



Savoir & Comprendre

Colloque Amyotrophies Spinales:

Ensemble, franchissons une nouvelle frontière

Mai 2003

Evry (France)

COMPTE RENDU FLASH

CE DOCUMENT EST LE REFLET
DES INTERVENTIONS
QUI ONT EU LIEU LORS DU
« COLLOQUE AMYOTROPHIES SPINALES :
ENSEMBLE, FRANCHISSONS UNE NOUVELLE FRONTIÈRE »
QUI S'EST TENU LES 16 & 17 MAI 2003
AU GÉNOCENTRE (EVRY).
IL NÉCESSITE D'ÊTRE RÉACTUALISÉ EN FONCTION
DE L'ÉVOLUTION DES CONNAISSANCES.

Amyotrophies spinales : du diagnostic aux thérapeutiques

Au cours du Colloque organisé par l'AFM « Amyotrophies spinales : Ensemble, franchissons une Nouvelle frontière », une trentaine d'experts internationaux, médecins et chercheurs, ont présenté leurs travaux, fait le point sur les connaissances acquises et évoqué les perspectives d'avenir.

Les amyotrophies spinales proximales liées aux mutations du gène *SMN* sont caractérisées par une hétérogénéité clinique. Elles sont classées en quatre types selon l'âge de début des signes. Leur diagnostic est basé sur l'existence d'un déficit moteur globalement symétrique, l'absence de déficit sensitif, la dénervation sans démyélinisation (observée à l'EMG et/ou à la biopsie du muscle), le mode de transmission autosomique récessif et la présence d'une délétion homozygote du gène *SMN* dans 95% des cas.

La quantification du nombre de copies des gènes *SMN1* et *SMN2* permet d'établir une corrélation phénotype/génotype.

Quant au conseil génétique, ce n'est que depuis deux ans que le dépistage des hétérozygotes pour la délétion de *SMN1* peut être proposé aux apparentés

d'une personne malade. Le diagnostic préimplantatoire, malgré les difficultés pratiques de réalisation, est proposé dans certaines conditions précises aux couples ayant un projet parental.

La prise en charge des patients doit être précoce car la maladie peut s'accompagner rapidement de problèmes respiratoires et orthopédiques. Elle nécessite une équipe pluridisciplinaire capable de s'occuper aussi bien des enfants que des adultes et c'est le but des consultations hospitalières. L'implication de la famille est importante pour assurer la qualité des soins et la scolarité pour laquelle se posent des difficultés d'insertion compte tenu de l'importance des incapacités motrices.

Pistes thérapeutiques

Sur le plan des approches thérapeutiques, les inhibiteurs des désacétylases (phénylbutyrate, acide valproïque) ont donné *in vitro* des résultats encourageants sur l'augmentation du taux de SMN. Les premiers travaux de thérapie cellulaire (cellules satellites, cellules souches) dans les amyotrophies spinales ont été présentés. Les voies en thérapie génique commencent à être explorées. Des travaux expérimentaux ont montré que des facteurs neurotrophiques (apportés par des vecteurs viraux ou plasmidiques) ont permis une prolongation du temps de survie dans certains modèles de la maladie chez la souris.

Des valeurs de référence, pour l'évaluation de futurs essais thérapeutiques, ont été définies grâce au suivi pendant deux ans de patients bénéficiant d'une prise en charge.

Diagnostic moléculaire

Statut des apparentés

Le mode de transmission des amyotrophies spinales proximales liées au gène *SMN* est autosomique récessif. Le diagnostic moléculaire est basé sur la détection de la délétion homozygote de l'exon 7 dans 95% des cas. Il est réalisé en France dans quatre laboratoires (hôpitaux Robert Debré et Necker-Enfants malades à Paris, CHU de Rouen et de Nice) à partir d'un prélèvement de sang sur anticoagulant réalisé au décours d'une consultation de génétique. L'absence de délétion homozygote de *SMN* peut être le fait soit d'une mutation différente de *SMN* soit d'un diagnostic erroné.

