

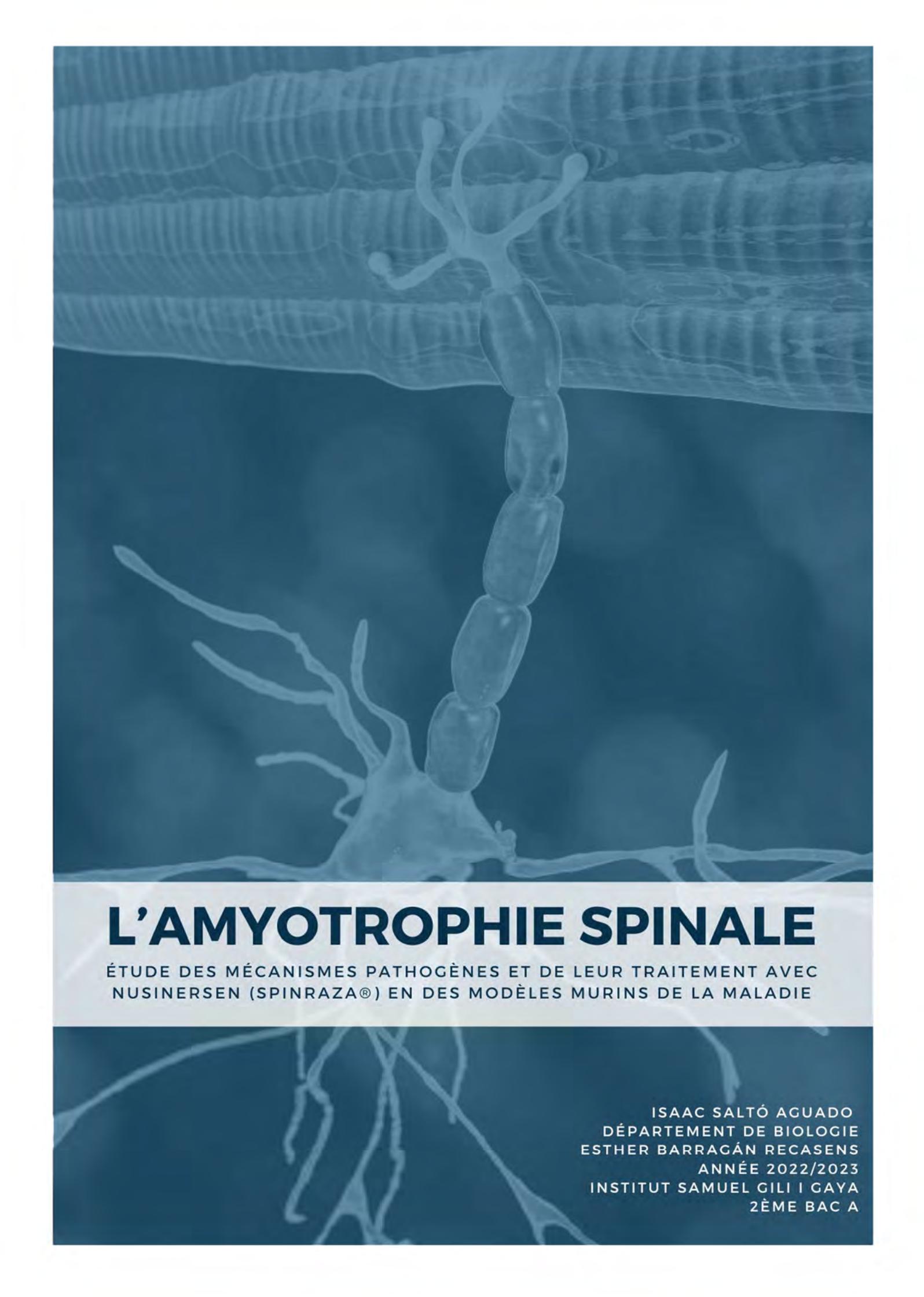
**L'Amyotrophie spinale: étude des mécanismes pathogènes et de leur traitement avec Nusinersen (Spinraza®) en des modèles murins de la maladie**

Isaac Saltó Aguado

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquest treball de recerca i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per a altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol del treball. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al web de la URL. Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts del treball com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de este trabajo de investigación y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título del trabajo. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al web de la URL. Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this research work and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the work must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside URL web is not allowed. These rights affect both the content of the work and its abstracts and indexes.



# L'AMYOTROPHIE SPINALE

ÉTUDE DES MÉCANISMES PATHOGÈNES ET DE LEUR TRAITEMENT AVEC  
NUSINERSEN (SPINRAZA®) EN DES MODÈLES MURINS DE LA MALADIE

ISAAC SALTÓ AGUADO  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
ESTHER BARRAGÁN RECASENS  
ANNÉE 2022/2023  
INSTITUT SAMUEL GILI I GAYA  
2ÈME BAC A



*« Ce n'est pas les médecins qui nous marquent, c'est la médecine »*

- **Montesquieu**

---

## REMERCIEMENTS

## REMERCIEMENTS

Montesquieu a déclaré que ce ne sont pas les médecins qui nous marquent, mais la médecine. Néanmoins, ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide désintéressée de beaucoup d'entre eux.

Je voudrais profiter de cet espace pour remercier toutes les personnes qui ont collaboré et rendu possible la réalisation de ce travail de recherche.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tout le personnel de l'*Institut de Recerca Biomèdica* (IRBLleida) qui a fait de moi, de manière altruiste, un participant au projet de neuropathologie expérimentale d'SMA. Merci à ma tutrice externe, le Dr Olga Tarabal, d'avoir accepté ma candidature si affablement, m'ayant permis d'accéder assidûment au laboratoire et m'ayant fourni tout le nécessaire à l'exécution du travail. De la même manière, je remercie mes collègues de laboratoire d'avoir résolu tant de préoccupations concernant ce domaine innovant, en particulier Alaó Gatus ainsi que Sílvia Gras et Lídia Piedrafrita, qui supervise toujours le respect de la rigueur des protocoles. Je tiens également à remercier le Dr Jordi Calderó pour sa bonne humeur et son professionnalisme.

Un grand merci à la tutrice de ce travail, Esther Barragán, pour son implication indispensable, ses conseils, son soutien et sa volonté qui m'ont aidée et guidée tout au long de la préparation du travail, surtout dans les moments les plus difficiles où il a montré une confiance totale en moi; ainsi que à Noemí Sancho pour tout ce qui concerne la correction. D'autre part, je tiens à remercier l'incroyable opportunité qui m'a été offerte par le programme ITINERA, organisé par l'ICE de l'Université de Lleida (UdL), notoirement à Francesc Alamon, qui a rendu possible l'ensemble des procédures bureaucratiques pour officialiser le séjour expérimental à IRBLleida.

Enfin, je suis reconnaissant pour le soutien de ma famille, de mes parents et de mon frère, qui m'ont donné carte blanche en tout temps et m'ont offert leur aide inconditionnelle.

Je le répète, merci beaucoup.



Universitat  
de Lleida



---

**ABSTRACT · ABSTRAIT**

## ABSTRACT

In this work, the pathogenic mechanisms of the neuropathology of spinal muscle atrophy (SMA) are evaluated. SMA is a devastating autosomal recessive neuromuscular disease characterized by degeneration of the ventral horn from the spinal cord alpha motor neurons ( $\alpha$ MNs). SMA is caused by the homozygous deletion or mutation of the survival motor neuron 1 (SMN1) gene, resulting in reduced expression of SMN protein, which leads to  $\alpha$ MN degeneration and muscle atrophy. The majority of transcripts of a second gene (SMN2) generate an alternative spliced isoform that lacks exon 7 and produces a truncated non-functional form of SMN. In recent years, new potential therapies have been developed to increase SMN levels, including treatment with antisense oligonucleotides (ASOs) such as Nusinersen SPINRAZA. In this work, we used the intracerebroventricular injection of Nusinersen in a mouse model of SMA to evaluate the effects of this ASO on the phenotypical behaviour as well as on  $\alpha$ MNs' number and NMJs. Altogether, our results assess the effectiveness of the treatment and support that the selective restoration of SMN expression in the spinal cord has a beneficial impact not only on  $\alpha$ MNs but also on muscular fibres.

**Key words:** Spinal muscular atrophy (SMA), mouse model, Nusinersen SPINRAZA, genetic, motor neuron, muscle atrophy, phenotype, RNA, neuromuscular junctions (NMJ), spinal cord, SMN

## ABSTRAIT

Dans ce travail, les mécanismes pathogènes de la neuropathologie de l'amyotrophie spinale (SMA) sont évalués. L'AS est une maladie neuromusculaire autosomique récessive dévastatrice caractérisée par une dégénérescence de la corne ventrale des motoneurones alpha de la moelle épinière ( $\alpha$ MN). La SMA est causée par la délétion homozygote ou la mutation du gène du motoneurone de survie 1 (SMN1), entraînant une réduction de l'expression de la protéine SMN, ce qui entraîne une dégénérescence des MNS-  $\alpha$  et une atrophie musculaire. La majorité des transcriptions d'un deuxième gène (SMN2) génère une isoforme épissée alternative qui manque d'exon 7 et produit une forme non fonctionnelle tronquée de SMN. Au cours des dernières années, de nouvelles thérapies potentielles ont été développées pour augmenter les niveaux de SMN, y compris le traitement avec des oligonucléotides antisens (ASO) tels que Nusinersen SPINRAZA. Dans ce travail, nous avons utilisé l'injection intracérébroventriculaire de Nusinersen dans un modèle murin de SMA pour évaluer les effets de cet ASO sur le comportement phénotype ainsi que sur le nombre des MNS-  $\alpha$  et les NMJs. Ensemble, nos résultats évaluent l'efficacité du traitement et soutiennent que la restauration sélective de l'expression de SMN dans la moelle épinière a un impact bénéfique non seulement sur les MNS-  $\alpha$  mais aussi sur les fibres musculaires.

**Mots-clés** : Amyotrophie spinale (AMS), modèle murin, Nusinersen SPINRAZA, génétique, motoneurone, atrophie musculaire, phénotype, ARN, jonctions neuromusculaires (NMJ), moelle épinière, SMN

---

## TABLE DES MATIÈRES

# TABLE DES MATIÈRES

<b>0. Abreviations/Abréviations</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Objectifs</b> .....	<b>6</b>
<b>3. CADRE THÉORIQUE</b> .....	<b>8</b>
3.1 BASES NEURONALES .....	9
3.1.1 Introduction au système nerveux humain .....	9
3.1.2 La moelle épinière .....	10
3.1.2.1 Anatomie externe .....	10
3.1.2.2 Anatomie interne .....	12
3.1.3 Structure cellulaire : morphologie, types, fonctions et emplacement d'un MN .....	14
3.1.4 La neurotransmission et le bouton C .....	20
3.2 L'AMYOTROPHIE SPINALE (AS).....	23
3.2.1 Qu'est-ce que l'AS? .....	23
3.2.2 Classification clinique de la maladie.....	25
3.2.3 Bases génétiques et moléculaires de la maladie.....	28
3.2.3.1 Le gène SMN (SMN1 et SMN2).....	28
3.2.3.2 Le Transcrit.....	29
3.2.3.3 La protéine.....	31
3.2.3.4 Fonctions de l'SMN .....	32
3.2.3.5 Corrélation génotype/phénotype.....	33
3.2.4 Modèles murins d'amyotrophie spinale.....	34
3.2.5 L'amyotrophie spinale en tant que pathologie multisystémique.....	37
3.2.5.1 L'affectation du système neuromusculaire.....	37
3.2.6.2 Les effets sur les autres populations neuronales.....	40
3.2.6.2 Effets de la glie.....	41

3.2.6.3 Autres affectations dans les cellules et les tissus au-delà du système nerveux.....	42
3.3 STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DE L'AS.....	44
3.3.1 Stratégies thérapeutiques actuelles.....	44
3.3.1.1 Stratégies thérapeutiques spécifiques.....	44
3.3.1.2 Stratégies thérapeutiques non spécifiques.....	46
3.3.2 Nouvelles thérapies.....	51
3.3.2.1 Thérapies dépendantes du SMN.....	52
3.3.2.2 Thérapies indépendantes du SMN.....	53
<b>4. CADRE PRATIQUE.....</b>	<b>56</b>
<b>Hypothèses.....</b>	<b>57</b>
<b>Approcher.....</b>	<b>57</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>59</b>
4.1 ANIMAUX ET ENTRETIEN DE LA COLONIE.....	59
4.2 ESSAIS DE MOTRICITÉ ET DÉTERMINATION DU POIDS DES ANIMAUX.....	61
4.2.1 <i>Righting Reflex</i> (RR).....	61
4.2.2 <i>Tube test</i> (TT).....	61
4.2.3 Marquage.....	62
4.3 GÉNOTYPAGE DES ANIMAUX.....	63
4.3.1 Extraction d'ADN.....	64
4.3.2 Préparation de LA PCR.....	65
4.3.3 Préparation de l'agarose et du gel d'électrophorèse.....	66
4.4 TRAITEMENT AVEC L'AGENT THÉRAPEUTIQUE.....	67
4.4.1 Classification des différents modèles murins.....	67
4.4.2 Administration de la dose de Nusinersen SPINRAZA.....	67
4.5 DISSECTION DU RONGEUR.....	70
4.5.1 Perfusion.....	70
4.5.2 Dissection de la moelle épinière et de la musculature inférieure.....	73

4.5.2.1 Procédure de dissection de la moelle épinière.....	73
4.5.2.2 Procédure de dissection de la musculature postérieure (TA).....	76
4.6 LE DÉCOUPE DANS LE CRYOSTAT TISSULAIRE.....	77
4.6.1 Coupe transversale de la moelle épinière.....	77
4.6.2.1 Montage sur le godet.....	77
4.6.2.2 Placement sur le support du cryostat.....	78
4.6.2.3 Placement sur la lame.....	79
4.6.2 Section longitudinale du nerf sciatique (musculature Tibiale Antérieure).....	79
4.6.2.1 Montage au moule.....	79
4.6.2.2 Placement sur le support du cryostat.....	80
4.6.2.3 Placement sur la lame.....	80
4.6.2 Aspects qui ont été pris en compte pour faire une bonne coupe.....	81
4.6.2.1 La température.....	81
4.6.2.2 Le couteau.....	81
4.6.2.3 Le <i>Roller</i> .....	81
4.7 TECHNIQUE DE COLORATION EN MICROSCOPIE AVEC DES ANTICORPS.....	83
4.7.1 Incubation avec AC .....	84
4.7.2 Incubation avec AC 2.....	84
4.7 WESTERN BLOT.....	86
4.7.1 Obtention et préparation d'échantillons.....	87
4.7.2 Quantification de la concentration en protéines.....	87
4.7.2 Électrophorèse avec gel d'acrylamide.....	88
4.7.2 Transfert de protéines à la membrane de Polyfluorure de Viniliden.....	88
4.7.2 Détection immunochimique.....	89
4.7.2 Analyse des résultats.....	90
<b>5. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>92</b>
5.1 Chapitre I.....	93

5.2 Chapitre II.....	96
5.3 Chapitre III.....	99
5.4 Chapitre IV.....	103
<b>6 CONCLUSIONS.....</b>	<b>106</b>
<b>7 CONSIDÉRATIONS FINALES .....</b>	<b>108</b>
<b>8. Références.....</b>	<b>112</b>
<b>9. Références des images .....</b>	<b>165</b>
<b>10. Annexes .....</b>	<b>140</b>
10.1 Annexe I .....	141
10.2 Annexe II.....	146
10.3 Anexe III.....	147

---

## **ABREVIATURES/ABRÉVIATIONS**

## 0. ABREVIATURES / ABRÉVIATIONS

**AChR** Receptor d'acetylcolina / Récepteur de l'acétylcholine

**AChRs** Acetylcolina / Acétylcholine

**AME** Atròfia muscular espinal

**AS** Amyotrophie Spinale

**ATP** Adenosina trifosfat / Adénosine triphosphate

**cM** Centimorgan

**DNA/ADN** Àcid desoxiribonucleic / Acide desoxiribonucléique

**DNAc/ADNc** DNA complementari / ADN complémentaire

**ELA/SLA** Esclerosi lateral amiotròfica / Sclérose latérale amyotrophique

**ESE** *Exonic splicing enhancer*

**ESS** *Exonic splicing silencer*

**FL-SMN** *Full length SMN protein*

**H2O2** Aigua oxigenada / Peroxyde d'hydrogène

**H2O<sub>d</sub>** Aigua destil·lada / Eau distillée

**Kb** Kilobase

**KDa** Kilodalton

**M** Molar / Molaire

**Mb** Megabase

**MN(s)** Motoneurona(es) / Motoneurone(s)

**MN- $\alpha$**  Motoneurona alfa / Motoneurone alpha

**NaCl** Clorur de sodi / Chlorure de sodium

**NF** Neurofilament

**NMJ(s)** *Neuromuscular Junction* / Union neuromusculaire

**P** Dia postnatal / Jour postnatal

**pb** Parells de bases / Paire de bases

**PB** Tampó fosfat / Tampon phosphate

**PBS** Tampó fosfat salí / Tampon de phosphate salin

**PCR** Reacció en cadena de la polimerasa / Réaction en chaîne par polymérase

**PFA** Paraformaldehid / Paraformaldehid

**PVDF** Polifluorur de viniliden / Vinylidene polyfluorur

**RNA/ARN** Àcid ribonucleic / Acide ribonucléique

**RNA<sub>m</sub>/ ARN<sub>m</sub>** RNA missatger / ARN messenger

**RNA<sub>n</sub>/ ARN<sub>n</sub>** RNA nucleolar / ARN nucléolaire

**RNA<sub>r</sub>/ARN<sub>r</sub>** RNA ribosòmic / ARN ribosomique

**RNA<sub>t</sub>/ARN<sub>t</sub>** RNA de transferència / ARN de transfert

**snRNP** *Small nuclear ribonucleoproteins* / Petite ribonucléoprotéine nucléaire

**rpm/tr min<sup>-1</sup>** Revolucions per minut / Tours par minute

**RR** Test "Righting Reflex"

**SD** *Standard Deviation* / Déviation typique

**SMA** *Spinal muscular atrophy*

**SMN** *Survival Motor Neuron*

**SMN $\Delta$ 7** *Survival Motor Neuron Delta7*

**SNA** Sistema nerviós autònom / Système nerveux autonome /

**SNC** Sistema nerviós central / Système nerveux central

**SNP** Sistema nerviós perifèric / Système nerveux périphérique

**SNS** Sistema nerviós simpàtic / Système nerveux sympathique

**SSC** Cisterna subsinàptica / Citerne Subsinàptica

**TA** Tibial anterior / Tibial antérieur

**TAE** *Tris-acetate-EDTA*

**TT** Test "Tube test"

**WT** *Wild type*

---

## **INTRODUCTION**

## 1. INTRODUCTION

À partir du moment où nous ouvrons les yeux sur le premier rayon de soleil jusqu'à ce que nous les refermions au crépuscule de la nuit, les êtres humains effectuent un large éventail de mouvements sans être pleinement conscients de la façon dont nous les exécutons. Marcher jusqu'au bureau, s'asseoir, tourner la tête quand quelqu'un nous appelle... Pour la plupart des gens, ce n'est qu'un rite régi par la vie quotidienne. Cependant, pour 1 individu sur 40 dans la population, c'est un miracle étant donné qu'ils ont été privés, beaucoup d'entre eux dès le moment de leur conception. Ergo, le principal but humanisant de ce travail est de rendre l'agrément du mouvement à ce groupe, avec une lueur d'espoir, le tout avec l'aide de la biomédecine actuelle.

Quand est venu le temps de choisir un sujet pour le projet de recherche, j'ai vu que c'était le moment idéal pour étudier le domaine de la recherche médicale, car c'est une question qui est traitée et en même temps étrangère à l'aspect éducatif. C'est ainsi que je m'ai mis en contact avec le groupe de neuropathologie expérimentale de l'Institut de recherche biomédicale de Lleida (IRBLleida), grâce à l'acceptation à laquelle, je me considère entièrement honoré d'avoir participé à une expérience scientifique immarcescible et d'avoir terminé ce travail à l'aide de leurs connaissances et de pratiques enrichissantes avec lesquelles je peux affirmer que j'ai été en véritable contact avec la science de la cathédrale qui est cachée dans les laboratoires.

J'ai donc opté pour l'étude d'une maladie neuromusculaire anonyme pour moi, mais au fil du temps, j'ai découvert qu'elle est proche dans la vie quotidienne de chaque citoyen : l'amyotrophie spinale (AMS). En plus de faire des recherches et de documenter les mécanismes pathogènes qu'il utilise, j'ai eu l'occasion d'évaluer l'efficacité d'un agent thérapeutique (Nusinersen SPINRAZA) qui composait cette lueur d'espoir de ce dont j'étais un chercheur. Malgré l'application de la thérapie génique (TG) qui incarnait la première approche du travail, j'ai également plongé dans le monde des acides nucléiques et de la biologie moléculaire avec une partie pratique qui implique une grande variabilité des processus et techniques scientifiques appliqués à la recherche et au comportement de la pathologie et de Nusinersen SPINRAZA dans les modèles murins.

---

## **OBJECTIFS**

## 2. OBJECTIFS

Une fois que j'ai su où mon travail de recherche se concentrerait, il est devenu essentiel de me fixer une série d'objectifs afin de suivre une ligne de travail ordonnée et organisée. En ce qui concerne les objectifs généraux du projet, ceux-ci se concentrent sur l'étude des bases cellulaires et moléculaires de la gamme des troubles neuromusculaires, en particulier la maladie alpha motoneurone (MNs- $\alpha$ ) et le développement des stratégies thérapeutiques proposées. Et à partir de là, une série d'aspects seront pris en compte afin d'évaluer à la fois les traitements actuels de la maladie et ce que la modification de l'expression du gène qui la code impliquerait.

Quant à mes objectifs particuliers, ils se concentrent principalement sur:

- Approfondir mes connaissances sur l'AS et étudier ses bases biologiques et phénotypiques.
- Participer au développement d'un projet scientifique et vivre leur quotidien.
- Démontrer empiriquement, à l'aide de diverses techniques scientifiques (PCR, observations microscopiques...) les mécanismes pathogènes de la maladie.
- Vérifier l'efficacité de Nusinersen SPINRAZA en tant qu'agent thérapeutique pour cette neuropathologie.

---

## CADRE THÉORIQUE

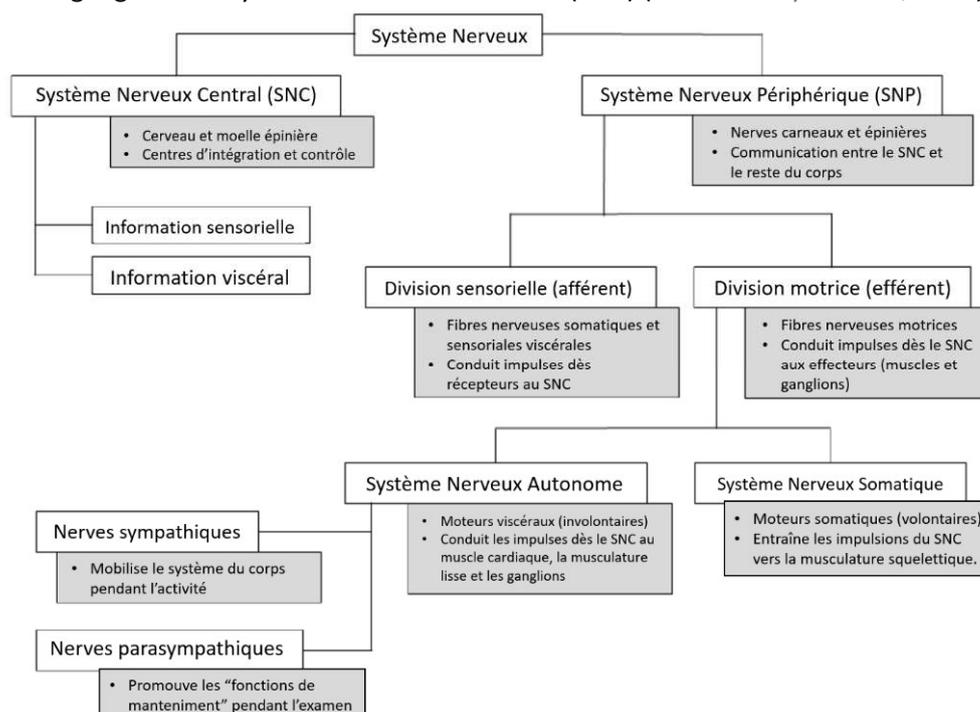
## 3.1 BASES NEURONALES

### 3.1.1 INTRODUCTION AU SYSTÈME NERVEUX HUMAIN

Le système nerveux humain est la structure la plus complexe et la plus organisée du corps. (De-la-Fuente S, 2020)

Entre autres fonctions décisives, il est le responsable de l'intégration, de la surveillance et de la direction des stimuli capturés à partir des récepteurs sensoriels dans le cerveau et dans la moelle épinière, et de les renvoyer vers d'autres parties du corps en utilisant un type de cellule spécifique : les neurones.

Comme pour le reste des vertébrés supérieurs, le système nerveux humain est subdivisé en deux parties principales : le système nerveux central (SNC) (formé par le cerveau et la moelle épinière) et le système nerveux périphérique (SNP) (composé de neurones sensoriels, de nerfs et de ganglions qui transportent des impulsions de et vers le SNC). En même temps, le SNP contient deux branches, subdivisées en fonction de la direction de propagation nerveuse. Les neurones sensoriels ou afférents transmettent l'influx nerveux des organes sensoriels au SNC, tandis que les neurones moteurs ou efférents transmettent les impulsions du SNC au muscle effecteur, au système nerveux somatique (SNS) ou aux ganglions du système nerveux autonome (SNA) (Nieuwenhuys et coll., 2008).



**Diagramme 1.** Diagramme montrant l'organisation du système nerveux des vertébrés. Le système nerveux est un système très complexe qui, chez les vertébrés, se compose de deux parties : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC englobe le cerveau et la moelle épinière tandis que le SNP se compose principalement des nerfs qui relient le SNC à toute autre partie du corps. Les nerfs qui transmettent des signaux du corps au SNC sont appelés sensoriels ou afférents, tandis que les nerfs qui transmettent des informations du cerveau sont appelés moteurs ou efférents. Le SNP est divisé en le système nerveux somatique (mouvement volontaire moyen) et autonome (mouvement involontaire), subdivisés en même temps en système nerveux sympathique (activé en cas d'urgence) et parasympathique (activé dans un état détendu) (par Nieuwenhuys et al., 2008) (Adapté de De-la-fuente S, 2020)

### 3.1.2 LA MOELLE ÉPINIÈRE

La colonne vertébrale est formée par une colonne d'os appelée vertèbres, en particulier 33 chez l'individu humain adulte. Ces vertèbres protègent la moelle épinière, une structure fragile et allongée contenue dans le canal rachidien, qui traverse le centre de la colonne vertébrale. Entre les vertèbres, il y a des disques composés de cartilage, qui aident à amortir la colonne vertébrale et lui donnent une certaine flexibilité. (Kenneth Maiese, MD, Université Rutgers, 2022)

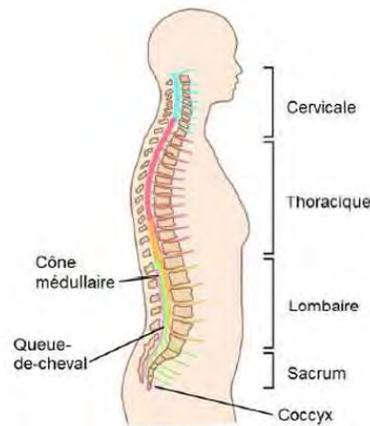
#### 3.1.2.1 ANATOMIE EXTERNE

Extérieurement, on peut comprendre la moelle épinière comme la colonne de tissu nerveux qui s'étend de la base du crâne (clivus) au coccyx, plus concrètement se termine approximativement à la hauteur des trois quarts de la trajectoire descendante de la colonne vertébrale, cependant la queue de cheval s'étend au-delà. La colonne vertébrale délimite cette structure, ainsi que le liquide et les membranes qui l'entourent. (*Dictionnaire NCI des termes du cancer*, 2011)

La moelle épinière mesure de 40 à 50 cm de long et de 1 à 1,5 cm de diamètre. De plus, deux rangées consécutives de racines nerveuses émergent de chacun de ses côtés. Ces racines nerveuses se lient distalement pour former 31 paires de nerfs spinaux.

Cette structure cylindrique composée de matière blanche et grise est uniformément organisée est divisée en quatre régions: le **cervical** (C1-C7), le **thoracique** (T1-T12), le **lombaire** (L1-L5) et le **sacré** (S1-S5), dont chacune est formée de plusieurs segments qui contiennent à leur tour plusieurs nerfs spinaux qui comprennent différentes fibres nerveuses motrices et sensorielles de toutes les parties du corps qui permettent de maintenir un canal messager avec le cerveau (**Figure 2**). Chaque segment

de la moelle épinière innerve un dermatome (J Schoenen, 1991). Ainsi, on peut limiter les fonctions qu'elle remplit dans chaque partie du corps en fonction de la région: cervicale, membres supérieurs et la respiration; thoracique, thorax et abdomen; lombaire, membres inférieurs; et le sacrum, également responsable du fonctionnement des membres inférieurs, joue cependant un rôle important dans le contrôle des organes sexuels et viscéraux.



**Figure 2.** Les cinq principales régions de la colonne vertébrale dans lesquelles la colonne vertébrale elle-même est anatomiquement divisée à l'extérieur. La moelle épinière est divisée en 31 segments nerveux, de haut en bas: 8 segments cervicaux; 12 segments thoraciques; 5 segments lombaires; 5 segments sacrés; 1 segment coccyx. Chaque segment est une partie de la moelle épinière qui donne naissance à une paire de nerfs spinaux (un à gauche et un à droite). Les nerfs spinaux quittent la colonne vertébrale par des arches entre les os et continuent vers l'extérieur pour devenir les nerfs des bras, des jambes et du corps. (Équipe communautaire SCIRE, 2017) [1]

Comme on a décrit préalablement, la moelle épinière commence à la base du crâne, où elle se connecte au cerveau à travers le tronc cérébral. De cette façon, elle passe par un canal creux au centre de la colonne vertébrale, le canal rachidien. Sa longueur est mineure comparée à celle de la colonne vertébrale et, par conséquent, elle ne le traverse donc pas complètement ; il se termine en un point nommé cône médullaire, près de la première/deuxième vertèbre lombaire. À partir de ce point, les nerfs spinaux qui sortent de l'extrémité de la moelle épinière sont regroupés en un faisceau, appelé queue de cheval ou *cauda équine*<sup>1</sup>, dans le canal rachidien.

<sup>1</sup> L'extrémité de la moelle épinière

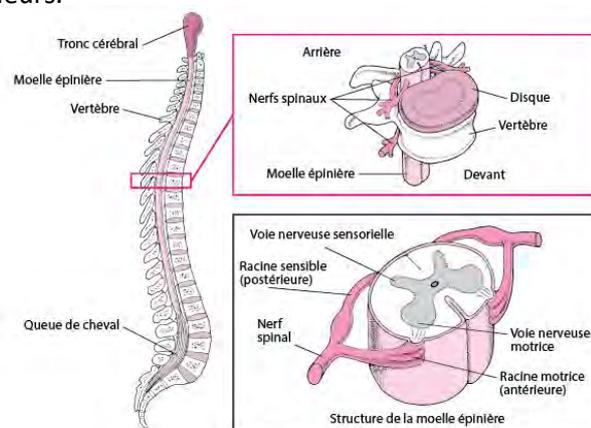
### 3.1.2.2 ANATOMIE INTERNE

Comprenant cela, la moelle épinière est composée internement de faisceaux d'axones nerveux qui transportent les messages entrants et sortants entre le cerveau et le reste du corps. Elle contient des circuits neuronaux en lui-même qui contrôlent les mouvements coordonnés, tels que la marche, la natation ou uriner. C'est aussi le centre des réflexes (Kenneth Maiese, MD, Université Rutgers, 2022)

La moelle épinière, comme le cerveau, est recouverte de trois couches de tissus typiques des méninges et en plus du liquide céphalo-rachidien qui la protège à l'intérieur de la colonne vertébrale.

Il se compose des parties suivantes :

- **Nerfs spinaux**, 31 paires en émergent. De chaque nerf se ramifient deux branches courtes, les **racines** :
  - Une racine est située dans la partie antérieure de la moelle épinière (racine **motrice** ou ventrale). Celles-ci portent principalement des commandes du cerveau et de la moelle épinière aux muscles squelettiques pour contrôler les mouvements moteurs.
  - Une autre est située à l'arrière (**racine sensible** ou dorsale). Elles transportent des informations sensorielles vers le cerveau (douleur, température, vibration, position des membres) à partir d'autres parties du corps. (**Figure 3**). Bref, elle est responsable de la transmission de l'influx nerveux, à la fois moteur et sensoriel, vers et depuis les membres inférieurs.



**Figure 3**, Illustration de l'organisation de la colonne vertébrale. De gauche à droite, image générale, visualisation d'une vertèbre et de la structure de la moelle épinière et de ses parties. [2]

Ainsi que le cerveau, la moelle épinière est formée de matière grise (composée de corps cellulaires peu profonds, de dendrites dépourvues de myéline et de cellules gliales impliquées dans le bon fonctionnement des tissus du système nerveux) et de **substance blanche** (essentiellement constitué de fibres nerveuses confinées à des gaines de myéline, blanchâtres) (Kenneth Maiese, MD, Université Rutgers, 2022). (**Figure 4**)

Le **centre** de la moelle, sous la forme d'un papillon, est constitué de la colonne intermédiaire, formée à son tour de matière grise. Il peut être subdivisé en ailes latérales qui se scindent en :

- Le corne **ventral** (autrement dénommé antérieure) qui contient les corps cellulaires des motoneurones (MNs), qui sont ceux qui transmettent des informations du cerveau ou de la moelle épinière aux muscles, en plus de stimuler le mouvement.
- Le corne **dorsale** (ou postérieur) qui contient les corps cellulaires des neurones sensibles (ou sensoriels), qui transmettent des informations sensorielles d'autres parties du corps à travers la moelle épinière, jusqu'à ce qu'elles atteignent le cerveau.

La **substance blanche** environnante contient des colonnes de fibres nerveuses (faisceaux d'axones) qui transportent des informations sensorielles vers le cerveau à partir du reste du corps, appelées voies ascendantes, et d'autres qui transportent les impulsions motrices du cerveau vers les muscles, les voies descendantes. Elle peut être sectionnée dans le funicule ou la colonne dorsale, la colonne latérale et la colonne ventrale, selon la position.



**Figure 4**, visualisation de la section d'une moelle épinière saine où l'on distingue la matière grise (au centre) et la substance blanche (à la périphérie) (Paxton S et coll., 2004) [3]

### 3.1.3 STRUCTURE CELLULAIRE : MORPHOLOGIE, TYPES, FONCTIONS ET EMBLEMEMENT D'UN MOTONEURONE

Le motoneurone (MN) est décrit comme le « *dernier chemin commun* » du système nerveux (Sherrington, 1906) et a été un point focal de la recherche en neurosciences pendant plus d'un siècle.

(McNeil C et coll., 2022)

Chez les vertébrés, le mouvement du système locomoteur se produit en raison de la coordination entre la contraction et la relaxation de multiples muscles squelettiques, composés de fibres musculaires striées.

