



3. SESSION 3

48 ➤ Déficit énergétique et maladies à triplets

53 ➤ La recherche clinique (BIOSCA...)

59 ➤ Stratégie antisens dans les ataxies :
exemple de SCA7

67 ➤ Modèles drosophiles pour avancer dans la
compréhension des mécanismes dans les maladies
à triplets (formes dominantes et ataxie de Friedreich)

74 ➤ Mitochondries et thérapeutique
dans la maladie de Friedreich

■ Alexandra DURR

Pour ouvrir cette session, Fanny Mochel nous présentera l'étude BIOSCA et précisera les raisons pour lesquelles la recherche s'intéresse au déficit énergétique dans les ataxies en général et dans les formes à expansion de polyglutamine en particulier. Fanny Mochel est métabolicienne et généticienne à la Salpêtrière, et maître de conférences universitaire.

➤ Déficit énergétique et maladies à triplets



Fanny MOCHEL
Généticienne
à l'Institut du Cerveau
et de la Moelle épinière,
Pitié-Salpêtrière

Bonjour à tous. Je suis très heureuse d'être présente parmi vous cet après-midi. J'essaierai d'apporter des explications aussi simples que possible, mais n'hésitez pas à me poser des questions. En effet, les concepts métaboliques que manie la recherche sont très complexes, y compris parfois pour les médecins !

Ainsi que l'a précisé Alexandra Durr, je travaille principalement sur des maladies métaboliques, c'est-à-dire sur le fonctionnement cellulaire et notamment la production d'énergie au sein des cellules.

Mon expérience a commencé avec la maladie de Huntington, qui n'a rien à voir avec l'ataxie, mais dont les mutations en cause (l'expansion de polyglutamine, ou répétition anormale de triplets CAG) sont très proches de ceux des maladies spinocérébelleuses à transmission dominante.

1. QUELLES SONT LES CARACTÉRISTIQUES DE LA MALADIE DE HUNTINGTON ?

Cette maladie à expansion de triplets anormale dans le gène *HTT* touche environ 5 000 personnes en France et 40 000 en Europe. Elle se caractérise principalement par des symptômes moteurs dits de Chorée et des troubles psychiatriques et cognitifs.

A l'instar des ataxies spinocérébelleuses, il est possible d'effectuer un diagnostic présymptomatique. Cela signifie que les personnes qui sont à risque dans les familles peuvent demander à connaître leur statut. Ce point est très important, puisque nous espérons pouvoir comprendre ce qui se passe au plus précoce de la maladie en étudiant son mécanisme avant le développement des symptômes.

Dans le cadre de nos travaux sur les maladies métaboliques, nous avons été rapidement interpellés par un symptôme non neurologique : la perte de poids, y compris chez des patients qui sont en tout début de maladie et qui mangent normalement voire plus que des individus non malades. Symptôme qui se retrouve aussi dans les maladies spinocérébelleuses à transmission dominante.

2. QUELLE EST L'ORIGINE DE LA PERTE DE POIDS DANS LA MALADIE DE HUNTINGTON ?

Nous avons confirmé voilà plus de six ans qu'une perte de poids s'observait alors même que les patients mangeaient davantage que les autres. Nous avons donc essayé de comprendre de façon très standardisée les causes de cet hypercatabolisme (augmentation de la dépense d'énergie).

La plus grande précision est de mise dans les études, d'autant que ce mécanisme de perte de poids est très long, d'environ un kilo par an. C'est la raison pour laquelle nous demandons à nos patients participant aux études d'être à jeun, afin que les analyses ne soient pas perturbées par le facteur alimentation. Ces analyses métabolomiques visent à étudier de très nombreux métabolites (petites molécules). Plusieurs méthodes peuvent être utilisées, comme la spectroscopie RMN (résonance magnétique) d'échantillons de plasma sanguin ou d'urine. Cette méthode permet de détecter des composés comme le lactate ou l'alanine, sans avoir à cibler l'analyse. Cette vision large du métabolisme est très utile dans la mesure où nous n'avons pas d'hypothèse sur la cause de la perte de poids.

Nous avons comparé le profil plasmatique global (à partir d'une prise de sang à jeun) d'individus à différents stades de la maladie, afin de rechercher d'éventuels éléments de distinction. Il est alors apparu que deux groupes de patients pouvaient être distingués : le groupe des « early » (en début de maladie) et celui des « présymptomatiques » (avant l'apparition des symptômes).

« ...nous avons été rapidement interpellés par un symptôme non neurologique : la perte de poids... »

Fanny Mochel

Nous avons ensuite compris que cette distinction était liée à la présence de trois métabolites situés au tout début du spectre RMN. Il s'agit d'acides aminés ramifiés (composants des protéines) : la valine, la leucine et l'isoleucine.

Ces trois acides aminés peuvent nourrir un cycle essentiel à la vie, appelé cycle de Krebs, qui est situé au cœur de la mitochondrie (usine énergétique de la cellule) et qui produit en permanence l'ATP, molécule énergétique par excellence. Or il apparaît que lorsqu'ils sont dégradés, ils fournissent des intermédiaires (substrats énergétiques) pour ce cycle de Krebs. Or ces métabolites sont abaissés en quantité significative et nous avons alors cherché à savoir si cette baisse était liée à une solution compensatoire que l'organisme mettait en place pour trouver de l'énergie en dégradant plus parce que la cellule a davantage besoin d'énergie en raison de la maladie.

3. DES MÉCANISMES COMPENSATEURS PEUVENT-ILS ÊTRE ACTIVÉS ?

Nous connaissions une molécule, avec laquelle j'avais déjà travaillé sur des maladies métaboliques très particulières : la triheptanoïne. Il s'agit d'une huile (triglycéride) qui peut entrer à deux niveaux dans le cycle de Krebs, par l'AcetylCoA et par le Succinyl-CoA.

Il a déjà été prouvé dans d'autres maladies que cette entrée à deux niveaux dans le cycle de Krebs, que nous appelons l'anaplérose, augmente la production d'énergie par le cycle de Krebs. Nous avons alors testé l'hypothèse qu'en apportant ce composé, nous aiderions les mécanismes de compensation déjà en place chez les patients (mais insuffisants) en fournissant ainsi plus d'énergie.

4. QUELS SONT LES RÉSULTATS DE L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE PAR SPECTROSCOPIE RMN PHOSPHORE ?

La résonance magnétique permet d'analyser la structure du cerveau, ainsi que sa composition en métabolites (petites molécules) comme le phosphore, l'ATP ou encore la phosphocréatine. Cette technique s'avère donc très intéressante pour étudier les mécanismes énergétiques. Nous avons cherché à l'appliquer à plusieurs tissus. Et plutôt que de travailler sur des prélèvements, nous avons choisi de revenir au patient en procédant à des mesures non invasives de son métabolisme énergétique.

• Spectroscopie RMN au phosphore dans le muscle

Nous avons utilisé la spectroscopie RMN pour mesurer les concentrations en ATP et en phosphocréatine du muscle, en collaboration avec l'Institut de myologie. Nous savons qu'au repos, les mesures comparatives ne montrent pas de réelle différence entre un patient souffrant d'une maladie neurodégénérative et un contrôle. En revanche, en cas d'effort nécessitant de l'énergie supplémentaire, nous risquons de pouvoir démasquer un déficit s'il existe. Aussi avons-nous demandé à six patients d'effectuer une flexion plantaire durant un certain temps. Nous avons mesuré la production d'énergie avant, pendant et après l'effort. Les résultats sont un peu complexes mais révèlent globalement des profils anormaux.

Il est apparu que chez deux patients sur six, un effort peu important entraînait une baisse du pH (niveau d'acidité) anormale. Ces résultats confirment ceux d'une étude italienne. Ils signifient qu'à un moment donné du fonctionnement mitochondrial, quelque chose de la demande énergétique n'est pas assuré. S'ajoute à cela un temps de rephosphorylation (modification chimique) de la créatine anormal chez ces deux mêmes patients. Nous leur avons prescrit l'huile dont je vous parlais durant une semaine. Et au terme de ce temps assez court, nous avons observé une normalisation de ces deux paramètres.