L'étude simultanée des parents d'un cas index (qui par définition présente une délétion homozygote du gène *SMN1*) est à faire systématiquement pour vérifier l'existence d'une délétion hétérozygote *SMN1* et réduire le nombre de diagnostic prénatal pour les couples présentant un risque faible. En effet, afin d'assurer un conseil génétique fiable, il convient d'éliminer une délétion *de novo* dont le risque de récurrence d'avoir

un enfant atteint est extrêmement faible, et une duplication en *cis* du gène *SMN1* masquant une délétion sur le second allèle, avec risque de récurrence 1/4 en cas d'une nouvelle grossesse. Seule une étude de la fratrie et des grands-parents permet de faire la distinction « *cis/trans* » car toutes les méthodes de génétique moléculaire permettent une quantification des copies des gènes *SMN1* et *SMN2* sans pouvoir préciser la situation en *cis* ou en *trans* de ces copies. La caractérisation de la délétion hétérozygote chez les parents permet aussi de faire une confirmation indirecte du diagnostic chez un cas index décédé n'ayant pas eu de diagnostic génétique.

Le conseil génétique des apparentés commence par l'évaluation du risque *a priori* d'avoir un enfant atteint. Ce risque est calculé à partir de l'incidence des amyotrophies spinales dans la population générale (1/6000 naissances) et du degré de parenté avec le sujet atteint. Au-delà d'un risque *a priori* supérieur ou égal à 1/1280, une étude moléculaire peut être proposée.

Phénotype : SMN2 prend sa place

Le gène *SMN1* possède une copie en position centromérique appelée *SMN2*. Le comptage du nombre de copies du gène *SMN2* a un rôle important dans la détermination de la corrélation génotype-phénotype. Dans une étude portant sur 365 patients, 73% des patients ayant un génotype à 2 copies *SMN2* présentaient un phénotype d'amyotrophie spinale de type I; 45,5% de ceux ayant un génotype à 4 copies *SMN2* avaient un phénotype de type III tandis que 82% de ceux avec génotype à 3 copies *SMN2* avaient un phénotype de type II. L'existence d'une corrélation génotype-phénotype est évidente mais la corrélation stricte est seulement applicable aux phénotypes extrêmes : 1 copie de *SMN2* correspond à un phénotype d'amyotrophie spinale de type I, 4 copies de *SMN2* à un phénotype de types III/IV. Un même nombre de copies de *SMN2* est retrouvé dans des phénotypes différents. Il est à noter que les différentes méthodes de quantification du nombre de copies du gène *SMN2* ne présentent pas la même sensibilité.

Diagnostic préimplantatoire

Le diagnostic préimplantatoire (DPI) est proposé aux femmes ayant dans leurs antécédents un ou plusieurs enfants atteints d'amyotrophie spinale et ayant subi des interruptions de grossesse répétées suite à une détection d'embryon atteint lors du diagnostic prénatal (DPN). Pour les couples porteurs de l'anomalie génétique de la maladie, le DPI permet d'avoir un enfant non atteint et d'éviter le traumatisme physique et psychique supplémentaire d'un avortement thérapeutique. Il consiste en l'analyse d'un ou de deux blastomères prélevés sur l'embryon au troisième jour après fécondation *in vitro*. Seuls les embryons sains ou porteurs sains

seront replacés dans l'utérus de la mère à J4. Par rapport au DPN, la réalisation d'un DPI présente davantage de difficultés. L'extraction d'ADN se fait à partir de 1 à 2 cellules par embryon alors qu'elle est réalisée sur 10 millions de cellules dans le DPN. En cas d'absence de noyau, de noyau en dégénérescence ou de mauvaise morphologie, le DPI devient impossible. Il est erroné en présence d'embryon mosaïque. Des risques de contamination peuvent survenir: cellules de la mère, cellules du manipulateur, spermatozoïde, fragment d'ADN. Le rendu des résultats se fait en 24 heures afin de permettre un transfert à J4 alors qu'il est d'une semaine dans le DPN.