Ces contractions coordonnées peuvent impliquer un grand nombre de fibres musculaires et conduire à des mouvements vraiment complexes du squelette. Pour que ces mouvements soient possibles, il est nécessaire de les coordonner à partir du cerveau à l'aide de signaux électriques envoyés par des MNs. (Figure 5)

D'un point de vue anatomique, la structure des MNs ne diffère pas en grand nombre avec d'autres neurones spécialisés puisqu'ils sont la structure la plus courante des neurones (Guardi P, 2019). Par conséquent, tous les neurones partagent certaines parties structurelles qui les définissent comme tels :

- **Soma** est le corps cellulaire où se trouve le noyau, qui contrôle les cellules et est également l'endroit où les protéines sont produites pour maintenir le fonctionnement du neurone.
- Le **dendrites** ce sont les structures en forme de branches que l'on trouve aux extrémités du neurone. Les dendrites utilisent ces structures pour envoyer et recevoir des informations d'autres neurones.

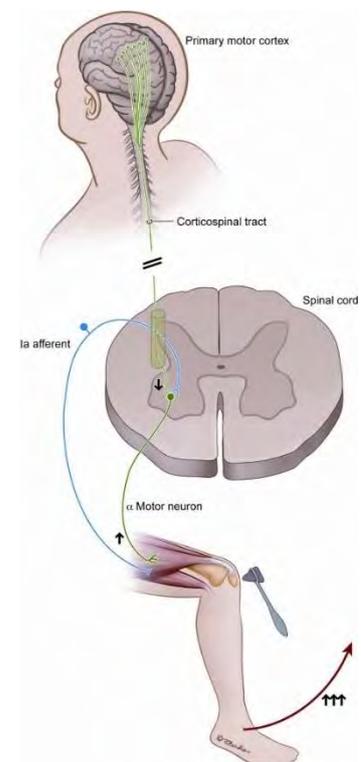
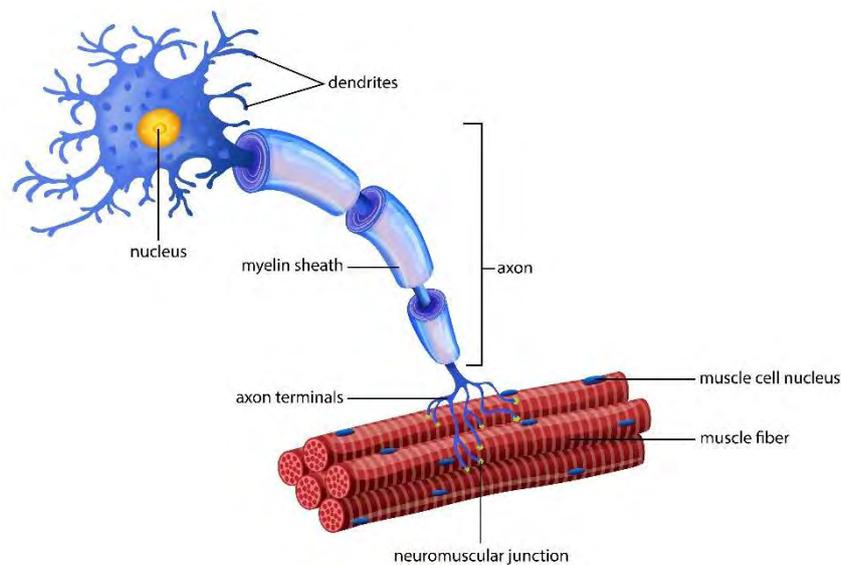


Figure 5, schéma du circuit neuronal du comportement moteur (Florman et coll., 2013) [4]

- **L'axone** est la longue structure d'extension dérivée du soma. L'axone fonctionne pour transmettre l'information qu'il reçoit à travers son corps aux dendrites à l'extrémité du neurone. (Guy-Evans O, 2021)
- **Les gaines de myéline** sont une couche isolante qui se forme autour des nerfs, composée de protéines et de corps gras. Il permet aux impulsions électriques d'être transmises rapidement et efficacement le long des cellules nerveuses. Si la myéline est endommagée, ces impulsions ralentissent. (Linda J et coll., 2021)

En outre, puisque les MNs innervent un certain muscle, ils ont **de nombreuses jonctions neuromusculaires (NMJ)**, ce sont les endroits où la synapse se produit entre le système nerveux et le muscle auquel elle s'innerve (del Arco J, 2014). Elles sont connues sous le nom de neurones multipolaires en termes structurels, ce qui signifie qu'ils ont un seul axone et plusieurs dendrites.



**Figure 6,** Illustration des parties principales d'un motoneurone (MN) innervant les fibres d'un muscle indéterminé. Extrait de (Graphics RF, 2019) [5]

Les MNs sont des cellules neuronales situées dans le SNC responsables de la génération et de la transmission de l'influx nerveux qui produisent la contraction musculaire. Les réseaux qui contrôlent les processus de locomotion sont connus sous le nom de circuits moteurs et les perturbations pathologiques de ces circuits sont impliquées dans de nombreuses maladies neurodégénératives.

Les MNs sont un type exceptionnel de cellule divisé en deux types principaux selon l'emplacement :

les MNs **supérieurs** et **inférieurs**. (De-la-Fuente S, 2020)

	MNs Supérieurs	MNs Inférieures
Location	Cortex cérébral	Tronc cérébral et moelle épinière
Type de cellule	Cellules de Betz	Multipolaires ( grande quantité de dendrites)
Neurotransmetteur	Glutamate	Acétylcholine
Objectif	Au SNC	Hors du SNC
Symptômes de la lésion	Spasticité	Paralipse

**Tableau 1.** Caractéristiques des MN supérieurs et inférieurs. Ces neurones diffèrent non seulement par leur emplacement, mais aussi par leurs caractéristiques et fonctions cellulaires (Stifani, 2014) Adapté de (De-la-Fuente S, 2020)

- **Les MN supérieurs**

Les MNs supérieurs, ou neurones sensoriels, se trouvent dans les régions primaires du promoteur et du moteur du cortex cérébral. Ces types de cellules sont un type de cellules pyramidales géantes connues sous le nom de *cellules pyramidales de Betz*, situées dans la cinquième couche de matière grise de la moelle épinière. Ce sont les neurones responsables de la planification et de la direction des mouvements du corps en envoyant leurs axones vers le bas et en se connectant aux MNs inférieurs de la colonne vertébrale. Étant donné que les plus élevés sont confinés exclusivement au SNC, les connexions sont essentiellement glutamatergiques<sup>2</sup>(Purves et coll., 2001).

Les symptômes cliniques des altérations des MNs plus élevés comprennent des mouvements incontrôlés, une sensibilité réduite à la stimulation réflexive superficielle et une spasticité du muscle (Ivanhoe et Reistetter, 2004; Stifani, 2014).

- **Les MN inférieurs**

Dans cette thèse, nous sommes consacrés sur l'étude des MNs de la moelle spinale puisque ceux-ci sont affectés dans la maladie de l'amyotrophie spinale (AS). Les MNs les plus bas sont

<sup>2</sup> Ils se servent du glutamate comme neurotransmetteur.

situés dans les noyaux des nerfs crâniens du tronc cérébral et de la corne ventrale de la moelle épinière. Ces neurones projettent leurs extensions axonales hors du SNC pour effectuer directement synapse avec le muscle squelettique ou, à travers les ganglions lymphatiques du système sympathique, contrôler indirectement la contraction musculaire de la cible qu'ils innervent. Les MNs plus bas sont cholinergiques<sup>3</sup> et reçoivent l'entrée des MNs supérieurs (circuits complexes) et des interneurons (circuits locaux) (Lahunta et Verre, 2009). Ils interviennent dans les mouvements réflexes et les mouvements involontaires.

Compte tenu que le contrôle musculaire n'a pas d'autre voie que la transmission de l'information, lorsque les MNs inférieurs sont perdus et dégénérés, le symptôme clinique développé est la paralysie (Purves et coll., 2001).

Selon le type de cible qu'ils innervent, les MN inférieurs sont sous classés en trois groupes :

- **MN viscéraux spéciaux**

Il s'agit essentiellement des MNs du tronc cérébral qui, avec les supérieurs, forment les noyaux crâniens: le trijumeau (V), le visage (VII), le glossopharynx (IX), le vide (X) et l'accessoire (XI).

Ils innervent les muscles du visage et du cou (Chandrasekhar, 2004).

- **NM viscéraux généraux**

Ces neurones appartiennent au système nerveux autonome (SNA) et sont responsables du contrôle des muscles lisses et des glandes. Ces neurones ne se connectent pas directement à l'effecteur final. Au lieu de cela, ils sont dysynaptiques et effectuent deux synapses, l'une dans les ganglions de la colonne vertébrale et l'autre dans la synapse neuromusculaire. (Purves et coll., 2001).

---

<sup>3</sup> C'est-à-dire qu'ils utilisent Acétylcholine en tant que neurotransmetteur.

- **MN somatiques**

Le soma de ces neurones est situé dans la corne ventrale de la moelle épinière et contrôle les muscles squelettiques. La caractéristique remarquable des MNs somatiques est leur longue extension axonale, qui contient une singularité anatomique exceptionnelle et unique. Chacun avec les fibres musculaires qu'il innerve, forme la structure connue sous le nom d'unité motrice. Le schéma d'innervation du muscle squelettique nécessite un haut degré de cohérence, obtenu par l'homogénéité des MNs. Chaque MN innerve les fibres musculaires d'un seul type et selon la nature de ceux-ci, les MNs somatiques peuvent être divisés en 3 groupes : alpha, bêta et gamma (Kanning et coll., 2010; Stifani, 2014).

- Les MNs alpha ( $\alpha$ -MNs) : ils innervent les fibres musculaires extrafusales<sup>4</sup> les plus abondantes et incarnent la clé de la contraction musculaire. Ils sont caractérisés par un grand soma et une NMJ bien caractérisée dans leur structure. Ils reçoivent une innervation monosynaptique directement des neurones sensoriels et jouent un rôle important dans les circuits réflexes rachidiens. Autrement dit, à tout réflexe qui est transmis directement de la moelle épinière sans atteindre le cerveau. Les MNs alpha sont classés en fonction des propriétés contractiles de la fibre extrafusale qu'ils innervent, de leur taille, de leur conductivité et de leur excitabilité neuronale : **vitesse, fatigue ou vitesse et résistant à la fatigue.** (Burke et coll., 1973).
- Les MNs bêta ( $\beta$ -MNs) : Les MNs bêta, anatomiquement, sont plus petits et moins abondants que les autres sous-types de NM somatiques. Ils innervent les fibres musculaires intrafusales<sup>5</sup> et extrafusales (Bessou et al., 1965) et

---

<sup>4</sup> Les muscles squelettiques sont composés de deux types de fibres différentes (intrafusale et extrafusale). Fibres musculaires *extrafusales* produisent des mouvements après la contraction, et la contraction de ces fibres est contrôlée par les motoneurons alpha. (*Contraction musculaire - Introduction, s.d.*)

<sup>5</sup> Les fibres musculaires *intrafusales* sont intégrées dans les fibres extrafusales et contiennent des récepteurs sensoriels proprioceptifs appelés épines musculaires. Les épines proprioceptives et musculaires des fibres intrafusales utilisent les neurones sensoriels et moteurs pour remplir leurs fonctions. Le neurone sensoriel qui provient de la colonne vertébrale musculaire transmet un signal lorsqu'un muscle est

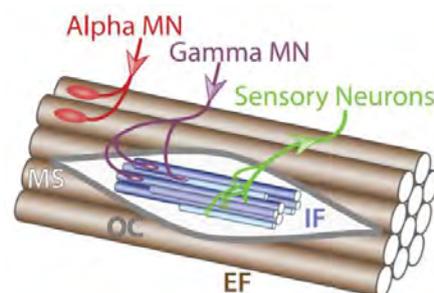
contrôlent à la fois la contraction musculaire et la réception de l'information sensorielle.

Les MNs bêta sont sous divisés en deux types : **statique**, innervant les fibres extrafusales et augmentant la vitesse de tir, et **dynamique**, qui innerve les fibres intrafusales et augmente la sensibilité de l'étirement.

- Les MNs gamma ( $\gamma$ -MN) : Celles-ci innervent exclusivement la sensibilité des fuseaux musculaires et régulent des fonctions complexes dans le contrôle moteur. Les MNs gamma sont distinctifs pour une conduction axonale lente, en raison du diamètre inférieur de l'axone et d'un degré d'arborisation plus faible. Ils ne reçoivent l'innervation des neurones sensoriels proprioceptifs qu'indirectement, de sorte qu'ils ne participent pas directement aux réflexes rachidiens (Eccles et al., 1960).

Ils n'ont pas non plus de fonction motrice, mais contribuent à la modulation de la contraction musculaire par stimulation directe des fibres musculaires intrafusales en augmentant la tension des fibres et, par conséquent, en imitant la section du muscle.

Il existe deux types de  $\gamma$ -MN : **dynamique**, améliorent la sensibilité dynamique, et **statique**, qui améliore la sensibilité à l'étirement.



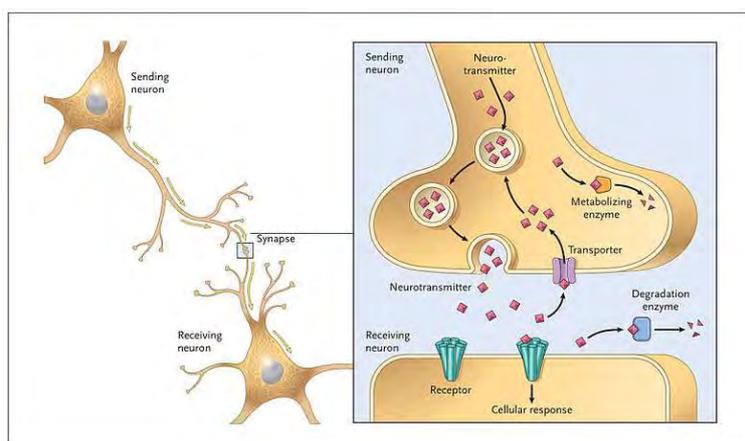
**Figure 7**, esquema des fibres musculaires dans la section longitudinale (adapté de Purvas et Williams, 2004). Il est observé comme le Mns alpha (rouge) inneren (flèche entrante) fibres musculaires extrafusals (brun) alors que Mns gamma (violet) se connectent avec les fibres intrafusals (bleu) à l'intérieur de la colonne vertébrale (gris clair). Les neurones sensoriels (verts) transportent des informations sur le Fibres intrafusals dans le système nerveux central (flèche saillante). (Stifani, 2014) [6]

étiré. Le motoneurone stimule alors la contraction des fibres musculaires à la fois intrafusales et extrafusales. La contraction des fibres musculaires intrafusales est induite par la stimulation des motoneurones gamma. (Contraction musculaire - Introduction, s.d..)

### 3.1.4 LA NEUROTRANSMISSION ET LE BOUTON C

Les mouvements complexes, tels que la marche, nécessitent la coopération de plusieurs dizaines de muscles. Pour assurer cette coordination affinée, les MNs de la moelle épinière doivent être intégrés dans un circuit neuronal cohérent et fonctionnel, qui est médié par la neurotransmission. (Zagoraïou et coll., 2009; Stifani, 2014). Ainsi, la neurotransmission joue un rôle important dans la compréhension des motoneurones et des maladies qui en découlent.

**La neurotransmission**, également appelée **transmission synaptique**, est le processus par lequel les molécules de signalisation, appelées neurotransmetteurs, sont libérées par un neurone (le neurone présynaptique) et se lient et activent les récepteurs d'un autre neurone (le neurone postsynaptique). La liaison des neurotransmetteurs peut influencer le neurone postsynaptique de manière inhibitrice ou excitative, déterminant son comportement. Il existe plusieurs rapports dans lesquels les principaux systèmes de transmission ont été décrits, autrement appelés neurotransmetteurs, qui constituent des entrées synaptiques dans les MNs; ceux-ci comprennent le glutamate, la glycine, l'acide γ-aminobutyrique (GABA), l'acétylcholine, la sérotonine, la noradrénaline et les neuropeptides. Tous fonctionnent à travers des récepteurs inotropes postsynaptiques spécifiques (<sup>6</sup>Gallart-Palau et al., 2014)

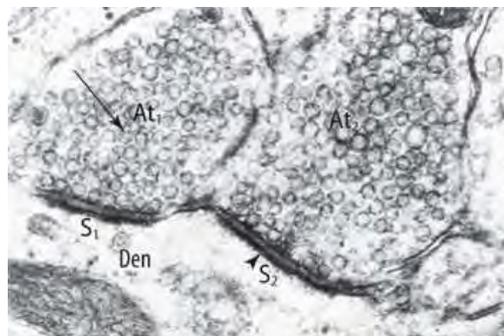


**Figure 8**, Diagramme montrant le système général de transmission synaptique d'un neurone à un neurone récepteur. (Orthographe J, 2021) [7]

<sup>6</sup> C'est-à-dire qu'ils se lient à un récepteur qui est un canal ionique, favorisant son ouverture et le passage d'ions qui favoriseront ou inhiberont l'action motrice dans le MN

Certaines études pionnières utilisant la microscopie électronique ont décrit la diversité structurelle des entrées synaptiques dans les MNs. Sur la base de la forme de la vésicule, des spécialisations des membranes présynaptiques et postsynaptiques et d'autres caractéristiques ultrastructurales, différents types de synapses ont été définis, y compris les synapses de type F, S et C. Alors que les boutons de type S correspondent principalement à *la glycine* ou au *GABA* contenant des synapses inhibitrices, les boutons de type F correspondent aux terminaux excitatifs contenant du *glutamate* (Gallart-Palau et al.2014).

**Les boutons-C** sont des terminaisons nerveuses exceptionnellement grandes (3 à 5  $\mu\text{m}$  de long) qui sont concentrées dans les corps cellulaires des MNs et des dendrites proximales. Dans la région présynaptique, ils contiennent un grand nombre de vésicules synaptiques densément tassées et dans la région postsynaptique, ils montrent une structure unique constituée d'une citerne souterraine de 10 mètres de large adjacente à la membrane de la MN et associée à un empilement de lamelles sous-jacentes de réticulum endoplasmique.



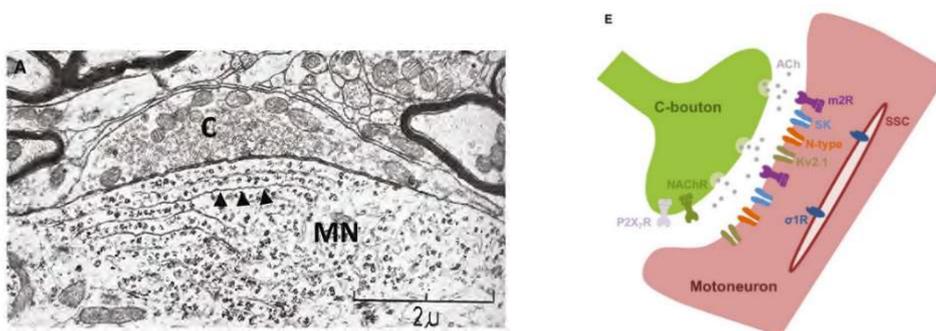
**Figure 9**, Union de deux éléments présynaptiques, constitués de terminaisons nerveuses, avec un élément postsynaptique composé d'une dendrite. Les vésicules présynaptiques SSV (flèche longue) sont appréciées, qui sont des organites spécialisés pour stocker, transporter et libérer différents types de substances transmettantes, appelées neurotransmetteurs; structures denses au niveau des membranes pré- et postsynaptiques (triangle) dues à la présence de plusieurs protéines, qui agissent comme des canaux ou des récepteurs, et celle d'un espace synaptique qui sépare les deux membranes dont la largeur peut varier entre 15 et 50 nm. (Fernandez Tresguerres J.A, 2010) [8]

Par conséquent, nous pouvons affirmer que les MNs reçoivent des synapses neuromodulatrices cholinergiques, appelées « Boutons-C », en raison de leur association avec la citerne souterraine postsynaptique (SSC) (Conradi, 1969; Kissane RWP et al., 2021) La présence de cette citerne

caractéristique est ce qui désigne les terminaux de type C (Zagoraiou et al., 2009; Gallart-Palau et coll., 2014; Navarro et coll., 2017).

L'évidence a montré que le terminal C est cholinergique (Hellström et al, 1999). Mais alors que la nature cholinergique des boutons C a été bien établie, l'origine neuronale de ces entrées était inconnue depuis longtemps. Plus récemment, l'origine et la fonction des boutons C ont été révélées comme un petit groupe d'interneurones cholinergiques, situés près du canal central de la moelle épinière, qui module l'activité du MN pendant le comportement locomoteur (Frank, 2009; Witts et coll., 2018).

En termes simples, le Bouton-C augmente l'excitabilité des  $\alpha$ -MNs et, par conséquent, la contraction musculaire puissante. Ainsi, une compréhension détaillée de ceux-ci pourrait conduire à une meilleure compréhension du fonctionnement des MNs et, par la suite, comment ils se dégèrent. En fait, des études ont révélé que les Boutons-C subissent des changements plastiques dans le MNs malades après des lésions de la moelle épinière et dans les maladies des motoneurones telles que la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) et l'Amyotrophie Spinale (AS) (Casanovas et al., 2017). De cette manière, une analyse approfondie de cette structure serait intéressante pour mieux comprendre ces maladies.



**Figure 10**, anatomie des synapses du bouton C. **(A)** Une micrographie électronique (adaptée de Conradi, 1969) montrant un bouton C (C) qui entre en contact avec un motoneurone (MN). **(E)** Représentation schématique d'une synapse du bouton C. (Witts et coll., 2013) [9]

## 3.3 L'AMYOTROPHIE SPINALE (AS)

### 3.3.1 QU'EST-CE QUE LE AS?

Amyotrophie spinale (AS) ou SMA de l'anglais *Spinal Muscular Atrophie*, est un terme qui comprend un groupe de pathologies autosomiques récessives <sup>7</sup> qui sont principalement caractérisés par la dégénérescence progressive des  $\alpha$ -MNs situés dans la corne ventrale de la moelle épinière. La maladie se caractérise par une perte de ces motoneurons inférieurs (ou motoneurons  $\alpha$ ) qui contrôlent l'activité musculaire volontaire, ainsi que par la faiblesse et la paralysie subséquentes des muscles squelettiques (**Figure 18**). Bien que la gravité clinique de la maladie varie considérablement, la faiblesse musculaire caractéristique de l'AS est symétrique, avec une affectation plus prononcée des membres inférieurs, ainsi que des muscles proximaux par rapport aux distales. En outre, le dysfonctionnement du muscle intercostal entraîne des complications respiratoires causant la mort prématurée des patients (Talbot K, 1999). Quels que soient les symptômes, la cognition chez ceux-ci n'est pas affectée (Kolb et Kissel, 2015).

La maladie a été décrite pour la première fois par Guido Werdnig (Werdning G, 1891) et Johann Hoffman (Hoffmann J, 1893) au début des années 1890, comme un trouble de faiblesse musculaire progressive apparu dans l'enfance et entraînant une mort prématurée, bien que l'âge de la mort soit variable (Kolb et Kissel, 2015).

Cent ans plus tard, la maladie a été associée à un locus génétique spécifique, grâce aux travaux du Dr Judith Melki, neuropédiatre et chercheuse à l'Institut de la Santé et de la Recherche médicale (INSERM) (Melki et al., 1990). Plus précisément, l'AS a été liée à deux gènes situés dans le bras long du chromosome 5 (**5q13.2**) : le gène du **motoneurone de survie** (SMN, de l'anglais *Survival Motor neuron*) (Lefebvre et coll., 1995) qui agit comme un gène déterminant des maladies, et le gène de la **protéine inhibitrice de l'apoptose neuronale** (NAIP, de l'anglais *Neuronal Apoptosis Inhibitory*

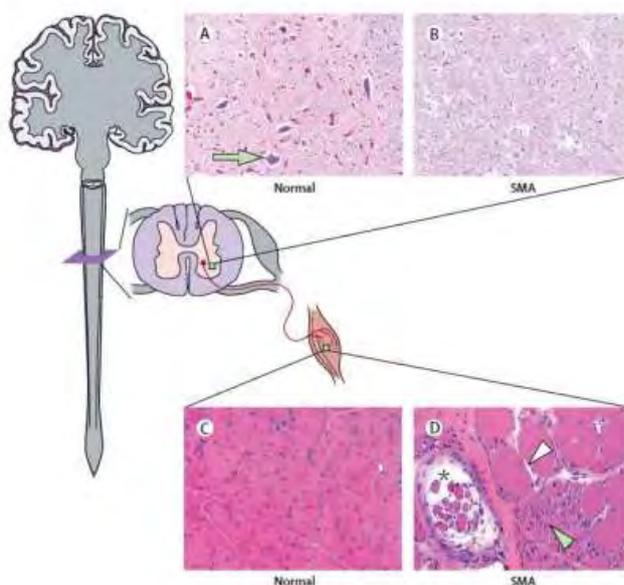
---

<sup>7</sup> Cela signifie que deux copies d'un gène anormal doivent être présentes a) de sorte que la maladie ou le trait se développe, c'est-à-dire, lorsque seulement les deux parents sont homozygotes (aa) (100 %), que l'un est homozygote et l'autre hétérozygote (50 %), ou que les deux hétérozygotes (Aa) (25 %).

*Protein*), un gène qui se conduit probablement comme un modificateur de phénotype (Roy et coll., 1995).

En raison d'un événement de duplication intrachromosomique, les humains ont deux copies du gène SMN : le gène **SMN1** et le gène **SMN2** (Lefebvre et coll., 1995). La cause la plus fréquente d'AS, dans environ 95% des cas, est l'élimination ou la mutation du gène SMN1 de l'homozygote chez les patients, tandis que le gène SMN2 est conservé dans un nombre variable de copies. Sans le gène SMN1, le gène SMN2 fournit suffisamment de protéines résiduelles sur toute la longueur pour la viabilité cellulaire, mais ce n'est pas suffisant pour maintenir la survie des MNs (Lefebvre et coll., 1997; Wirth, 2000). Par conséquent, l'AS est donc une maladie causée par de faibles niveaux de protéines et non par une ablation totale.

Avec une incidence d'environ d'1 entre 6000 à 10 000 naissances vivantes, dont le 60% développent la forme la plus grave de la maladie approximativement, l'AS est la deuxième maladie autosomique récessive la plus fréquente chez l'homme et la première cause génétique de décès chez l'enfant (Wirth B et coll., 2006; Montes J et coll., 2009) suivie par la fibrose kystique (Poire, 1978). Actuellement la fréquence est d'1 sur 54 nouveau-nés pour la population mondiale et d'1 sur 35 pour la population européenne, signifiant cela qu'en Espagne, il y a vers 1 000 000 de porteurs de la maladie et environ 1 500 familles qui a touché des proches (Verhaart et coll., 2017).

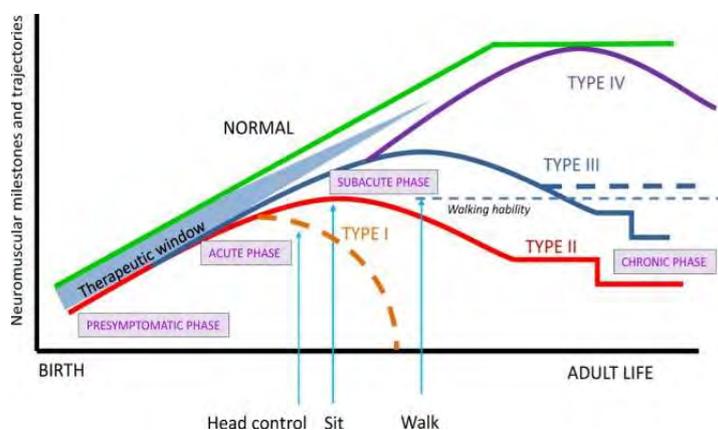


**Graphique 18,** Atteinte à l'amyotrophie spinale. Les commandes motrices sont générées dans le cortex cérébral et transmises par des motoneurones à moelle épinière (cellule dessinée en rouge dans le schéma et indiquée par la flèche verte en (A)). La région de la corne ventrale (B) d'un patient montre une absence de motoneurones par rapport au contrôle sain (A). Le muscle squelettique d'un patient (D) a des groupes de fibres atrophiques (pointe de flèche verte) autour des fibres hypertrophiques (pointe de flèche blanche) par rapport aux fibres qui ont une morphologie uniforme dans les muscles sains (C). Figure tirée de (Lunn, M.R. et Wang C.H., 2008) [17]

### 3.3.2 CLASSIFICATION CLINIQUE DE LA MALADIE

L'AS est très variable et il existe un large spectre de gravité clinique, de ce fait, la maladie est classée en quatre types (type 1-4) en fonction de l'âge d'apparition et de la capacité motrice maximale acquise par les personnes affectées (Dubowitz V, 1995; Wang C.H et coll., 2012). Certains auteurs incorporent un sous-type d'AS supplémentaire, de type 0 ou embryonnaire. Or, chez tous les patients, l'étude clinique et électrophysiologique est consistant avec une pathologie neurogénique dans laquelle la perte d'unités motrices et la détérioration fonctionnelle rapide ont lieu peu de temps après l'apparition de la maladie, généralement suivies d'une phase de stagnation dans laquelle la force musculaire reste relativement stable (Swoboda K.J et coll., 2005)

Le diagnostic et la classification de la maladie sont généralement effectués en premier par des paramètres cliniques : atrophie musculaire, tremblements, faiblesse, perte de réflexes, mouvements anormaux de la langue (fasculation) et dénervation ; puis confirmé par des tests génétiques (Kolb et Kissel, 2015; Russman, 2007).



**Graphique 19**, les jalons et les trajectoires neuromusculaires de la naissance à la vie adulte dans les types d'AS. L'AS de type I (rouge) a une phase aiguë avec un déclin rapide, où les patients n'obtiennent qu'un mauvais contrôle de la tête. Les patients de type II (orange), sans intervention, sont capables de s'asseoir, mais ne parviennent jamais à marcher de manière autonome. Les AS de type III (bleu) et IV (violet) ont un début tardif avec une détérioration plus stable qui leur permet de maintenir la capacité de marcher pendant des années. Les trajectoires de type 0 ne sont pas représentées. Le développement neuromusculaire normal est représenté par une ligne verte. Extrait de (Serra-Juhe & Tizzano, 2019). [18]

- **Type 0 ou prénatal**

L'AS de type 0 décrit une maladie avec un début prénatal. Les nouveau-nés de type 0 souffrent d'une faiblesse et d'une hypotonie<sup>8</sup> sévères et ont des antécédents de réduction des mouvements fœtaux.

Les fasciculations de la langue et l'insuffisance respiratoire rendent l'assistance respiratoire nécessaire pendant les premières heures de la vie. Les patients souffrent également d'un dysfonctionnement autonome et, dans certains cas, de malformations cardiaques congénitales (septum). L'espérance de vie est réduite et la plupart sont incapables de survivre au-delà de 6 mois. (Dubowitz, 1995; Macleod et coll., 1999).

- **Type I ou maladie de Werdnig-Hoffman**

C'est la forme la plus courante de la pathologie, représentant 50% des patients diagnostiqués atteints d'AS (Markowitz J.A. et al., 2004). Elle présente les manifestations cliniques les plus graves, étant diagnostiquée avant l'âge de 6 mois de vie (Pearn J.H et al., 1978). Les personnes touchées ont une hypotonie marquée et une faiblesse musculaire généralisée ; en conséquence, elles ne possèdent jamais la capacité de s'asseoir et les réflexes tendineux sont réduits ou absents (se manifestant généralement par une posture de « pattes de grenouille »). La plupart meurent avant les 2 premières années de leur vie, car les muscles intercostaux sont fortement affectés, ce qui entraîne une insuffisance respiratoire et un risque accru d'infection. Parfois, et avec un soutien respiratoire et nutritionnel, les patients peuvent survivre plus de deux ans. (Finkel et coll., 2014; Thomas et Dubowitz, 1994).

- **Type II ou maladie de Dubowitz**

Les patients atteints d'AS de type II sont diagnostiqués entre 6 et 18 mois de vie, ils sont capables de s'asseoir, mais la perte progressive de masse musculaire les empêche de rester insistants et de marcher. L'espérance de vie est faible, mais jamais inférieure à 2 ans de vie, et dans 70% des cas, ils vivent plus de deux décennies avec des soins de soutien (Mercury et

---

<sup>8</sup> Diminution du tonus musculaire se manifestant par une élasticité élevée de l'individu.

al., 2016). En raison de la faiblesse musculaire, ces patients ont souvent une cyphoscoliose, une courbure anormale de la colonne vertébrale, qui peut être corrigée par une intervention orthopédique et /ou chirurgicale (Talbot K, 1999; Lunn, M.R. et Wang C.H., 2008)

- **Type III** ou maladie de **Kugelberg-Welander**

Cette forme d'AS a été subdivisée en fonction de l'apparition de la maladie : le **type 3a** comprend les patients ayant un début antérieur, âgés de 18 mois à 3 ans, tandis que le **type 3b** couvre ceux dont l'apparition est ultérieure, entre 3 et 21 ans. Les personnes atteintes du type 3 d'AS peuvent marcher sans assistance, mais ont de la difficulté à courir, à monter des escaliers ou à monter une chaise. Finalement, à certains moments de leur vie, la faiblesse proximale progressive des jambes signifie que les patients finissent par avoir besoin d'un fauteuil roulant. Comme dans l'AS de type II, les comorbidités telles que la scoliose et la faiblesse des muscles respiratoires sont courantes. Bien qu'il soit fréquent que la maladie soit mortelle à l'âge adulte, avec un traitement adéquat, l'espérance de vie n'est pas modifiée dans ce groupe (Mercury et coll., 2016; Zerres et coll., 1997).

- **Type IV** ou **adulte**

En plus des trois formes d'AS chez les enfants, il existe un quatrième type où l'apparition de la maladie survient à l'âge adulte, généralement dans la deuxième ou la troisième décennie de la vie (Wirth B, 2002). C'est la forme la plus bénigne de SMA et aussi la plus rare car elle ne représente que moins de 5% des cas de SMA trouvés principalement chez les hommes. Le processus neurodégénératif est plus lent et les patients peuvent maintenir une vie relativement normale (ils n'ont pas de problèmes respiratoires et la capacité de marcher n'est pas perdue jusqu'à des stades très avancés), sans que leur espérance de vie ne soit réduite (Zerres K & Rudnikschoneborn S, 1995). Cependant, il est courant qu'une personne ait besoin d'utiliser un fauteuil roulant pour se déplacer (Piepers et coll., 2008).

Type d'AS	Âge d'apparition	Caractéristiques du diagnostic	Âge de la mort	Proportion vers l'AS total (%)
Type 0	Prénatal	Mouvement réduit dans l'utérus Assistance respiratoire requise au moment de la naissance	< 6 mois	-
Type I	< 6 mois	Hypotonie et manque de mouvement Incapacité pour s'asseoir	< 2 ans	60
Type II	< 18 mois	Incapacité pour s'asseoir ou marcher de façon indépendante	2 – 10 ans	27
Type III	> 18 mois	Peuvent perdre l'habileté pour bouger ou marcher à l'âge adulte	Espérance de vie normal	12
Type IV	Âge adulte (> 21 années)	Faiblesse légère du muscle proximal	Espérance de vie normal	1

**Tableau 3**, classification clinique de l'AS adaptée de (Cerveró C, 2016)

### 3.3.3 BASES GÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES DE LA MALADIE

#### 3.3.3.1 LE GÈNE SMN

L'identification du gène à l'origine de la maladie a commencé en 1990, lorsque, grâce à l'analyse des ligaments génétiques chez des patients atteints d'AS de type I, II et III, environ 10 cM<sup>9</sup> du **chromosome 5q11.2-q13.3** ont été limités à la région où il pouvait être localisé (Melki J et al., 1990 & Brzustowicz L.M et al., 1990). Le développement de nouveaux marqueurs polymorphes a permis de réduire l'intervalle à une région critique inférieure à un Mb (Melki J et al., 1993 & Wirth B et al., 1995). Enfin, en 1995, le *SMN* a été identifié comme le gène à l'origine de la maladie. Ceci est situé dans une région complexe d'environ 500 kb très instable, qui est liée à des réarrangements intrachromosomiques, y compris des duplications de gènes, des conversions de gènes et des délétions *de novo* (Lefebvre S et al., 1995).