Même si l'étude porte sur un très petit nombre de patients, nous pouvons affirmer après discussion avec les myologues que cette normalisation n'est en rien le fruit du hasard, mais du rééquilibrage de la production énergétique. Ces résultats nous ont vivement encouragés, même si nous sommes restés très prudents quant à leur signification.

• Spectroscopie RMN au phosphore cérébrale dynamique

De la même façon que dans le muscle, les mesures comparatives au repos dans le cerveau ne montrent pas de réelle différence entre un patient souffrant d'une maladie neurodégénérative et un contrôle. Après des échanges avec nos collègues d'Italie, nous avons donc mis en place – initialement à l'Institut de myologie et aujourd'hui au CENIR – un dispositif permettant de stimuler le cortex occipital (partie postérieure du cerveau où se trouvent les aires de la vision), par l'envoi d'un flash. Ce flash visuel, sous forme de damier, est projeté à une certaine fréquence au-dessus des patients allongés dans une IRM.

Une sonde de détection va nous permettre de quantifier les métabolites qui nous intéressent (ATP et phosphocréatine) dans la zone stimulée. On obtient des spectres que l'on peut ensuite analyser. Je précise que nous avons bénéficié de l'aide de collègues situés aux Etats-Unis pour cette démarche.

« ...quelque chose de la demande énergétique n'est pas assuré. »

Fanny Mochel

Chez les témoins, le rapport entre le phosphate inorganique (Pi) et la phosphocréatine (PCr) augmente pendant la phase d'effort. Chez les patients Huntington, le profil est complètement différent, avec un ratio qui diminue d'emblée ou qui monte et ne redescend pas – sans que l'on sache encore complètement expliquer pourquoi. Les mêmes résultats ayant été obtenus avec deux méthodes indépendantes, nous sommes assez confiants quant à leur fiabilité.

5. QUELLES SONT LES CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ?

Ces études nous ont permis de confirmer qu'il existe un déficit énergétique dans les maladies neurodégénératives, et que ce déficit entraîne une perte de poids.

Sans doute faut-il apporter plus d'énergie dans le cycle de Krebs – grâce notamment à une molécule connue dans d'autres maladies. Un essai effectué dans le muscle chez un très petit nombre de patients s'est d'ailleurs avéré encourageant dans la mesure où il montre qu'il est possible de rétablir un profil anormal au moment de l'activation musculaire.

Qui plus est, nous disposons possiblement d'un marqueur du déficit énergétique au niveau cérébral, en tout cas dans la maladie de Huntington. Si vous n'avez pas de questions pour le moment, je propose de vous présenter une autre étude en cours, l'étude BIOSCA, qui résume plusieurs des grands principes que je viens de vous exposer.

➤ La recherche clinique (BIOSCA...)

L'étude BIOSCA est coordonnée par Alexandra Dürr.

1. QUELS SONT LES OBJECTIFS DE LA RECHERCHE ?

Son principal objectif vise à rechercher le même biomarqueur que celui que nous avons trouvé dans la maladie de Huntington, à la fois à partir d'approches métabolomiques (recherche de métabolites sur des prélèvements périphériques plasmatiques standardisés) et d'études de spectroscopie, notamment du phosphore (étude du spectre de réponse énergétique dans le cerveau). Il s'agit donc de répondre à la question de l'existence d'indicateurs de déficit énergétique dans les ataxies spinocérébelleuses et, le cas échéant, s'ils peuvent constituer une cible sur le plan thérapeutique – avec notamment l'utilisation de la triheptanoïne. Mais il s'agit également de savoir si ces marqueurs pourraient servir pour d'autres essais thérapeutiques.

2. QUEL EST LE PLAN EXPÉRIMENTAL ?

L'étude BIOSCA n'est pas thérapeutique, mais observationnelle. Les patients sont reçus sur notre site, ici à l'ICM. Dans la mesure où il existe différents types de mutations, même si les symptômes peuvent être assez proches, nous avons constitué quatre groupes de patients (SCA1, SCA2, SCA3 et SCA7 – qui sont les SCA les plus fréquents), ainsi qu'un groupe de témoins pour permettre les comparaisons.



Fanny MOCHEL
Généticienne
à l'Institut du Cerveau
et de la Moelle épinière,
Pitié-Salpêtrière

Nous avons prévu un total de 120 participants (80 patients et 40 témoins). Pour l'heure, nous en avons inclus environ la moitié.

La durée de l'étude est de deux ans par personne.

3. QUELS SONT LES CRITÈRES D'INCLUSION ET LE DÉROULÉ DES VISITES ?

Les critères sont standards. Le participant doit être majeur et habilité à passer une IRM cérébrale.

Lors de la visite, le patient doit être à jeun depuis 12 heures. Nous commençons par étudier sa composition corporelle, en évaluant l'existence d'un déficit au niveau du corps entier grâce à la calorimétrie. Nous opérons ensuite un prélèvement sanguin à jeun, qui permettra les analyses métaboliques que j'ai présentées tout à l'heure. Le participant peut alors prendre un petit-déjeuner. Nous enchaînons enfin sur l'imagerie cérébrale, pour quantifier les métabolites dans le cerveau grâce à la spectroscopie. Ces différentes étapes s'étalent sur une matinée et s'accompagnent de tests cliniques standards.

4. QUELLES SONT LES ÉTUDES UTILISÉES ?

Les études suivent le principe de comparaison du profil plasmatique de patients et de témoins à partir de la spectroscopie RMN. Une autre méthode, plus sensible, permet également de détecter des métabolites en plus petite quantité. Il s'agit de la spectrométrie de masse. Nous combinons donc la spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse afin d'identifier une éventuelle distinction entre les patients et les témoins, mais également entre les patients des différents groupes génétiques. Le protocole est le même que celui qui est suivi dans le Huntington, et qui nécessite que les patients participent un minimum puisqu'il leur est demandé d'ouvrir et de fermer les yeux.

Nous opérons également de la spectroscopie standard afin de mesurer dans le cervelet la concentration des métabolites connus depuis longtemps, comme le N-acétylaspartate. Nous n'avons pas réellement d'hypothèse physiopathologique, mais nous cherchons à savoir si ces marqueurs peuvent être utilisés. Je précise qu'il s'agit d'examen non invasifs.

5. QUELLES SONT LES PERSPECTIVES ?

Identifier des marqueurs de la maladie pourrait nous servir à mieux suivre la progression de celle-ci, mais peut-être aussi nous donner des cibles thérapeutiques nouvelles ou confirmées.

Les acteurs qui participent à l'étude BIOSCA sont très nombreux. Il s'agit notamment d'assistants de recherche clinique, notamment Céline Jauffret, Sandra Benaich, Daisy Rinaldi avec qui vous êtes régulièrement en contact pendant l'étude. Par ailleurs, pour ce qui est de l'imagerie, les examens sont effectués au CENIR, à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière. Mais nous travaillons également avec les laboratoires et des diététiciens. Enfin, nous avons plus récemment pris contact avec l'association CSC pour faire connaître l'étude. C'est d'autant plus important que nous n'avons pas encore recruté la totalité du nombre souhaité et indispensable de participants.

Échange avec la salle

■ Alexandra DURR

Avez-vous des questions ? Pour citer mon cas personnel, je suis susceptible d'être atteinte d'une ataxie autosomique dominante (SCA3) mais je n'ai pas encore passé de test génétique. Or j'ai entendu dire qu'il fallait que vous connaissiez avec certitude le statut génétique des personnes qui ne présentent pas encore de symptôme pour pouvoir les inclure à l'étude BIOSCA. Est-ce à dire qu'il faut que je passe par les « fourches caudines » du Conseil génétique si j'entends participer à cette étude ?

■ Alexandra DURR

N'y participez pas, d'autres le feront pour vous. Ne pas participer à l'étude n'est pas grave. Il ne faut surtout pas se forcer à passer un test génétique si l'on n'en a pas envie. Mieux vaut alors ne pas participer à une étude.