Du gène à la protéine

Variété d'actions de SMN

Il y a 8 ans, en 1995, *SMN* a été identifié comme le gène responsable des amyotrophies spinales proximales liées au chromosome 5. Aujourd'hui, le rôle de la protéine SMN dans l'assemblage de nombreux complexes ribonucléoprotéiques (RNPs) associés au transport des ARNs, dans l'épissage des pré-ARNm, la biogénése des ARNr et la transcription est mieux connu. Les travaux actuels analysent aussi sa fonction en dehors des motoneurones. La protéine SMN est localisée, dans toutes les cellules, à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans le noyau, elle se concentre dans les corps de Cajal. Ces

corps sont jumelés d'où leur nom « gems » (pour *gemin*) contenant des protéines appelées *gemin* 2 à 7. SMN fait partie d'un complexe macromoléculaire intervenant dans l'épissage du pré-ARNm et l'assemblage des petites ribonucléoprotéines nucléaires du spliceosome (snRNPs). Le spliceosome réalise l'épissage des ARN messagers dans le noyau de la cellule.

La construction d'un modèle cellulaire a permis de mieux comprendre les interactions de la protéine SMN. Il existe un lien fonctionnel entre la protéine SMN et Nopp 140, une protéine localisée dans les nucléoles et les corps de Cajal.

La protéine SMN est transportée activement, du noyau vers le cytoplasme puis le long de l'axone jusqu'aux dendrites à une vitesse correspondant au transport axonal rapide. Ce mécanisme de transport comporte des interactions très complexes avec d'autres protéines. Des délétions de l'exon 7 du gène *SMN1* entraînent l'accumulation anormale de la protéine SMN mutée dans le noyau et son absence dans les prolongements axonaux.

Perspectives thérapeutiques

Molécules : regain d'intérêt

La technologie automatisée très sensible du *screening* pharmacologique à haut débit a permis de cribler des centaines de milliers de molécules très rapidement pour trouver des molécules potentiellement intéressantes. Le *screening* à haut débit se compose de deux étapes essentielles : le *screening* primaire révélant les « *hits* » et l'étape de validation des « *hits* » révélant les têtes de série (ou « *leads* »). Chaque tête de série, après une suite d'optimisations structurales, conduit au candidat requis, tant au point de vue toxicologique que pharmacologique pour entrer en développement clinique. « Quelques » molécules pouvant être actives *in vivo* grâce à un modèle de culture de motoneurones et une plate-forme de criblage à haut débit ont été identifiées.

D'autres molécules candidates (ayant déjà obtenu l'AMM dans d'autres indications que l'amyotrophie spinale) auraient déjà été identifiées par une autre technique. Une très grande discrétion a été adoptée en attendant leur caractérisation.

Des stratégies expérimentales visant à corriger les effets de la protéine SMN mutée ont permis d'identifier et de tester des molécules candidates sur cultures cellulaires. Des inhibiteurs des désacétylases, inhibitrices de la transcription, (phénylbutyrate, acide valproïque, apicidine, etc.) sont à l'étude.

Le phénylbutyrate est un acide gras aromatique qui a été étudié dans les cultures de fibroblastes de 16 personnes atteintes d'amyotrophies spinales. Dans toutes les cultures cellulaires, à l'exception d'une seule, le phénylbutyrate a entraîné une augmentation de l'expression de SMN2 pleine longueur. Des résultats encourageants sur l'augmentation de l'expression du

gène *SMN2* ont été trouvés dans une étude pilote (Italie) : six patients atteints d'amyotrophie spinale de types II et III ont reçu du phénylbutyrate (500 mg/kg/jour) pendant 7 jours. Un essai en double aveugle incluant 80 patients de type II ou III avec évaluation de la force musculaire est envisagé. La durée de traitement prévue est de 3 mois.

L'acide valproïque est un inhibiteur des histones-désacétylases. Les histones sont des protéines autour desquelles est enroulé le filament d'ADN. Leur acétylation permet la transcription de l'ADN. L'acide valproïque appliqué sur des cultures de fibroblastes provenant de patients de type I favorise l'épissage correct du gène *SMN2* et active le promoteur SMN. Les lignées cellulaires traitées par l'acide valproïque, à la concentration de 10 millimoles, expriment la protéine SMN2 (contenant l'exon 7) à un taux normal. Les cellules expriment aussi dans leur noyau des gems en plus grand nombre. La concentration efficace de l'acide valproïque *in vivo* doit être déterminée avant d'envisager tout essai thérapeutique.