En vise de ce qui a été commenté préalablement, dans la région génomique responsable de l'AS, on trouve deux copies du *SMN*: le gène *SMN1* (ou télomérique) et le gène *SMN2* (ou centromérique) (**Figure 20**). Les deux copies diffèrent par des changements nucléotidiques silencieux dans 5 positions spécifiques (Lefebvre S et al., 1995 & Burglen L et al., 1996). La différence critique causée par la

<sup>9</sup> Centimorgan, une unité de mesure de la fréquence de la recombinaison génétique. Cela équivaut à une probabilité de 1% que deux marqueurs d'un chromosome se séparent l'un de l'autre en raison d'un événement de recombinaison pendant la méiose (qui se produit lors de la formation des ovules et des spermatozoïdes). En moyenne, un centimorgan correspond à environ 1 million de paires de bases dans le génome humain.

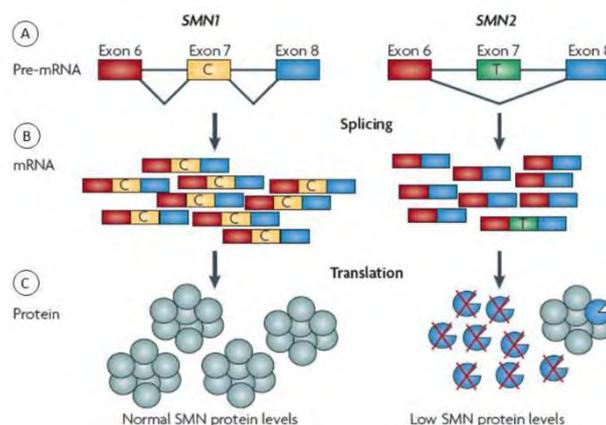
fonctionnalité partielle du gène *SMN2* est la transition d'un nucléotide C par un T à la position +6 dans l'exon 7.

Le gène *SMN* présente, au niveau génomique, une taille de 28 kb et se compose de 9 exons et 8 introns (Lefebvre S et al., 1995 & Chen Q et al., 1998). Les transcriptions du *SMN* ont une taille de 1,5 kb, sont exprimées dans tous les tissus somatiques et codent pour une protéine de 294 acides aminés et 38 kDa. Le niveau d'expression de la protéine dans la moelle épinière est de l'ordre de 50 à 100 fois plus élevé que celui d'autres tissus (Coovert D.D et al., 1997 & Lefebvre S et al., 1997).

Il convient de noter la haute conservation tout au long de l'évolution du gène *SMN*, qui est présent dans tous les organismes : des levures aux humains (Schrank B et al., 1997 ; Miguel-Aliaga I et coll., 1999 ; Paushkin S et coll., 2000). Cependant, la copie *SMN2* est exclusive aux humains, tandis que le reste des vertébrés et des invertébrés ont une seule copie appelée *SMN 1* (Rochette C.F et al., 2001). Environ 98 % des patients atteints d'AS présentent une perte fonctionnelle homozygote du gène *SMN1*, causée par des délétions, des réarrangements ou des mutations (Lefebvre S et al., 1997 & Hahnen, E., et al., 1995). D'autre part, toutes les personnes touchées conservent au moins une copie du gène *SMN2*. L'absence totale de *SMN* est embryonnairement létale. Ainsi, le degré de gravité de la maladie est inversement corrélé avec le nombre de copies de *SMN2* présentées par ces personnes (Wirth B, 2000).

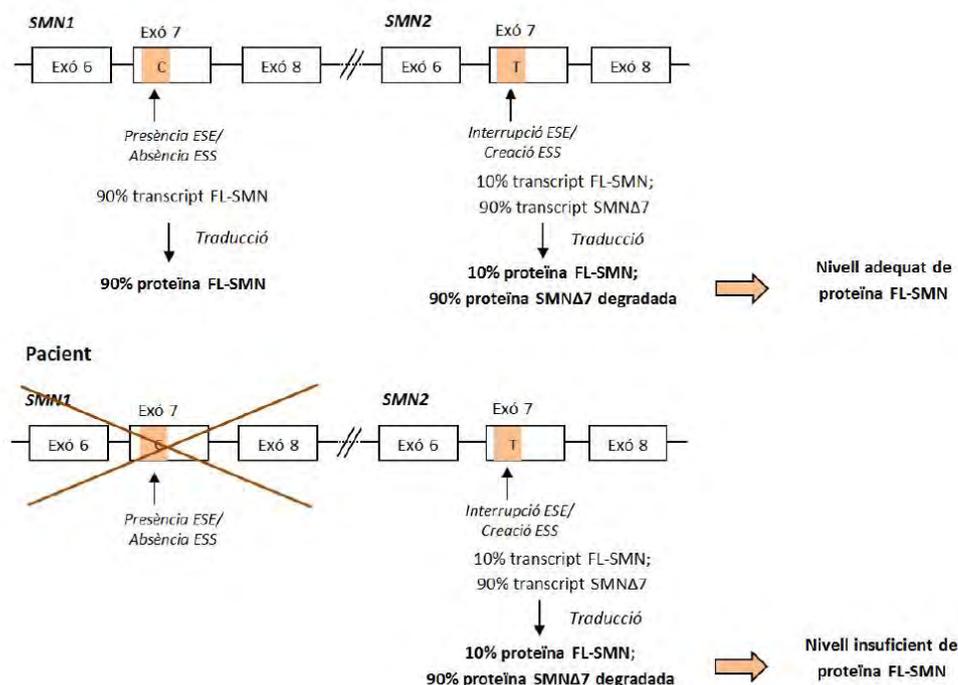
### 3.3.3.2 LE TRANSCRIT

Même si les gènes *SMN1* et *SMN2* diffèrent en 5 nucléotides, les changements sont silencieux lors de la traduction, codant ainsi pour la même protéine. Or, la variation d'un C par un T à la position +6 de l'exon 7 dans le gène *SMN2* modifie la séquence nécessaire à la maturation correcte de l'ARNm. D'une part, il a été décrit que le changement nucléotidique modifierait la séquence d'un ESE (*exonic splicing enhancer*), désactivant ainsi la capacité d'inclure un exon (Cartegni L & A.R. Krainer, 2002) ; d'autre part, il a été proposé que le passage de C à T créerait un nouveau ESS (*exonic splicing silencers*), provoquant ainsi le retrait d'un exon de la séquence (Kashima T. & J.L. Manley, Année 2003).



**Figure 20, Gènes SMN, maturation et traduction de l'ARNm.** La perte de SMN1 détermine des niveaux réduits de protéine SMN. **A)** Les gènes SMN1 et SMN2 présentent une séquence identique à l'99,9% avec un changement critique de C à T à la position +6 de l'exon 7. **B)** Cette variation nucléotidique affecte la maturation des ARNm, de sorte que la plupart des transcriptions du gène SMN2 ne possèdent pas l'exon 7. **C)** Le manque d'acides aminés codés par l'exon 7 confère une capacité d'oligomérisation réduite, réduisant l'efficacité et la stabilité du SMN protéine. Figure adaptée de (Burghes A.H & C.E. Beattie, 2009) et extraite de (Cerveró C, 2016) [19]

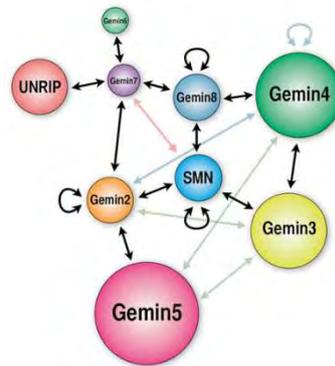
Même s'il n'y ait pas d'études concluantes pour expliquer le mécanisme, le résultat est une maturation alternative (ou un *splicing* alternatif) dans 90% des ARNm à partir de cette copie du gène (**Figure 20**). De ce façon, la traduction de ces ARNm alternatifs aboutit à une protéine tronquée, appelée SMNΔ7, de seulement 282 acides aminés où l'exon 7 est exclu (Lorson C.L et al., 1999; Lorson C.L. & E.J. Androphy, 2000) et possédant une capacité d'oligomérisation altérée (Lorson C.L et al., 1998). En conséquence, sa stabilité est réduite (**Figure 21**) par rapport à celle possédée par la protéine FL-SMN (*full-length*) du gène SMN1.



**Figure 21, Génétique de l'amyotrophie spinale.** Les patients atteints de SMA présentent des délétions homozygotes ou des mutations ponctuelles du gène *SMN1*, mais conservent toujours au moins une copie du gène *SMN2*. Figure adaptée de (Monani U.R, 2005), tirée de (Cerviό C, 2016) [20]

### 3.3.3.3 LA PROTÉINE

La protéine FL-SMN ou SMN, de 38 kDa, est constituée de 294 acides aminés et est exprimée de façon omniprésente<sup>10</sup> (Lefebvre et coll., 1995), avec des niveaux d'expression plus élevés chez les motoneurones de la moelle épinière (Coover D.D et coll., 1997). Au niveau subcellulaire, il est localisé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. La distribution cytoplasmique de la protéine SMN est diffuse, comme on l'observe avec les immunomarquages dans divers types de cellules, et fait partie d'un complexe multiprotéique stable appelé « complexe SMN ».



**Figure 22, Structure du complexe SMN.** La protéine SMN interagit directement et indirectement avec différents membres de la famille des protéines associées aux « gemmes » nucléaires. Figure tirée de (Cauchi R.J, 2010) [21]

Ce complexe est composé de la protéine SMN, gémines 2-8 et UNRIP (UNR *interacting protein* ou STRAP) (Figure 22). D'autre part, le noyau est situé formant des structures bien définies appelées « gémeaux de corps enroulés », des petites structures nucléaires pointues qui sont à proximité de corps roulés (Liu Q. & G. Dreyfuss, 1996; Burlet P et coll., 1998). Comme leur nom l'indique, ces structures sont similaires en taille et en nombre aux corps de Cajal (structures nucléaires enrichies en snRNP, la Ribonucléoprotéine Petite et Nucléaire susmentionnée (Fakan S et al., 1984) et sont fréquemment associées aux deux structures (Liu Q. & G. Dreyfuss, 1996).

<sup>10</sup> Il est donc présent dans toutes les parties du corps.

#### 3.3.3.4 FONCTIONS DE L'SMN

Afin de bien comprendre la pathologie de l'AS, il est nécessaire de mentionner les fonctions les plus caractéristiques et les rôles joués par la protéine exprimée par le gène SMN chez l'humain.

L'SMN est une protéine multifonctionnelle qui est localisée dans tout le cytoplasme, dans le noyau et dans l'axone et les NMJs des MN (Riboldi G.M et al., 2021) et fonctionne dans le cadre d'un complexe multiprotéique, le **complexe SMN**, qui joue un rôle essentiel dans la biogenèse du snRNP et le *splicing* de l'ARNm. Par conséquent, cette biogenèse du snRNP est altérée dans les cellules des souris d'AS.

Ces observations ont donné lieu à une question centrale : alors que la protéine SMN influence le traitement de l'ARN dans toutes les cellules, la protéine a-t-elle une fonction supplémentaire et unique dans les MNs ? Une explication parcimonieuse pourrait être que les conséquences dérivées d'un traitement altéré de l'ARN résultant d'une expression insuffisante du SMN ne sont pas favorables soit au développement des MNs, soit à la survie ou aux deux. En ce sens, puisque le transcriptome du MN est unique, une altération globale du *splicing*, par exemple, pourrait avoir un effet unique sur le transcriptome des motoneurones. Les fonctions pertinentes de la protéine SMN dans l'AS est un domaine de recherche actif qui promet d'ajouter à notre compréhension de la biologie fondamentale qui peut être pertinente dans d'autres troubles affectant la MN inférieur. (Kolb SJ et al., 2015)

La perte de plus d'une de ces fonctions contribue probablement à la dégénérescence du motoneurone. Or, la multifonctionnalité de SMN a été excellemment examinée ailleurs.

Ainsi, plusieurs études récentes illustrent deux fonctions différentes : l'SMN fait partie de la machinerie qui assemble les composants splicéosomaux. On a émis l'hypothèse que cela conduisait à une déficience générale de l'hélice et que les motoneurones y étaient particulièrement sensibles. Cependant, étant donné que l'épissage n'est pas un processus limité aux neurones ou aux MNs, il est possible que ce soit la fonction de « maintien » de la protéine SMN qui affecte toutes les cellules et tous les organes.

Une fonction plus spécifique est la participation de la protéine SMN dans le cytosquelette d'actine neuronal. Il interagit directement avec la prophyllaxie-2a, une protéine de liaison à l'actine qui y est spécifiquement exprimée. L'absence de la protéine SMN conduit à une accessibilité accrue de la prophyllaxie-2a pour sa Rho-kinase<sup>11</sup> située en amont (ROCA). En effet, la prophyllaxie-2a devient hyperphosphorylate en induisant un dérèglement neuronal spécifique du cytosquelette d'actine. (Riboldi G.M et al., 2021)

### 3.3.3.5 CORRÉLATION GÉNOTYPE/PHÉNOTYPE

Vues les corrélations génétiques et fonctionnelles, la question réside dans la façon dont le défaut d'un seul gène peut produire un large éventail de gravité clinique. La solution est simplifiée à la duplication génétique de SMN1, le gène SMN2, déjà présentée.

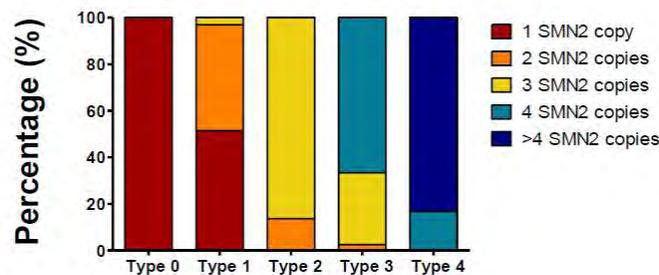
Des études subséquentes sur le génotype et le phénotype confirment que parmi les types d'AS, il existe une corrélation entre le nombre de copies génétiques de SMN2 et la gravité de la maladie (Lefebvre et coll., 1995; Mailman et coll., 2002). Au fur et à mesure que le nombre de copies de SMN2 augmente, la quantité de production stable de protéines SMN en toute sa longueur incrémente contemporanément, et la maladie se manifeste légèrement. Les patients atteints de la forme sévère d'AS, de type 1, ont généralement une ou deux copies de SMN2, tandis que les patients de type 2 et de type 3 d'AS la plupart ont des copies 3 et 4 de SMN2, respectivement.

Type d'AS	Copies SMN2	Niveaux d'SMN produits (%)
Type 0	1	5
Type I	1-2	10
Type II	2-3	15
Type III	3-4	20
Type IV	>4	25

**Tableau 4**, Nombre d'exemplaires et quantité de SMN produits en type différents types d'AS. Le nombre de copies du gène SMN2 détermine la quantité de protéine SMN produite et est donc en corrélation avec la gravité de l'AS (adapté de Mailman et coll., 2002; De-La-Fuente S, 2020).

<sup>11</sup> Protéine de type kinase qui est principalement impliquée dans l'émulation de la forme et du mouvement des cellules en agissant le soufre dans le cytosquelette. Voir plus dans la section sur les nouvelles stratégies thérapeutiques (3.4.2)

Même si le nombre de copies de SMN2 est le principal déterminant de la maladie, il est non seulement possible d'expliquer la variation de gravité clinique observée dans le phénotype d'AS à l'aide de ce phénomène. C'est le cas des patients discordants, où les patients atteints d'AS avec le même nombre de copies de SMN2 présentent des symptômes différents qui suggèrent l'existence d'autres facteurs modificateurs phénotypiques (Calucho et al., 2018).



**Figure 23**, Pourcentage du nombre de copies de patients pour chaque type d'AS. En 1995, la corrélation génotype/phénotype entre le nombre de copies du gène SMN2 et la gravité de l'AS a été découverte (d'après Mailman et coll., 2002). [22]

### 3.3.4 MODÈLES MURINS D'AMYOTROPHIE SPINALE

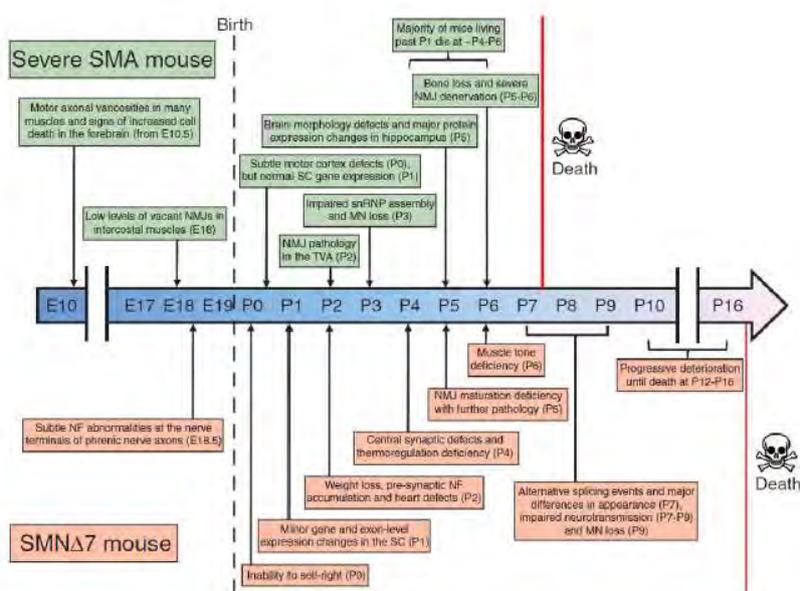
La découverte du gène SMN et sa haute conservation tout au long de l'évolution ont permis l'étude de la maladie grâce au développement et à l'analyse de divers modèles animaux qui présentent de nombreux symptômes pathologiques et électrophysiologiques observés chez les patients atteints d'AS. Parmi eux se trouvent des organismes invertébrés, tels que *Caenorhabditis elegans* (Briese M et al., 2009) et *Drosophila melanogaster* (Rajendra T.K et al., 2007 ; Chang H.C et al., 2008 ; Dimitriadi M et al., 2010), en plus des organismes modèles de vertébrés, y compris : *Dario rerio* (McWhorter M.L et al., 2003 & Boon K.L et al., 2009), *Xenopus laevis/tropicalis* (Ymlahi-Ouazzani Q et al., 2013 & Winkler C et al., 2005) et *Mus musculus* (Edens B.M et al., 2015).

L'étude et la caractérisation des modèles murins sont très utiles pour comprendre la fonction biologique du gène SMN dans le système nerveux et la pathogenèse de la maladie, car les souris sont parmi le large éventail de modèles animaux d'AS les plus largement utilisés ayant ceux-ci des caractéristiques neuromusculaires plus similaires à celles des humains. En outre, ils sont présentés comme un puissant outil préclinique pour tester d'éventuelles substances thérapeutiques.

Plusieurs stratégies ont été conçues pour développer des modèles qui récapitulent les caractéristiques pathologiques des patients atteints d'AS étant aussi similaires que possible au génotype humain qui cause la maladie. Comme mentionné ci-dessus, les souris possèdent un seul gène SMN qui produit des transcriptions complètes, équivalentes à celles du *SMN1* humain, et ne présentent aucune copie comparable au gène *SMN2* (Rochette C.F et al., 2001 & DiDonato C.J et al., 1997). Par suite, la délétion homozygote du gène murin SMN est létale sur le plan embryonnaire, provoquant une mort cellulaire massive avant l'implantation (Schrank B et coll., 1997). Deux groupes de recherche scientifique ont décrit un sauvetage de la létalité embryonnaire en exprimant le gène *SMN2* humain chez des animaux *knock-out* (KO) pour le SMN (Hsieh-Li, H.M., et al., 2000 & Monani, U.R., et al., 2000). En effet, ils ont démontré comment le nombre de copies du transgène modifiait la gravité de la maladie. Ainsi, les souris qui ont une ou deux copies du gène *SMN2* sont impossibles à distinguer des contrôles (WT) à la naissance mais meurent avant le jour postnatal 7 (P7) avec une perte de 40% des MNs. Ce modèle (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*<sup>+/+</sup>) est considéré comme une représentation de l'AS de **type I la plus grave (SMAT1)**. D'autre part, les animaux avec plus de quatre copies du gène *SMN2* présentent un sauvetage complet et une espérance de vie normale, ce qui indique qu'un incrément de l'expression de FL-SMN à partir de *SMN2* modifierait positivement la pathologie de l'AS.

Plus tard, sur la base de cette théorie, un deuxième transgène contenant l'ADN complémentaire du *SMN-2* humain a été introduit sur ce fond génétique, dans le but de créer un modèle moins sévère (Le T.T et al., 2005). Ce modèle, appelé « **SMNΔ7** » (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*<sup>+/+</sup>; *SMNΔ7*<sup>+/+</sup>), prolonge la demi-vie de l'animal jusqu'à 13 jours postnatals (P13) et présente des symptômes et une neuropathologie similaires à ceux des patients atteints **d'AS de type II**. La création de ce modèle a supposé une preuve *in vivo* que, bien qu'elle soit rapidement dégradée, la protéine SMNΔ7 conserve la capacité de s'associer à la protéine SMN et de stabiliser le complexe SMN.

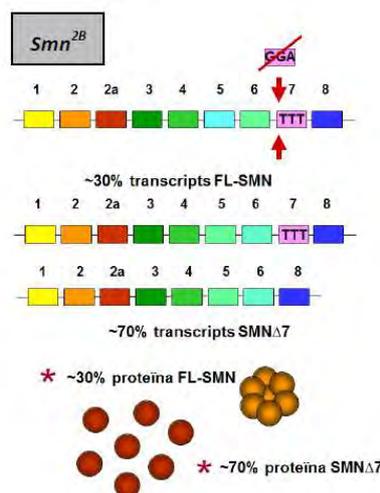
Dans ces modèles, les plus grandes considérations phénotypiques sont l'affectation des MNs et la réduction de la fonctionnalité motrice (**Figure 24**). La perte des MNs a été associée à des stades avancés de la maladie (Dachs E et al., 2011 & Monani U.R et al., 2000), de sorte que de nombreuses recherches se sont concentrées sur la pathologie des NMJs. Des défauts y ont été décrits, avant la mort neuronale, tels que l'accumulation de neurofilaments (NF) dans les terminaux présynaptiques, le manque de maturation et d'organisation des récepteurs de l'acétylcholine dans la structure postsynaptique, la réduction de la libération de vésicules synaptiques, la faible régulation des protéines présynaptiques et la présence de branches axonales isolées des NMJs (McGovern V.L et al., 2008 & Torres-Benito L et al., 2011).



**Figure 24,** Représentation temporelle des principaux événements cellulaires et symptomatiques au cours du développement embryonnaire et postnatal du modèle murin sévère ou de type I (*Smn*<sup>-/-</sup> ; *SMN2*<sup>+/+</sup>) et *SMNΔ7* (*Smn*<sup>-/-</sup> ; *SMN2*<sup>+/+</sup> ; *SMNΔ7*<sup>+/+</sup>). (Figure tirée de Sleight, J.N et coll., 2011) [23]

Dans un second temps, une approche différente pour réduire les niveaux de protéines SMN chez la souris a été fournie par Bowerman (Bowerman, M., et al., 2012) qui, sur la base d'une mutation décrite préalablement, (DiDonato C.J et al., 2001 & Hammond S.M et al., 2010) a créé un modèle murin d'AS appelé *Smn2B* / -. La mutation 2B, générée par une substitution de 3 nucléotides dans l'exon 7, modifie le *splicing* du gène SMN (**Figure 25**) de la même manière que l'altération produite par le

changement d'un seul nucléotide dans le gène *SMN2*, à la différence qu'un niveau plus élevé de protéine FL-SMN est exprimé par rapport à la protéine FL-SMN à partir de la traduction du gène *SMN2*. Par conséquent, avoir plus de protéines fonctionnelles entraîne la création d'un modèle murin plus doux d'AS, avec un début symptomatique ultérieur et qui représenterait, de manière plus réelle que les modèles les plus sévères, la pathologie des patients atteints de l'AS de **type II-III**.



**Figure 25, Mutation SMN2B et conséquences sur la traduction**. La substitution de 3 nucléotides dans l'exon 7 provoque une réduction de la production de la protéine FL-SMN, de sorte qu'environ 70% du résultat de la traduction est une protéine SMN Δ7. (extrait de Cerveró C, 2016) [24]

Cette caractéristique, ainsi que le fait qu'elle présente une progression plus lente et plus durable de la maladie, fait un modèle intéressant pour l'étude de la pathologie de l'AS au cours d'une évolution plus longue. D'autre part, il est présenté comme une alternative pour l'identification et le développement de stratégies thérapeutiques indépendantes du gène *SMN2*. De plus, ce modèle permet une approximation plus réelle de l'efficacité que les thérapies possibles pourraient avoir chez les patients ayant une affectation plus légère.

### 3.3.5 L'AMYOTROPHIE SPINALE EN TANT QUE PATHOLOGIE MULTISYSTÉMIQUE

#### 3.3.5.1 L'AFECTATION DU SYSTÈME NEUROMUSCULAIRE

Les caractéristiques cliniques prédominantes dans l'AS sont la faiblesse musculaire et l'atrophie attribuées au dysfonctionnement et à la perte des MNS. Or, la disponibilité limitée de matériel provenant de patients atteints d'AS limite une analyse approfondie au niveau cellulaire. La plupart des études menées à terme jusqu'à présent ont été réalisées dans des tissus d'autopsies de patients, de

sorte que les résultats ne correspondent qu'au stade terminal de la maladie (Crawford T.O & C.A Pardo, 1996). Ce fait a empêché une étude physiopathologique à un stade précoce, et il n'y a actuellement aucun consensus sur le type de cellule qui est le premier affecté dans la SMA. Par suite, deux hypothèses sont combattues pour répondre à cette question ; le premier indique que le MN est le premier type de cellule affecté par un déficit d'SMN ; alors que la seconde est fondée sur le fait que les structures cellulaires qui dégènèrent d'abord avec les structures cellulaires où se produisent les premiers événements moléculaires ne doivent pas nécessairement coïncider (Conforti L et al., 2007) défend une affectation initiale du muscle et des synapses, y compris les axones neuronaux et les plaques motrices, expliquant la dégénérescence du soma du MN à la suite d'une déconnexion (axonopathie distale ou « *dying-back* »).

Afin de connaître le tissu où commence la pathogénèse, plusieurs groupes de chercheurs ont étudié les effets directs dans certains tissus de la diminution du SMN, ainsi que la restauration de la protéine, en utilisant des modèles murins où le niveau de SMN était modulé dans des tissus spécifiques.

D'une part, en utilisant un modèle *knock-out spécifique* aux tissus et des souris avec un fond génétique de deux copies de *SMN2*, Park et son groupe de chercheurs (Park G.H et al., 2010) ont éliminé le SMN uniquement dans les cellules progénitrices des MNs, entraînant une dégénérescence neuronale et une faiblesse musculaire. Malgré la démonstration d'une exigence de SMN par ces motoneurones, le phénotype était moins sévère que celui montré par les souris *SMN $\Delta$ 7*, avec une survie de plus de 12 mois chez 70% des animaux étudiés. D'autre part, la réintégration sélective du SMN chez les MNs d'animaux *SMN $\Delta$ 7* a empêché le dysfonctionnement synaptique des NMJs, mais elle n'a pas empêché la mort neuronale, et l'effet global sur le phénotype neuromusculaire et la survie était relativement modéré (Martinez T.L et al., 2012). De plus, la restauration du SMN chez les MNs d'un modèle de SMA à létalité embryonnaire, malgré la prévention de la perte de synapses sensorimotrices, n'a augmenté la survie qu'à 5 jours postnataux ou **P5** (Gogliotti R.G et al., 2012)

Autrement, avec l'objectif de déterminer si les changements musculaires sont une conséquence de la dégénérescence des MNs ou s'ils contribuent directement à la pathogenèse de la SMA, Cifuentes et son équipe (Cifuentes-Diaz C et al., 2001) ont créé un modèle murin où le SMN a été sélectivement retiré du muscle squelettique. Le déficit en SMN a conduit à un phénotype sévère caractérisé par l'apparition d'une paralysie musculaire à trois semaines de vie, avec une demi-vie de 33 jours. En outre, des fibres nécrotiques entourées de cellules mononucléaires infiltrées, une désorganisation du sarcolemme, une diminution de la protéine dystrophine et une faible proportion de noyaux centraux ont été observées, indiquant ensemble une diminution de la capacité de régénération musculaire et une affectation intrinsèque du muscle en raison du déficit en SMN. Il convient toutefois de noter que ce modèle présentait une suppression complète du NMS au muscle, un scénario qui ne se produit pas dans le SMA, car, bien qu'il soit faible, il maintient un niveau nms.

Par conséquent, Iyer et d'autres auteurs (Iyer C.C et al., 2015) soutiennent que l'élimination du SMN uniquement dans le muscle, en utilisant un animal avec un fond génétique de deux copies de *SMN2* et *SMNΔ7*, n'a pas de conséquences phénotypiques. En outre, la restauration des niveaux normaux de SMN dans le muscle, à l'aide du modèle murin *SMNΔ7* et du modèle sévère (Gavrilina T.O et al., 2008) n'a causé aucun changement phénotypique par rapport aux animaux malades. Ces deux études complémentaires indiqueraient que le muscle maintient une fonction normale malgré des niveaux réduits de SMN et que toute altération serait une conséquence de dommages antérieurs à d'autres tissus. D'autre part, la restauration du SMN chez les progéniteurs des fibres musculaires a conduit à un sauvetage de la diminution de la taille des fibres ainsi qu'à une amélioration du phénotype moteur et de la survie, mais elle n'a eu aucun effet sur les synapses centrales ou les défauts au niveau des NMJs. En prenant en compte tous ces rapports fruits des expérimentations, on pourrait conclure que l'implication directe du muscle dans la pathogenèse de l'AS reste un débat controversé.

Dans l'ensemble, cela suggérerait que, bien qu'ayant été considéré comme une maladie purement neuromusculaire qui affecte les MNs et les muscles squelettiques, l'épuisement du SMN dans d'autres cellules et tissus au-delà du système neuromusculaire pourrait contribuer à la pathogenèse de la SMA, compte tenu d'une affectation plus répandue.

#### 3.3.5.2 LES EFFETS D'AUTRES POPULATIONS NEURONALES

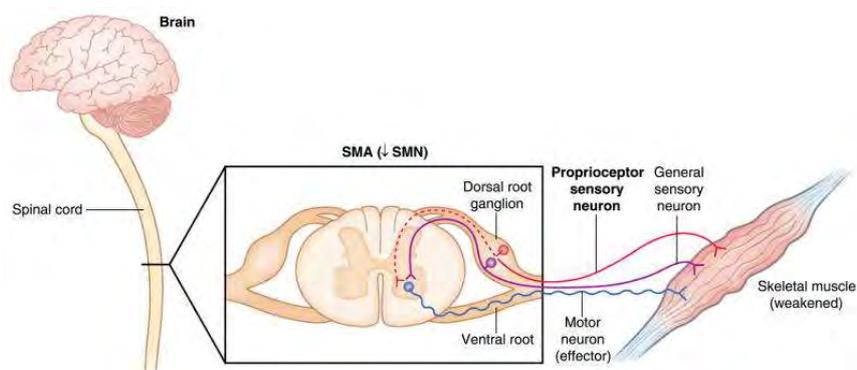
Il a été postulé que, chez les humains (Ito, Y., et al., 2004 & Shishikura K et al., 1983) et les souris, l'absence de SMN affecte d'autres populations cellulaires dans le cerveau. Par exemple, un modèle d'AS sévère a décrit une perte de neurones corticospinaux (par Errico P et al., 2013) ainsi que des problèmes de prolifération cellulaire et de neurogenèse<sup>12</sup>, entraînant des altérations du développement de l'hippocampe (Wishart T.M et al., 2010). D'autre part, la perturbation des voies sensorielles a été rapportée à la fois chez des patients atteints de la maladie (Rudnik-Schoneborn S et al., 2003) et dans plusieurs modèles murins (Jablonka S et al., 2006 & Ling K.K et al., 2010). De plus, il a été noté que dans le modèle SMN $\Delta$ 7, la perte du nombre et de la fonction des synapses afférentes (et donc de la connexion fonctionnelle entre les neurones sensoriels et les motoneurons de la moelle épinière) a lieu par étapes antérieures à la perte des MNs, survenant même aux stades prénataux (Mentis G.Z et al., 2011 et Tarabal O et coll., 2014). Toutes ces études suggèrent que cet événement à un stade précoce contribuerait à la pathogenèse et aux problèmes fonctionnels de l'AS. Néanmoins, d'autres études suggèrent que des défauts dans les connexions neuronales se produisent à la suite de la pathologie intrinsèque des MNs, arguant que la perte de synapses sensorielles peut être évitée en augmentant sélectivement les niveaux de SMN chez ce type de cellules.

En même temps, des études avec un modèle *KO de Drosophila melanogaster* pour le SMN suggèrent que le manque de protéine SMN affecte en premier lieu une sous-population de neurones sensoriels cholinergiques et d'interneurones spinaux et que, à la suite de l'altération de leurs fonctions, un dysfonctionnement des MNs a lieu (Tarabal O et al., 2014)

---

<sup>12</sup> C'est-à-dire la formation de cellules neuronales.

Même s'il n'existe pas d'études concluantes pour postuler le mécanisme définitif d'affectation des différentes populations neuronales et les connexions entre elles, il existe des preuves claires que les motoneurones ne sont pas la seule population neuronale affectée par des niveaux insuffisants de SMN (**Figure 26**).



**Figure 26**, circuit neuromusculaire dans l'amyotrophie spinale. Figure tirée de (Imlach W.L et al., 2012) [25]

### 3.3.5.3 LES EFFETS SUR LA GLIE

Les **astrocytes** ou la **glie** sont les cellules les plus abondantes du système nerveux central et remplissent des fonctions importantes dans des conditions normales, telles que le maintien de la barrière hémato-encéphalique, la sécrétion de facteurs de croissance et la régulation du métabolisme neuronal et de l'homéostasie, étant d'une importance vitale leur implication dans la mise en tampon des ions extracellulaires et des neurotransmetteurs (D.D. Wang, 2008). Des chercheurs plus récents attribuent à la glie, à la fois l'astroglie et la microglie, un rôle clé dans le contrôle de la formation des synapses neuronales ainsi que dans leur fonction, leur plasticité et leur élimination (Chung W.S et al., 2015).

La glie a été altérée dans les derniers stades de plusieurs pathologies du système nerveux (Ransohoff R.M & V.H. Perry, 2009), y compris l'AS, où une activation astrogliale et microgliale marquée a été analysée. Des études menées dans le modèle murin SMN $\Delta$ 7 et dans les astrocytes de cellules pluripotentes induites de patients ont décrit des altérations morphologiques de ces cellules, en plus d'une augmentation des taux de calcium basal et d'une diminution de la réponse aux stimuli ATP, fait qui témoigne d'une altération de la fonction des astrocytes dans la neuropathologie de l'AS (McGivern

J.V et al., 2013). En outre, la restauration des niveaux de SMN dans la glie, en plus des MNs, a un impact plus important sur la survie des animaux malades, par rapport à la réinitialisation exclusive chez les motoneurones (McGovern V.L et al., 2015). De plus, la restauration du SMN uniquement dans les astrocytes, à l'aide de plusieurs modèles murins (SMN $\Delta$ 7 et Smn2B $^{-/-}$ ), a révélé un incrément de la survie et de l'atténuation de l'astrogliose, ainsi qu'une diminution partielle des défauts dans les NMJs et une perte de synapses proprioceptives (Rindt H et al., 2015).