☒ Identifier des marqueurs de la maladie pourrait nous servir à mieux suivre la progression de celle-ci... ☒

Fanny Mochel

■ Fanny MOCHEL

Nous encourageons évidemment les gens à participer à notre étude. Cela étant, et heureusement, d'autres personnes peuvent y participer, pour lesquelles les implications ne seront pas les mêmes que pour vous. Au stade où nous en sommes, qui est un stade opérationnel, vous ne devez pas motiver votre décision de passer un test génétique par la participation à l'étude. L'étude sera conduite de toute façon et vous en connaîtrez les résultats.

■ Pierre RUSTIN

Si l'étude n'est pas conclusive, que faire ? Cela n'exclut pas qu'il y ait un problème mitochondrial. Maintient-on l'idée que les problèmes énergétiques sont éventuellement importants, mais que la technique ne permet pas d'y répondre ? C'est d'ailleurs une partie du problème des maladies mitochondriales. La manipulation de l'oxygène et toutes les activités mitochondriales qui peuvent être affectées quand la mitochondrie ne fonctionne pas, permettent – ou non – de fermer une porte, mais il est très rare de pouvoir conclure « noir » ou « blanc ». Les études *in vivo* sont certes absolument requises et centrales mais souvent, les réponses qu'elles apportent restent marquées d'un grand point d'interrogation. On joue avec de toutes petites variations, dont nous avons parfois du mal à imaginer qu'elles aient des conséquences pathologiques, en particulier quand on les compare avec des malades qui souffrent de maladies mitochondriales primaires et importantes.

■ Fanny MOCHEL

C'est bien la raison pour laquelle je n'ai pas indiqué que nous allions ou pas trouver la preuve d'un problème énergétique et que nous élaborerons ou pas un traitement. J'ai évoqué toutes les questions qui nous ont conduits à envisager cette étude, mais ces questions sont peut-être indépendantes. Nous avons tout à fait conscience de la limite de sensibilité. Nous savons très bien que nous pouvons ne rien mesurer d'anormal au cours des tests. Par ailleurs, même si elle est axée sur des marqueurs énergétiques, notamment en spectroscopie du phosphore, cette étude inclut de nombreuses autres recherches de biomarqueurs (via de multiples approches techniques, spectro en protons, imagerie, approches métabolomique ou transcriptomique).

Nous faisons certes le choix d'utiliser des outils ciblés au regard de la thématique de la perte de poids, mais nous espérons qu'au moins un des biomarqueurs dont nous disposerons pourra servir pour d'autres essais thérapeutiques que ceux qui ciblent le problème d'énergie.

■ Alexandra DURR

Même dans SCA7, dont nous savons qu'elle est une maladie mitochondriale (présentation multi-systémique, rétinite pigmentaire, surdité), nous n'avons jamais rien trouvé en mito. Peut-être trouverons-nous quelque chose en spectro ?

■ Pierre RUSTIN

La démarche est évidemment parfaitement justifiée. Sauf erreur de ma part, la mitochondrie concerne plus les Friedreich que les SCAs ? L'étude BIOSCA permettra certainement de mieux comprendre le phénomène de fatigue dans les SCAs, qui est très important et qui se produit de façon très aléatoire et à des stades bien précis de la journée.

■ Fanny MOCHEL

Le cycle de Krebs dont je vous ai parlé est dans la mitochondrie. De très nombreux dysfonctionnements sont possibles et il existe donc des centaines voire des milliers de maladies mitochondriales. Il existe des problèmes mitochondriaux dans le Friedreich, mais aussi dans la quasi-totalité des maladies neurodégénératives (dont les ataxies, mais pas uniquement). L'une des questions qui se posent est donc de savoir si ces problèmes sont vraiment importants au point qu'il faille les traiter, ou s'ils existent sans pour autant constituer une cible thérapeutique intéressante. C'est pour y répondre que nous conduisons le type d'étude que je viens de décrire.

Concernant la fatigue, nous avons tout à fait conscience que ce symptôme très fréquent est véritablement handicapant. Il se retrouve dans les ataxies, mais aussi dans de nombreuses autres maladies dégénératives. Implique-t-il directement la mitochondrie ? C'est une très bonne hypothèse, que nous allons essayer d'approfondir. Cela étant, les raisons de la fatigue sont multiples et multifactorielles. Il est donc très difficile de les isoler les unes des autres. Certaines fatigues ne sont en rien liées à une production énergétique.

⏪ Concernant la fatigue, nous avons tout à fait conscience que ce symptôme très fréquent est véritablement handicapant. ⏩

Fanny Mochel

Au terme de l'étude, nous ne pourrions certainement pas exclure ou non un problème énergétique, comme l'indiquait Pierre Rustin, mais nous pourrions notamment mieux comprendre la fatigue – sous les réserves que je viens d'expliquer. D'une part, la fatigue n'est pas liée qu'à la mitochondrie. D'autre part, l'étude BIOSCA n'étudie pas que la mitochondrie et ne permettra pas de tout étudier de la mitochondrie non plus.

■ Giovanni STEVANIN

Vous voyez que c'est une étude qui s'attelle à une problématique complexe comme toujours en sciences. On n'est jamais certain qu'une étude aboutira à un résultat, voire même au résultat que l'on attend. Mais comme le dit Pierre Rustin, la démarche se justifie et les résultats seront à interpréter avec toutes les précautions qui s'imposent.

Je vous remercie. Je propose de céder maintenant la parole à Sandro Alves, qui est post-doctorant. Il a déjà fait une thèse, au Portugal, sur l'ataxie de Machado-Joseph (SCA3). Il réfléchit actuellement à une stratégie de traitement sur l'ataxie SCA7 après avoir eu une démarche similaire sur l'ataxie SCA3.



➤ Stratégie antisens dans les ataxies : exemple de SCA7

Bonjour à tous. Je souhaite aujourd'hui vous parler d'une potentielle stratégie thérapeutique pour un certain type d'ataxie, par ARN antisens dans un modèle de souris – étant entendu que cette stratégie peut également s'appliquer à d'autres types d'ataxie.

1. QU'EST-CE QUE L'ATAXIE SPINOCÉRÉBELLEUSE DE TYPE 7 (SCA7) ?

L'ataxie spinocérébelleuse de type 7 est une maladie neurodégénérative qui se transmet de façon héréditaire. Elle est causée par une mutation qui est une expansion de trinuécléotides (CAG) dans la région codante du gène SCA7 qui conduit à une expansion à polyglutamine dans la protéine ataxine 7. Celle-ci s'accumule de façon anormale dans le cerveau humain. Elle ne s'accumule pas seulement dans les régions les plus affectées par la pathologie, comme le cervelet, mais également dans des régions moins affectées comme le cortex.

Cette accumulation d'ataxine 7 mutée est toxique et induit une très forte perte neuronale, surtout au niveau du cervelet et du tronc cérébral. Les patients perdent alors le contrôle des mouvements volontaires.

Malheureusement, il n'existe aujourd'hui aucun traitement pour cette maladie très sévère.



Sandro ALVES

Docteur en biologie,
Post-doctorant à l'Institut
du Cerveau et de la Moëlle
épinière, Pitié-Salpêtrière

2. COMMENT SE DÉROULE LA RECHERCHE ?

Pour comprendre ce qui se passe dans le cerveau humain en cas d'accumulation d'ataxine 7, des souris ont été génétiquement modifiées de façon à exprimer le gène qui contient la protéine ataxine 7 mutée. Dans un premier temps, ces souris nous aideront à étudier et à comprendre des mécanismes de dégénérescence. Puis, dans un second temps, nous utiliserons ces modèles pour suivre des approches thérapeutiques en vue de combattre la maladie.

Notre laboratoire utilise une technique qui permet de détecter l'expression de protéines directement sur les coupes du cerveau. En l'occurrence, nous avons recherché l'expression de la protéine ataxine 7.