Gabapentine en Italie

La gabapentine ayant montré un effet neuroprotecteur chez des modèles animaux de maladies du motoneurone, un essai clinique multicentrique en ouvert incluant 120 patients atteints d'amyotrophies spinales de type II ou III a été réalisé en Italie : 61 patients recevant de la gabapentine contre 59 n'en recevant pas. Les résultats ont montré une amélioration significative des forces de flexion et d'extension du genou et de flexion plantaire à 6 mois, plus nette à 12 mois, et une amélioration à peine significative des forces de flexion du coude, de préhension et de pince pouce-index-majeur à 12 mois. Le traitement n'a pas eu d'effet sur la capacité vitale ni sur les tests fonctionnels chronométrés. Ces résultats doivent être confirmés par une étude en double aveugle.

Modèles animaux et cellulaires

Grâce à des développements technologiques récents, des modèles originaux de souris transgéniques développant des symptômes moteurs similaires à ceux observés dans l'amyotrophie spinale humaine ont été mis au point. Ces techniques permettent d'induire une mutation génétique non seulement dans un tissu donné (motoneurones, cellules musculaires), mais aussi à un moment donné du développement des cellules (cellules souches, cellules différenciées). Les modèles obtenus fournissent de précieuses informations sur la physiopathologie de la maladie et offrent un outil de choix pour évaluer des stratégies de traitement ou pour sélectionner des molécules d'intérêt thérapeutique.

Un poisson modèle muté, « le poisson zèbre » a été élaboré. Ce dernier a permis de montrer que des niveaux élevés de protéine SMN sont essentiels à un développement correct de l'axone des motoneurones (orientation vers le muscle à innover et longueur suffisante de l'axone). Par ailleurs, le « poisson zèbre » permet de faire le *screening* rapide *in vivo* de diverses molécules à visée thérapeutique.

Des cultures cellulaires ont été générées à partir de modèles murins transgéniques pour sélectionner des bio-marqueurs et des voies d'accès thérapeutiques chez l'homme. Des cultures de motoneurones purifiés permettent de découvrir des facteurs neurotrophiques actifs favorisant la survie du motoneurone *in vitro* grâce à une plate-forme de criblage à haut débit.

Cellules satellites : une voie à considérer

La délétion de l'exon 7 est la mutation la plus fréquente trouvée dans les amyotrophies spinales. Certaines souris transgéniques portent une délétion de l'exon 7 du gène *SMN* dans les cellules satellites et la fibre musculaire (myotubes fusionnés), d'autres uniquement dans la fibre musculaire. Lorsque les cellules satellites portent aussi la mutation, les souris mutées développent une myopathie sévère, avec paralysie motrice progressive et mort précoce à 1 mois d'âge (mutant sévère). Chez ces mutants sévères, il existe une faible régénération musculaire et une réduction significative du nombre de cellules satellites. Par contre, lorsque les cellules satellites ne sont pas délétées, les souris mutantes développent un processus myopathique avec un phénotype moins grave (survie médiane de 8 mois et performances motrices analogues à celles des souches sauvages). Ainsi des cellules satellites intactes permettent d'améliorer de façon importante la survie et les performances motrices des souris mutées (délétion de

l'exon 7), malgré l'existence d'un grave processus myopathique. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'utiliser des cellules satellites comme stratégie thérapeutique efficace dans les myopathies.

Cellules souches : un potentiel à confirmer

Des expériences avec les cellules souches pluripotentes humaines ont été réalisées chez des rats porteurs de lésions du motoneurone. Après injection de cellules souches dans le liquide céphalo-rachidien, celles-ci se sont bien réparties sur la longueur rostro-caudale de la moelle épinière et ont migré dans le parenchyme de la moelle épinière chez les animaux paralysés. Les rats paralysés ayant reçu la greffe de cellules souches ont partiellement retrouvé leurs fonctions motrices après la greffe.