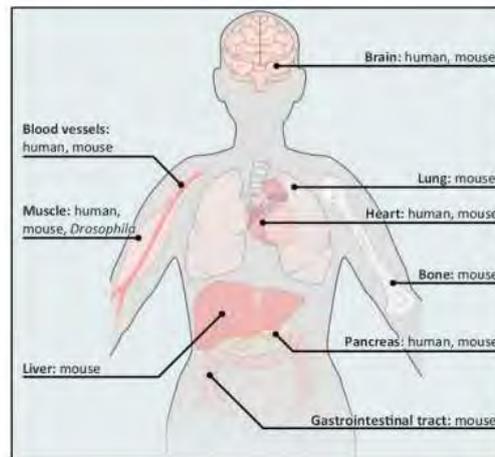
Tandis que l'astrogliose et la microgliose marquées dans l'AS ont été documentées dans les stades finaux, le dysfonctionnement et la perte de synapses peuvent survenir à des stades plus précoces, ce qui signifierait, en tenant en considération de tous les résultats susmentionnés ainsi que de l'implication de la glie dans le bon fonctionnement des synapses, que cette population du système nerveux central pourrait être directement impliquée dans cette neuropathologie.

#### 3.3.5.4 AUTRES AFFECTATIONS DANS LES CELLULES ET LES TISSUS AU-DELÀ DU SYSTÈME NERVEUX

De plus en plus, les études rapportent l'AS comme une pathologie des cellules et des tissus au-delà du système neuromusculaire. Les malformations cardiaques et les arythmies sont l'un des phénotypes périphériques les plus courants chez les patients et les modèles murins atteints (Heier C.R & C.J. DiDonato, 2009; Bevan A.K et coll., 2010). En supplément, des malformations cardiaques structurales qui précèdent le dysfonctionnement du MN (Shababi M et coll., 2010) et qui peuvent exister indépendamment de la pathologie neuromusculaire et de la déconnexion ont été décrites. Il est intéressant de noter que, dans un modèle d'AS sévère, les traitements basés sur l'incrément des niveaux d'SMN provoquent une diminution des malformations cardiaques. Toutes ces observations suggèrent un rôle crucial du SMN dans le développement et la fonction cardiaques (Shababi M et al., 2012). En addition, le pancréas, le foie, les poumons et les intestins ont été signalés comme étant affectés; ainsi que les anomalies vasculaires, la nécrose et les anomalies de la teneur et de la densité des minéraux dans les os (**Figure 27**). De même, des niveaux insuffisants de SMN ont également été associés à des altérations du système immunitaire de souris atteintes d'AS sévère, où une atrophie de

la rate et du thymus a été observée, et une apoptose massive dans le cortex de ce dernier. (Cerveró C, 2016)

Etant donné qu'il existe un consensus définitif, l'affectation de tissus et d'organes non neuronaux a été aperçue en parallèle avec la pathologie du système nerveux et des muscles, ce qui suggère que la carence en SMN provoquerait un trouble multisystémique et non une maladie pure du système neuromusculaire.



**Figure 27**, Diagramme de la pathologie systémique dans l'amyotrophie spinale. Plusieurs organes et tissus ont été affectés dans la SMA. Les organismes où la pathologie a été observée sont indiqués. Figure tirée de (Hamilton G & T.H Gillingwater, 2013) [26]

## 3.4 STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DE L'AS

### 3.4.1 STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES ACTUELLES

#### 3.4.1.1 STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES SPÉCIFIQUES

Dans cette étude, les stratégies thérapeutiques utilisées ont été classées en fonction des pathologies que l'on peut voir dans le phénotype du patient. Comme déjà mentionné ci-dessus, il n'est pas seulement basé sur l'atrophie musculaire due au dysfonctionnement du système neuromusculaire, mais d'autres conditions graves ont également été observées. (**voir rubrique 3.3.5**)

- **Paralysie :**

La principale caractéristique de l'AS est la faiblesse musculaire progressive et l'atrophie. Dans les cas les plus graves, cette atrophie peut finir par produire une paralysie musculaire. Conséquemment, afin de maintenir la force musculaire et de prévenir les articulations rigides, une physiothérapie contrôlée et de l'exercice sont recommandés. Or, à mesure que la maladie progresse, le soutien orthopédique des bras et des jambes, les appareils de marche orthopédiques, les synthétiseurs vocaux et les fauteuils roulants, et accompagnés de périodes vitales avec capacité motrice, sont des éléments qui peuvent devenir nécessaires (Finkel et coll., 2018; Mercury et coll., 2018).

- **Complications pulmonaires :**

Une autre pathologie des patients atteints d'AS, plus spécifique cependant, est l'affaiblissement du mucus intercostal qui provoque la dépendance exclusive au diaphragme pour respirer (bien que leur action ne soit effectuée que par inhalation). Par la suite, il conduit à une détérioration respiratoire progressive. Cela provoque une hypoventilation pendant le sommeil, une toux altérée avec un nettoyage inadéquat des sécrétions des voies respiratoires inférieures et une pneumonie récurrente. La diminution de la fonction respiratoire se termine généralement par la mort des patients en raison d'une insuffisance respiratoire. La prise en charge existante pour traiter les problèmes respiratoires comprend des exercices respiratoires, une aspiration orale des muqueuses pour éclaircir la gorge, la vaccination contre

la grippe et, dans les cas les plus graves, une ventilation assistée pour soutenir la respiration (Finkel et coll., 2018; Mercury et coll., 2018).

- **Complications orthopédiques :**

L'une des complications les plus courantes chez les patients est le développement de la scoliose, des contractions articulaires et des luxations de la hanche. Sans traitement, la scoliose progressive peut affecter la fonction pulmonaire et la fonction cardiaque, dans les cas graves. Initialement, le traitement de la colonne vertébrale le problème est l'utilisation d'une barre arrière, pour forcer la colonne vertébrale à se développer correctement et soutenir le dos. Dans les cas plus graves, une intervention chirurgicale est nécessaire pour redresser la colonne vertébrale avec des crochets métalliques et des baguettes (Finkel et coll., 2018; Mercury et coll., 2018).

- **Problèmes nutritionnels :**

La dysmotilité<sup>13</sup> gastro-intestinale dans l'AS entraîne une vidange gastrique retardée, constipation, reflux par aspiration et gastro-œsophage. Si les muscles de la mâchoire et de la gorge sont également affectés, ils peuvent causer des difficultés à avaler et à se nourrir, ce qui entraîne une perte de poids et affecte la croissance des enfants. Les retards de croissance et les problèmes nutritionnels peuvent être traités avec un régime strictement réglementé ou des sondes d'alimentation dans les cas les plus graves (Finkel et al., 2018; Mercury et coll., 2018).

- **Acidose métabolique :**

Le métabolisme aberrant du glucose peut comporter une acidose métabolique sévère avec acidurie dicarboxylique et de faibles concentrations de carnitine sérique, ce qui peut être prévenue en évitant le jeûne prolongé chez les patients atteints d'AS (Finkel et al., 2018; Mercury et coll., 2018).

---

<sup>13</sup> Le cou, les muscles du système digestif ou les nerfs qui les contrôlent ne fonctionnent pas comme ils le devraient.

### 3.4.1.2 STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES NON SPÉCIFIQUES

Dans la maladie, il est courant d'utiliser des médicaments qui n'ont pas été spécialement conçus pour celle-ci. Ils sont utilisés pour traiter des symptômes spécifiques ou pour prévenir les complications dans la pathologie. Le plus courant est l'utilisation de relaxants musculaires (tels que le baclofène, la tizanidine, les obenzodiazépines) pour éviter la raideur et la tension musculaire, autrement appelée spasticité. D'autres médicaments soit le Botox (onabotulinumtoxinA), l'amitriptyline, l'Robinul (glycopyrola) ou l'AtropPen (atropine) sont utilisés pour prévenir la production excessive de salive et les spasmes de la mâchoire (Finkel et al., 2018; Mercury et coll., 2018).

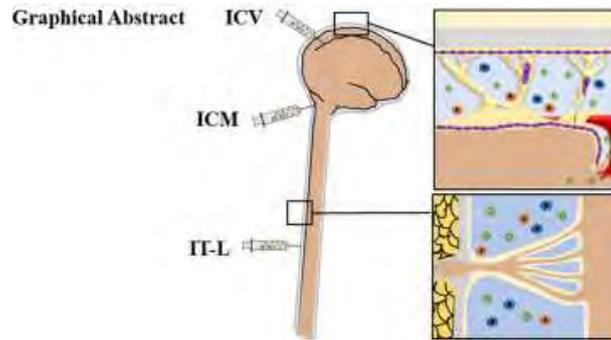
- **Nusinersen SPINRAZA® :**

*Nusinersen* (SPINRAZA-Biogen; Cambridge, MA, États-Unis) c'était le premier traitement approuvé vers l'AS par la FDA (*Food and Drugs Administration*), pendant le Décembre 2016. Les bons résultats obtenus dans l'essai clinique type aléatoire III<sup>14</sup> appelé ENDEAR ont été décisifs. Dans un essai en double aveugle (avec des patients témoins et traités) avec 121 enfants avec AS type de I et avec seulement 6 administrations de *Nusinersen* (environ un an de traitement), le 30% des patients ont montré une nette amélioration dans la fonction motrice: garder la tête assis ou debout, pendant que qu'aucun patient faisant partie du groupe contrôle n'a atteint le succès de ces jalons (Finkel et coll., 2017).

L'extension des répétitions avec *Nusinersen* ont montré que le traitement est capable de prévenir la mortalité et l'assistance respiratoire et maintenir un développement normal ou presque normal chez les patients atteints d'AS lorsque le traitement est présymptomatique (Neil et Bisaccia, 2019).

---

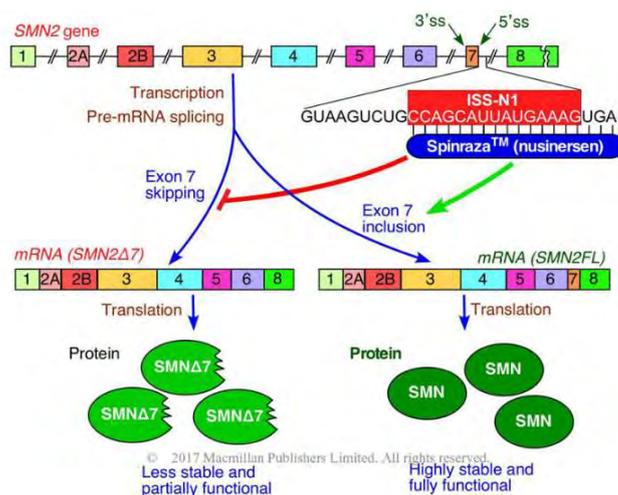
<sup>14</sup> Qu'il prouve si un nouveau traitement est sûr et fonctionne bien par rapport au traitement standard.



**Figure 28**, Injection intrathécale. Figure adaptée de (M.G Fowler et al., 2020) [27]

*Nusinersen* est présenté dans une solution injectable de 12 mg / 5 ml pour administration intrathécale (**Figure 28**), c'est-à-dire par ponction lombaire. Lors de son administration, un volume de liquide équivalent à ce qui sera administré céphalo-rachidien (LCR) doit être préalablement évacué, à l'aide d'une technique aseptique et évaluant le besoin de sédation (Finkel RS et al., 2016). L'utilisation des techniques d'imagerie pour guider l'administration intrathécale peut également être analysée, en particulier chez les patients les plus jeunes et ceux atteints de scoliose. (AEMPS, 2018)

Pharmacologiquement, *Nusinersen* est un oligonucléotide antisens (ASO) modifié avec du 2'-O- (2-méthoxyéthyle). Les ASO sont des chaînes de nucléotides synthétiques courts conçues pour se lier à des ARNm spécifiques pour la complémentarité des bases azotées, établissant des liaisons de pont hydrogène. Plus précisément, *Nusinersen* vise l'ESS dans l'exon 7 du pré-ARNm du *SMN2*. Le médicament déplace les pRNP de l'ESS, ce qui facilite l'*splicing* correct des transcriptions du *SMN2*, y compris l'exon 7, et entraîne la production complète de SMN. Cela produit une augmentation des niveaux de protéine SMN fonctionnelle dans les cellules, en retardant la progression des symptômes de la maladie (Figure 17) (Chiriboga, 2017).



**Figure 29,** Le mécanisme d'action du Nusinersen est basé sur la modulation de l'épissage alternatif du gène SMN2, pour remplacer le déficit de SMN1. C'est un oligonucléotide (fraction d'ADN à 18 bases) qui agit en augmentant l'inclusion de l'exon 7 dans l'ARN produit par le gène SMN2 et collabore à la production de la protéine pleine longueur. Figure tirée de (J Hugh, 2019) [28]

Comme établi ci-dessus, les molécules d'ASO ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique, elles doivent donc être administrées directement au SNC, par injection intrathécale. Le schéma posologique est dans une solution injectable de 12 mg / 5 ml par administration avec une vitesse contrôlée de 1 à 3 minutes. Le schéma d'administration commence par 3 doses initiales séparées quatorze jours (jours 1, 15, 30) et 35 jours après le quatrième (jour 60). Des doses d'entretien sont administrées tous les quatre mois par vie (Chiriboga, 2017).

Le prix de chaque flacon de *Nusinersen* 12mg/5ml (en solution injectable) a un coût de 70 000\$, de sorte que le coût annuel est de 750 000 \$ la première année de traitement et de 375 000\$ pour les années suivantes.

Comme tout autre, le traitement de *Nusinersen* a des effets secondaires non seulement en termes du traitement lui-même, mais également d'administration intrathécale. Les effets indésirables les plus courants décrits sont : fièvre, maux de tête, maux de dos, vomissements, protéurie, thrombocytopenie, thrombose secondaire, infection des voies respiratoires

inférieures avec obstruction des voies respiratoires (atélectasie), des voies urinaires infection, hyponatrémie (faible concentration sanguine de sodium), perte de poids et infections à méningite associées au score lombaire (Aslan et coll., 2019; Chiriboga, 2017).

Classification des troubles et des effets indésirables	SPINRAZA 12 mg N = 80	Pacients contrôle N = 41
Troubles respiratoires, thoraciques ou médiastinaux*	7	10
Troubles cardiaques	2	2
Troubles NH	2	0
Infections et infestations	0	0
Mort	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>13</b>

**Tableau 5,** troubles et effets divers selon l'essai clinique mené par la FDA pour l'approbation de Nusinersen SPINRAZA. (\*blessures typiques du médiastin, entre le sternum et la colonne vertébrale). Adapté de FDA, 2016)

En Espagne, la distribution de *Nusinersen* a été légalisée en 2018 selon le Rapport et positionnement thérapeutique (IPT) de l'Agencia Estatal de Medicamentos y Productos Sanitarios et en soi, l'étude ENDEAR réalisée est parvenue aux conclusions suivantes :

- Dans l'AS de type I, *Nusinersen* a démontré un effet positif sur la fonction motrice, la fonction respiratoire et la survie. Cependant, il existe une grande variabilité dans la réponse au médicament. Environ la moitié des patients ne montrent aucune amélioration et celles obtenues pourraient devenir très discrètes. Le bénéfice était plus important chez les patients présentant une évolution de la maladie de plus en plus faible et chez les patients présymptomatiques présentant 2 ou 3 copies du gène SMN2. Étant donné que les patients atteints de la maladie de type 0 ont une maladie extrêmement grave, la possibilité d'obtenir un bénéfice cliniquement pertinent avec le médicament peut être très faible. Les patients qui n'ont qu'une seule copie du gène ne sont pas représentés dans les études pivots, qui incluent des patients avec 2-3 copies.

- Dans l'AS de type II et III, le traitement avec *Nusinersen* a montré un effet positif sur la fonction motrice, sans aucune donnée pour le moment sur l'amélioration de la survie. Le bénéfice était également plus important chez les patients présentant moins d'évolution de la maladie et moins de gravité.

- **Zolgensma**

*Onasemnogene abeparvovec*, anciennement AVXS-101, a été véritablement développé par AveXis en tant que marque déposée, *Zolgensma Novartis*. Il s'agit de la première thérapie génique (TG) et du deuxième médicament approuvé (actuellement en vigueur aux États-Unis) pour le traitement de l'AS. La FDA a approuvé en mai 2019 l'utilisation de *Zolgensma* sous certaines conditions. Dans le dernier essai clinique, des deux qui ont été réalisés, les résultats sont très prometteurs. Dans le dernier procès financé par le projet NeuroNEXT, avec 16 nourrissons atteints d'AS de type I et 27 en bonne santé, une amélioration de la fonction motrice et une augmentation de la survie à 24 mois de suivi du 100% ont été rapportées par rapport aux 38% obtenus à la suite d'une étude précédente (NN101) avec des patients non traités d'âge et de caractéristiques similaires (Al-Zaidy et al., 2019).

*Zolgensma* utilise la TG pour restaurer les niveaux fonctionnels des protéines SMN dans les cellules. Il fonctionne en utilisant un *virus adénoassocié* (AAV) génétiquement modifié avec un vecteur hybride promoteur du cytomégalo virus (amplificateur / poulet- $\beta$ -actine) (CMV) pour intégrer une copie fonctionnelle du gène SMN1 dans les noyaux des MNs des patients (Rao et al., 2018).

Ce traitement exceptionnel n'est administré par voie intraveineuse qu'une seule fois dans la vie du patient. Son administration n'est indiquée qu'aux patients atteints d'AS de type I âgés de moins de deux ans présentant des mutations bi-alléliques<sup>15</sup> du gène *SMN1*. La posologie réelle recommandée de *Zolgensma* est un vecteur  $1.1 \times 10^{14}$  génomes par kilogramme (kg) de

---

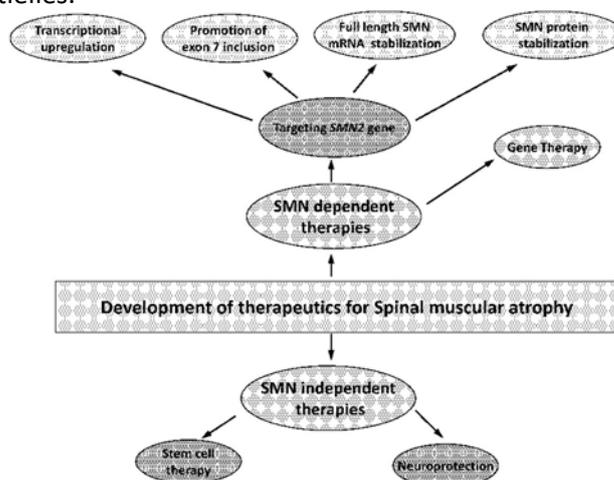
<sup>15</sup> Les porteurs de bi mutations allélique ils ont une mutation dans les deux copies d'un gène spécifique (une mutation d'origine paternelle et une mutation d'origine maternelle). C'est-à-dire qu'ils sont des individus homozygotes récessifs (aa).

poids corporel. Son principal inconvénient et la raison pour laquelle ce médicament fait l'objet d'une telle controverse est son coût élevé, fixé à 2,1 millions de dollars, incarnant ainsi le médicament le plus dispendieux qui existe (Malone et al., 2019).

En tant qu'effets indésirables, *Zolgensma* peut interagir avec les corticostéroïdes et certains vaccins, tels que le vaccin viral triple (rougeole, papier et rubéole) ainsi qu'avec des infections semblables à la varicelle, provoquer des vomissements et peut synthétiser des enzymes spécifiques dans le foie (aminotransférases) qui produisent des blessures graves. Force est de constater qu'il n'existe pas encore de liste complète d'effets secondaires, qui pourraient entraîner d'autres complications pas encore décrites (mise à jour de Rao et al., 2018).

### 3.4.2 NOUVELLES THÉRAPIES

Malgré les résultats spectaculaires décrits pour les deux traitements d'AS déjà approuvés et en vigueur sur le marché (*Zolgensma* seulement en EEUU), il convient de souligner que l'effectivité et l'innocuité à long terme n'ont été évaluées dans aucune des thérapies susmentionnées. De la même manière, ils ont également d'autres limitations, en dehors de leurs effets secondaires, leur prix élevé peut ne pas les rendre accessibles à toute la population mondiale. C'est la raison pour laquelle nous continuons d'étudier cette question de la maladie, non seulement pour comprendre la complexité génétique et moléculaire de la neuropathologie de l'AS, mais aussi pour développer de nouvelles approches thérapeutiques potentielles.



**Figure 30,** Stratégies de développement de nouvelles thérapies pour l'AS. Les stratégies générales de traitement de l'AS sont axées sur des stratégies qui tentent de compenser en tout ou en partie l'absence de SMN1 (en utilisant la thérapie génique

pour le restaurer ou en dirigeant le locus du gène *SMN2*) ou en utilisant des stratégies qui ne dépendent pas du niveau de protéines *SMN* (basé sur Tariq et al., 2013). [29]

#### 3.4.2.1 THÉRAPIES DÉPENDANTES DU SMN

Dans le contexte de ce qui a déjà été décrit, il existe une corrélation inverse entre les niveaux de protéine *SMN* et la gravité de la maladie de l'AS. Cela implique que l'incrément des niveaux de *SMN* pourrait empêcher la dégénérescence des MNs et, par conséquent, le développement d'AS. Il existe deux mécanismes principaux pour y parvenir : soit remplacer le gène affecté, soit se concentrer sur le gène *SMN2*.

Un large éventail de thérapies ont été réalisées chez des souris atteintes d'AS dans le but d'augmenter les niveaux de la protéine *SMN*, donnant à certaines d'entre elles des effets bénéfiques prometteurs (Lorson C.L. et al., 2010). L'objectif d'accroître les niveaux de protéine *SMN* a été abordé par différentes stratégies (Nurputra D.K et al., 2013). Ainsi, compte tenu que la quantité de protéine FL-*SMN* est en corrélation inverse avec la gravité de la maladie et que le gène *SMN2* maintient un pourcentage minimum de la production de FL-*SMN*, il faut s'attendre à ce qu'une stratégie largement étudiée consiste à augmenter la quantité de protéine endogène du FL-*SMN* produite par celui-ci.

D'un côté, des composés pharmacologiques ont été utilisés pour activer le promoteur du gène *SMN2*. Ces composés peuvent être divisés en **inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDAC)**, tels que le phénylbutarate de sodium, le resvératrol, le SAHA (vorinostat) et l'acide valproïque et **d'autres agents**, notamment: salbutamol agoniste<sup>16</sup>  $\beta$ -adrénergique, dérivés de la quinazoline C5 et antibiotiques tels que les tétracyclines ou l'antibiotique  $\beta$ -lactam ceftriaxone, inhibiteurs de GSK3, prolactine et agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'indoprofène et le célécoxib (Faraz Farooq et coll., 2013)

D'un autre côté, un approche alternatif pour augmenter les niveaux de protéines *SMN* est l'introduction exogène de *SMN1* soit par correction de *SMN1* anormal à l'aide d'une thérapie génique

---

<sup>16</sup> Médicament ou substance qui se lie à un récepteur à l'intérieur ou à la surface d'une cellule et produit la même action que la substance qui se lie normalement au récepteur.

utilisant des vecteurs viraux (Sivanesan S et al., 2013) ou par thérapie cellulaire avec des méthodes de greffe de cellules souches (Corti S et al., 2008; 2010; 2012). Une autre option pour incrémenter les niveaux de protéine SMN fonctionnelle consiste à stabiliser la protéine SMN $\Delta$ 7, réduisant ainsi la susceptibilité à la dégradation. Des différents aminoglycosides ont été testés à cette fin (Mattis V.B et al., 2006; 2009).

#### 3.4.2.2 THÉRAPIES INDÉPENDANTES DU SMN

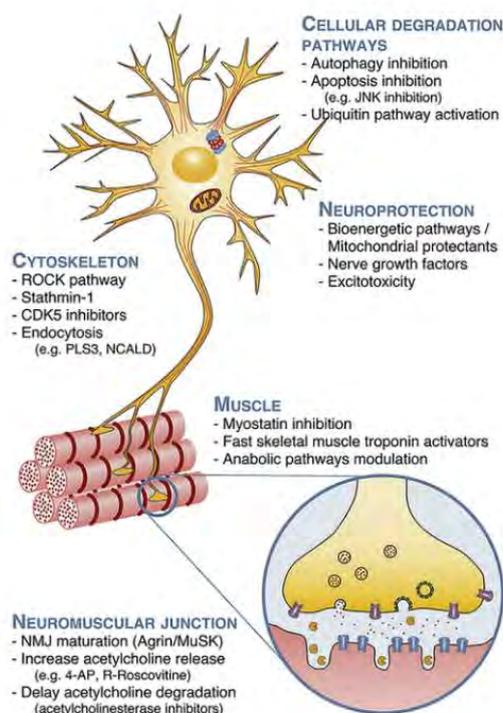
Malgré que le rétablissement des niveaux de SMN soit la clé pour prévenir l'apparition de la maladie, il existe des preuves suggérant que ce type de traitement ne serait efficace que si l'intervention était effectuée aux premiers stades de la maladie (Lutz C.M et al., 2011). Au-delà de ce point, il serait d'une importance vitale d'orienter les thérapies vers les voies moléculaires et les activités cellulaires qui sont affectées par le déficit en SMN et qui sont pertinentes dans la maladie.

Au cours des dernières années, plusieurs cibles et stratégies indépendantes des SMN ont été étudiées. Certains d'entre eux, sinon la grande majorité, se concentrent sur la promotion de la **neuroprotection** pour prévenir la dégénérescence et la mort des MNs (Comley L.H et al., 2022). Dans ces études thérapeutiques se trouvent celles qui ont un effet neurotrophique, comme la cardiotrophine-1 ou le facteur neurotrophique ciliaire, en plus de celles qui cherchent une protection contre les mitochondries ou une réduction de la toxicité du glutamate par l'agent pharmacologique *riluzol* ou *gabapentine* (Chaytow H et al., 2021)

En revanche, d'autres thérapies visent à améliorer les conditions pathologiques dans les tissus musculaires non neuronaux, en particulier, basées sur la préservation des jonctions synaptiques neuromusculaires telles que les médicaments: *Pyridostigmine* ou *Salbutamol* (Comley L.H et al., 2022).

Parmi ces dernières figurent des stratégies visant à atténuer l'atrophie musculaire, telles que l'inhibition de la myostatine par la folistatine afin d'augmenter la masse musculaire et la force, comme c'est le cas avec le produit pharmacologique *Domagrozumab* (Rose F.F Jr et al., 2009; Sumner C.J et al., 2009 ; Rindt H et coll., 2012) ou l'expression du facteur protéique IGF-1 (*facteur de croissance*

*analogue à l'insuline-1*) (Bosch-Marce M et coll., 2011; Murdocca M et al., 2012). Ainsi que ceux visant à moduler la dynamique des axones, qui incluent la surexpression de la protéine Plastin-3 (McGovern V.L et al., 2015) – qui a entraîné le sauvetage partiel de la pathologie des MNs, en particulier la structure et la fonction des NMJs, sur un large éventail de modèles animaux d'AS alors qu'il ait été insuffisant pour inverser la pathologie dans un modèle murin sévère –, ou des inhibiteurs de la protéine **rho kinase** qui affectent la croissance, la différenciation et la neurorégénération, agissant sur le cytosquelette cellulaire, comme cela peut être le cas du médicament *Fasudil* (Bowerman M et al., 2010; 2012; Comley L.H et al., 2022). (Voyez l'annexe)



**Figure 31, Représentation schématique des principaux objectifs thérapeutiques indépendants des SMN.**

En raison des diverses fonctions cellulaires et de l'expression omniprésente du SMN, la carence en SMN entraîne des changements dans de nombreux processus et organes cellulaires, qui ont été identifiés comme des cibles thérapeutiques possibles. Pour plus de clarté, nous classons ces cibles en dégradation de la voie cellulaire, neuroprotection, cytosquelette, muscle et liaison neuromusculaire, mais certaines thérapies peuvent être étendues à des fins multiples. Adapté de (Comley L.H et al., 2022) [30]



---

**CADRE PRATIQUE**

Comme il a été préalablement annoncé, l'idée initiale de ce travail était de pouvoir réaliser une partie pratique en rapport avec l'étude des applications de la thérapie génique (TG) en l'AS. Néanmoins, cette ambition est née avant de faire des recherches approfondies sur le sujet en question et d'entrer en contact avec des experts compétents. C'est pourquoi, au fur et à mesure que les concepts et les informations sur ce domaine ont été établis, il a été conclu que la réalisation d'une partie pratique telle que celle mentionnée ci-dessus échappait aux ressources et aux capacités de l'auteur de ce travail, en raison de la non-viabilité de pouvoir être réalisée sur le territoire de l'État. Par conséquent, c'est ainsi qu'il a appris l'existence du groupe de pathologie neuromusculaire expérimentale à l'*Institut de Recerca Biomèdica de Lleida* (IRB Lleida) qui étudie les bases cellulaires et moléculaires des troubles neuromusculaires, en particulier les maladies propres des motoneurones, telles que la *Sclérose Latérale Amyotrophique* (SLA) et l'*Amyotrophie Spinale* (AS). Sans aucun doute, cela a donné lieu à un séjour absolument enrichissant.

Ainsi, dans ce travail, le traitement sera effectué dans des modèles murins de l'AS avec l'une des stratégies thérapeutiques présentées dans l'une des sections précédentes (3.4.1.1), *Nusinersen SPINRAZA*.

## HYPOTHÈSE

Sur la base de ce qui vient d'être présenté et des connaissances acquises dans ce travail, l'hypothèse suivante a été formulée :

*« Peut-être que la stratégie thérapeutique Nusinersen SPINRAZA est efficace pour le traitement de la neuropathologie de l'amyotrophie spinale »*

## APPROCHE

L'ensemble du processus expérimental a été réalisé à l'IRB Lleida, en particulier dans les laboratoires du groupe expérimental de pathologie neuromusculaire, dirigé par le Dr Jordi Calderó Pardo. Plus précisément, le travail a été encadré par la chercheuse Olga Tarabal, docteur en biologie moléculaire

et spécialiste dans le domaine, qui m'a accompagné tout au long du processus et de l'exécution de la conception expérimentale.

Dans le but de prouver mes hypothèses, le cadre pratique consistait à traiter les modèles murins d'AS avec Nusinersen SPINRAZA, comme ceci a déjà été mentionné ci-dessus.

Afin de le mener à terme, la première partie de l'expérience a consisté à maintenir une colonie de souris transgéniques pour servir de modèles de AS aussi fidèles que possible à celui d'un humain, et l'extraction de l'ADN pour procéder au génotypage avec un test de séquençage et à connaître en fonction des niveaux de protéines du gène SMN, s'ils sont porteurs de la maladie.

Deuxièmement, une fois que le nombre de souris contrôle et patients a été classé par une petite marque avec de l'encre sur les membres postérieurs, le médicament a été injecté par voie intracérébroventriculaire. De la même manière, il a été décidé lesquels seraient sacrifiés et dans lesquels la longévité serait évaluée.

Ensuite, sur une base quotidienne pendant la période du séjour, des tests comportementaux ont été effectués pour évaluer la capacité motrice des souris et pour effectuer une étude comparative des souris contrôle, des souris traitées, des patients et des *wild type*.

En vue de compléter le travail, deux spécimens de souris ont été abattus, l'un traité et l'autre patient, afin d'extraire une partie de la moelle épinière et les muscles de l'un des membres postérieurs. Par la suite, les échantillons ont été préparés.

Éventuellement, la technique d'immunohistochimie a été appliquée où, grâce à un microscope bifocal, il a été possible de visualiser la variété de structures morphologiques mentionnées tout au long de ce travail et de conclure par une étude comparative pour déterminer l'efficacité de *Nusinersen SPINRAZA*.

Les résultats et les discussions seront divisés en chapitres afin d'englober différents aspects analysés dans des concepts plus larges qui permettent une meilleure interprétation.

## MATÉRIAUX ET MÉTHODES

### 4.1 ANIMAUX ET ENTRETIEN DE LA COLONIE

Comme il a été observé tout au long de la thèse, ce travail se concentre sur la pathologie neuromusculaire de l'AS dans les modèles murins transgéniques. Les animaux sont logés, en particulier dans l'animalerie située au 4<sup>ème</sup> étage du bâtiment Biomedicine-2 de l'*IRB Lleida*, selon les exigences nécessaires : avec un régime *ad libitum* et une atmosphère contrôlée en termes de température, d'humidité et de cycles lumière-obscurité.

Il convient de mentionner qu'avant d'interagir avec un animal situé à l'intérieur de l'usine, il est nécessaire de suivre un protocole rigoureux de vêtements avec robe, sabots, casquette, masque et gants jetables, car les colonies pourraient être fortement contaminées par le contact de tout agent externe en raison de la stérilisation absolue de l'environnement.

Tant la conception expérimentale comme l'entretien des souris ont suivi les lignes directrices publiées dans le décret réglementant l'utilisation des animaux pour l'expérimentation de la Generalitat de Catalunya dans le cadre des directives du Conseil européen.

Dans notre cas, la ligne de souris utilisée était la suivante :

**FVB.CgGRM7<sup>TG(SMN2)89AHMB</sup> SMN1<sup>TM1MSD</sup> TG(SMN2\*DELTA7)4299AHMB/J**

Ces souris sont conçues en utilisant des techniques de génie génique au *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, États-Unis), au prix de 214,25 \$ / souris. Ils sont homozygotes pour l'allèle rapporteur *lacZ*, des mutants ciblés par le SMN et homozygotes pour les allèles transgéniques présentent des symptômes et une neuropathologie similaire à ceux des patients atteints d'amyotrophie spinale proximale.

Les souris triples homozygotes du fond génétique FVB / N sont sensiblement plus petites que les compagnons de portée normaux à la naissance et présentent une faiblesse musculaire progressive. À P5, les signes de faiblesse musculaire sont évidents et deviennent progressivement plus prononcés au cours de la semaine suivante, car les souris présentent une démarche anormale, des tremblements

des membres postérieurs et une tendance à tomber. En 2006, le taux de survie moyen était d'environ 13 jours. Les cohortes testées au Jackson Laboratory en 2013 montrent un décès compris entre P15 et P22 (survie moyenne de 17,7 jours). L'analyse immunocytochimique indique que l'expression de la dystrophie est normale, mais les fibres isolées du muscle gastrocnémien à l'aide d'un triple mutant de 14 jours montrent clairement des signes d'atrophie.

Ainsi, il s'agit d'une souris triple mutante contenant deux allèles transgéniques et un mutant nul cible unique. Le transgène *Tg(SMN2\*delta7)4299Ahmb* est constitué d'un ADNc d'AS qui n'a pas d'exon 7, tandis que le transgène *Tg(SMN2)89Ahmb* est constitué de l'ensemble du gène *SMN2* humain. L'allèle rapporteur mutant *lacZ* orienté au SMN remplace l'expression endogène du SMN par l'expression *lacZ*.

En ce qui concerne sa création, l'allèle mutant cible a été créé dans le laboratoire du Dr Michael Sendtner de l'Université de Würzburg, en Allemagne.

En 2021, une souche d'éleveurs homozygotes pour les transgènes et hétérozygotes pour l'allèle nul a été examinée pour obtenir des données sur l'héritage. Il a été conclu que 17 des 26 unités reproductrices produisaient une progéniture (65,4 %), avec une taille moyenne de portée d'environ 7 enfants. Sur les 251 chiots génotypés à l'âge de 5 jours, 56 étaient homozygotes (22,3 %).

The Jackson Laboratory maintient cette souche en élevant des souris ensemble qui sont homogènes pour les deux transgéniques ( $\Delta 7SMN^{+/+}$  ;  $SMN2^{+/+}$ ) et hétérozygotes pour l'allèle nul ( $Smn^{+/-}$ ) ou de type sauvage (WT) dans le locus *SMN1* ( $Smn^{+/+}$ ). Ces couples reproducteurs sont typiquement normaux et ne présentent pas de symptômes de la neuropathologie.