Dans le cerveau des souris sauvages (saines), l'ataxine 7 a une expression dans le cytoplasme des cellules. En revanche, elle s'exprime plutôt au niveau du noyau des neurones dans le cerveau de souris atteintes de la maladie. Nous observons aussi, dans le cerveau des souris malades, des dépôts de protéines.

C'est précisément cette accumulation pathologique d'ataxine 7 mutée au cours du temps qui induit la maladie.

3. POURQUOI ET COMMENT RECHERCHER UNE STRATÉGIE ANTISENS ?

L'objectif de notre étude est de réduire le niveau d'ataxine 7 mutée dans le cerveau des souris porteuses de la maladie.

Plusieurs techniques ont été utilisées au cours des dernières années, dans différents modèles souris de maladie dégénérative. Notre étude vise, pour sa part, à mettre au point une stratégie alternative visant à appliquer des antisens spécifiques afin de bloquer de façon sélective les messagers qui codent pour la protéine ataxine 7.

Le processus régissant les principes de la vie est très simple : l'ADN (information génétique insérée à l'intérieur des chromosomes) est transcrit en ARN messager, qui est un négatif pour fabriquer les protéines. Lorsqu'une protéine est mutée, en l'occurrence l'ataxine 7, elle induit la maladie.

Pour leur part, les antisens sont des petites séquences d'ADN qui s'accrochent au messager qui fabrique la protéine. Ce dernier est alors

clivé et dégradé. Il ne peut plus produire la protéine qui induit la maladie. L'avantage des antisens par rapport aux traitements traditionnels est qu'ils agissent en amont, en stoppant l'expression du messager pour éviter la production de la protéine toxique.

Nous espérons donc qu'une stratégie antisens permettra d'empêcher la production d'ataxine mutée, de façon à ralentir l'évolution de la maladie.

• Validation de l'efficacité des antisens *in vitro*

Pour passer de la théorie à la pratique, nous avons établi une collaboration avec une société américaine leader dans le domaine qui nous a produit différentes séquences d'oligonucléotides antisens (ASOs) ciblant le messager qui code pour la protéine ataxine 7.

Nous avons introduit ces antisens dans des lignées cellulaires de souris avant de mesurer, 24 heures plus tard, la quantité du messager codant l'ataxine 7. Cela marche car, nous avons alors pu observer une réduction d'environ 90 % du messager codant l'ataxine 7, ainsi qu'une réduction significative du niveau de protéine fabriquée par le messager dans la cellule.

À ce stade, nous avons uniquement validé l'efficacité des antisens *in vitro*. Ce n'était pas le plus difficile ! Plus compliquée, en effet, est la validation *in vivo*.

• Validation de l'efficacité des antisens *in vivo*

Nous avons tenté de valider l'efficacité des ASOs en les injectant directement dans le cerveau d'une souris – qui est relativement similaire au cerveau humain.

Ainsi que je l'ai rappelé tout à l'heure, les régions les plus affectées dans l'ataxie SCA7 sont le cervelet et le tronc cérébral. Aussi avons-nous envisagé dans un premier temps une stratégie thérapeutique via injection stéréotaxique de l'antisens. Cette technique consiste à insérer une aiguille fine dans un petit trou effectué dans le crâne. Malheureusement, les antisens restent alors coincés au niveau du cervelet. Or la protéine mutée s'accumule dans la totalité du cerveau. Nous avons donc abandonné cette stratégie, pour en retenir une autre consistant à délivrer des solutions concentrées d'antisens dans le ventricule latéral, de façon à maximiser leur diffusion dans tout le cerveau et favoriser une diminution globale de l'ataxine 7. C'est en effet dans cette région qu'est produit le liquide céphalorachidien, qui passe ensuite dans le deuxième et le troisième ventricule pour irriguer tout le cerveau.

« L'avantage des antisens par rapport aux traitements traditionnels est qu'ils agissent en amont... »

Sandro Alves

Pour l'instant, nous avons effectué cette manipulation sur des souris sauvages (saines), uniquement. Nous avons constitué plusieurs groupes de souris sauvages, pour lesquelles nous avons injecté dans le ventricule latéral, soit une solution saline, soit une solution d'antisens dosée de façon variable suivant les groupes. Un mois plus tard, nous avons prélevé les cerveaux des souris sauvages. Il est alors apparu que les antisens injectés dans le ventricule latéral s'étaient diffusés dans la totalité du cerveau. C'est très prometteur ! Nous espérons que cette stratégie fonctionnera aussi chez la souris malade.

Nous avons ensuite étudié en laboratoire différentes coupes du cerveau, correspondant au striatum (une structure profonde du cerveau) et au cervelet. Le striatum est situé immédiatement à proximité du ventricule latéral. Nous avons pu observer que les doses d'antisens injectées étaient plus fortement détectées dans cette région. Nous avons également pu analyser que l'injection d'antisens dirigé contre les messagers qui codent l'ataxine 7 entraînait une diminution d'environ 80 % du niveau endogène d'ataxine 7 dans le striatum des souris sauvages (saines).

Enfin, l'examen du cervelet a montré que l'injection d'antisens dans le ventricule latéral permettait une diffusion homogène, tant dans la couche granulaire que dans la substance blanche. Ces résultats sont très intéressants. Par ailleurs, des biopsies ont permis de montrer que ces injections d'antisens ont permis une diminution de 40 % du niveau d'ataxine 7 dans le cervelet des souris sauvages (saines).

Ce résultat plus modeste que le précédent s'explique par la localisation du cervelet, qui est plus éloigné du ventricule latéral que le striatum.

4. QUELLES SONT LES PERSPECTIVES ?

Pour l'instant, nous avons uniquement montré l'efficacité des antisens sur des cultures cellulaires et le cerveau des souris sauvages (saines). La validation de cette stratégie est encore en cours, puisqu'il nous reste 20 séquences d'antisens à analyser. Il s'agit notamment de savoir s'il existe des séquences plus puissantes que celles que nous avons déjà étudiées.

Une fois que nous aurons trouvé la bonne séquence et la bonne dose, nous procéderons à un essai sur des souris porteuses de la maladie. Cela nous permettra de voir s'il est possible d'empêcher l'accumulation d'ataxine 7 mutée et toxique causant la maladie, afin de ralentir l'évolution des symptômes.

A titre personnel, je considère que cette stratégie semble très prometteuse pour SCA7, mais aussi pour d'autres formes d'ataxies avec expansion à polyglutamine, comme les formes SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 et SCA17.

Pour finir, je tiens à remercier les membres de mon équipe, le professeur Alexis Brice et son équipe, ainsi que toutes les personnes qui sont impliquées dans ce projet : Martina Marinello, Khalid El Hachimi, Giovanni Stevanin, Alexandra Durr et nos collaborateurs à l'Institut de myologie. Je remercie également Isis Pharmaceuticals qui nous a fourni les antisens, et l'AFM qui finance le projet. J'adresse enfin un très grand merci à l'association CSC et à toutes les familles, qui ont largement soutenu la recherche sur les SCAs au cours des dernières années. Je leur suis très reconnaissant.

Je vous remercie de votre attention.

Échanges avec la salle

■ Giovanni STEVANIN

Merci, Sandro. J'imagine que votre intervention va susciter de nombreuses questions car c'est une stratégie, prometteuse.

Concrètement, un médicament pourra-t-il stopper l'évolution de la maladie ?

■ Sandro ALVES

Pour le moment, nous sommes en train de valider cette stratégie d'antisens sur la souris, dont les séquences sont complémentaires avec l'ataxine 7 humaine. Cette stratégie semble fonctionner. Ensuite, avant de trouver le moyen de délivrer efficacement des antisens chez l'humain, nous devons valider cette stratégie chez les singes. Même si cette stratégie est prometteuse, nous ne sommes pas encore certains qu'elle sera efficace chez l'humain. Nous nous attendons toutefois à observer une diminution très significative du niveau d'ataxine 7 mutée (la protéine toxique qui cause la maladie). En outre, nous ne savons pas si une diminution de 40 ou même 60 % suffirait à stopper l'évolution de la maladie.