Des cellules souches embryonnaires exposées à de l'acide rétinolique et à des agonistes de Sonic hedgehog, une protéine de signalisation, ont acquis les propriétés

immunohistochimiques et fonctionnelles des motoneurons : formation de jonctions neuromusculaires et axones se prolongeant vers le muscle en co-culture. Toutefois, les axones ne parviennent pas à traverser la substance blanche de la moelle épinière. Des recherches complémentaires sont en cours.

Génothérapie : des techniques novatrices

Après injection d'un lentivirus modifié comportant le gène *SMN* (SMN-EIAV) dans le muscle d'un modèle murin d'amyotrophie spinale de type III, l'expression de la protéine SMN dans les motoneurons a été observée au moins pendant 3 mois. Ce virus modifié est obtenu à partir du pseudotypage du vecteur EIAV «*equine infectious anaemia virus*» à l'aide de la glycoprotéine du virus de la rage atténué. D'autre part, le transfert de gène *SMN* par l'intermédiaire de EIAV chez un modèle murin d'amyotrophie spinale de type I, *in utero* et chez la souris nouveau-née, prolonge le temps de survie de ces souris grâce à une large expression du transgène.

Ces résultats montrent que les approches de thérapie génique utilisant les vecteurs en injections intramusculaires pourraient représenter une stratégie prometteuse pour l'administration de gènes dans les motoneurons. En effet, des vecteurs lentiviraux EIAV peuvent médier un transfert de gènes durable dans le système nerveux central avec une expression efficace et une toxicité minimale.

Chez des souris modèles de l'amyotrophie spinale, l'électroporation combinée à l'injection intramusculaire de plasmide codant la cardiotrophine-1 (CT-1) améliore la probabilité de survie, retarde la déficience motrice et exerce un effet protecteur limitant la perte axonale des motoneurons proximaux. CT-1 est un facteur de protection du motoneuron appartenant à la famille des cytokines IL-6 (interleukine-6). L'électroporation est une méthode basée sur l'application d'impulsions électriques contrôlées. Pratiquée à plusieurs reprises, elle permet d'augmenter les effets neuroprotecteurs des facteurs neurotrophiques produits.

Essais cliniques : critères d'évaluation

Pour la première fois, une étude multicentrique nationale a permis de décrire l'évolution de l'amyotrophie spinale chez les patients bénéficiant d'une prise en charge respiratoire et orthopédique. L'objectif était de définir des critères précis cliniques et paracliniques pour l'évaluation de l'efficacité d'éventuelles thérapeutiques.

Les 203 patients (110 de sexe masculin et 93 de sexe féminin) inclus ont été examinés dans les différents centres du réseau au cours des années 1997 et 1998 (même si le diagnostic était antérieur). Le diagnostic d'amyotrophie spinale a été confirmé par biologie moléculaire. Parmi les patients recrutés, il y avait 15 de type I, 37 de type Ibis, 117 de type II et 34 de type III. Pour chaque patient, un médecin d'un même centre a rempli deux questionnaires standardisés, l'un lors de l'inclusion et l'autre deux ans plus tard. Cent soixante et onze patients ont pu être suivis pendant deux ans (22 étant décédés avant la fin de cette période).

Au terme de cette étude, des critères d'évaluation peuvent être proposés. L'indice d'examen moteur pourrait être le critère principal dans les protocoles des essais concernant les types Ibis, II et III, les autres indices (indices de fonctions motrices, d'examen moteur, d'activités, de paralysies respiratoires et de capacité vitale forcée) étant des critères complémentaires. Pour les types I, le critère d'efficacité ne pourrait être que le temps de survie.



Association Française contre les Myopathies

Association reconnue d'utilité publique

1, rue de l'Internationale - BF 59
91002 Evry cedex
Téléphone : 01 69 47 28 28
Télécopie : 01 60 77 12 16
www.afm-france.org

Siège social : AFM - Institut de Myologie
47-83, boulevard de l'Hôpital
75651 Paris cedex 13

POUR EN SAVOIR PLUS...

Collection Savoir & Comprendre

... Fiches Techniques

... Monographies

... Bulletin Myoline

www.afm-france.org