**Figure 32.** Camarade souris P1 avec leur mère, dont 4 souffrent de SMA. Remarquez les marques avec de l'encre verte non toxique effectuées sur les membres.

## 4.2 TESTS D'HABILITÉ MOTRICE ET DÉTERMINATION DU POIDS DE L'ANIMAL

Tandis que l'AS est une pathologie neuromusculaire, il est crucial de déterminer la progression de la maladie et la motricité des modèles murins, tant sur le plan des souris type contrôle (KO) et de type sauvage (WT) comme Knockout (KO). Dès lors, une série d'essais comportementaux ont été effectués quotidiennement au petit matin, fixés en fonction de l'âge de l'animal. Plus précisément, ceux-ci ont été réalisés au 3ème étage du bâtiment *Biomedicine 2* à *IRBLleida* lui-même. Dans le même temps, une observation de chaque animal a été faite pour détecter l'apparition de signes et de symptômes de la maladie et leur poids a été mesuré.

Les méthodes et les types de tests mis en pratique seront mentionnés ci-dessous:

### 4.2.1 RIGHTING REFLEX (RR)

Dans ce type d'essai, les animaux sont situés sur une surface complètement plate et en position décubitus dorsal (de façon que la partie postérieure du dos fasse contact avec la surface). Le succès ou l'échec du repositionnement est évalué, ainsi que le temps passé, avec un temps maximum de 30 secondes ; en tenant compte du fait qu'en général les souris sont généralement agiles car ce n'est pas une position naturelle et défie leur contrôle corporel. Le test est considéré comme réussi, seulement lorsque les 4 membres sont correctement situés pour commencer à marcher.

Dans notre cas, trois répétitions ont été effectuées avec le temps nécessaire entre elles pour laisser les animaux se reposer.

### 4.2.2 TUBE TEST (TT)

Ce test évalue la fonction neuromusculaire et la posture corporelle chez les nouveau-nés, et en particulier la force, la faiblesse et la fatigue des muscles proximaux des pattes postérieures (El-Khodor B.F et al., 2008). Ce test fonctionne jusqu'à P10 dans le cas des modèles *Smn2B*<sup>-/-</sup> et jusqu'aux étapes terminales dans le SMN $\Delta$ 7.

Le test consiste à mettre l'animal en position décubitus ventral (à l'envers qu'au décubitus dorsal, face vers le bas) de sorte qu'il soit attaché avec les membres postérieurs à un tube centrifuge de 50 ml de capacité, contenant une certaine quantité de coton au fond pour protéger l'animal de la chute.

Trois répétitions ont été effectuées avec le temps nécessaire entre elles pour laisser les animaux se reposer. Tout en évaluant deux paramètres :

**Temps TT.** Temps nécessaire à la souris pour tomber, avec un temps maximum de 30 secondes.

**Score TT.** Score qui varie entre 0 et 4 en fonction de la position de la queue et des jambes plus tard pendant les 10 premières secondes .



**Figure 33, Essai du « test en tube » et critère de notation en fonction de la position de la queue et des pattes postérieures.** Score de 4, indique une séparation normale des pattes postérieures et une position de la queue complètement surélevée (A); score de 3, les pattes postérieures ont une légère inclinaison d'un côté mais n'atteignent pas à être en contact (B); score de 2, les jambes sont plus proches et souvent touchées (C); score de 1, les pattes sont presque toujours en contact (D) et la queue a un état dressé avec des dénottations de faiblesse ; le score de 0 indique un contact continu des pattes (E) et de la queue complètement plate (F) ou l'incapacité de l'animal d'effectuer l'essai . Image tirée de (B.F El-Khodor, 2008) [31]

#### 4.2.3 MARQUAGE

Plus tard, après le séquençage PCR et le processus de génotypage, chaque souris a été tatouée en utilisant la même gamme verte indépendamment des membres (antérieurs, A, ou postérieurs, P), afin de les identifier et, par la suite, identifié chaque échantillon selon le numéro de portée. Plus précisément, une encre non toxique de *Fine Science Tolls GmbH*, Heidelberg, Allemagne a été utilisée.

Bref, un code établi a été suivi pour classer les animaux :

MARCAGE DES SOURIS			
N°	Patte	N°	Patte
1	PPD	9	PPD-PAG
2	PPG	10	PPG-PAD
3	PAD	11	PP-PAD
4	PAG	12	PP-PAG
5	PP	13	PA-PPD
6	PA	14	PA-PPG
7	PD	15	4P
8	PG	16	∅

### 4.3 GÉNOTYPAGE DES ANIMAUX

Tous les animaux utilisés étaient génotypés pour assurer la présence ou l'absence de transgènes. Le génotypage est compris comme le processus de laboratoire permettant d'analyser l'ADN de la lignée germinale d'un individu avec le but d'identifier des nucléotides ou des bases spécifiques permettant de déterminer la présence de certaines variantes. Ainsi, en même temps que les animaux étaient tatoués, un fragment de la queue a été coupé pour obtenir l'ADN nécessaire à leur génotypage. Pour exécuter le séquençage<sup>17</sup>, la technique PCR a été utilisée. À cet égard, le *kit de PCR tissulaire REExtract-N-Amp* de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, États-Unis) contient les réactifs nécessaires à l'extraction de l'ADN et à la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour mener à terme ce processus. Toutefois, pour que l'amplification des gènes soit analysée, une combinaison de 3 *primers* était nécessaire. De cette façon, chez les animaux WT, une bande de 800 paires de bases (pb) est apparue, chez les animaux malades, le fragment amplifié avait une taille de 500 pb et chez les hétérozygotes, les deux côtés ont été observés.

Conséquemment, les étapes suivantes ont été effectuées en suivant les recommandations du fabricant.

#### Matériel:

- Un fragment de queue des différentes portées de souris lesquelles ont été classées comme *Wild Type* ou contrôle (WT) et malades ou *Knock-Out* (KO).
- Les différents primers 5' → 3' précédemment acquises auprès du laboratoire Sigma-Aldrich (étant les mêmes pour l'*SMAT1* et *SMAΔ7*) :
  - Forward (Fwd) primer: Pour le gène SMN commun aux souris de type WT et KO avec le gène interrompu.  
**5' CTCCGGGATATTGGGATTG 3'**
  - Reverse 1 (Rev1) primer : spécifique au gène SMN des souris WT.  
**5' GGTAACGCCAGGGTTTCC 3'**

---

<sup>17</sup> C'est-à-dire le processus par lequel l'ordre précis de bases azotées d'une chaîne d'Adn est obtenu

- Reverse 2 (Rev2) ou Cassette primer: c'est le primer inverse spécifique aux souris de type KO avec le gène SMN interrompu.

**5' TTTCTTCTGGCTGTGCCTT 3'**

- Comme mentionné ci-dessus, le *kit de PCR tissulaire REExtract-N-Amp* employé, également du même fabricant, contient :
  - Solutions pour l'extraction de l'ADN:
    - 24 ml de Solution d'extraction
    - 3 ml de *Tissue preparation solution*
    - 24 ml de *Neutralization Solution B*
  - Le réactif principal pour la PCR
    - *REExtract-N-Amp™ PCR Reaction Mix*; qui comprend un tampon, des sels, des dNTPs, des polymérase Taq, un colorant REDTaq® et l'anticorps JumpStart Taq.
- Tampon TAE (solution tampon formée par Tris) à 1x
- Agarose 1x

#### 4.3.1 EXTRACTION DE L'ADN

Chaque fragment de queue, qui spécifiquement dans l'expérience étaient 13, a été disposé dans un tube eppendorf du polypropylène taille grand (1,5 ml de capacité). De cette façon, pour chaque file d'attente ont été introduits 40 µl de solution d'extraction et 10 µl de *Tissu preparation solution*. Par la suite, un total de 250 µl de solution d'extraction et 130µl de



*tissu preparation solution* ont été calculés. Ensuite, nous avons incubé les dissolutions pendant 10 minutes à température

**Figure 34**, l'auteur a canalisé la solution avec une solution d'extrait et une préparation tissulaire dans les 13 queues pertinentes pour 2 pattes différentes.

ambiante. Passé ce délai, les échantillons ont été réchauffés pendant 3 minutes à 95°C, puis 50 µl de *neutralisation solution B* ont été ajoutés par échantillon. Enfin, les échantillons ont été centrifugés à la vitesse maximale pendant 10 minutes et nous avons recueilli les particules surnageantes dans un

nouveau tube eppendorf. Ainsi, l'extrait s'y trouvait préparé pour l'utilisation immédiate dans la PCR, autrement il est souhaitable de le conserver à 4°C pendant une période maximale de 6 mois.

#### 4.3.2 PRÉPARATION DE LA PCR

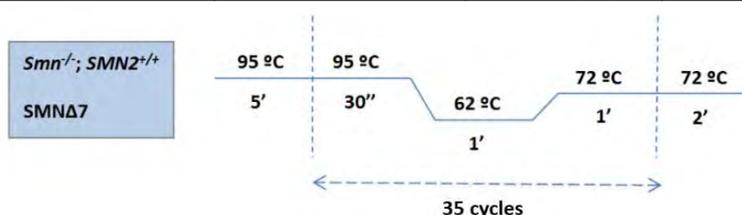
Il est à noter que le *kit de PCR RedExtract-N-Amp Tissue* comprend aussi un anticorps JumpStart™ Taq pour la PCR de démarrage en chaud qui empêche l'activation prématurée de l'ADN polymérase Taq à température ambiante et améliore la spécificité.

Ainsi, le mélange de réaction de la PCR a été préparé selon le protocole suivant :

Réactifs	Volumes
Tampon d'extraction Red	4,65 µl
Eau stérilisée milliQ	3,15 µl
Fwd Primer	1,2 µl
Rev 1 primer	0,6 µl
Rev 2 primer	0,4 µl
<b>VOLUME TOTAL</b>	<b>10 µl</b>

Dans cette voie, pour chaque 10 µl de solution, 2 g de la solution d'ADN extrait ont été ajoutés dans de nouveaux tubes eppendorf d'une capacité de 1,5 ml. Ensuite, les échantillons ont été introduits dans le thermocycleur avec les paramètres suivants (de l'étape 2 à 5, le processus a été répété 35 fois):

Pas	Température (°C)	Temps (min)	Cycles
Dénaturation initiale	94	5	1
Dénaturation	94	30	35
Recuit	62	1	
Élongation	72	1	
Élongation finale	72	7	1
Retention finale	4	Indéfiniment	



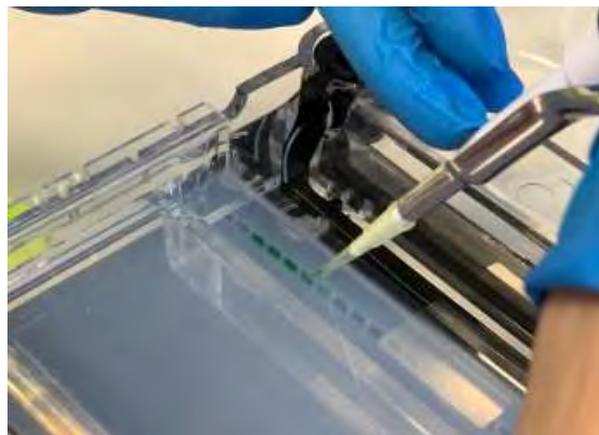
### 4.3.3 PRÉPARATION DU GEL D'AGAROSE ET ÉLECTROPHORÈSE

Contemporain à la réaction d'amplification, le gel d'agarose a été préparé à 1x pour faire couler l'ADN par électrophorèse. C'est pourquoi nous avons dissous 2g d'agarose dans 200ml de 1x TAE, en le chauffant par périodes d'1 minute au micro-ondes jusqu'à ce que les particules d'agarose en suspension deviennent imperceptibles.

Le mélange a été inséré dans la cuvette d'électrophorèse, puis le peigne avec les dépôts et laissé se solidifier.

Une fois l'amplification de l'ADN terminée s'était culminée, les échantillons ont été chargés dans les dépôts (environ 5  $\mu$ l) de telle sorte que les différentes portées de rongeurs ont été distinguée grâce à la séparation qui nous a permis de visualiser les sections avec le marqueur de poids moléculaire ou *ladder* qui nous a facilité à son tour d'estimer la taille des produits résultant de la PCR.

Ensuite, la séparation des fragments d'ADN a été réalisée en soumettant la cuvette à une tension de 100V pendant une période de 30 minutes, c'est-à-dire jusqu'à ce que les échantillons ont coulé dans leur intégralité. Finalement, les fragments d'ADN ont été visualisés avec de la lumière ultraviolette à l'aide d'un transilluminateur (ou dispositif d'éclairage par transparence) du système d'imagerie *ChemiDoc XRS* (Bio-Rad).



**Figure 35**, technicien de laboratoire chargeant les puits du gel d'agarose avec 20  $\mu$ l de la solution d'ADN pour poursuivre l'électrophorèse.

## 4.4 TRAITEMENT AVEC L'AGENT THÉRAPEUTIQUE

### 4.4.1 CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTS MODÈLES MURINS

Une fois que les souris ont été génotypées, les classifications appropriées ont été effectuées au sein de la même colonie. Ainsi, les WT étaient toujours destinés au contrôle ou au sacrifice pour faire une étude comparative de la moelle épinière et du motoneurone. Dans le cas des souris KO, ceux-ci ont été dérivés à :

- Survie
- Sacrifice
- Traitement avec NUSINERSEN SPINRAZA
  - Survie
  - Sacrifice

### 4.4.2 ADMINISTRATION DE LA DOSE DE NUSINERSEN SPINRAZA

Ainsi, après avoir connu le nombre de modèles pathogènes KO, la quantité qui devrait être allouée au traitement par Nusinersen SPINRAZA a été débattue. En particulier, dans ce processus d'expérimentation, il y avait 4 modèles KO dont 2 étaient destinés à la survie et le reste à traiter.

Cette procédure a été développée avec une extrême prudence en raison de la complexité du travail avec les rongeurs P1, et ce qui implique le travail dans des dimensions aussi minuscules, ainsi que le coût économique élevé du médicament (comme on a déjà mentionné dans les sections précédentes), étant parmi les 3 médicaments les plus dispendieux dans le monde.

#### **Matériaux**

- Plateau en polystyrène avec chiffons en microfibre
- Plateau en polystyrène avec de la glace à l'intérieur
- Panneau en acier inoxydable
- Feuille d'acétate

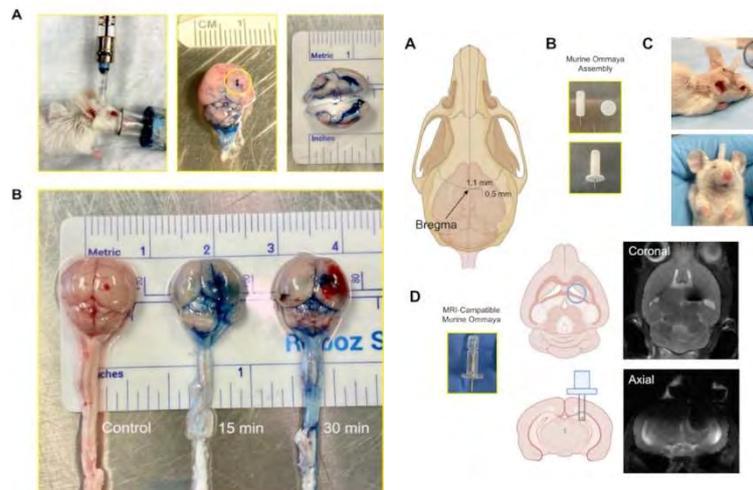
- Eau (H<sub>2</sub>O)
- Seringue Hamilton série 700 10 µl capacité
- Nusinersen SPINRAZA flacon, 12 mg

### Procédure

1. Initialement, en raison de l'incapacité d'utiliser l'anesthésie pour la taille des souris, elles ont été incitées à dormir sur une surface en acier inoxydable qui avait été précédemment disposée au-dessus d'un plateau avec de la glace. Cette procédure prend une période de 5 minutes.
2. Une fois que les souris ont été trouvées endormies, elles ont reçu une dose de 5 ml de Nusinersen SPINRAZA par injection intrathécale, de sorte que le médicament a pu accéder au SNC en traversant la barrière hémato-encéphalique.

Pour ce faire, la dose a été injectée à un point de distance de 1,1 mm à droite et de 0,5 mm au bas du point crânien « bregma », où le cathéter Ommaya serait implanté chez l'homme adulte.

L'injection a été exécutée lentement afin que les autres structures du corps ne souffrent pas d'altérations indésirables (c'était un processus d'1-2 minutes).

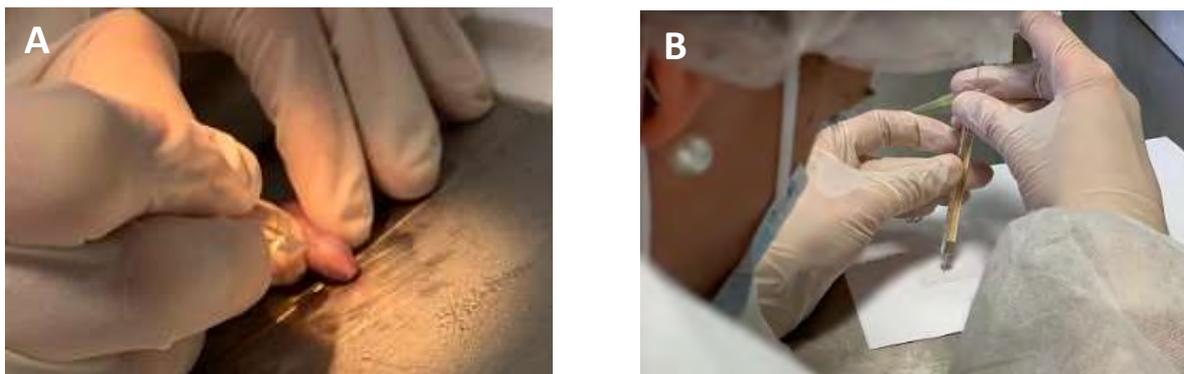


**Figure 36**, point crânien où l'injection intracérébroventriculaire a été effectuée, dans ce cas, pour simuler le locus du cathéter Ommaya dans des modèles murins à l'aide d'encre non toxique. Figure tirée de (V Loi, 2021) [32]

3. Effectuées l'injection intracérébroventriculaire, les souris ont été placées dans un environnement chaud (composé par des chiffons en microfibre à l'intérieur du plateau en polystyrène).
4. Enfin, un lavage a été effectué avec des gouttes d'eau non seulement pour assurer la sortie totale de l'agent thérapeutique mais aussi dans le but de recalibrer la seringue sous pression.

Force est de noter que les souris traitées ont également subi des tests quotidiens de comportement et de mobilité dans le cadre de l'étude comparative.

Rémarque : Avant l'injection intracérébroventriculaire avec le médicament, des tests ont été effectués avec de l'encre non toxique pour ratifier les mesures calculées à partir du point de bregma et corroborer qu'il a correctement irrigué le SNC (**Figure 36**).



**Figure 37, (A)** Injection intracérébroventriculaire chez une souris SMA P1 avec une seringue Hamilton d'une capacité de 10 l. Dans le processus, l'aide du Dr Jordi Calderó a été nécessaire pour exécuter patiemment l'agent thérapeutique. ( **$\mu$ B**) Technique de laboratoire effectuant le nettoyage de la seringue avec des gouttes d'eau.

## 4. 5 LA DISSECTION DU RONGEUR

### 4.5.1 PERFUSION

En vue de procéder à la dissection des souris pour extraire un fragment de la moelle épinière et des muscles postérieurs droits, il est d'abord nécessaire d'effectuer un processus de perfusion afin de libérer toutes les cavités corporelles du tissu sanguin et de les durcir pour faciliter la dissection ultérieure. En raison de sa complexité, l'ensemble de ce processus a été exécuté avec l'aide de deux techniciens de laboratoire en voie d'achever leur doctorat.

#### **Matériel**

- Grille
- Plateau blanc
- Panneau de polystyrène avec 4 aiguilles d'insuline
- Bêchers en verre avec solution saline ou NaCl 0,9% (9 g NaCl + 1L de H<sub>2</sub>O)
- Fiole d'erenmeyer en verre avec PFA (Paraformaldéhyde) 4%
- Bêchers en plastique avec H<sub>2</sub>O
- Pompe de perfusion
- Anesthésie : Kétamine 10% + Xylazine 2%
- Scalpel
- Ciseaux chirurgicaux moyens
- Ciseaux chirurgicaux petites
- Pincés Kocher
- Aiguille et canule de perfusion

#### **Préparation préliminaire**

- 1) Une réservation préalable a été faite pour la hotte aspirante qui se trouve dans la salle de cryostat du bâtiment BIOMED1, 1er étage.

- 2) Le plateau blanc, la grille et au-dessus du panneau de polystyrène ont été placés, où la souris a ensuite été immobilisée, tout à l'intérieur de l'hôte.
- 3) La pompe de perfusion a été déplacée dans la salle du cryostat où le goutte-à-goutte a été branché et placé haut, c'est-à-dire au-dessus de la carafe. Il fallait que ce dernier soit remplacé par un nouveau (situé dans la salle des loupes) puisque d'un jour à l'autre de perfusion, il se bloque.
- 4) Du PFA à 4 % a été placé dans une fiole d'erlenmeyer, ainsi que du NaCl 0,9 % dans un bécher et du H<sub>2</sub>O dans un autre bécher. Ainsi, tous les conteneurs ont été disposés sur l'étagère inférieure de la pompe.
- 5) Enfin, il était important d'affiner la bombe :
  - a) Le tube inférieur du circuit de la pompe a été inséré à l'intérieur de la cuve de précipité avec NaCl 0,9%, et puis il est allumé.
  - b) Une fois que la solution est arrivée dans le goutteur, il était nécessaire qu'elle s'accumule, de cette façon, elle pouvait sortir à travers le plus petit tube du circuit sans aucune bulle à l'intérieur du fluide. Afin de le réguler, nous nous sommes aidés avec le filetage en orange ; de sorte que, plus proche soit à la région étroite, plus le tube sera bouché et plus il se rapproche de la région large, plus il s'élargit.

### **Procédure de perfusion**

- 1) Premièrement, la souris a été anesthésiée en sachant que chez une souris standard (P10), 0,3 mL d'anesthésie intrapéritonéale (100 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine) est injecté au départ. S'il ne s'était pas endormi, nous aurions pu injecter plus de solution plus tard.
- 2) Deuxièmement, la souris a été crucifiée en position couchée dans le panneau de polystyrène à l'aide des 4 aiguilles d'insuline comme fixateurs de membres.

- 3) Nous sommes procédés à l'ouverture de l'abdomen de la souris à l'aide d'un scalpel, faisant une coupe longitudinale, de la hauteur du bassin à l'extrémité des côtes. Il a fini d'atteindre le sternum à l'aide de petites chirurgies.
- 4) Le diaphragme a été coupé. Pour faciliter le processus, le sternum a été pincé à l'aide d'une pince incurvée et le tissu situé des deux côtés de celui-ci a été coupé, jusqu'à ce que le diaphragme soit entièrement visible. Une fois comme cela, il a été coupé.
- 5) Ensuite, les côtes ont été coupées aussi latéralement que possible, afin d'ouvrir au maximum la cage thoracique. Avec l'aide de la pince Kocher, le diaphragme a été pincé et s'est éloigné, de sorte que le cœur était complètement exposé.
- 6) Après avoir atteint le cœur, le ventricule gauche a été perforé, le tenant avec une pince à incurvée, aussi droite et parallèle que possible à la souris. Ensuite, à l'aide d'une aiguille et d'une canule de perfusion, le ventricule gauche a été percé (en y entrant parallèlement par la pointe), et l'aiguille a été enlevée, laissant la canule à l'intérieur.
- 7) À l'aide de petits ciseaux chirurgicaux, le ventricule droit a été coupé.
- 8) Enfin, le tube de perfusion a été connecté à la canule, effectuant un léger virage afin de commencer à entrer dans la solution saline.
- 9) Un premier lavage d'environ 10 minutes a été effectué avec la solution saline NaCl 0,9% (jusqu'à ce que l'animal soit exempt de sang) puis nous avons procédé à la perfusion avec PFA 4% pendant une période similaire à celle du lavage. Pour ce processus, deux indicateurs étaient essentiels : lors du lavage, il était nécessaire de regarder l'estomac qui s'est avéré blanchâtre en raison de la courte période de vie de la souris et de son régime alimentaire entièrement d'allaitement. Le deuxième et dernier indicateur de la perfusion était la palpation constante de la tête pour déterminer si le PFA avait pénétré correctement dans la circulation sanguine.

#### 4.5.2 DISSECTION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE ET DE LA MUSCULATURE DES RONGEURS (P1-P10)

Dès lors que la souris a été lavée et perfusée, elle a été disséquée afin d'enlever un fragment de la moelle épinière et des muscles inférieurs droits. Plus précisément, le fragment de la moelle épinière d'intérêt était la région dite « élargie » ou ventrale où les axones des neurones sont massivement situés, principalement ceux du MNs (la coupure a été faite entre les vertèbres Lombaire II (L II) et Coccyx I (Co I), atteignant presque la *cauda equina*).

En ce qui concerne la musculature postérieure des rongeurs, le tibial antérieur (TA) a été disséqué dans le but de focaliser l'étude en la visualisation du nerf sciatique et des NMJs.

#### Matériel

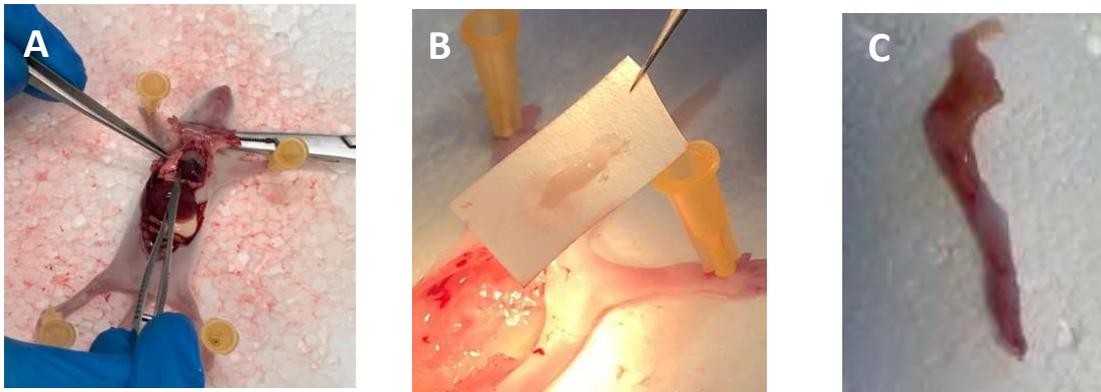
- Boîte de Pétri en verre avec fond noir, ou Phorexpan (si les souris sont p10)
- Aiguilles de taille petite
- Flacons en verre ou en plastique étiquetés (en verre dans le cas où la moelle et les jambes seraient déjà disséquées ; en plastique et de grande taille au cas où toute la carcasse serait enlevée; à disséquer plus tard).
- PFA 4% : à la fois en bouteille et dans une fiole séparée avec une pipette Pasteur en plastique (2mL)
- Pinces Dumont n° 5, n° 3 et petites. Celles de Laminectomie sont également nécessaires (si les rongeurs sont p10).
- Ciseaux chirurgicaux grands et petits.
- Scalpel.
- Aiguille d'insuline (avec la seringue).

##### 4.5.2.1 PROCÉDURE DE DISSECTION DE LA MOELLE ÉPINIÈRE

- 1) Le corps de la souris a été disposé en position décubitus dorsal sur une plaque de phorexpan (car il s'agissait de P10) et fixé avec les aiguilles d'insuline.

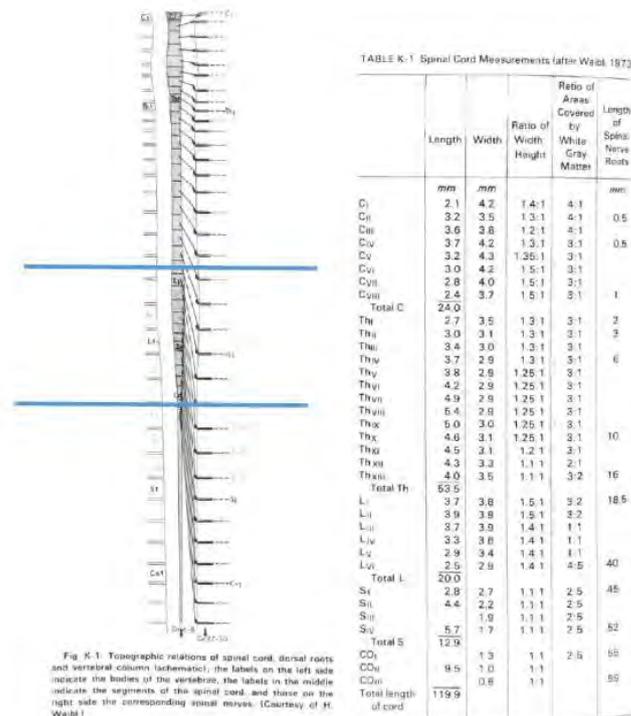
- 2) Ensuite, la souris a été éventée du rostral au caudal à travers la région ventrale avec les gros ciseaux chirurgicaux.
- 3) Il a fallu enlever tous les viscères, à l'aide d'une pince Dumont du n° 3 et d'un scalpel pour se débarrasser du tissu.
- 4) Les côtes ont été coupées avec les petits ciseaux chirurgicaux pour élargir l'ouverture de la surface de travail, puis 4% de PFA ont commencé à être versés.
- 5) L'animal a été attaché avec une pince. Immédiatement après, à l'aide d'une aiguille d'insuline (précédemment placée dans leur seringue respective), les côtés de la colonne vertébrale ont été rayés, détériorant ainsi le cartilage sur le côté du corps des vertèbres jusqu'à ce qu'il provoque sa rupture. Comme à l'étape précédente, 4% de PFA a été versé, en particulier l'abondance pour être P10.
- 6) Puis, lorsque nous avons obtenu les ouvertures latérales, la colonne a été sectionnée à un niveau très caudal pour faciliter l'entrée des pinces et/ou de l'aiguille.
- 7) Ainsi, la région ventrale de la colonne vertébrale (facilement identifiable par «l'épaississement» de la moelle épinière) a été enlevée à l'aide d'une pince Dumont du n° 3 et/ou d'une aiguille jusqu'à ce que la moelle épinière soit complètement exposée. Il convient de noter qu'il était nécessaire d'entrer horizontalement afin d'éviter de blesser la moelle épinière.
- 8) La moelle a été prélevée avec une pince Dumont du n° 5 à travers la région la plus rostrale et progressivement soulevée. Par la suite, à l'aide de la pince Dumont n° 3, les méninges ont été enlevées.
- 9) La moelle entière a été placée dans un récipient contenant 4% de PFA. – l'avoir préalablement étendu sur une portion de papier filtre ; pour assurer sa position droite.
- 10) L'échantillon a été conservé à 4°C (plus précisément, dans le réfrigérateur N7).
- 11) Au-delà de 24h, la moelle a été changée en **30% saccharose + tampon phosphate (TP) 0,1M + 0,02% d'azote.**

12) Enfin, lors de l'assemblage du bloc pour le couper dans le cryostat était délimiter la région lombaire.



**Figure 38, (A)** ouverture dans le canal des rongeurs avec tous les organes\* perfusés pour procéder à leur retrait. **(B)** Section de la moelle épinière obtenue, remarquez l'épaississement de la moelle épinière dû à l'accumulation d'axones de différents MN. **(C)** Obtention des muscles du tibia antérieure pour déterminer l'innervation des MNs dans la musculature postérieure par la coupe du nerf sciatique (partie supérieure).

\* L'organe blanchâtre situé entre le foie et l'intestin grêle est l'estomac qui acquiert cette couleur en raison de l'apport en lactation consommé dans le sein de sa mère, surtout compte tenu de son âge, P1.



**Figure 39**, diagramme de la division de la moelle épinière qui a été réalisée à partir des relations topographiques de la même avec les racines dorsales et la colonne vertébrale.

4.5.2.2 PROCÉDURE DE DISSECTION DE LA TIBIALE ANTÉRIEUR (TA)

- 13) Dans un premier temps, la patte de la souris a été attachée avec une pince, tendue et, avec l'aide d'un autre technicien, elle a été coupée jusqu'à ce qu'il ne reste que sa hanche.
- 14) Le fragment a été drainé, étirant la peau, à l'aide d'une pince et de ciseaux chirurgicaux de petite taille.
- 15) L'échantillon a été immergé dans un bocal contenant 4% de PFA.
- 16) Nous avons procédé à son stockage à 4°C.
- 17) Dans un maximum de 2h, l'échantillon de tissu musculaire est passé à TP 0.1M + 0.02% Azide.
- 18) La veille de disséquer les muscles : il a été alterné à 30% de saccharose + TP 0,1M + 0,02% d'azoture.

## 4.6 LE DÉCOUPE DANS LE CRYOSTAT TISSULAIRE

Une fois la moelle épinière enlevée, et après le temps écoulé dans le saccharose, sa coupe transversale a été effectuée afin de monter l'échantillon sur une porte d'objet et ainsi pouvoir examiner en profondeur l'affectation des MN au microscope confocal.

Tout cela a été possible grâce à l'utilisation du cryostat qui permet d'obtenir des coupes jusqu'à 8-40  $\mu$ m tout en maintenant la température nettement froide (-20/-30 °C) grâce à la chambre de refroidissement qu'il contient.

### Matériel

- Moule
- *Tissu Freezing Medium*
- Pincés à épiler de petite taille
- Pincés à épiler de grande taille
- Petit couteau
- Couteau Cryostat
- Rouleau
- Petite brosse
- Grande brosse
- Curseurs gélatinisés

### 4.6.1 COUPE TRANSVERSAL DE LA MOELLE ÉPINIÈRE

#### 4.6.1.1 MONTAGE DANS LE MOULE

1. Tout d'abord, la moelle a été placée dans un moule carré orienté du rostral au caudal et avec la région ventrale à la partie inférieure. Pour y parvenir :
  - a) Il a en premier lieu été orienté vers une boîte de Pétri (où nous avons précédemment versé la moelle et la solution avec un tampon phosphate, de l'azoture et du saccharose dans laquelle on trouvait l'échantillon immergé).

- b) La position de la moelle a été marquée d'une bande à la partie inférieure et d'un X sur la paroi du moule, où elle toucherait la partie rostrale. Lorsque le X était marqué, il était crucial de s'assurer que les deux encoches étaient toujours laissées.
  - c) Nous nous sommes guidés en tout moment principalement par deux structures : les racines (qui s'étendent toujours du rostral au caudal) et le sillon ventral (qui est situé dans la région ventrale).
  - d) Du *Tissue Freezing Medium* a été ajouté (jusqu'à 3/4 du moule) et plus tard, la moelle. Celle-ci devait être placée de manière centrée dans le moule afin que la partie la plus rostrale soit légèrement séparée de la paroi, mais pas excessivement.
2. Ensuite, le moule a été introduit à -80 ° C afin que le *Tissue Freezing Medium* se solidifie, puis il a été gelé pendant un temps d'environ 15 minutes et nous avons procédé à la coupe le même jour, toutefois, si ce n'était pas possible, cela aurait pu être fait le lendemain).
  3. Généralement, dans cette étape, le bloc *Tissue Freezing Medium* est extrait avec la moelle du moule à l'aide d'un couteau, or, nous avons pour la première fois un seau amovible qui facilitait le processus.

#### 4.6.1.2 PLACEMENT DANS LE SUPPORT DU CRYOSTAT

4. Le bloc a été fixé au support du cryostat, à l'aide de *Tissue Freezing Medium* supplémentaire, laissant la plate-forme où le bloc a ensuite été fixé, se tempérer dans le but de faciliter l'adhésion.
5. Nous l'avons laissé se solidifier et immédiatement après, le bloc a été placé dans le support du cryostat.
6. L'échantillon a été pyramidé de manière droite et non triangulaire, de sorte qu'il a été bien délimité. Nous l'avons fait de façon minimale au début et plus tard, au fur et à mesure qu'il a été coupé, il n'a pas été soudainement délimité car l'échantillon perdrait en stabilité.