« ...cette stratégie semble très prometteuse pour SCA7, mais aussi pour d'autres formes d'ataxies... »

Sandro Alves

Les chercheurs doivent se montrer honnêtes et ne pas promettre aux personnes impliquées que cette stratégie fonctionnera chez l'humain.

Nous ne savons donc pas encore quand cette stratégie permettra un traitement pour l'humain... Nous attendons tous un aboutissement, mais il ne nous est pas encore possible de fixer une date.

■ Alexandra DURR

La méthode est prometteuse et a fait la preuve de son efficacité sur la maladie de Huntington. Elle a d'ailleurs fait l'objet d'un article dans le Figaro récemment. Cela étant, des inconnues demeurent. Les antisens peuvent-ils se diffuser dans un cerveau humain ? Est-il possible d'injecter une aiguille dans le cerveau humain ? Plusieurs pistes sont suivies.

■ Sandro ALVES

Les séquences que nous avons étudiées sont stables dans le cerveau durant quatre mois. Cela signifie que le messager qui produit l'ataxine 7 est bloqué durant quatre mois. Au terme de cette période, son niveau redevient normal.

Si nous pouvons appliquer cette stratégie chez l'humain un jour, il faudra certainement envisager des injections régulières ou alors avec des mini-pompes qui permettraient au flux d'arriver en continu. Cette méthode d'infusion est déjà en essai clinique pour d'autres maladies cérébrales.

■ Giovanni STEVANIN

On sait dans d'autres modèles, que cela stabilise la maladie plusieurs mois après le traitement, même après disparition des antisens, donc on n'aura peut-être pas besoin de refaire trop souvent des injections. La grande interrogation est celle du bon moment pour traiter : dès le début des signes, longtemps avant l'apparition des symptômes ou même chez des personnes déjà sévèrement atteintes ? Est-ce que cela sera efficace ? Nous n'avons pas encore la réponse mais on sait que cela marche chez la mouche drosophile SCA7 comme vous le montrera Hervé Tricoire plus tard.

■ Sandro ALVES

L'expérience sur la maladie de Huntington montre que si les souris sont traitées tôt (avant l'apparition des symptômes), le traitement est plus efficace.

■ Alexandra DURR

Il faudra sans doute imaginer des traitements différents suivant les stades de la maladie.

■ Sandro ALVES

D'où l'importance de l'étude BIOSCA pour identifier la fenêtre à partir de laquelle on peut commencer à traiter le patient !

Est-il possible de tester la stratégie antisens sur une SCA3 également ?

■ Sandro ALVES

Oui, comme sur d'autres SCAs – sous réserve de changer les séquences d'antisens dans la mesure où les gènes concernés sont différents.

Ainsi que je l'indiquais, nous avons encore 20 séquences ASOs contre le gène SCA7. Nous cherchons à savoir s'il existe des séquences plus puissantes que celles dont j'ai parlé aujourd'hui. Il apparaît que les récentes modifications chimiques sont cinq fois plus efficaces. Une centaine de souris sont actuellement sacrifiées en Californie pour valider ces données. Nous connaissons bientôt la réponse pour l'ataxie SCA7 et pourquoi pas ensuite passer à la SCA3 car par une approche similaire, on sait que cela a de grandes chances de marcher (du moins en théorie).

Existe-t-il des souris SCA7, SCA3, SCA1, etc. ?

■ Sandro ALVES

Oui. Le principe est le même.

Peut-on envisager une autre méthode que la piqûre, qui est très invasive ?

■ Sandro ALVES

Chez la souris, nous savons que l'injection d'une aiguille dans le cerveau entraîne toujours quelques séquelles. Mais l'injection en une fois dans le ventricule latéral n'induit pas de toxicité. En effet, les antisens pénètrent le liquide céphalorachidien, qui les diffuse ensuite dans tout le cerveau.

Un autre paramètre à prendre en compte pour définir le traitement est l'évolutivité de la maladie. Plus l'état de santé est dégradé, plus le traitement doit être correctif.

« La grande interrogation est celle du bon moment pour traiter... »

Giovanni Stevanin

■ Sandro ALVES

Bien sûr. D'où le caractère plus prometteur du traitement présymptomatique (avant l'apparition des signes cliniques) dont nous avons parlé ce matin.

■ Giovanni STEVANIN

Comme vous l'avez vu, c'est une stratégie prometteuse, du moins en théorie et qui marche in vitro. Mais il faut encore valider cela chez la souris, in vivo. Ce type d'approche est actuellement testé dans d'autres maladies neurologiques.

Je vous propose de répondre aux questions dans le cadre de la table ronde prévue en fin d'après-midi. Nous souhaitons maintenant vous présenter l'intérêt que présentent les modèles drosophiles pour avancer dans la compréhension des maladies du système nerveux humain. La parole est à Hervé Tricoire, de l'université Paris Diderot.



➤ Modèles drosophiles

pour avancer dans la compréhension des mécanismes dans les maladies à triplets (formes dominantes et ataxie de Friedreich)

Je suis exotique, puisque je vais vous parler de drosophiles – ce qui peut vous sembler très éloigné de vos préoccupations ! J'espère en tout cas vous convaincre, à la fin de cet exposé, que ce n'est pas si éloigné que cela.

Le travail que nous avons conduit a été financé, entre autres, par vos deux associations. Je voulais donc avant tout vous remercier pour cette possibilité que vous nous avez donnée de connaître le modèle drosophile.

1. QUEL INTÉRÊT LES DROSOPHILES PRÉSENTENT-ELLES POUR ÉTUDIER LES PATHOLOGIES NEURODÉGÉNÉRATIVES ?

La drosophile a un cerveau mais n'a pas de cervelet. En revanche, toutes les cellules qui composent le cerveau humain y sont présentes. Ainsi, les neurotransmetteurs (les molécules qui transmettent les messages nerveux) sont à peu de chose près les mêmes chez l'humain et chez la drosophile.

Un autre intérêt de la drosophile réside dans son développement rapide et sa courte durée de vie, qui permettent de conduire des expériences vingt fois plus vite que sur une souris.

Autre avantage, le nombre d'animaux pouvant être réunis par mètre carré permet de travailler sur des effectifs très nombreux. En effet, nous pouvons mettre jusqu'à 40 000 drosophiles dans un incubateur, ce qui offre des statistiques d'analyse très intéressantes.



Hervé TRICOIRE

Docteur en biologie,
Responsable de l'équipe
Génétique du stress et du
vieillessement normal et
pathologique à l'université
Paris Diderot

De façon plus fondamentale, l'avantage avec la drosophile est que nous disposons d'une panoplie d'outils de génétique moléculaire qui permettent d'effectuer des opérations qui ne sont pas possibles avec d'autres modèles. Nous pouvons ainsi inactiver ou surexprimer à peu près n'importe quel gène dans un tissu donné de la drosophile – et de manière contrôlée dans le temps. Nous pouvons par exemple décider d'exprimer les gènes uniquement durant la phase adulte et non durant la phase de développement.

Au total, l'organisme de la drosophile est pertinent pour identifier de nouvelles voies thérapeutiques et tester des molécules pharmacologiques.

2. COMMENT LE MODÈLE DROSOPHILE PERMET-IL DE MIEUX COMPRENDRE LES ATAXIES DOMINANTES SCA1, SCA3 ET SCA7 ?

Pour modéliser une pathologie neurologique chez la drosophile, nous amenons deux types de transgènes (gènes que l'on apporte de l'extérieur) – l'un pour exprimer une protéine de régulation qui permettra de choisir le lieu et le moment d'expression de l'autre transgène qui code pour la protéine humaine causant la maladie. En l'occurrence, cette seconde protéine est l'ataxine 7, qui porte les expansions de polyglutamine.

Nous pouvons aussi utiliser des protéines régulatrices mutées, de telle façon qu'elles soient inactives en temps normal, mais produites avec l'apport d'un inducteur (le RU486) que l'on peut mettre dans la nourriture de la mouche. Cela permet de contrôler temporellement l'expression du transgène : il suffit de placer l'inducteur pour que la protéine pathologique soit produite.

Une fois que nous disposons d'un modèle de ce type, nous recherchons des signes cliniques, comme conséquences de l'expression de la protéine pathologique dans la drosophile, de manière à rechercher des facteurs modificateurs soit génétiques soit pharmacologiques de la pathologie. Permettez-moi d'en citer quelques exemples.

• Observation d'agrégats avec la protéine fabriquée à partir du gène SCA7 muté

Ce premier exemple est tiré du modèle SCA7, qui remonte à un certain temps et que nous avons développé avec les équipes d'Alexis Brice et de Giovanni Stevanin. Dans ce modèle, nous avons exprimé le gène SCA7 muté ce qui a permis de reproduire un certain nombre d'éléments de la pathologie humaine. Nous observons, comme vous l'avez déjà vu dans les modèles présentés par Sandro Alvez, de magnifiques agrégats ou

dépôts protéiques dans les neurones qui expriment la protéine mutante. Dans la mesure où nous pouvons travailler beaucoup plus vite sur la drosophile que sur la souris, nous savons déjà ce qui se passe lorsque nous arrêtons de produire la protéine SCA7 chez l'adulte, les agrégats sont progressivement éliminés. On observe également que la durée de vie et le comportement de ces mouches sont plus normaux que chez les animaux qui expriment la protéine tout le reste de leur vie.

C'est très encourageant, et cela motive complètement les essais sur la souris que mène Sandro Alves dans le but d'interrompre l'expression du gène SCA7.

• Expression des ataxines pathologiques et longévité des mouches

Outre les agrégats, nous travaillons plus précisément sur la longévité, l'objectif étant de suivre la mortalité des animaux au cours du temps.

Nous avons pu montrer que l'induction de la protéine pathologique grâce au RU486 présent dans la nourriture des drosophiles réduisait de façon très significative leur longévité.

• Suppression génétique de l'ataxie

Nous pouvons croiser ces animaux « ataxiques » avec d'autres types d'animaux dans lesquels nous avons amené des mutations. Ces mutations vont modifier l'expression d'autres gènes, et on espère que certaines de ces mutations amélioreront la longévité.

L'expression de la protéine SCA3 pathologique dans l'œil d'une drosophile entraîne une dépigmentation de cet œil et une disparition presque totale de la rétine. En revanche, quand on modifie l'expression d'une autre protéine (via un croisement avec une drosophile mutante pour un autre gène, ici dPRIM1), nous avons pu montrer que l'on restaure une rétine quasiment normale pour l'animal. Il s'agit là d'une façon rapide de rechercher des modificateurs de pathologies à polyglutamine. Le résultat est ici spectaculaire, même si nous ne comprenons pas exactement pourquoi pour l'instant.

1998-2012 : quel bilan des études génétiques menées sur les différents modèles ?

Plusieurs dizaines de modificateurs génétiques conservés chez l'homme ont été identifiées, ce qui ouvre de nouvelles pistes thérapeutiques potentielles (cf. ci-dessus).

Certains de ces modificateurs génétiques semblent communs à plusieurs ataxies dominantes, tandis que d'autres sont spécifiques à telle ou telle

« ...l'organisme de la drosophile est pertinent pour identifier de nouvelles voies thérapeutiques et tester des molécules pharmacologiques. »

Hervé Tricoire

maladie. Il semble donc y avoir une complexité relativement importante, en la matière.

Par ailleurs, l'action de plusieurs modificateurs reste encore incomprise. Un important travail de recherche reste indispensable pour comprendre les mécanismes de suppression.

Je tiens en outre à signaler que dans tous ces modèles ou presque, toutes ces études ont été concentrées sur le neurone. Il s'agit, à mon sens, d'un petit problème. Dans un cerveau, en effet, il existe d'autres populations que les neurones, notamment des populations de cellules gliales qui jouent un rôle important dans le maintien des neurones et dans leur bon fonctionnement. Il en est de même dans un cerveau de drosophile. Or nous avons pu observer que l'expression de protéines pathologiques dans les cellules gliales adultes diminue aussi la longévité des drosophiles. Cela signifie que les problèmes liés aux cellules gliales sont sans doute aussi importants que les problèmes neuronaux. D'ailleurs, pour faire le lien avec l'exposé sur les déficits énergétiques, il a été montré dans des modèles d'Huntington réalisés dans les cellules gliales des drosophiles que certains défauts énergétiques mis en évidence pouvaient être sauvés par certains composants.

En résumé, plusieurs questions ne sont pas encore abordées. Les modificateurs des ataxies sont-ils les mêmes dans les neurones et les cellules gliales, par exemple ? L'efficacité d'une molécule thérapeutique candidate au test peut-elle ou non être la même dans les deux types de cellule ?

Qu'il s'agisse d'une ataxie SCA3 ou de la maladie de Huntington, l'expression d'une protéine pathologique dans la glie entraîne de très forts déficits de longévité. Reste à comprendre, à partir de ces modèles, si les modificateurs et les molécules potentielles sont efficaces. Nous disposons de toute une série d'outils nouveaux que nous pouvons mettre en œuvre.

3. COMMENT LE MODÈLE DROSOPHILE PERMET-IL DE MIEUX COMPRENDRE LES ATAXIES RÉCESSIVES, NOTAMMENT L'ATAXIE DE FRIEDREICH ?

L'ataxie de Friedreich est liée à une diminution de la frataxine, qui est une protéine mitochondriale impliquée dans la synthèse des centres fer/soufre. Dans la pathologie, la dégénérescence neuronale est parfois accompagnée d'une cardiomyopathie (atteinte cardiaque) significative

observée chez deux tiers des patients. Aussi avons-nous récemment développé au laboratoire un modèle cardiaque de l'ataxie de Friedreich pour analyser les conséquences de l'inactivation de la frataxine dans le cœur de la drosophile – car la drosophile a un cœur ! Ce dernier est en fait un vaisseau dorsal ouvert, qui permet de faire bouger le liquide interstitiel.

Nous avons pu filmer les battements du cœur de la drosophile *in vivo*, grâce à une petite protéine fluorescente. D'une part, comparé à un cœur normal, un cœur frataxique est complètement dilaté, de la même manière qu'est dilaté le cœur dans la pathologie humaine. D'autre part, le cœur frataxique bat beaucoup moins vite que le cœur sain.

A partir de là, nous avons comparé un cœur contrôle, un cœur frataxique et un cœur traité avec un composé pharmacologique. Il est alors apparu que ce traitement permettait une récupération quasi totale du cœur frataxique. Nous étudions actuellement d'autres symptômes liés à l'ataxie, pour voir si ce composé est efficace sur d'autres tissus. En tout cas, le résultat que nous avons déjà obtenu est potentiellement intéressant, même s'il n'est pour l'instant question que d'une drosophile. Ne l'oubliez pas. La plus grande prudence est de mise. Il convient désormais de passer à l'étude sur la souris.

4. QUELS SONT LES NOUVEAUX OBJECTIFS À ATTEINDRE ?

Notre objectif de base est de recaractériser les modèles biologiques que nous venons d'établir, qui nous paraissent fort importants à analyser, notamment en termes de modificateurs.

A plus long terme, l'objectif est de trouver des molécules pharmacologiques, en disposant de modèles plus rapides et faciles à cribler. Aussi essayons-nous de mettre au point des tests comportementaux plus rapides qui permettraient de faire du criblage à moyen débit de composés. Plusieurs pistes sont à l'étude.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à nos travaux, à commencer par ma collaboratrice de toujours, Véronique Monnier, mais aussi Anita Reinhardt et Christelle Lasbleiz qui ont fait leur post-doc au laboratoire, ainsi que Raheleh Heidari qui fait actuellement une thèse sur le problème du criblage dans nos modèles. Nous avons également étroitement collaboré avec Giovanni Stevanin et son équipe, ainsi qu'avec l'université de Bonn. Enfin, nous collaborons maintenant avec Jean-Michel Camadro sur le modèle Friedreich.