7. Ensuite, le bloc a été circonscrit jusqu'à ce qu'il atteigne l'échantillon. Pour ce faire, le TRIM a été pressé ; cela nous a permis de faire des coupes de 90  $\mu\text{m}$  et non de 16  $\mu\text{m}$ , pour parvenir à l'échantillon lui-même plus rapidement.
8. Nous avons commencé à couper, obtenant des coupes transversales de 16  $\mu\text{m}$ . Il était nécessaire de faire attention au *roller* car il n'était pas complètement horizontal, mais légèrement incliné vers la droite, par conséquent l'échantillon a été coupé par l'un des coins du rouleau afin que la coupe soit égale. Le *roller* et le couteau devaient être complètement alignés ; notant comme le couteau dépasse superficiellement au-dessus.

#### 4.6.1.3 PLACEMENT SUR LA LAME

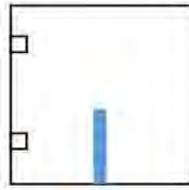
9. Les échantillons ont été placés dans la lame comme suit :
  - a) Des rangées se sont formées perpendiculairement à la lame de 3 coupes en 3 coupes pour qu'elle reste aussi proche que possible, de sorte qu'il était possible d'économiser d'anticorps en faisant l'immunofluorescence plus tard. En outre, nous l'avons fait en série, la première rangée (3 premières coupes) de chaque lame a été formée et une fois que toutes ont été placées, les 3 suivantes ont été exécutées et ainsi de suite. De cette manière, nous garantissons d'avoir des échantillons de similitude presque identique et permettons la division en partie rostrale, lombaire et caudale.
  - b) Jusqu'à 25 lames par moelle ont été atteints.
  - c) Il a fallu coller les étiquettes pertinentes.
10. On a laissé sécher les lames avec les moelles coupées pendant 24 heures à température ambiante.
11. Immédiatement, elles sont gelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.2 SECTION LONGITUDINALE DU NERF SCIATIQUE (MUSCULATURE TIBIALE ANTÉRIEURE)

##### 4.6.2.1 MONTAGE AU MOULE

1. Initialement, le nerf sciatique a été versé dans une boîte de Pétri.

2. À l'intérieur du moule, la position du nerf sciatique était marquée d'une bande au bas du récipient. Vu d'un point en plongée, ce serait comme ce schéma :



3. Du *Tissue Freezing Medium* a été introduit (jusqu'à une hauteur de 1/4 de la capacité totale du moule) et, postérieurement, le nerf sciatique. Ce dernier a été placé au-dessus de la marque que nous avons préalablement dessinée dans le moule ; en restant aussi près et parallèle que possible du sol du seau et légèrement séparé du mur.
4. Il a été gelé à -80°C.

#### 4.6.2.2 PLACEMENT DANS LE SUPPORT DU CRYOSTAT

1. Le bloc *Tissue Freezing Medium* avec le nerf sciatique a été désassembler. Il était notamment important de connaître à tout moment l'emplacement de la sciatique dans le bloc car il n'était pas visible à l'œil nu.
2. Le bloc a été fixé avec *Tissue Freezing Medium* au support du cryostat. Il a été placé sur le support dans une position décubitus ventrale afin que le sciatique soit parallèle au support. Pour faciliter la connaissance de l'endroit où se trouve l'extrémité du nerf près de la marge du bloc, ceci a été positionné et orienté de manière qu'il restait devant la marque qui a sur le support.
3. Nous l'avons laissé fixer. Puis, nous avons commencé la coupe à l'extrémité inférieure du bloc où nous savions à l'avance que le nerf ne l'atteignait pas.

#### 4.6.2.3 PLACEMENT SUR LA LAME

4. Lors de l'assemblage des coupes à la lame, les mêmes étapes ont été suivies que dans la moelle épinière. **(4.6.1.3)**

#### 4.6.3 ASPECTS QUI ONT ÉTÉ PRIS EN COMPTE POUR FAIRE UNE BONNE COUPE

##### 4.6.3.1 LA TEMPÉRATURE

- Température de la chambre : -25°C (ou -24°C)
- Température de l'échantillon : -19°C (ou -20°C).

La différence idéale entre la température de la chambre et celle de l'échantillon devrait être d'environ 4°C. Si la température est trop élevée : l'échantillon soit se froissera ou soit se brisera. La solution consiste à abaisser la température ou à prendre tout le support du bloc et à le soumettre pendant un certain temps à -80 ° C.

Si la température est trop basse : l'échantillon peut également se briser. Dans ce cas-là, pour le résoudre, nous devons légèrement glisser notre doigt (soit rapidement, soit le maintenir pendant quelques secondes), puis bien le couper. Si nous traînons, l'échantillon se froissera.

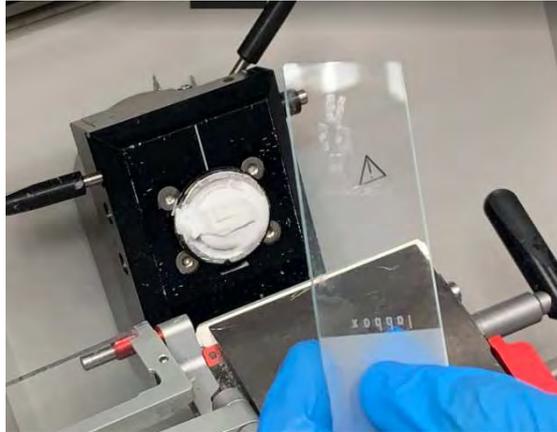
##### 4.6.3.2 LE COUTEAU

C'était souhaitable de s'assurer de ne pas avoir de piqûres pour la zone que nous coupons.

##### 4.6.3.3 LE ROULEAU

Il était indispensable de vérifier de ne plus avoir de piqûres pour la zone que nous coupons. Et de l'aligner avec le couteau de sorte qu'il soit légèrement plus vers l'extérieur que le rouleau (sinon le rouleau collera avec l'échantillon et l'endommagera).

Pour régler le couteau et le rouleau, l'idéal est d'utiliser un bloc vide. Nous avons recherché la meilleure région en déplaçant : (1) le couteau et le rouleau de position, (2) le rouleau légèrement vers l'avant ou vers l'arrière ou (3) en déplaçant tout le support vers la droite ou la gauche. Il est hautement conseillé que le bloc que nous devons couper se trouve à une extrémité du couteau (de préférence à gauche); puisque le contact entre le couteau et le rouleau est meilleur aux extrémités et meilleur à gauche.



**Figure 40**, Échantillons bruts découpés dans le cryostat. Observez le support avec l'échantillon placé dans le milieu de congélation des tissus déjà pyramidé et soumis à basse température pour faciliter la coupe ; voir aussi, le couteau.

## 4.7 TECHNIQUE DE COLORATION EN MICROSCOPIE AVEC DES ANTICORPS

Une fois que nous avons obtenu les coupes des échantillons, une coloration préalable a été effectuée avec des anticorps afin de pouvoir distinguer chromatiquement les différentes structures du MNs au microscope confocal. Ainsi, cette technique a été réalisée indirectement. C'est-à-dire qu'un anticorps primaire se lie à l'antigène et, à son tour, un anticorps secondaire porteur d'un fluorochrome perçu différemment selon la longueur d'onde lorsqu'il est excité, se lie à l'anticorps primaire. Par ailleurs, un bloqueur d'une race équine NHS (*Normal Horse Serum*) est utilisé pour délimiter les zones que nous voulons mettre en évidence. Or, normalement, une chèvre NGS est utilisée pour le Nissl bleu que nous n'introduirons pas.

Néanmoins, ce processus présente deux complications : soit une fois que le fluorochrome a été introduit et que, le processus doit se poursuivre dans l'obscurité, soit les échantillons humides doivent être conservés à tout moment pour éviter qu'ils ne se dessèchent, et qu'une série de lavages doivent être effectués. Pour exécuter cela, différents réactifs ont été préparés :

Le PBS-Triton 0,1% (*Phosphate-buffered saline*) a été préparé dans l'étage au fond du laboratoire où se trouvent tous les réactifs. Il était nécessaire d'incorporer :

- 100 mL de PBS 10x (dans un grand éprouvette)
- 900 mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (jusqu'à jauger)
- 1 mL de triton 100x

Enfin, un aimant a été inséré et placé sur le dessus de l'agitateur.

Pour la préparation du PBS 1x a été mélangé :

- 200 mL de PBS10x (dans un grand éprouvette)
- 2L de H<sub>2</sub>O<sub>miliQ</sub> (jusqu'à jauger)

Comme dans le PBS-Triton 0,1%, l'aimant a été introduit et agité.

Par conséquent, l'immunofluorescence sur les lames a été effectuée comme suit:

#### 4.7.1 INCUBATION AVEC L'AC 1

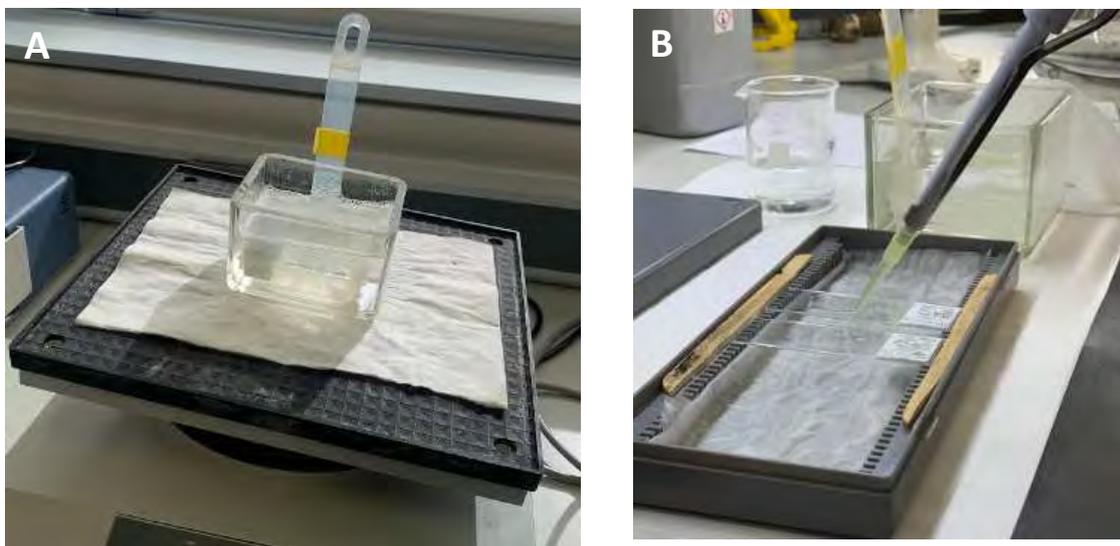
1. Premièrement, nous avons laissé décongeler les lames pendant un temps d'environ 20 minutes.
2. Ensuite, il a été noté au crayon sur l'étiquette les anticorps et les fluorochromes avec lesquels l'échantillon devait être marqué. Alors (voyez l'**annexe I** pour plus de détails):
  - CGRP 488 (sera affiché en rouge)
  - MMP9 Cy3 (sera affiché en vert)
  - HA Cy5 (sera affiché en rouge lointain)
  - Nissl bleu (sera affiché en bleu)
3. Les échantillons ont été perméabilisés avec PBS-Triton à 0,1 % pendant 30 min sous agitation. Pour ce faire, les lames ont été insérées dans un panier et ceci à l'intérieur d'un seau plein jusqu'à ce qu'il soit au ras de la solution.
4. L'acte suivi, les échantillons ont été bloqués avec NHS (Normal Horse Serum) à 10% sur PBS pendant 1h. Dans ce but, ils ont été disposés dans une chambre humide, préparés dans une boîte de lames avec du papier humidifié avec de l'eau distillée.
5. Ils ont été incubés toute la nuit avec l'anticorps primaire et PBS 1x dans la chambre humide à 4°C.

#### 4.7.2 INCUBATION AVEC L'AC 2

6. Une fois incubés les échantillons, 3 lavages de 10 minutes ont été effectués avec 1x PBS en agitation.
7. Puis, ils ont été perméabilisés avec PBS-Triton 0,1%. Simplement il était suffisant en faisant sortir et d'entrer le panier dans le seau ; afin de faciliter l'entrée d'anticorps secondaires.
8. Une incubation avec l'anticorps secondaire a été ré-exécutée à 1/500 dans la chambre humide pendant 1h, couverte afin qu'elle ne soit pas exposée à la lumière.

9. Tout de suite, nous avons effectué 3 lavages d'une durée de 10 minutes avec PBS 1x dans l'obscurité (en le recouvrant de papier aluminium) et en agitation.
10. Les échantillons ont été incubés avec le Nissl (Bleu 1:100; soustraction 1:150) dans la chambre humide pendant 20 minutes. Tout en pipetant 100  $\mu$ L d'environ de Nissl par lame.
11. Nous avons réalisé un premier lavage de 5 min et un deuxième de 10 min, dans l'obscurité et dans l'agitation.
12. Finalement l'assemblage avec Mowiol-Dabco a été mené. Pour ce faire, d'environ 200  $\mu$ L de Mowiol ont été ajoutés sur chaque lame en accompagnant la lamelle de sorte que, par capillarité, toute la lame soit imprégnée de solution.
13. Pour conclure, les échantillons ont été enregistrés dans un livret à 4°C jusqu'à ce qu'il soit observé au microscope.

Remarque : Après chaque lavage, la lame a bien séché, délimitant la zone de l'échantillon. Et en termes de blocage, des anticorps et de Nissl, environ 100  $\mu$ L ont été ajoutés sur chaque lame.



**Figure 41, (A)** Un des lavages PBS effectués sur l'agitateur. L'importance du processus réside dans le mouillage constant de l'échantillon. Voir les échantillons placés de manière ordonnée dans le panier. **(B)** Couvrir les échantillons avec AC 2 avec une pipette dans une chambre sombre pour préserver les propriétés photosensibles.

## 4.8 LE WESTERN-BLOT

Bien que, revenant aux bases moléculaires de la maladie, l'AS se caractérise par de faibles niveaux de protéine FL-SMN exprimées. Conséquemment, pour compléter l'étude comparative, les niveaux de protéine spécifique des différents modèles murins (WT, KO et traités) ont été quantifiés en effectuant un Western-Blot ou immuno blot à partir des tissus obtenus comme fruit de la dissection .

Cette technique est basée sur la détection de protéines par électrophorèse sur gel, en séparant les protéines en fonction de leur taille. Ils sont ensuite transférés dans une membrane absorbante, qui est une membrane incubée avec un anticorps spécifique à la protéine problématique. Enfin, cela est détecté par des méthodes de chimiluminescence.

### Matériel

- Caméra d'électrophorèse (Bio-rad)
- Plaque ELISA
- Solutions tampons préparées à l'avance :
  - Tampon d'homogénéisation
    - SR 1x = 2 % de FDS dans Tris HCl ; pH de 6,8 ; 1 125 mM
    - SR 4x = 8% SDS dans Tris HCl ; pH de 6,8 ; 0,5 M
    - Inhibiteur de la protéase (Sigma-Aldrich)
  - Tampon de charge
    - SS 4x = 20% de saccharose + 0,05% de bromophénol bleu, complété par du  $\beta$ -mercaptoéthanol à 2x
  - Tampon *transferer* = 25 mM Tris, 190 mM de glycine, 20 % de méthanol, 0,1 % de FDS
  - Tampon de nettoyage et de blocage
  - TBST (*Tris-Buffered Saline*) = 20 mM Tris-HCl, 0,125 M NaCl, 0,1 % Tween 20, ajusté à pH 8
  - Tampon d'incubation = 0,25 % de lait écrémé en TBST

- Tampon I
- Tampon *Running Buffer*
- Kit *Micro DC protein assay* (Bio-Rad)
- Bisacrylamide 30x
- Isopropanol
- Marcadors poids moléculaire, *MagicMarc XP* et *SeeBlue* (Thermo Fisher)
- Papier buvard
- Kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*

## Procédure

### 4.8.1 OBTENTION ET PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS

En tirant parti des échantillons de tissu médullaire et musculaire (TA) stockés et conservés dans la congélation à -80°C, les protéines ont d'abord été extraites et dénaturées :

1. Les tissus ont été transférés dans un tube de polypropène Eppendorf de 1,5 ml contenant 150 µl de SR 1x préalablement chauffé à 100°C et supplémenté avec des inhibiteurs de la protéase.
2. À l'aide d'une aiguille de 30G, l'échantillon a été désintégré et chauffé à 100 ° C pendant 5 minutes.
3. Ensuite, pour se débarrasser des débris cellulaires, des impuretés et de l'ADN, il a été centrifugé pendant 5 minutes à 12000 tr/min et le surnageant résultant de la séparation a été transféré dans un nouvel Eppendorf.

### 4.8.2 QUANTIFICATION DE LA CONCENTRATION DE PROTÉINES

Pour quantifier la concentration de protéines dans les échantillons, un dosage colorimétrique a été effectué sur la base de la méthode de liaison aux colorants décrite par Bradford (M.M Bradford, 1876).

Pour ce faire, le kit *Micro DC protein assay* (Bio-Rad) a été utilisé et, par conséquent, les étapes ont été exécutées en suivant les recommandations du fabricant:

4. 3  $\mu\text{l}$  de l'extrait de protéine ont été incubés avec 25  $\mu\text{l}$  de réactif A et 200  $\mu\text{l}$  de réactif B pendant 15 minutes dans l'obscurité, sur une plaque ELISA.
5. Par la suite, la concentration de protéines a été calculée par un contrôle positif.

#### 4.8.3 ÉLECTROPHORÈSE AVEC GEL D'ACRYLAMIDE

Avec l'objectif de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, elles ont été passées à travers d'un gel d'acrylamide selon le principe postulé par Laemmli (U.K Laemmli, 1970).

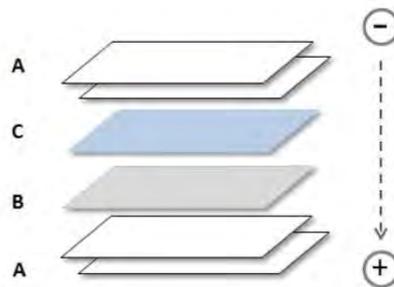
6. En premier lieu, les gels séparateurs ont été préparés à une concentration de 10% de bis-acrylamide (30%). L'épaisseur de la glace en question était de 0,5 mm.
7. L'isopropanol a été rapidement ajouté au gel qui a été retiré une fois polymérisé.
8. Immédiatement après, le gel empileur a été incorporé, avec une concentration plus faible de bis-acrylamide (5%). Les deux gels contenaient des FDS (à 10 %) et étaient préparés avec un tampon Tris, mais différaient à la fois par leur concentration (1,5 M pour les gels séparateurs et 0,5 M pour les épisseurs) et par leur pH (8,9 et 6,5 respectivement).
9. 20  $\mu\text{g}$  de protéines ont ensuite été chargés dans chaque puits, préalablement complétés par un tampon de charge 4X SS, et chauffés pendant 3 minutes à 100°C pour assurer la dénaturation et faciliter le chargement.
10. En outre, 4  $\mu\text{l}$  des marqueurs ont été chargés dans différents puits pour estimer le poids moléculaire et reconnaître les protéines à étudier.
11. Nous avons laissé couler les gels à une intensité de 20 mA/gel dans une caméra d'électrophorèse (BioRad) à l'aide de *Running Buffer* (BioRad).

#### 4.8.4 TRANSFERT DE PROTÉINES À LA MEMBRANE DU POLIFLUORURE DE VINILIDEN

Après la migration des protéines à travers le gel de polyacrylamide, elles ont été transférées sur une membrane PVDF (précédemment immergée dans du méthanol pendant 1 minute) et lavées pendant 5 minutes avec un tampon *transfer* pour ensuite effectuer une détection immunochimique.

La méthode utilisée était l'électrotransfert demi-sec :

12. Deux papiers séchants précédemment immergés dans le tampon *transfer* ont été empilés, suivis de la membrane PVDF qui correspondait aux dimensions du gel de polyacrylamide (6 x 9 cm), au-dessus de ceci le gel de polyacrylamide été placé et enfin deux portions supplémentaires de papier buvard.
13. Une fois le bloc construit (**figure 42**), les bulles d'air possibles qui pouvaient être introduites entre les différentes couches ont été enlevées et le bloc entier a été transféré dans un dispositif *Novex Semi-Dry Blotter* (Invitrogen), de sorte que l'électrode négative restait sous la membrane et l'électrode positive sur la glace. Le transfert a été effectué à un ampérage constant de 0,06 mA/glace pendant 1 heure.



**Figure 42, Diagramme du bloc de transfert pour le Western Blot.** En présence de tampon de transfert, le bloc est formé avec deux papiers de séchage (A) suivis d'une membrane PVDF préalablement immergée dans du méthanol et lavée avec un tampon de transfert (B) et le gel de polyacrylamide contenant les protéines à transférer (C), et deux autres papiers séchants (A). La flèche signale la direction du transfert des protéines.

#### 4.8.5 DÉTECTION IMMUNOCHIMIQUE

14. Avant l'incubation avec des anticorps d'intérêt (voyez l'**annexe II** pour plus de détails) et afin d'éviter les signaux non spécifiques, la membrane a été bloquée pendant 1 heure avec une solution bloquante contenant 5% de lait écrémé dans un tampon TBST.
15. La membrane a ensuite été lavée avec TBST et incubée avec l'anticorps primaire d'intérêt à 4 °C pendant 16 heures (pendant la nuit) dans un tampon d'incubation (lait écrémé à 0,25 % dans TBST).
16. Après cette période, l'excès d'anticorps non liés a été éliminé par deux lavages de TBST ( de 15 et 5 minutes) et un lavage de 10 minutes avec tampon d'incubation.

17. Par la suite, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire correspondant attaché à la peroxydase et dilué en tampon d'incubation.
18. Aussitôt, une série de lavages TBST ont été effectués (un de 15 minutes, suivi d'un 10 minutes et de 3 lavages supplémentaires de 5 minutes chacun). Toutes les étapes ont été effectuées dans une agitation douce et continue.

#### 4.8.6 ANALYSE DES RÉSULTATS

Les westerns blot ont été révélés par chimiluminescence. À cette fin, le kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni) a été employé.

19. Des volumes égaux de réactifs de la solution de peroxyde et de la solution de *Luminol/Enhancer Solution* ont été mélangés et déposés uniformément sur la membrane pendant 5 minutes.
20. L'excès de réactif luminescent a été éliminé et les membranes ont été recouvertes de papier transparent par rétroprojection et révélées au ChemiDoc MP (Bio-Rad).
21. L'image a été analysée par densitométrie avec le logiciel *Imagelab* (Bio-Rad) pour évaluer la quantité relative et quantifier le résultat par densité optique.



**Figure 43**, électrophorèse en cours sur une clôture spécifique pour les gels de polyacrylamide. Observez les différentes caméras que l'instrument possède pour séparer les gels et les immerger dans les différents tampons pour effectuer un effacement des protéines de manière optimale.



---

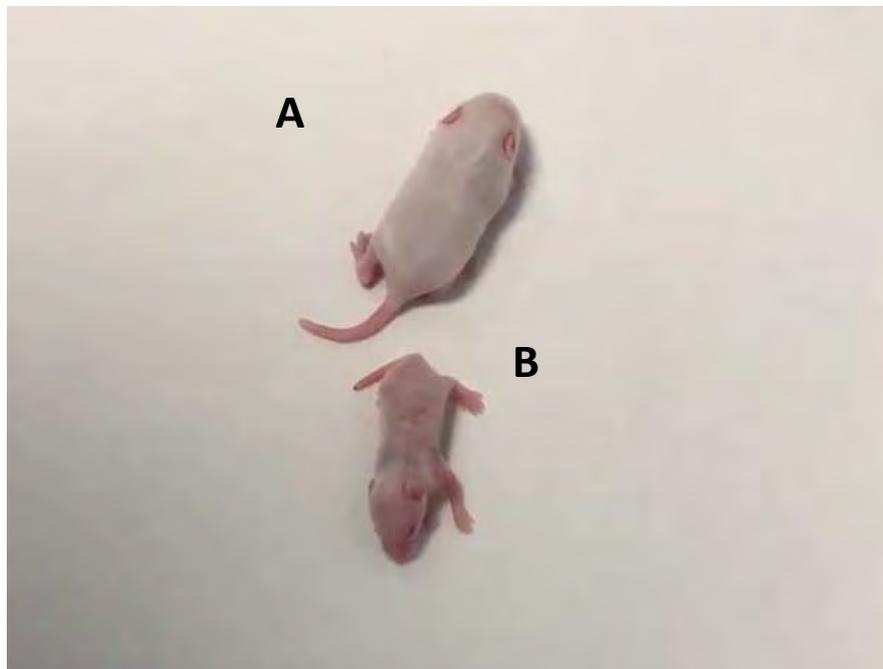
## RÉSULTATS ET DISCUSSION

## 5.1 CHAPITRE I

### PHÉNOTYPE, SURVIE ET CHANGEMENTS DANS LA CAPACITÉ MOTRICE DES MODÈLES MURINS D'AS

Les deux modèles animaux utilisés souffrent d'une forme d'amyotrophie spinale (AS) en évolution rapide. Le SMA de type I (SMAT1) meurt environ 6 à 7 jours postnatals et le SMA $\Delta$ 7 (SMA $\Delta$ 7) environ 14 à 15 jours postnatals. Pour faire un parallèle avec l'homme, l'SMAT1 correspond à l'AS de type I ou à la maladie de Werdnig-Hoffman et la SMA $\Delta$ 7 oscille entre une AS de type I à évolution plus lente ou une AS de type II, le tout selon les auteurs.

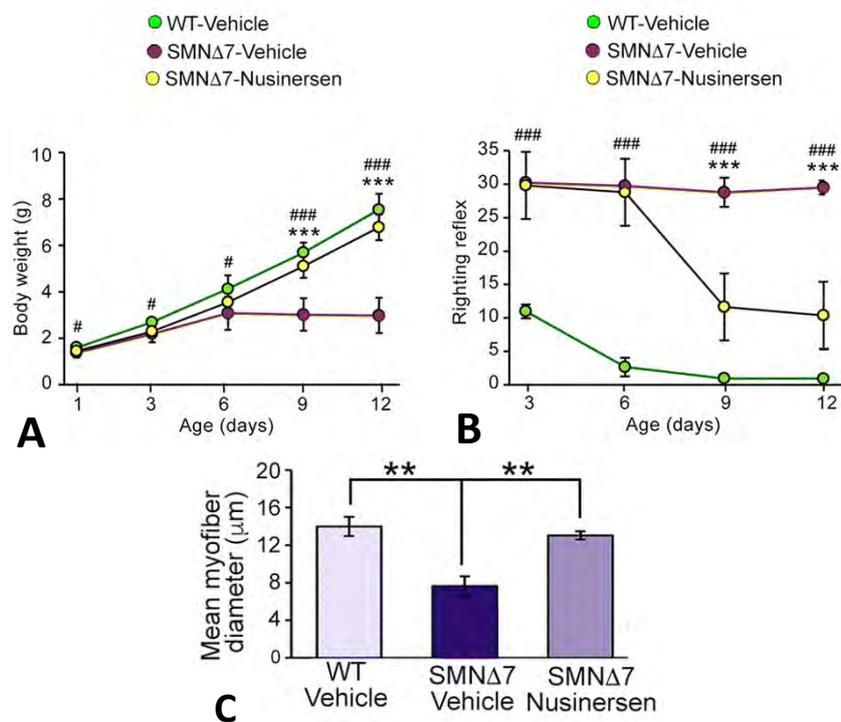
La gravité de la maladie se reflète dans la mortalité postnatale; alors que près de la moitié des animaux SMAT1, nés, meurent au cours du premier jour de vie (46,5 % n = 39 des 84 SMAT1 nés), la mortalité postnatale en SMA $\Delta$ 7 est pratiquement la même que celle des hétérozygotes et légèrement supérieure au WT $\Delta$ 7 (5 % n = 9 sur 173 SMA $\Delta$ 7 nés; 4,6% n = 15 sur 367 HET $\Delta$ 7 nés; 2,6% n = 4 sur 153 WT $\Delta$ 7 nés), par conséquent, nous considérerions que la mortalité postnatale dans l' SMA $\Delta$ 7 est dans la normalité du modèle.



**Figure 44**, photographie de deux souris de la même portée, toutes deux sont P6. **(A)** Souris WT. **(B)** Souris KO traitées avec Nusinersen. Dans ce cas, la souris a réussi à terminer avec succès le test RR dans un temps de 28s. On dit le changement important dans la taille du rongeur dû à l'atrophie des muscles et à la dégénérescence consécutive de la capacité motrice.

Il semble que la difficulté que les animaux ont à ingérer de la nourriture, affectant l'état nutritionnel des chiots malades, n'est pas le plus grand coupable du phénotype de l'AS, c'est-à-dire malgré tous les animaux souffrant d'une réduction considérable du poids corporel et d'une atrophie musculaire, en particulier dans la musculature postérieure (TA), seulement environ 50 % des souris terminales des deux modèles avaient l'estomac vide au moment du prélèvement de l'échantillon. En général, ces résultats concordent avec les résultats précédemment publiés dans le même modèle animal (Monani et coll., 2000; Jablonka et coll., 2006).

Force est de constater qu'actuellement, un modèle murin de SMN $\Delta$ 7 traité par Nusinersen SPINRAZA dans les installations de l'IRB Lleida pendant la période de séjour de cette recherche, est en P90, septuplant presque le taux de survie chez les souris KO D'as.



**Figure 45.** Preuves statistiques des divers changements phénotypiques. **(A)** Analyse comparative du poids corporel (moyenne  $\pm$  ET) entre WT, SMN $\Delta$ 7 et des souris traitées par Nusinersen de P0 à P12 ( $n = 8$  souris par groupe). **(B)** Réponse à l'acquisition correcte du réflexe de redressement (moyenne  $\pm$  SD) dans les périodes postnatales indiquées. Notez comment le traitement de Nusinersen améliore la réponse motrice chez les souris SMN $\Delta$ 7 par rapport aux souris SMN $\Delta$ 7 non traitées ( $n = 8$  souris par groupe) **(C)** changement de diamètre en m du diamètre des fibres musculaires chez les souris traitées WT, KO et SMN $\Delta$ 7. ( $\mu$ m ) [32]

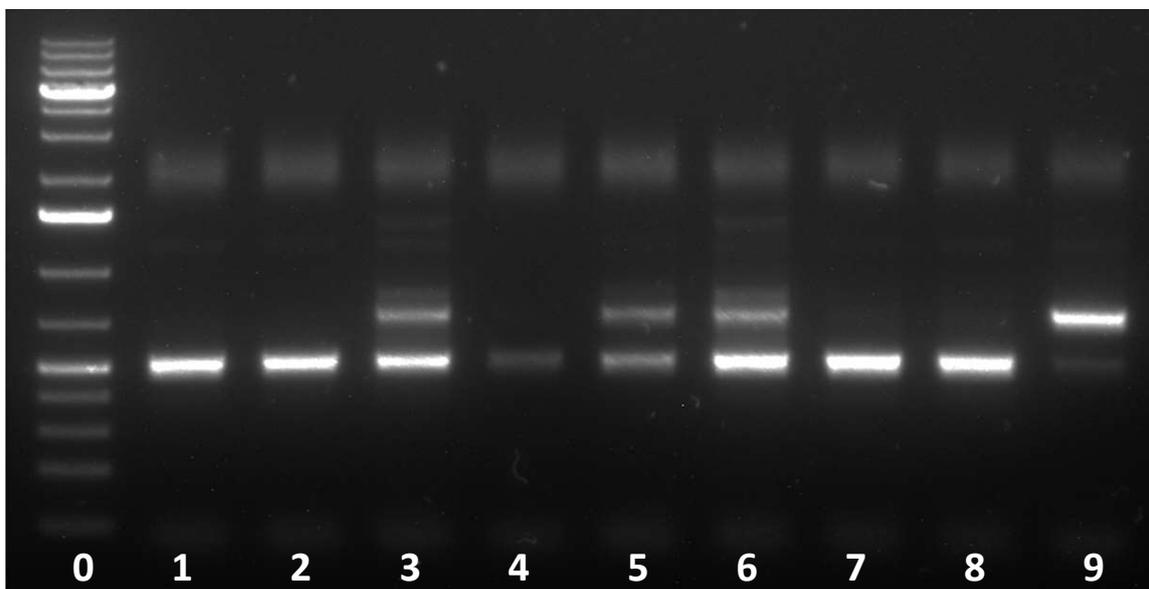
Nous pouvons étayer l'hypothèse à l'aide du graphique ci-dessus (**Figure 45**). Compte tenu des informations données, la réduction du diamètre des fibres musculaires est d'une grande différence entre WT et le KO de SMN $\Delta$ 7. De plus, cette réduction est directement liée aux symptômes phénotypiques de l'atrophie. Cependant, selon les études réalisées, il peut être entièrement récupéré avec l'application de l'agent étudié dans ce travail.

## 5.2 CHAPITRE II

### GÉNÉTIQUE DE LA MALADIE ET CHANGEMENTS DANS LES NIVEAUX EXPRIMÉS DE PROTÉINES SMN

Tout au long du séjour expérimental, il y a eu deux moments clés pour l'identification de la nature des modèles murins.

- Tout d'abord, l'un des processus initiaux pour réaliser cette sonde appelée génotypage, un test PCR a été effectué pour étudier la génétique de la maladie et exclure la présence ou l'absence de transgènes. C'était le résultat de l'électrophorèse traitée:



**Figure 46**, électrophorèse traitée à partir d'une litière de souris dans un transilluminateur du système d'imagerie ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Comme mentionné ci-dessus, un marqueur de poids moléculaire a été utilisé pour déterminer l'écoulement de l'ADN, ce qui nous a permis d'interpréter plus facilement le résultat; ceci est représenté dans la colonne 0 qui s'étend à une vitesse décroissante, c'est-à-dire d'un poids moléculaire plus élevé à moins.

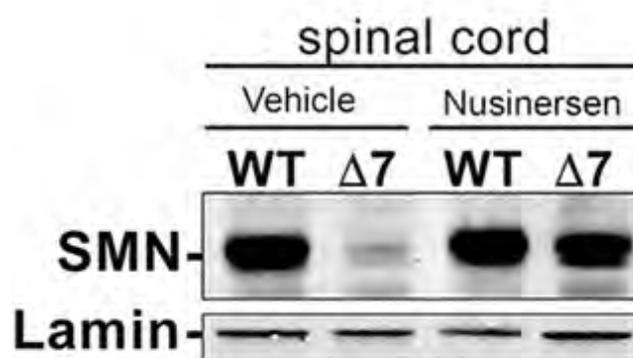
De cette façon, les puits qui n'ont qu'une bande inférieure, ont un total de paires de bases azotées avec un poids moléculaire minimal et, par conséquent, ont subi une délétion (comme c'est le cas **1, 2, 4, 7 et 8**). Ce sont, par conséquent, des souris malades qui souffrent de SMA d'une manière homozygote récessive (aa).

D'autre part, le cas n° 9 a une forte intensité sur la face supérieure, qui est liée à un grand nombre de paires de bases azotées et présente donc le gène SMN 1 dans son intégralité, étant un WT homozygote (AA).

Enfin, les cas qui présentent deux bandes plus intenses dans la bande inférieure (3, 5 et 6) sont des souris qui, bien qu'elles ne présentent pas la maladie, car comme mentionné elle est récessive, sont hétérozygotes (Aa) et ne sont pas considérées comme WT bien qu'elles soient constamment étudiées.