« ...ce traitement permettait une récupération quasi totale du cœur frataxique. »

Hervé Tricoire

Échanges avec la salle

■ Giovanni STEVANIN

Je vous remercie d'avoir fait battre le cœur de plein de gens, en plus de celui de vos drosophiles, et de nous avoir fait partager ces résultats très encourageants ! Y a-t-il des questions ?

■ Sandro ALVES

Pourquoi avez-vous choisi la protéine dPrim1 pour tester l'effet sur l'ataxie SCA3 ? Remplit-elle une fonction particulière ?

■ Hervé TRICOIRE

Elle a une fonction plus que particulière, puisqu'elle intervient dans le tout début de la réplication de l'ADN. Cela étant, j'aurais pu ne pas mentionner son nom sur mes transparents car rien ne dit que c'est elle qui est réellement impliquée. En tout cas, le résultat est sûr.

■ Giovanni STEVANIN

Oui, cela peut être un effet indirect. En ce qui concerne, l'Idebenone, fonctionne-t-elle moins bien sur les drosophiles Friedreich ?

■ Hervé TRICOIRE

Nous n'avons pas encore fait de tests extensifs sur l'Idebenone. Il est donc un peu tôt pour vous répondre. L'inconvénient majeur du criblage des composés est souvent que les résultats obtenus sont des « courbes en cloche » (la réponse finit par retomber). Il faut donc balayer des gammes relativement importantes de doses. C'est un véritable problème.

Dans la méthode proposée par Sandro Alves, les agrégats restent au niveau du noyau si j'ai bien compris.

■ Hervé TRICOIRE

Dans le modèle drosophile, nous faisons exprimer chez l'animal la protéine SCA7 avec ses polyglutamines. Puis nous arrêtons sa production, en retirant l'inducteur. Nous pouvons alors suivre le nombre d'agrégats et observer leur comportement. En l'occurrence, il apparaît qu'ils sont progressivement éliminés une fois que la production de la protéine est stoppée.

Jusqu'à zéro ?

C'est difficile à dire, ne serait-ce que dans la mesure où le temps de vie d'une drosophile est particulièrement court.

Ma question n'est pas neutre, puisqu'elle vise à savoir si les agrégats jouent un rôle protecteur ?

■ Hervé TRICOIRE

Nous ne savons pas. Personne ne le sait, pour l'instant.

■ Giovanni STEVANIN

Ils jouent certainement un rôle protecteur au départ. La cellule se protège en séquestrant la protéine toxique. Mais, après un certain temps, les agrégats séquestrent de nombreuses autres protéines. Ils peuvent donc finir par devenir responsables de la souffrance et de la mort cellulaire. Je vous remercie. Passons à l'intervention de Monsieur Rustin sur l'ataxie de Freidreich. Il est chercheur à l'Hôpital Robert Debré.

⏪ ...ils (agrégats) sont progressivement éliminés une fois que la production de la protéine est stoppée. ⏩

Hervé Tricoire

➤ Mitochondries et thérapeutique dans la maladie de Friedreich



Pierre RUSTIN

Directeur de recherches au CNRS,
hôpital Robert Debré

Bonjour. Je suis supposé vous parler des aspects mitochondriaux dans la thérapie de la maladie de Friedreich, mais vous verrez que je dériverai un peu sur des découvertes très récentes. Elles sont positives en ce sens qu'elles permettent de mieux comprendre la maladie, mais dans le même temps elles rendent plus complexe ce que nous pouvons et devons faire.

1. QUELLE EST LA VISION TRADITIONNELLE DE L'ATAXIE DE FRIEDREICH ?

Dans la vision traditionnelle de ce qu'est l'ataxie de Friedreich, la séquence des événements est assez linéaire depuis le gène jusqu'aux mitochondries, en bout de chaîne. De l'ordre de 95 % des patients sont concernés par une grande expansion des petites séquences GAA dans le premier intron du gène. A la suite de cette expansion, la machinerie qui lit l'ADN pour fabriquer l'ARN rencontre des difficultés. L'ARN est alors produit en moindre quantité, ce qui réduit à son tour son produit, la frataxine – la protéine frataxine étant alors dirigée dans la mitochondrie. Or il a été très bien établi et montré que cette protéine, dans un certain nombre de conditions, est requise pour fabriquer des molécules primordiales pour la cellule : les centres fer/soufre, qui entrent dans la composition d'autres protéines. Ces composés permettent ainsi à de nombreuses protéines de travailler.

En l'absence des protéines qui contiennent les centres fer/soufre, les mitochondries travaillent mal. En effet, plusieurs protéines qui sont nécessaires au fonctionnement des mitochondries possèdent des centres fer/soufre. Une partie du travail des mitochondries est donc mal faite –

l'ATP, en particulier, présent en plus petite quantité. Il va également y avoir production d'espèces réactives de l'oxygène que l'on appelle ROS. Nous pouvons donc imaginer qu'à la suite de cela, un stress oxydant se produit dans les cellules, ce qui peut induire des dysfonctionnements.

2. QUELLES SONT LES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES DÉJÀ MISES EN ŒUVRE ?

Depuis près de dix ans, cette vision traditionnelle a permis d'envisager différentes approches thérapeutiques, dont un certain nombre ont été mises en œuvre.

Nous savons notamment que nous pouvons amener la version correcte du gène défectueux, en tout cas dans les modèles animaux et cellulaires. C'est ce que l'on appelle la thérapie génique.

Nous pouvons également dérouler la boucle d'ADN pour permettre d'améliorer sa lecture et augmenter la quantité de frataxine produite. J'y reviendrai.

Par ailleurs, certains effets plus ou moins étranges ont été rapportés, en particulier celui de l'EPO qui semble pouvoir augmenter la quantité de frataxine produite quand elle est donnée à des êtres humains – même si nous ne savons pas encore par quel mécanisme. Les premiers essais thérapeutiques qui ont été menés en Italie ne sont pas très prometteurs. Il semblerait que l'effet ne soit pas très spectaculaire, en tout cas sur la moyenne des patients.

Une autre approche développée à l'heure actuelle consiste à agir sur les voies de signalisation. Le fonctionnement d'une cellule est sous le contrôle de grandes voies de signalisation, qui permettent à l'organisme de s'adapter aux conditions du milieu. Certaines de ces voies de signalisation sont celles qui contrôlent les activités mitochondriales et qui disent à la cellule de fabriquer plus de mitochondries ou des mitochondries plus actives. Vous avez sans doute entendu parler du resveratrol, mais il existe en fait plusieurs molécules intéressantes qui agissent au niveau de ces voies de signalisation. Je vous parlerai tout à l'heure de la pioglitazone que nous sommes en train d'essayer dans le cas de l'ataxie de Friedreich. Pour leur part, les premières molécules qui ont été utilisées dans le cas de l'ataxie de Friedreich sont liées à la vision que nous avons de la perte des centres fer/soufre. Cette perte est associée à une libération du fer dans les mitochondries, pouvant induire un stress oxydant. Plusieurs molécules ont donc été ou sont encore en cours d'étude pour essayer de

lutter contre ce stress. C'est notamment le cas de l'Idebenone, qui est distribué à de nombreux malades.

Par ailleurs, certaines molécules ne sont pas antioxydantes à proprement parler mais sont capables, par leurs réactions, d'acquérir des propriétés antioxydantes. A l'inverse, de très nombreuses molécules sont des antioxydants purs. On en trouve notamment dans l'alimentation. Plusieurs sont à l'essai dans le monde, en particulier aux Etats-Unis. Nous ne disposons pas de réponse très claire pour le moment. Les enjeux économiques sont tels que je ne sais pas comment seront manipulés les résultats.

Enfin, en bout de chaîne, il est possible de piéger le fer qui serait présent dans les mitochondries – sachant qu'il est extraordinairement compliqué de savoir si le retrait du fer présente des effets positifs ou négatifs. Ces molécules sont, de toute façon, extrêmement dangereuses à utiliser. Les résultats des quelques essais qui ont été effectués en France ou en Australie ne sont d'ailleurs pas très sympathiques.

3. QUEL EST LE MÉCANISME D'ACTION DES LIGANDS ?

Je considère que l'approche qui consiste à agir sur les voies de signalisation est l'une des plus intéressantes actuellement. Je ne peux pas vous présenter les résultats des essais conduits à l'hôpital pour le moment. Ce serait prématuré, mais sachez que des recherches sont en cours et que rien n'est à rejeter jusqu'ici.

Le principe des molécules agissant sur les voies de signalisation, en tout cas de la pioglitazone, est d'agir à travers un récepteur nucléaire placé à la surface du noyau des cellules. Ce récepteur migre ensuite à l'intérieur du noyau pour activer l'expression d'un certain nombre de gènes. Ces gènes cibles sont tous impliqués dans des processus mitochondriaux, ce qui nous intéresse dans l'ataxie de Friedreich vu la physiopathologie de la maladie.

Cela étant, la plus grande prudence est de mise dans la mesure où ces molécules agissent sur des voies de signalisation qui contrôlent une infinité de gènes. Elles sont extrêmement efficaces mais potentiellement très dangereuses aussi.

La pioglitazone est le ligand d'une catégorie de récepteurs PPAR qui active directement la synthèse de la frataxine. Il est donc très intéressant d'utiliser la pioglitazone dans la maladie de Friedreich. Nous savons,

en outre, que l'augmentation d'expression de la frataxine augmente la production des enzymes antioxydantes et diminue l'expression des facteurs d'inflammation. Cela a été bien montré dans un certain nombre de maladies neurodégénératives chez la souris.

Ces avancées ont conduit voilà quelques années à organiser un essai clinique avec la pioglitazone à l'hôpital Robert Debré. Cet essai est conduit par Isabelle Husson. Pour le moment, une quarantaine de malades ont été traités. Nous connaissons les résultats début 2013 si tout se passe bien. Vous comprendrez que je ne puisse pas vous en dire plus pour le moment. J'espère simplement que ces résultats seront positifs.

4. QUEL EST LE RÔLE DU FOND GÉNÉTIQUE ?

En revanche, je souhaite vous parler d'un sujet absolument central pour l'étude de toutes nos maladies. Nous avons tous entendu aujourd'hui que les phénotypes (ensemble de symptômes) de toutes les maladies dont nous parlons dépendent fortement du fond génétique des animaux.

Quand nous étudions une maladie, si au lieu de prendre une lignée de souris (souris ayant toutes le même fond génétique), nous prenons une population de souris génétiquement non pures, c'est-à-dire que le gène muté responsable de la maladie soit entouré de variants qui sont différents d'une souris à l'autre. Alors nous constaterions que l'expression de la maladie varie d'un individu à l'autre. Cela n'a rien de surprenant et nous nous retrouverions alors dans la situation humaine.

Prenons l'exemple des souris ataxiques dites Arlequin que Paule Bénit étudie dans notre laboratoire. Une partie de ces souris réussissent moins bien à se tenir sur un tube qui tourne que les contrôles, tandis que d'autres font au moins aussi bien que les contrôles. Le gène est pourtant le même et toutes ont pourtant la même mutation. La seule différence, au sein de cette population, est le fond génétique. Cela peut sembler évident. Mais il est intéressant de constater qu'il en est de même concernant la réponse au traitement : nous finissons par distinguer deux groupes au sein de cette population de souris qui ont un fond génétique extrêmement variable. Un groupe fait beaucoup mieux avec les médicaments et un autre n'y répond pas. Et lorsque nous faisons la moyenne de tout cela, nous obtenons systématiquement des résultats non significatifs.

Pour répondre à cette question, il faudrait des millions d'animaux. J'ai posé la question à des statisticiens, qui m'ont confirmé qu'il suffirait de multiplier les animaux. Mais dans nos maladies rares, allez réunir

...l'expression de la maladie varie d'un individu à l'autre.

Pierre Rustin

un million de malades ! Essayez même d'en réunir 1000 ou 100 avec exactement la même mutation... Ce type d'observation est catastrophique. Il signifie que dans la plupart des essais, une partie des malades pourraient répondre au traitement tandis qu'une autre partie n'y répondrait pas. Et lorsque nous voudrions rapporter les résultats aux autorités pour la mise sur le marché de ce médicament, nous serions systématiquement refoulés, les résultats n'étant pas significatifs. Nous nous entendrions dire que nous n'avons pas établi que notre drogue, quelle que soit l'approche expérimentale retenue, a un effet indiscutable. Nous devons absolument nous saisir de ce problème et réfléchir à la conception des essais.

5. QUELLES SONT LES PERSPECTIVES ?

Je souhaite, pour finir, dire un mot de l'approche que j'ai évoquée plus haut et qui consiste à agir sur l'enroulement de l'ADN. Un gène peu se coller à de grosses protéines appelées histones, puis s'enrouler autour d'elles. Ces histones peuvent être soit déacétylées – l'ADN est alors condensé et la machinerie qui lit le gène travaille mal. Si on les acétyle, alors l'ADN se relâche et la lecture du gène s'en trouve facilitée. Nos collègues américains ont donc eu l'idée de jouer sur l'état d'enroulement de l'ADN sur les histones en changeant l'état d'acétylation de ces protéines, pour permettre une lecture du gène.

Certaines approches sont désormais probablement moins prometteuses, mais nous gardons l'espoir que les thérapies que nous développons actuellement restent valables.

Pour finir, je tiens à remercier la kyrielle d'associations dans le monde qui soutient notre travail sur l'ataxie de Friedreich. Toutes ces associations se sont réunies pour assurer un salaire, celui d'Aurélien Bayot. Elles seront contentes de voir que son travail aboutit à des résultats très intéressants. Je vous remercie.

Échanges avec la salle

■ Giovanni STEVANIN

Merci pour cette excellente présentation, riche de nouveautés. Avez-vous des questions ?

■ Claudie BALEYDIER

Pouvez-vous établir un lien avec l'essai qui se déroule actuellement à Turin sur les inhibiteurs de déacétylases ?

■ Pierre RUSTIN

C'est précisément ce dont je parlais. Ces molécules vont manipuler l'expansion pour permettre une meilleure lecture du gène qui sera ainsi mieux traduit en ARN puis en protéine frataxine. Il est donc très intéressant de les tester.

■ Claudie BALEYDIER

Avez-vous plus d'informations sur cet essai ?

■ Pierre RUSTIN

Non. Cet essai n'a démarré qu'en mars dernier.

Quelles sont les autres molécules qui existent pour les approches thérapeutiques ?

■ Pierre RUSTIN

Je pense qu'il existe une quinzaine de molécules au total, dont beaucoup remplissent une fonction extrêmement proche. De nombreuses molécules ressemblant à l'Idebenone ont été produites et sont vendues comme des molécules antioxydantes légèrement modifiées. Mais elles n'empêcheront pas les problèmes que nous rencontrons avec l'Idebenone. La vraie problématique est celle de la démonstration de leur efficacité ou non comme je l'ai évoqué.

❖ De nombreuses molécules ressemblant à l'Idebenone ont été produites et sont vendues... La vraie problématique est celle de la démonstration de leur efficacité... ❖

Pierre Rustin

■ **Claudie BALEYDIER**

Grâce à FARA, association de recherche américaine, de nombreux essais sont menés de par le monde. Vous travaillez beaucoup en collaboration.

■ **Pierre RUSTIN**

Les collaborations entre les chercheurs sont bonnes concernant la maladie de Friedreich, en effet.

■ **Giovanni STEVANIN**

Merci beaucoup, Pierre.

Nous allons terminer cette journée avec une table ronde réunissant les représentants des associations, les médecins et les chercheurs. N'hésitez pas à leur poser toutes vos questions, y compris celles que vous n'osez pas poser d'habitude. Les multiples intervenants présents aujourd'hui essaieront d'y répondre.