Ainsi, il est conclu qu'il n'y a qu'un seul rongeur WT dans les résultats de la portée présentée et que la génétique de la pathologie est confirmée.

- Deuxièmement, la dernière procédure effectuée a été le Western Blot dans lequel les niveaux d'expression de la protéine SMN ont été évalués à un âge avancé de la pathologie chez les souris WT, KO et traitées. Plus précisément, ceux qui concernent la moelle épinière et les muscles du tibial antérieur ont été analysés.



**Figure 47,** Analyse Western Blot des niveaux de protéines dans toute la moelle épinière et les muscles squelettiques se dissipent dans P12. Les bandes SMN ont été normalisées en lamin, et les niveaux d'expression relative de SMN ont été calculés à l'aide d'ImageJ. Les vêtements longs sont présentés dans les renseignements supplémentaires. [32]

Comme on peut le voir à l'œil nu, le raisonnement ne va pas au-delà du tangible : le niveau d'expression de la protéine SMN est directement lié à l'intensité de la bande supérieure. Ainsi, dans le cas de la moelle épinière, la nette différence d'intensité entre les souris WT et KO peut

être visualisée, ces dernières possédant un niveau de protéines presque négligeable ; alors que par rapport au modèle traité avec Nusinersen SPINRAZA, les niveaux de protéines sont presque entièrement récupérés.

De cette façon, il a été corroboré que la réduction de la protéine NMS provoque une augmentation de la dégénérescence des MN et, à son tour, la viabilité de Nusinersen SPINRAZA en tant qu'agent thérapeutique pour la neuropathologie de la SMA.

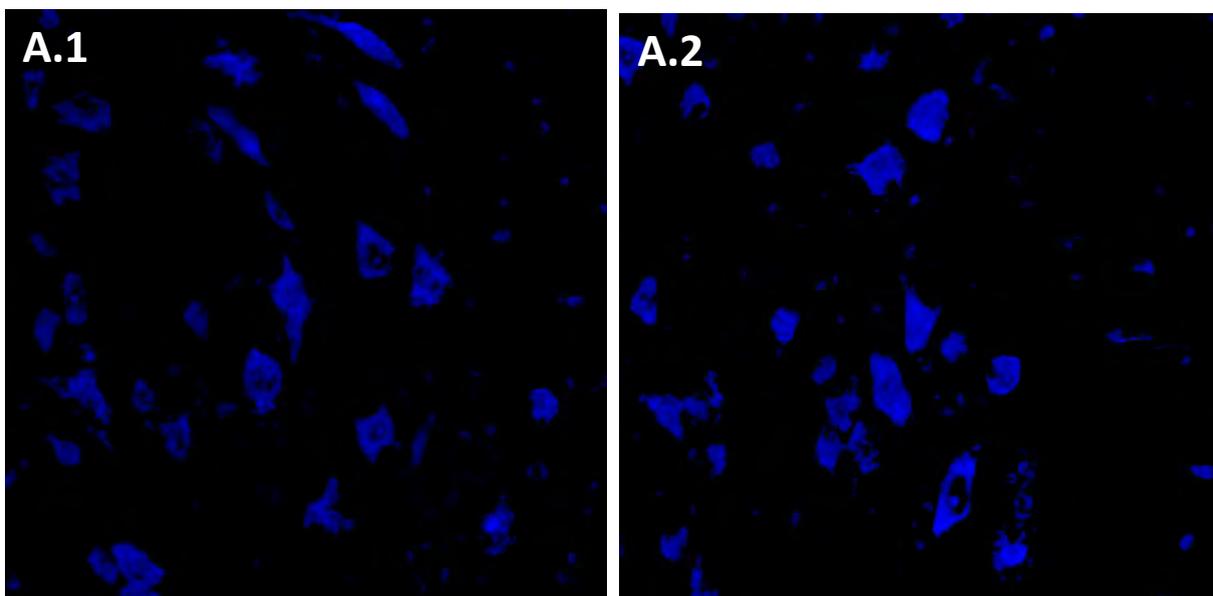
## 5.3 CHAPITRE III

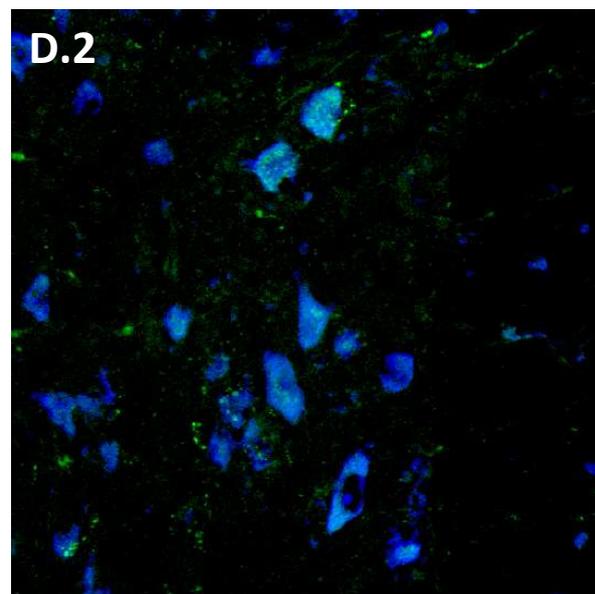
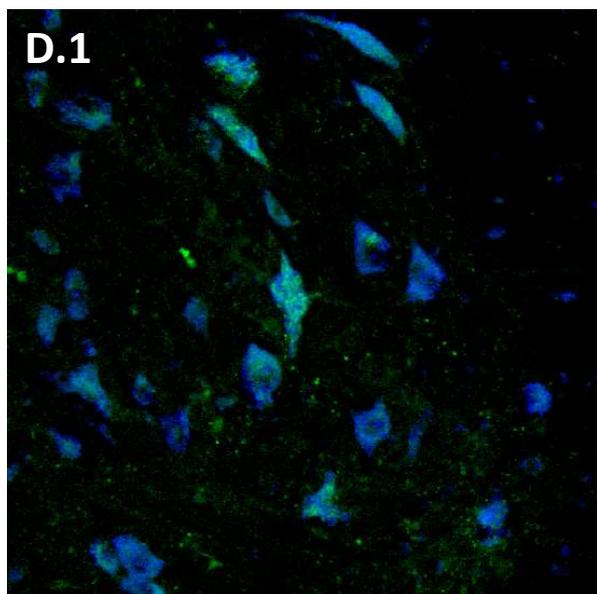
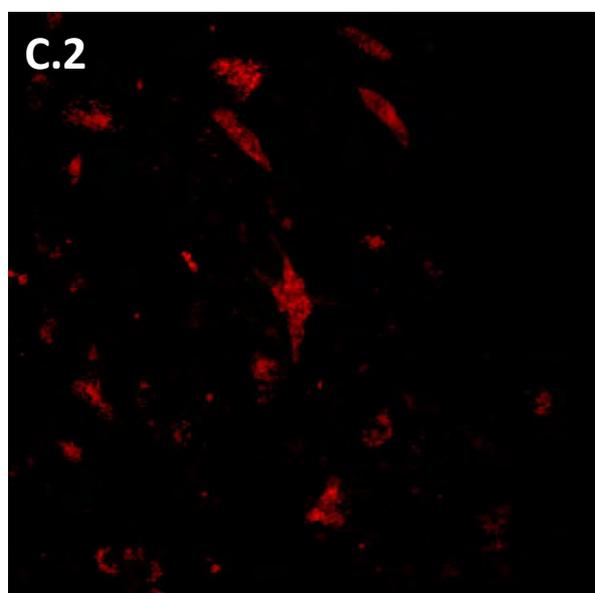
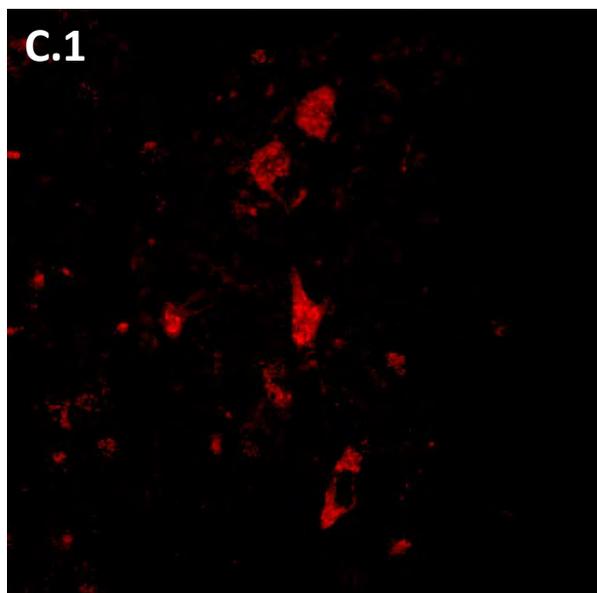
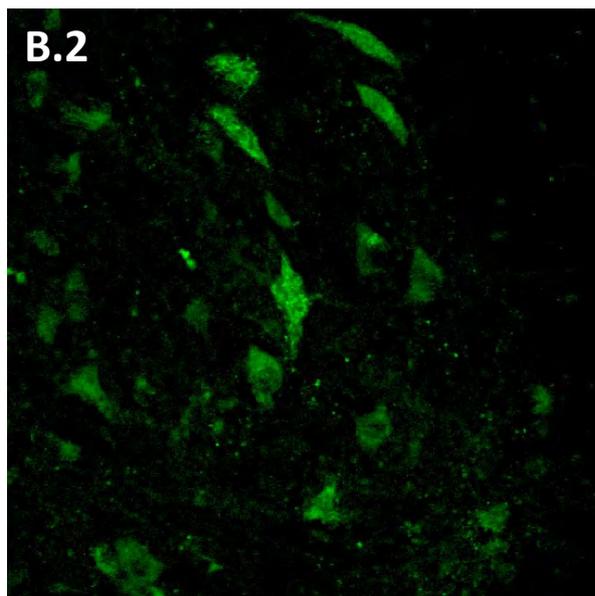
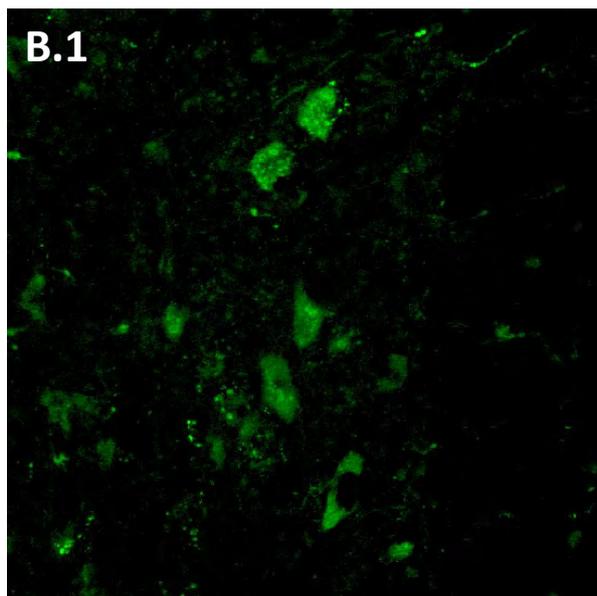
### CHANGEMENTS ULTRASTRUCTURAUX DANS LE SYSTÈME NEUROMUSCULAIRE: AFFECTATIONS DANS LA MOELLE

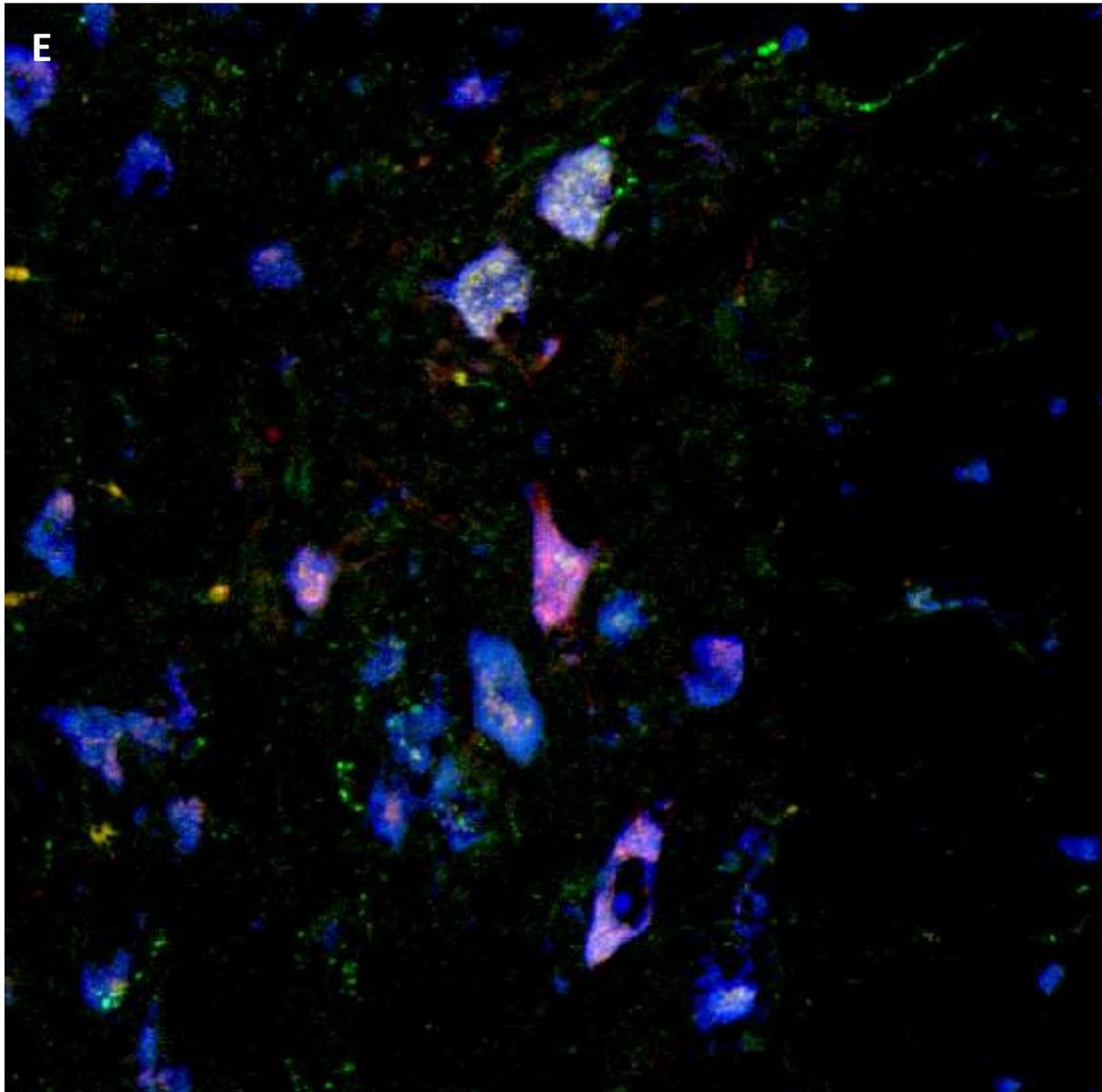
En ce qui concerne les échantillons observés au microscope confocal à l'aide de techniques immunocytochimiques, les AC utilisés nous ont permis d'identifier les MNs en raison des différentes propriétés et structures auxquelles ils sont associés (Annexe I) :

- **CGRP 488** (vert), est un neuropeptide qui a été lié à la plasticité synaptique: lorsqu'il y a une croissance axonale (neurites), il a été détecté qu'il y a une augmentation de l'expression de ce neuropeptide.
- **MMP9 Cy3** (rouge), marqueur des NM les plus vulnérables, le premier qui dans une neuropathologie est dégénéré.
- **Nissl bleu**, tache les parties les plus basophiles (ex, RER). Ceci, étant une structure très présente dans les MN, nous aide à les identifier.
- **HA Cy5**, spécifique aux transgènes. Bien que le processus d'immunostimulation ait été effectué avec ce AC, des échantillons de souris KO d'AS n'ont pas encore été observés.

Ainsi, nous avons pu visualiser les MNs-  $\alpha$  présents dans le segment médullaire s'étendant de L II à Co I. En particulier, ceux des modèles murins WT ont été observés où l'intensité du nombre de NM groupés dépend du segment rachidien observé.

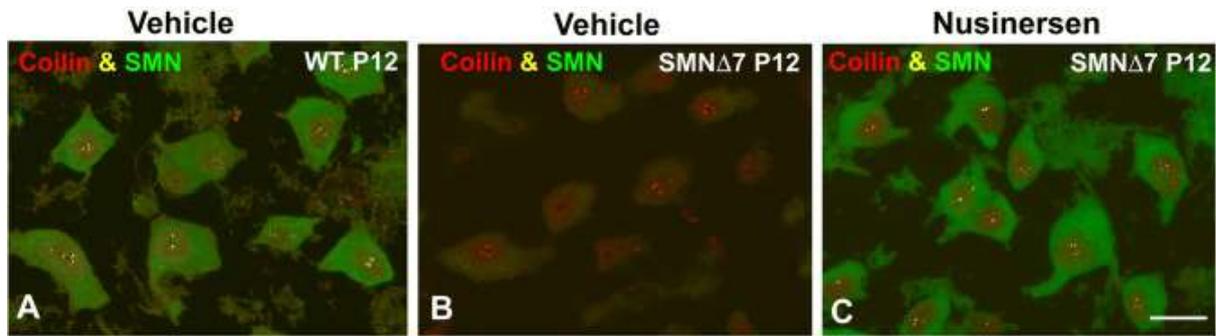






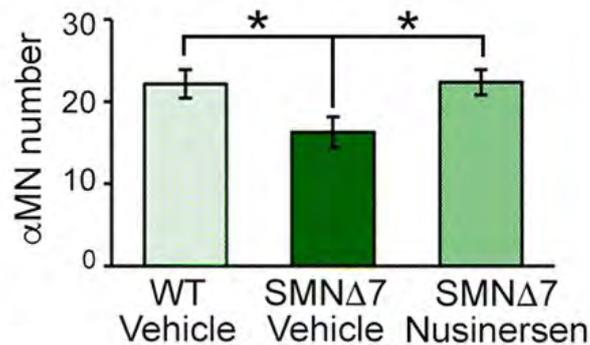
**Figure 48**, Différentes micrographies des MN de la région lombaire de la moelle épinière du modèle de type WT réalisées à l'aide du microscope confocal. (A.1/A.2) Coloration avec marqueur Nissl. (B.1/B.2) Coloration avec le neuropeptide CGRP 488. (C.1/C.2) Coloration avec AC MMP9 Cy3. (D.1/D.2) Micrographie montrant des structures teintées avec du Nissl bleu et du CGRP 488. (E) Micrographie avec tous les colorants et anticorps utilisés au cours du processus d'immunohistochimie.

Par conséquent, par rapport aux échantillons de MN de la corne ventrale de la même section lombaire de la moelle épinière dans des modèles atteints de SMA, une intensité minimale est observée de la même manière qu'une réduction du nombre due à la mort neuronale de la pathologie ; comme on peut le voir dans l'exemple suivant (**Figure 46**):



**Figure 46**,  $\alpha$ -MN d'un WT SMN7 (A), d'un KO SMN7 (B) et d'un SMN7 traités par Nusinersen spinraza;  $\Delta\Delta\Delta$ Nous pouvons voir le changement d'intensité dans l'immunomarquage et dans le nombre de MN dans le modèle KO et comment il peut être récupéré avec l'agent thérapeutique.

En outre, l'analyse statistique montre quantitativement la réduction du nombre de  $\alpha$ -MN dans les modèles de souris KO à la suite de la pathologie de l'AS, et comment elle peut être complètement récupérée avec l'administration de l'agent thérapeutique étudié.



**Figure 49**, Analyse quantitative (moyenne  $\pm$  ET) du nombre de mns de la corne ventrale (alpha) dans les cryosections transversales de la moelle épinière immunocolorées par ChAT. Les comptages de MN ont été effectués sur les cordes hémispinales de souris WT, SMN $\Delta$ 7 et SMN77 traitées de Nusinersen à P12. (n = 4 par groupe, réalisé à l'aide de GraphPad). [32]

De cette façon, l'effectivité de Nusinersen SPINRAZA en tant que traitement de la neuropathologie de la SMA est confirmée à nouveau et les bases pathologiques de celle-ci sont démontrées avec la visualisation des échantillons, qui impliquent des changements au niveau ultrastructurel et des altérations du nombre de MNS- $\alpha$  situés dans la corne ventrale de la moelle épinière.

## 5.4 CHAPITRE IV

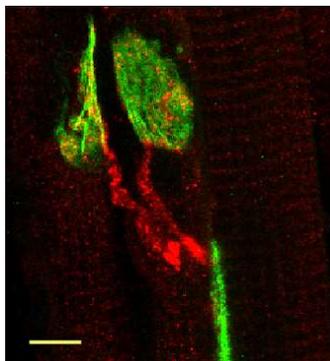
### CHANGEMENTS ULTRASTRUCTURAUX DANS LE SYSTÈME NEUROMUSCULAIRE: EFFETS SUR LES NMJs

L'AS est une maladie classiquement considérée comme une maladie MN, de sorte que la perte de ceux-ci en raison des faibles niveaux de la protéine NMS provoque son apparition avec ce phénotype caractéristique.

Or, la diminution modérée des MNs- $\alpha$  chez les souris SMAT1 n'explique pas pleinement la paralysie sévère subie par les souris touchées par la maladie, c'est pourquoi nous avons recherché des changements dans les articulations musculaires et neuromusculaires (NMJ) qui peuvent expliquer ce déficit moteur. L'incapacité dans le transport axonal des protéines, telles que l'actine et le ribonucléoprotéïnes le long des nerfs moteurs peut être essentielle (Zhang et al, 2003; Rossoll et al, 2003).

Pour déterminer les changements prématurés dans les protéines NMJ, l'expression de 9 marqueurs synaptiques a été analysée par immunohistochimie, en particulier, nous nous concentrerons sur CGRP et Y172.

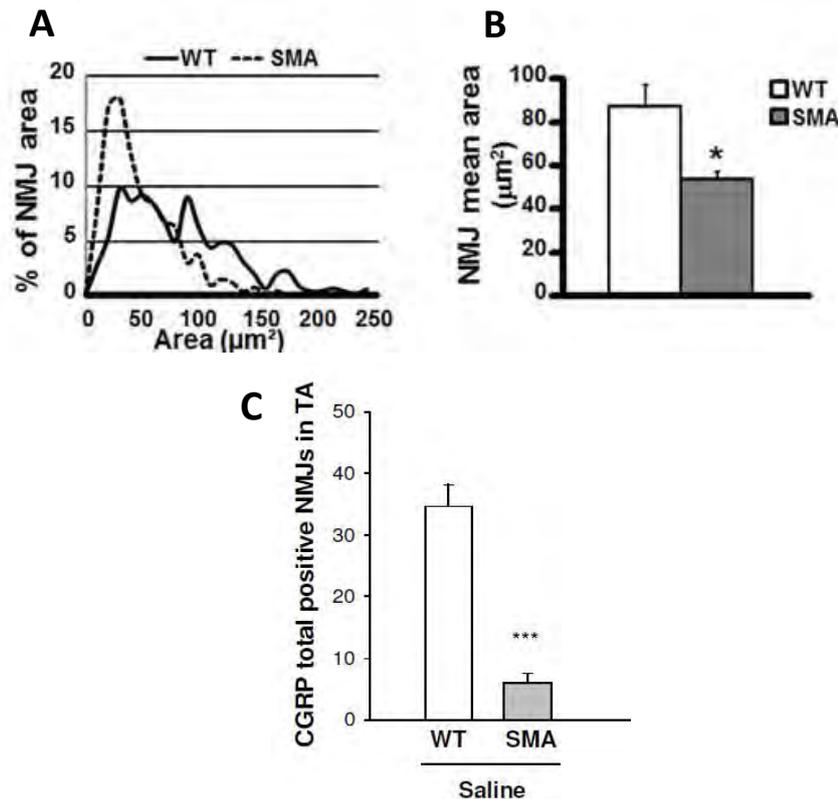
Le CGRP est régulé au cours du développement, étant plus actif et se trouvant plus abondant dans le développement ou la régénération des NMJ (Matteoli et al, 1988; Matteoli et coll., 1990; Tarabal et al, 1996) et est stocké dans des vésicules de noyau denses. L'épuisement du CGRP est exclusif dans les nerfs moteurs et les NMJ puisque l'immunoréactivité dans le système sensoriel/viscéral est maintenue dans les muscles affectés de SMAT1, un marquage qui a servi de contrôle positif de la même technique.



**Figure 50**, image de l'expression de *cgrp* et Y172 dans les muscles TA d'une souris WT, mentionne des fibres et des plaques musculaires légèrement marquées (NMJ).

Ainsi, la dernière partie du séjour expérimental a consisté à analyser plusieurs images NMJ (**Figure 50**) selon différents paramètres afin d'établir des différences entre les souris WT et SMNT1 puis de les évaluer avec les résultats de modèles animaux traités avec Nusinersen SPINRAZA.

Voici les analyses statistiques obtenues à partir des paramètres les plus pertinents extraits de *Valsecchi et al.*, (**figure 51**) :



**Figure 51**, analyse quantitative des différents NMJ des modèles WT et TG d'AS à P10. (A) distribution de la zone NMJ dans les plaques terminales WT (ligne continue) et SMA (ligne pointillée) exprimée en pourcentage du nombre total de plaques. (B) valeur moyenne de la zone NMJ dans les quadriceps WT et SMA. \* $p < 0,05$  par analyse par T-test. (C) [33]

Dans l'ensemble, on peut voir comment les modèles murins WT présentent un pourcentage de NMJs avec une area plus grande et avec une intensité du marqueur CGRP9 plus élevé par rapport aux souris KO de SMNT1, ce qui confirme que la neuropathologie de l'AS déclenche un large éventail de changements ultrastructuraux dans les MNS- $\alpha$  à la fois au niveau nucléaire, comme mentionné dans le bouton C, et au niveau des NMJ, ce qui produit l'absence d'innervation et l'atrophie des muscles antérieurs.



---

## **CONCLUSIONS**

## 6. CONCLUSIONS

En guise de conclusion, une fois que les résultats de la recherche ont été analysés et discutés, on peut indiquer ce qui suit :

- Les résultats ont montré que l'agent thérapeutique Nusinersen SPINRAZA est efficace pour le traitement de la pathologie SMA dans les modèles murins SMAT1.
- De cette façon, il a été possible de vérifier une diminution du nombre de MNS- $\alpha$  situés dans la corne ventrale de la moelle épinière des rongeurs KO par rapport aux WT et il a été démontré qu'un nombre analogue peut être atteint à nouveau en administrant le traitement.
- En outre, il a été démontré que les niveaux de protéine SMN extraits du tissu nerveux de la moelle épinière des rongeurs traités ont également été assimilés à WT, ce qui illustre l'efficacité de l'agent thérapeutique.
- D'autre part, des relations de divers paramètres ont également été trouvées qui concerne les NMJ (pourcentage de l'area et intensité) à la suite d'une pathologie neuromusculaire chez les rongeurs KO.

Ainsi, il est mentionné que l'hypothèse initiale a été corroborée : la stratégie thérapeutique Nusinersen SPINRAZA est efficace pour le traitement de la neuropathologie de l'amyotrophie spinale ; de la même manière que les objectifs fixés ont été plus que atteints.

---

## **CONSIDERATIONS FINALES**

## 7. CONSIDÉRATIONS FINALES

En définitive, je joins une évaluation prenant en compte les objectifs fixés au début par rapport au cadre théorique et pratique :

- La partie théorique du travail m'a permis d'élargir mes connaissances sur la SMA grâce à la documentation dans des articles scientifiques et des revues; À son tour, le séjour dans le laboratoire expérimental de neuropathologie de l'IRBLleida a en soi conduit à une étude exhaustive des bases biologiques et phénotypiques de la SMA afin d'être pleinement conscient des techniques et des processus qui ont été exécutés.
- À la lumière de ce qui précède, la préparation des travaux m'a permis de participer au développement d'un projet scientifique, au quotidien. Avoir été encadré et accompagné par Dra. Olga Tarabal, experte dans le domaine, m'a directement rapprochée du travail quotidien qui doit être effectué dans un laboratoire : des protocoles de nettoyage et de désinfection à l'instinct de dépassement et à la curiosité nécessaire. D'autre part, j'ai pu me familiariser avec les méthodologies et les outils utilisés dans les laboratoires, tels que l'utilisation correcte des pipettes automatisées et l'assemblage d'échantillons grâce à des techniques immunohistochimiques.
- Parallèlement aux résultats déjà exprimés, il a été possible de démontrer empiriquement, les mécanismes pathogènes de la maladie. Premièrement, les changements phénotypiques subis par les souris tels que la réduction de la taille, du poids, de l'atrophie et des tremblements musculaires constants (en particulier dans les muscles postérieurs); deuxièmement, la délétion de l'exon 7 du gène NMS par la réalisation du test PCR; et enfin les changements dans les niveaux de protéine SMN exprimés par la technique du Transfert de Western.

Tout bien pesé, je trouve que ce travail m'a aidé à entrer dans le monde de la recherche scientifique et à travailler en laboratoire. De plus, j'ai appris à concevoir une méthode expérimentale : poser un

problème, formuler une hypothèse, mener plusieurs expériences, analyser les résultats obtenus et rédiger une conclusion.

Je reconnait que malgré les limites dans l'obtention des représentations des résultats pour des raisons bureaucratiques, je considère que ce travail peut contribuer positivement à la communauté scientifique en apportant sa pierre à l'édifice, en résolvant et en corroborant un aspect dominant à la fois dans l'aspect humanitaire et dans le domaine de la recherche biomédicale.



---

## RÉFÉRENCES

## 9. RÉFÉRENCES

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (2018). *Informe de Posicionamiento Terapéutico de nusinersen (Spinraza®) en atrofia muscular espinal.*
- Al-Zaidy, S.A., Kolb, S.J., Lowes, L., Alfano, L.N., Shell, R., Church, K.R., Nagendran, S., Sproule, D.M., Feltner, D.E., Wells, C., Ogrinc, F., Menier, M., L'Italien, J., Arnold, W.D., Kissel, J.T., Kaspar, B.K., Mendell, J.R., 2019a. AVXS-101 (Onasemnogene Apeparvovec) for SMA1: Comparative Study with a Prospective Natural History Cohort. *J. Neuromuscul. Dis.* 6, 307–317. <https://doi.org/10.3233/jnd-190403>
- Aslan, N., Yildizdas, D., Coban, Y., Horoz, O.O., Mert, G.G., Ozcan, N., 2019. A Novel Adverse Event of Nusinersen Treatment: Thrombocytosis. *Indian J. Pediatr.* 86, 1157. <https://doi.org/10.1007/s12098-019-03069-1>
- Belsa, M et al., (Ed.). (2016). La duplicació del DNA i biosíntesi de proteïnes. In *Biologia 1* (pp. 212–213). Santillana Educacion.
- Belsa, M et al., (Ed.). (2016). Les mutacions, els gens, i la enginyeria genètica. In *Biologia 1* (pp. 212–213). Santillana Educacion.
- Bessou, P., Emonet-Dénand, F., Laporte, Y., 1965. Motor fibres innervating extrafusal and intrafusal muscle fibres in the cat. *J. Physiol.* 180, 649–672. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1965.sp007722>
- Bevan, A.K., et al., Early heart failure in the SMNDelta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum Mol Genet*, 2010. 19(20): p. 3895-905.
- Boon, K.L., et al., *Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects.* *Hum Mol Genet*, 2009. 18(19): p. 3615-25.
- Bosch-Marce, M., et al., *Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice.* *Hum Mol Genet*, 2011. 20(9): p. 1844-53.

- Bowerman, M., et al., *A critical smn threshold in mice dictates onset of an intermediate spinal muscular atrophy phenotype associated with a distinct neuromuscular junction pathology*. *Neuromuscul Disord*, 2012. **22**(3): p. 263-76.
- Bowerman, M., et al., *Fasudil improves survival and promotes skeletal muscle development in a mouse model of spinal muscular atrophy*. *BMC Med*, 2012. **10**: p. 24.
- Bowerman, M., et al., *Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model*. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(8): p. 1468-78.
- Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
- Briese, M., et al., *Deletion of smn-1, the Caenorhabditis elegans ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(1): p. 97-104.
- Brzustowicz, L.M., et al., *Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3*. *Nature*, 1990. **344**(6266): p. 540-1.
- Burglen, L., et al., *Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene*. *Genomics*, 1996. **32**(3): p. 479-82.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P., Zajac, F.E., 1973. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol.* 234, 723–748. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010369>
- Burlet, P., et al., *The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy*. *Hum Mol Genet*, 1998. **7**(12): p. 1927-33.
- Calucho, M., Bernal, S., Alías, L., March, F., Venceslá, A., Rodríguez-Álvarez, F.J., Aller, E., Fernández, R.M., Borrego, S., Millán, J.M., Hernández-Chico, C., Cuscó, I., Fuentes-Prior, P., Tizzano, E.F., 2018. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul. Disord.* 28, 208–215. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.01.003>

- Cardiello JF, Sanchez GJ, Allen MA, Dowell RD. Lessons from eRNAs: understanding transcriptional regulation through the lens of nascent RNAs. *Transcription*. 2020 Feb;11(1):3-18. doi: 10.1080/21541264.2019.1704128. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31856658; PMCID: PMC7053884.
- Cartegni, L. and A.R. Krainer, *Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1*. *Nat Genet*, 2002. **30**(4): p. 377-84.
- Casanovas, A., Salvany, S., Lahoz, V., Tarabal, O., Piedrafita, L., Sabater, R., Hernández, S., Calderó, J., & Esquerda, J. E. (2017). Neuregulin 1-ErbB module in C-bouton synapses on somatic motor neurons: molecular compartmentation and response to peripheral nerve injury. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep40155>
- Cerveró, C. (2016). *Atròfia muscular espinal: mecanismes patogènics i estratègies terapèutiques en models murins de la malaltia*. Universitat de Lleida.
- Chandrasekhar, A., 2004. Turning Heads: Development of Vertebrate Branchiomotor Neurons. *Dev.Dyn*. 229, 143-161. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10444>
- Chang, H.C., et al., *Modeling spinal muscular atrophy in Drosophila*. *PLoS One*, 2008. **3**(9): p. e3209.
- Chaytow H, Faller KME, Huang YT, Gillingwater TH. Spinal muscular atrophy: From approved therapies to future therapeutic targets for personalized medicine. *Cell Rep Med*. 2021 Jul 21;2(7):100346. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100346. PMID: 34337562; PMCID: PMC8324491.
- Chen, Q., et al., *Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP*. *Genomics*, 1998. **48**(1): p. 121-7.
- Chiriboga, C.A., 2017. Expert Review of Neurotherapeutics Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Rev. Neurother*. 17, 955–962. <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1364159>
- Chung, W.S., et al., Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nat Neurosci*, 2015. **18**(11): p. 1539-45.

- Cifuentes-Diaz, C., et al., *Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy*. J Cell Biol, 2001. **152**(5): p. 1107-14.
- Cipriano, A., & Ballarino, M. (2018). The ever-evolving concept of the gene: The use of RNA/protein experimental techniques to understand genome functions. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00020>
- Comley LH, Kline RA, Thomson AK, Woschitz V, Landeros EV, Osman EY, Lorson CL, Murray LM. Motor Unit Recovery Following Smn Restoration in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy. *Hum Mol Genet*. 2022 May 12;ddac097. doi: 10.1093/hmg/ddac097. Epub ahead of print. PMID: 35551393.
- Conforti, L., R. Adalbert, and M.P. Coleman, *Neuronal death: where does the end begin?* Trends in Neurosciences, 2007. **30**(4): p. 159-166.
- Conradi, S. (1969) Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the surface of the proximal part of a motoneuron den-drite, as analyzed by serial sections. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 332, 49.
- Cooper, G. M. (2000). Translation of mRNA. In ***The cell: a molecular approach***. (2nd ed.). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9849/>(Opens in a new window).
- Coovert, D.D., et al., *The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(8): p. 1205-14.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., Gilchrist, D.A., et al., 2012. Defining the status of RNA polymerase at promoters. *Cell Rep.*, 2(4):1025-1035. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.034
- Corti, S., et al., *Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice*. *Brain*, 2010. **133**(Pt 2): p. 465-81.
- Corti, S., et al., *Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(165): p. 165ra162.

- Corti, S., et al., *Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy*. J Clin Invest, 2008. **118**(10): p. 3316-30.
- Crawford, T.O. and C.A. Pardo, *The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy*. Neurobiol Dis, 1996. **3**(2): p. 97-110.
- Dachs, E., et al., *Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy*. J Neuropathol Exp Neurol, 2011. **70**(6): p. 444-61.
- Dawkins R., 1976. **The Selfish Gene**. Oxford University Press, Oxford.
- del Arco, J. (2014). *Curso básico. Formación terapéutica para pacientes neurológicos. Tema 6. Trastornos de la unión neuromuscular*. Elsevier.
- d'Errico, P., et al., *Selective vulnerability of spinal and cortical motor neuron subpopulations in delta7 SMA mice*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82654..
- DiDonato, C.J., et al., *Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene*. Genome Res, 1997. **7**(4): p. 339-52.
- DiDonato, C.J., et al., *Regulation of murine survival motor neuron (Smn) protein levels by modifying Smn exon 7 splicing*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(23): p. 2727-36.
- Dimitriadi, M., et al., *Conserved Genes Act as Modifiers of Invertebrate SMN Loss of Function Defects*. Plos Genetics, 2010. **6**(10).
- Dubowitz, V., *Chaos in the classification of SMA: a possible resolution*. Neuromuscular Disord, 1995. **5**(1): p. 3-5.
- Eccles, J.C., Eccles, R.M., Iggo, A., Lundberg, A., 1960. Electrophysiological Studies on Gamma Motoneurons. Acta Physiol. Scand. 50, 32–40. <https://doi.org/10.1111/j.17481716.1960.tb02070.x>
- Edens, B.M., et al., *Molecular mechanisms and animal models of spinal muscular atrophy*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(4): p. 685-92.

El-Khodor, B.F., et al., *Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy*. *Exp Neurol*, 2008. **212**(1): p. 29-43.

El-Khodor, B.F., et al., *Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy*. *Exp Neurol*, 2008. **212**(1): p. 29-43.

Fakan, S., G. Leser, and T.E. Martin, *Ultrastructural Distribution of Nuclear Ribonucleoproteins as Visualized by Immunocytochemistry on Thin-Sections*. *Journal of Cell Biology*, 1984. **98**(1): p. 358-363.

Faraz Farooq, Francisco Abadía-Molina, Duncan MacKenzie, Jeremiah Hadwen, Fahad Shamim, Sean O'Reilly, Martin Holcik, Alex MacKenzie, Celecoxib increases **SMN** and survival in a severe spinal muscular atrophy mouse model via p38 pathway activation, **Human Molecular Genetics**, Volume 22, Issue 17, 1 September 2013, Pages 3415–3424, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt191>

Fernandez Tresguerres, J. A. (2010). *Fisiología humana 4e*. Mc Graw-Hill Education.

Finkel, R.S., McDermott, M.P., Kaufmann, P., Darras, B.T., Chung, W.K., Sproule, D.M., Kang, P.B., Reghan Foley, A., Yang, M.L., Martens, W.B., Oskoui, M., Glanzman, A.M., Flickinger, J., Montes, J., Dunaway, S., O'Hagen, J., Quigley, J., Riley, S., Benton, M., Ryan, P.A., Montgomery, M., Marra, J., Gooch, C., De Vivo, D.C., 2014. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology* 83, 810–817. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000741>

Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, Yamashita M, Rigo F, Hung G, Schneider E, Norris DA, Xia S, Bennett CF, Bishop KM. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet*. 2016 Dec 17;388(10063):3017-3026. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31408-8. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27939059.

Finkel, R.S., Mercuri, E., Darras, B.T., Connolly, A.M., Kuntz, N.L., Kirschner, J., Chiriboga, C.A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E., Topaloglu, H., Tulinius, M., Montes, J., Glanzman, A.M., Bishop, K.,

- Zhong, Z.J., Gheuens, S., Bennett, C.F., Schneider, E., Farwell, W., De Vivo, D.C., 2017. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* 377, 1723–1732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>
- Finkel, R.S., Mercuri, E., Meyer, O.H., Simonds, A.K., Schroth, M.K., Graham, R.J., Kirschner, J., Iannaccone, S.T., Crawford, T.O., Woods, S., Muntoni, F., Wirth, B., Montes, J., Main, M., Mazzone, E.S., Vitale, M., Snyder, B., Quijano-Roy, S., Bertini, E., Davis, R.H., Qian, Y., Sejersen, T., 2018. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 2: Pulmonary and acute care; medications, supplements and immunizations; other organ systems; and ethics. *Neuromuscular Disord.* 28, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.11.004>
- Florman, J. E., Duffau, H., & Rughani, A. I. (2013). Lower motor neuron findings after upper motor neuron injury: insights from postoperative supplementary motor area syndrome. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 85. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00085>
- Frank, E. (2009). A new class of spinal interneurons: the origin and function of C boutons is solved. *Neuron*, 64(5), 593–595. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.030>
- Gallart-Palau, X., Tarabal, O., Casanovas, A., Sábado, J., Correa, F. J., Hereu, M., Piedrafita, L., Calderó, J., & Esquerda, J. E. (2014). Neuregulin-1 is concentrated in the postsynaptic subsurface cistern of C-bouton inputs to  $\alpha$ -motoneurons and altered during motoneuron diseases. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(8), 3618–3632. <https://doi.org/10.1096/fj.13-248583>
- Gavrilina, T.O., et al., *Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect.* *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(8): p. 1063-75.
- Gogliotti, R.G., et al., *Motor neuron rescue in spinal muscular atrophy mice demonstrates that sensory-motor defects are a consequence, not a cause, of motor neuron dysfunction.* *J Neurosci*, 2012. **32**(11): p. 3818-29.

Guardi, P. (2019, July 16). Los 9 TIPOS DE NEURONAS: estructura y funciones. *psicologia-online.com*.

<https://www.psicologia-online.com/tipos-de-neuronas-estructura-y-funciones-4651.html>

Guo J. Transcription: the epicenter of gene expression. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014 May;15(5):409-11.

doi: 10.1631/jzus.B1400113. PMID: 24793758; PMCID: PMC4076597.

Guo J. Transcription: the epicenter of gene expression. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014 May;15(5):409-11.

doi: 10.1631/jzus.B1400113. PMID: 24793758; PMCID: PMC4076597.

Guy-Evans, O. (2021, February 15). *Motor neuron: Function, types, and structure*.

Simplypsychology.org. <https://www.simplypsychology.org/motor-neuron.html>

Hahnen, E., et al., *Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals*. *Hum Mol Genet*, 1995. 4(10): p. 1927-33.

Hammond, S.M., et al., *Mouse survival motor neuron alleles that mimic SMN2 splicing and are inducible rescue embryonic lethality early in development but not late*. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e15887.

Heier, C.R. and C.J. DiDonato, *Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo*. *Hum Mol Genet*, 2009. 18(7): p. 1310-22.

Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 126(14), 3047–3055. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3047>

Hoffmann, J., Ueber chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiärer Basis. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde*, 1893. 3(6): p. 427-470.

Houseley, J., Tollervey, D., 2009. The many pathways of RNA degradation. *Cell*, 136(4):763-776.[doi:10.1016/j.cell.2009.01.019]

Hsieh-Li, H.M., et al., *A mouse model for spinal muscular atrophy*. Nature Genetics, 2000. **24**(1): p. 66-70.

<https://doi.org/10.18553/jmcp.2018.24.12-a.s3>

Ito, Y., et al., *Thalamic lesions in a long-surviving child with spinal muscular atrophy type I: MRI and EEG findings*. Brain Dev, 2004. **26**(1): p. 53-6.

Ivanhoe, C.B., Reistetter, T.A., 2004. Spasticity: the misunderstood part of the upper motor neuron syndrome. Am. J. Phys. Med. Rehabil. 83, S3-9.<https://doi.org/10.1097/01.phm.0000141125.28611.3e>

Iyer, C.C., et al., *Low levels of Survival Motor Neuron protein are sufficient for normal muscle function in the SMNDelta7 mouse model of SMA*. Hum Mol Genet, 2015.

Izban, M. G., & Luse, D. S. Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates. *Journal of Biological Chemistry* 267, 13647–13655 (1992)

Jablonka, S., et al., *Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(3): p. 511-8.

Kanning, K.C., Kaplan, A., Henderson, C.E., 2010. Motor neuron diversity in development and disease. Annu. Rev. Neurosci. 33, 409–40. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135722>

Kashima, T. and J.L. Manley, *A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 460-3.

Kenneth Maiese , MD, Rutgers University. (2022, April 28). *Anatomie de la colonne vertébrale*. <https://www.merckmanuals.com/fr-ca>

Kissane RWP, Ghaffari-Rafi A, Tickle PG, Chakrabarty S, Egginton S, Brownstone RM, Smith CC. C-bouton components on rat extensor digitorum longus motoneurons are resistant to chronic functional overload. J Anat. 2021 May 3. doi: 10.1111/joa.13439. Epub ahead of print. PMID: 33939175.

- Kolb SJ, Kissel JT. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin.* 2015 Nov;33(4):831-46. doi: 10.1016/j.ncl.2015.07.004. PMID: 26515624; PMCID: PMC4628728.
- Kolb, S.J., Kissel, J.T., 2015. Spinal Muscular Atrophy. *Neurol. Clin.* 33, 831–846. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.004>
- Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- Lahunta, A., Glass, E., 2009. Lower Motor Neuron, in: *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology.* Elsevier, pp. 77–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-6706-5.00005-6>
- Le, T.T., et al., *SMN $\Delta$ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN.* *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(6): p. 845-57.
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frézal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., Melki, J., 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3)
- Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G., Melki, J., 1997. *Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy.* *Nat. Genet.* 16, 265–9. <https://doi.org/10.1038/ng0797-265>
- Lefebvre, S., et al., *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy determining gene.* *Cell*, 1995. **80**(1): p. 155-65.
- Linda, J. (2021, May 3). *Myelin and nerve structure.* Medlineplus.gov. <https://medlineplus.gov/ency/article/002261.htm>
- Ling, K.K., et al., *Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy.* *PLoS One*, 2010. **5**(11): p. e15457.

- Liu, Q. and G. Dreyfuss, *A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein*. EMBO J, 1996. **15**(14): p. 3555-65.
- Logan, J., *et al.* A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 23, 8306–8310 (1987)
- Lorson, C.L. and E.J. Androphy, *An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN*. Human Molecular Genetics, 2000. **9**(2): p. 259-266.
- Lorson, C.L., *et al.*, *A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(11): p. 6307-6311.
- Lorson, C.L., *et al.*, *SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity*. Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 63-6.
- Lorson, C.L., H. Rindt, and M. Shababi, *Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(R1): p. R111-8.
- Lutz, C.M., *et al.*, *Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy*. J Clin Invest, 2011. **121**(8): p. 3029-41.
- Macleod, M.J., Taylor, J.E., Lunt, P.W., Mathew, C.G., Robb, S.A., 1999. Prenatal onset spinal muscular atrophy. Eur. J. Paediatr. Neurol. 3, 65–72. [https://doi.org/10.1016/S1090-3798\(99\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S1090-3798(99)80015-4)
- Mailman, M.D., Heinz, J.W., Papp, A.C., Snyder, P.J., Sedra, M.S., Wirth, B., Burghes, A.H.M., Prior, T.W., 2002. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. Genet. Med. 4, 20–26. <https://doi.org/10.1097/00125817-200201000-00004>
- Malone, D.C., Dean, R., Arjunji, R., Jensen, I., Cyr, P., Miller, B., Maru, B., Sproule, D.M., Feltner, D.E., Dabbous, O., 2019. Cost-effectiveness analysis of using onasemnogene abeparvocec (AVXS-101) in spinal muscular atrophy type 1 patients. J.
- Mancuso, R., & Navarro, X. (2017). Sigma-1 receptor in motoneuron disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 964, 235–254. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1_16)

- Markowitz, J.A., M.B. Tinkle, and K.H. Fischbeck, *Spinal muscular atrophy in the neonate*. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs, 2004. **33**(1): p. 12-20.
- Martínez Hernández, R. (2012). *Desarrollo neuromuscular en la atrofia muscular espinal*. Universitat de Barcelona.
- Martinez, T.L., et al., *Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy*. J Neurosci, 2012. **32**(25): p. 8703-15.
- Matteoli M, Haimann C, Torri-Tarelli F, Polak JM, Ceccarelli B, De Camilli P. *Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Oct;85(19):7366-70. doi: 10.1073/pnas.85.19.7366. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Feb;86(4):1416. PMID: 3050995; PMCID: PMC282187.
- Matteoli M, Balbi S, Sala C, Chini B, Cimino M, Vitadello M, Fumagalli G. *Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction*. J Mol Neurosci. 1990;2(3):175-84. doi: 10.1007/BF02896842. PMID: 2275848.
- Mattis, V.B., et al., *Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts*. Hum Genet, 2006. **120**(4): p. 589-601.
- Mattis, V.B., et al., *Subcutaneous administration of TC007 reduces disease severity in an animal model of SMA*. BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 142.
- McGivern, J.V., et al., *Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production*. Glia, 2013. 61(9): p. 1418-28.
- McGovern, V.L., et al., *Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(18): p. 2900-9.
- McGovern, V.L., et al., *Plastin 3 Expression Does Not Modify Spinal Muscular Atrophy Severity in the SMA Mouse*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132364.
- McGovern, V.L., et al., *SMN expression is required in motor neurons to rescue electrophysiological deficits in the SMNDelta7 mouse model of SMA*. Hum Mol Genet, 2015. 24(19): p. 5524-41.

- McNeil C Butler J Taylor J Gandevia S. (2022). *Testing the excitability of human motoneurons*.
- McWhorter, M.L., et al., *Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 919-31.
- Melki, J., Abdelhak, S., Sheth, P., Bachelot, M.F., Burlet, P., Marcadet, A., Aicardi, J., Barois, A., Carriere, J.P., Fardeau, M., 1990. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. Nature 344, 767–8. <https://doi.org/10.1038/344767a0>
- Melki, J., et al., *Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q*. Nature, 1990. **344**(6268): p. 767-8.
- Melki, J., et al., *Refined linkage map of chromosome 5 in the region of the spinal muscular atrophy gene*. Genomics, 1993. **15**(3): p. 521-4.
- Mentis, G.Z., et al., *Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy*. Neuron, 2011. **69**(3): p. 453-67.
- Mercuri, E et al., 2018. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. Neuromuscul. Disord. 28, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.11.005>
- Mercuri, E., Finkel, R.S., Montes, J., Mazzone, E.S., Sormani, M.P., Main, M., Ramsey, D., Mayhew, A., Glanzman, A.M., Dunaway, S., Salazar, R., Pasternak, A., Quigley, J., Pane, M., Pera, M.C., Scoto, M., Messina, S., Sframeli, M., Vita, G.L., D'Amico, A., van den Hauwe, M., Sivo, S., Goemans, N., Kaufmann, P., Darras, B.T., Bertini, E., Muntoni, F., de Vivo, D.C., 2016. Patterns of disease progression in type 2 and 3 SMA: Implications for clinical trials. Neuromuscul. Disord. 26, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.10.006>
- Miguel-Aliaga, I., et al., *The Caenorhabditis elegans orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability*. Human Molecular Genetics, 1999. **8**(12): p. 2133- 2143.

Minchin S, Lodge J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem.* 2019 Oct 16;63(4):433-456. doi: 10.1042/EBC20180038. PMID: 31652314; PMCID: PMC6822018.

Monani, U.R., et al., *The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy.* *Human Molecular Genetics*, 2000. **9**(3): p. 333-339.

Monani, U.R., *Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease.* *Neuron*, 2005. **48**(6): p. 885-96.

Montes, J., et al., Clinical outcome measures in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol*, 2009. **24**(8): p. 968-78

Murdocca, M., et al., *IPLIX administration improves motor neuron survival and ameliorates motor functions in a severe mouse model of spinal muscular atrophy.* *Mol Med*, 2012. **18**: p. 1076-85.

*Muscle Contraction - Introduction.* (n.d.). Athabasca.ca. Retrieved 22 June 2022, from <https://psych.athabasca.ca/html/Psych402/Biotutorials/31/intro.shtml>

National, S., & Network, B. (n.d.). *Red Nacional de Biobancos.* Redbiobancos.Es. Retrieved 11 May 2022, from <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-tejidos-neurologicos.pdf>

*NCI dictionary of Cancer Terms.* (2011, February 2). National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/spinal-column>

Neil, E.E., Bisaccia, E.K., 2019. Nusinersen: A novel antisense oligonucleotide for the treatment of spinal muscular atrophy. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* **24**, 194-203. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-24.3.194>

Newman, T. (2022, February 4). *Central nervous system: Structure, function, and diseases.* Medicalnewstoday.com. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/307076>

- Nieuwenhuys, R., Voogd, J., Van Huijzen, C., 2008. The human central nervous system, The Human Central Nervous System. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp, 1-967. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-34686-9>
- NIH Community Team. (2022). *Gen. genome.gov*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Gen>
- Nurputra, D.K., et al., *Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials*. *Ann Hum Genet*, 2013. **77**(5): p. 435-63.
- Parente, V., Corti, S., 2018. Advances in spinal muscular atrophy therapeutics. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 11, 1-13. <https://doi.org/10.1177/1756285618754501>
- Park, G.H., et al., *Reduced survival of motor neuron (SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene*. *J Neurosci*, 2010. **30**(36): p. 12005-19.
- Paushkin, S., et al., *The survival motor neuron protein of Schizosacharomyces pombe. Conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(31): p. 23841-6.
- Pearn, J., 1978. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J. Med. Genet.* 15, 409–413. <https://doi.org/10.1136/jmg.15.6.409>
- Pearn, J.H., P. Hudgson, and J.N. Walton, *A Clinical and Genetic Study of Spinal Muscular Atrophy of Adult Onset: The Autosomal Recessive Form as a Discrete Disease Entity*. *Brain*, 1978. **101**(4): p. 591-606.
- Piepers, S., van den Berg, L.H., Brugman, F., Scheffer, H., Ruitkamp-Versteeg, M., van Engelen, B.G., Faber, C.G., de Visser, M., van der Pol, W.-L., Wokke, J.H.J., 2008. A natural history study of late onset spinal muscular atrophy types 3b and 4. *J. Neurol.* 255, 1400–4. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-0929-0>
- Portin P, Wilkins A. The Evolving Definition of the Term "Gene". *Genetics*. 2017 Apr;205(4):1353-1364. doi: 10.1534/genetics.116.196956. PMID: 28360126; PMCID: PMC5378099.

- Proudfoot, N., 1991. Poly(A) signals. *Cell*, 64(4):671-674. doi:10.1016/0092-8674(91)90495-K
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., Anthony-Samuel, L., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2003. *Neurosciences*, 2nd edition. de boeck. ISBN-10: 9780878936953.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001a. Chapter 17: Upper Motor Neuron Control of the Brainstem and Spinal Cord. ISBN-10: 9780878936953
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001b. The Lower Motor Neuron Syndrome. ISBN-10: 9780878936953
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., Williams, S.M., 2001c. Chapter 21: The Visceral Motor System. ISBN-10: 9780878936953
- Rajendra, T.K., et al., *A Drosophila melanogaster model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle*. *J Cell Biol*, 2007. **176**(6): p. 831-41.
- Ransohoff, R.M. and V.H. Perry, Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 119-45.
- Rao, V.K., Kapp, D., Schroth, M., 2018. Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy: An Emerging Treatment Option for a Devastating Disease. *J. Manag. care Spec. Pharm.* 24, S3-S16.
- Riboldi, G. M., Faravelli, I., Kuwajima, T., Delestrée, N., Dermentzaki, G., De Planell-Saguer, M., Rinchetti, P., Hao, L. T., Beattie, C. C., Corti, S., Przedborski, S., Mentis, G. Z., & Lotti, F. (2021). Sumoylation regulates the assembly and activity of the SMN complex. *Nature Communications*, 12(1), 5040. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25272-5>
- Richard, P., Manley, J.L., 2009. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.*, 23(11):1247- 1269. doi:10.1101/gad.1792809
- Rindt, H., et al., Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, 2015. 24(14): p. 4094-102.

- Rindt, H., et al., *Transgenic inactivation of murine myostatin does not decrease the severity of disease in a model of Spinal Muscular Atrophy*. *Neuromuscul Disord*, 2012. **22**(3): p. 277-85.
- Rochette, C.F., N. Gilbert, and L.R. Simard, *SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens*. *Human Genetics*, 2001. **108**(3): p. 255-266.
- Rose, F.F., Jr., et al., *Delivery of recombinant follistatin lessens disease severity in a mouse model of spinal muscular atrophy*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(6): p. 997-1005.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol*. 2003 Nov 24;163(4):801-12. doi: 10.1083/jcb.200304128. Epub 2003 Nov 17. PMID: 14623865; PMCID: PMC2173668.
- Rossoll, W., & Singh, R. N. (2022). Commentary: Current status of gene therapy for spinal muscular atrophy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 916065. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.916065>
- Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shutter, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., BesnerJohnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., Salih, M., Aubry, H., Tamai, K., Guan, X., Ioannou, P., Crawford, T.O., de Jong, P.J., Surh, L., Ikeda, J.E., Korneluk, R.G., MacKenzie, A., 1995. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80, 167–178. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90461-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90461-1)
- Rudnik-Schoneborn, S., et al., *Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy*. *Neurology*, 2003. **60**(6): p. 983-7.
- Ruiz-de-la-Fuente S (2020). *Development of new therapeutic strategies for Spinal Muscular Atrophy*. Universitat de Lleida.
- Russman, B.S., 2007. Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *J. Child Neurol*. 22, 946–51. <https://doi.org/10.1177/0883073807305673>

- Saxton, C. (1983). Welcome. *American Heart Journal*, 106(5), 1189. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(83\)90172-2](https://doi.org/10.1016/0002-8703(83)90172-2)
- Schoenen J. Clinical anatomy of the spinal cord. *Neurol Clin*. 1991 Aug;9(3):503-32. PMID: 1921943.
- Schrank, B., et al., *Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(18): p. 9920-5.
- Schuster, D.J., Dykstra, J.A., Riedl, M.S., Kitto, K.F., Belur, L.R., Scott Mclvor, R., Elde, R.P., Fairbanks, C.A., Vulchanova, L., 2014. Biodistribution of adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) vector, after intrathecal and intravenous delivery in mouse. *Front. Neuroanat*. 8.
- SCIRE Community Team. (2017). Anatomie de la moelle épinière. *SCIRE Comunity*. <http://www.scireproject.com/community/topic/anatomy/>
- Shababi, M., et al., Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models. *Hum Mol Genet*, 2010. 19(20): p. 4059-71.
- Shababi, M., et al., Partial restoration of cardio-vascular defects in a rescued severe model of spinal muscular atrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. 52(5): p. 1074-82.
- Shishikura, K., et al., *A neuropathologic study of Werdnig-Hoffmann disease with special reference to the thalamus and posterior roots*. *Acta Neuropathol*, 1983. **60**(1-2): p. 99-106.
- Shishikura, K., et al., *A neuropathologic study of Werdnig-Hoffmann disease with special reference to the thalamus and posterior roots*. *Acta Neuropathol*, 1983. **60**(1-2): p. 99-106.
- Shorrock, H.K., Gillingwater, T.H., Groen, E.J.N., 2018. Overview of Current Drugs and Molecules in Development for Spinal Muscular Atrophy Therapy. *Drugs* 78, 293–305. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0868-8>
- Singh, N. N., Hoffman, S., Reddi, P. P., and Singh, R. N. (2021). Spinal muscular atrophy: broad disease spectrum and sex-specific phenotypes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis*. 1867,166063. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.166063

- Sivanesan, S., et al., *Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy*. *Transl Neurosci*, 2013. **4**(1).
- Sleigh, J.N., T.H. Gillingwater, and K. Talbot, *The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy*. *Dis Model Mech*, 2011. **4**(4): p. 457-67.
- Stifani, N., 2014. Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front. Cell Neurosci*. 8, 293. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293>
- Sumner, C.J., et al., *Inhibition of myostatin does not ameliorate disease features of severe spinal muscular atrophy mice*. *Hum Mol Genet*, 2009. **18**(17): p. 3145-52.
- Swoboda, K.J., et al., *Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function*. *Ann Neurol*, 2005. **57**(5): p. 704-12.
- Talbot, K., Spinal muscular atrophy. *J Inherit Metab Dis*, 1999. **22**(4): p. 545-54.
- Tarabal O, Calderó J, Ribera J, Sorribas A, López R, Molgó J, Esquerda JE. *Regulation of motoneuronal calcitonin gene-related peptide (CGRP) during axonal growth and neuromuscular synaptic plasticity induced by botulinum toxin in rats*. *Eur J Neurosci*. 1996 Apr;**8**(4):829-36. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01269.x. PMID: 9081635.
- Tarabal, O., et al., *Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014. **73**(6): p. 519-35.
- Tariq, F., Holcik, M., MacKenzie, A., 2013. Spinal Muscular Atrophy: Classification, Diagnosis, Background, Molecular Mechanism and Development of Therapeutics, in: *Neurodegenerative Diseases*. InTech. Chapter 23. <https://doi.org/10.5772/53800>
- Thomas, N.H., Dubowitz, V., 1994. The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord*. **4**, 497–502. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0960-8966(94)90090-6)
- Torres-Benito, L., et al., *SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e26164.

- Verhaart, I.E.C., Robertson, A., Wilson, I.J., Aartsma-Rus, A., Cameron, S., Jones, C.C., Cook, S.F., Lochmüller, H., 2017. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - A literature review. *Orphanet J. Rare Dis.* 12, 124. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0671-8>
- Waldrop, M.A., Kolb, S.J., 2019. Current Treatment Options in Neurology—SMA Therapeutics. *Curr. Treat. Options Neurol.* 21, 25. <https://doi.org/10.1007/s11940-019-0568-z>
- Wang, C.H., et al., *Consensus statement on standard of care for congenital myopathies.* *J Child Neurol*, 2012. **27**(3): p. 363-82.
- Wang, D.D. and A. Bordey, *The astrocyte odyssey.* *Prog Neurobiol*, 2008. **86**(4): p. 342- 67.
- Werdnig, G., Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber anf neurotischer Grundlage. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 1891. 22(2): p. 437-480
- Winkler, C., et al., *Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy.* *Genes Dev*, 2005. **19**(19): p. 2320-30.
- Wirth, B., 2000. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum. Mutat.* 15, 228–37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200003\)15:33.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200003)15:33.0.CO;2-9)
- Wirth, B., *An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA).* *Hum Mutat*, 2000. **15**(3): p. 228-37.
- Wirth, B., et al., *Mapping of the spinal muscular atrophy (SMA) gene to a 750-kb interval flanked by two new microsatellites.* *Eur J Hum Genet*, 1995. **3**(1): p. 56-60.
- Wirth, B., L. Brichta, and E. Hahnen, Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol*, 2006. 13(2): p. 121-31.

- Wirth, B., *Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2002. **3**(2): p. 87-95.
- Wishart, T.M., et al., *SMN deficiency disrupts brain development in a mouse model of severe spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(21): p. 4216-28.
- Witts, E. C., Zagoraïou, L., & Miles, G. B. (2014). Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons. *Journal of Anatomy*, *224*(1), 52–60. <https://doi.org/10.1111/joa.12063>
- Wright S., 1968., *Evolution and the genetics of populations. Vol. 1. Genetic and biometric foundations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Ymlahi-Ouazzani, Q., et al., *Reduced levels of survival motor neuron protein leads to aberrant motoneuron growth in a Xenopus model of muscular atrophy*. Neurogenetics, 2010. **11**(1): p. 27-40.
- Zagoraïou, L., Akay, T., Martin, J. F., Brownstone, R. M., Jessell, T. M., & Miles, G. B. (2009). A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron*, *64*(5), 645–662. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.017>
- Zerres, K. and S. Rudnikschoneborn, *Natural-History in Proximal Spinal Muscular-Atrophy -Clinical Analysis of 445 Patients and Suggestions for a Modification of Existing Classifications*. Archives of Neurology, 1995. **52**(5): p. 518-523.
- Zerres, K., Rudnik-Schöneborn, S., Forrest, E., Lusakowska, A., Borkowska, J., Hausmanowa, Petruszewicz, I., 1997. *A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients*. J. Neurol. Sci. 146,67–72. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(96\)00284-5](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(96)00284-5)
- Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ. Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci*. 2003 Jul 23;23(16):6627-37. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-16-06627.2003. PMID: 12878704; PMCID: PMC6740639.

Zhao, X., Feng, Z., Risher, N., Mollin, A., Sheedy, J., Ling, K. K. Y., et al. (2021). SMN protein is required throughout life to prevent spinal muscular atrophy disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 31, 82–96. doi: 10.1093/hmg/ddab220

---

## RÉFÉRENCES DES IMAGES

## 10. RÉFÉRENCES DES IMAGES

1. SCIRE Community Team (2017) *Anatomie de la moelle épinière*. <https://community.scireproject.com/wp-content/uploads/SCIRE-C.-Spinal-Cord-Anatomy.-4-Download.-French.pdf>
2. Paxton, S., Peckham, M., & Knibbs, A. (2003). Nerves: Central Nervous System (CNS). *Histology Guide* © Faculty of Biological Sciences, University of Leeds. [https://www.histology.leeds.ac.uk/tissue\\_types/nerves/nerve\\_disease.php](https://www.histology.leeds.ac.uk/tissue_types/nerves/nerve_disease.php)
3. Florman, J. E., Duffau, H., & Rughani, A. I. (2013). Lower motor neuron findings after upper motor neuron injury: insights from postoperative supplementary motor area syndrome. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 85. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00085>
4. Vecteezy (Graphics RF). (2019). *A Vector of Motor Neuron Function from Vecteezy*. <https://www.vecteezy.com/vector-art/296405-a-vector-of-motor-neuron-function>
5. Stifani, N. (2014). *Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity*. *Frontiers in Human Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293>
6. Speller, J. (2021). *Synaptic Transmission*. Teache Me Psychology. <https://teachmephysiology.com/>
7. Fernandez Tresguerres, J. A. (2010). *Fisiología humana 4e*. Mc Graw-Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/>
8. Witts, E. C., Zagoraïou, L., & Miles, G. B. (2014). Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons. *Journal of Anatomy*, 224(1), 52–60. <https://doi.org/10.1111/joa.12063>

- 11, 12, 15** Minchin S, Lodge J. Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem.* 2019 Oct 16;63(4):433-456. doi: 10.1042/EBC20180038. PMID: 31652314; PMCID: PMC6822018.
- 13.** Sastre, L. (2014). *Exome sequencing: what clinicians need to know*. Research Gate. <https://doi.org/10.2147/AGG.S39108>
- 14.** Lumen Learning. (n.d.). *Steps of genetic transcription*. Lumen Learning. Retrieved 28 June 2022, from <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-steps-of-genetic-transcription/>
- 16.** Rossoll, W., & Singh, R. N. (2022). Commentary: Current status of gene therapy for spinal muscular atrophy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 916065. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.916065>
- 17.** Lunn, M.R. and C.H. Wang, Spinal muscular atrophy. *The Lancet*, 2008. 371(9630): p. 2120-2133.
- 18.** Serra-Juhe C, Tizzano EF. Perspectives in genetic counseling for spinal muscular atrophy in the new therapeutic era: early pre-symptomatic intervention and test in minors. *Eur J Hum Genet.* 2019 Dec;27(12):1774-1782. doi: 10.1038/s41431-019-0415-4. Epub 2019 May 3. PMID: 31053787; PMCID: PMC6871529.
- 19, 20, 24.** Cerveró, C. (2016). *Atròfia muscular espinal: mecanismes patogènics i estratègies terapèutiques en models murins de la malaltia*. Universitat de Lleida.
- 21.** Cauchi, R.J., *SMN and Gemins: 'we are family' ... or are we?: insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN*. *Bioessays*, 2010. 32(12): p. 1077-89.

- 22.** Mailman, M.D., Heinz, J.W., Papp, A.C., Snyder, P.J., Sedra, M.S., Wirth, B., Burghes, A.H.M., Prior, T.W., 2002. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet. Med.* 4, 20–26. <https://doi.org/10.1097/00125817-200201000-00004>
- 23.** Sleight, J.N., T.H. Gillingwater, and K. Talbot, *The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy*. *Dis Model Mech*, 2011. **4**(4): p. 457-67.
- 25.** Imlach, W.L., et al., SMN is required for sensory-motor circuit function in *Drosophila*. *Cell*, 2012. 151(2): p. 427-39.
- 26.** Hamilton, G. and T.H. Gillingwater, Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron. *Trends Mol Med*, 2013. 19(1): p. 40-50
- 27.** M.J. Fowler, J.D. Cotter, B.E. Knight, E.M. Seveck-Muraca, D.I. Sandberg, R.W. Sirianni, Intrathecal drug delivery in the era of nanomedicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volumes 165–166, 2020, Pages 77-95, ISSN 0169-409X, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.02.006>.
- 28.** Hugh, J. (2019). *Nusinersen: Evidence of sustained clinical improvement and lessened fatigue in older ambulatory patients with spinal muscular atrophy*. McMillan MC.
- 29.** Tariq, F., Holcik, M., MacKenzie, A., 2013. Spinal Muscular Atrophy: Classification, Diagnosis, Background, Molecular Mechanism and Development of Therapeutics, in: *Neurodegenerative Diseases*. InTech. Chapter 23. <https://doi.org/10.5772/53800>
- 30.** Comley LH, Kline RA, Thomson AK, Woschitz V, Landeros EV, Osman EY, Lorson CL, Murray LM. Motor Unit Recovery Following Smn Restoration in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy. *Hum Mol Genet.* 2022 May 12:ddac097. doi: 10.1093/hmg/ddac097. Epub ahead of print. PMID: 35551393.
- 31.** El-Khodori, B.F., et al., *Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMN $\Delta$ 7 neonate model of spinal muscular atrophy*. *Exp Neurol*, 2008. **212**(1): p. 29-43.
- 32.** Berciano, M.T., Puente-Bedia, A., Medina-Samamé, A. et al. Nusinersen ameliorates motor function and prevents motoneuron Cajal body disassembly and abnormal poly(A) RNA

distribution in a SMA mouse model. *Sci Rep* **10**, 10738 (2020).

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67569-3>

**33.** Valsecchi, V., Boido, M., De Amicis, E., Piras, A., & Vercelli, A. (2015). Expression of muscle-specific MiRNA 206 in the progression of disease in a Murine SMA model. *PLoS One*, *10*(6), e0128560.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128560>

---

## **ANNEXES**

## 8. ANNEXES

### 8.1 ANNEXE I : RÉSUMÉ DES THÉRAPIES POUR L'SMA

Tableau adjointe qui constate et classifie les différentes thérapies sélectionnés avec objectif au gène SMN en fonction de si sont approuvées ou se trouvent en plein développement clinique (**Tableau 6**). D'une autre part, résumé des médicaments ayant un potentiel de renouveau sur la moelle épinière et donc, favorables au traitement du SMA (**Tableau 7**).

**Tableau 6. Résumé des thérapies sélectionnées avec des objectifs SMN approuvés ou en développement clinique**

Médecine/entreprise	Mécanisme d'action	Phase de développement	Itinéraire d'administration et protocole	Populations spécifiques auxquelles il s'adresse	Coût	Commentaires/descriptions
<b>Thérapies approuvées</b>						
Nusinersen (SPINRAZA) / Biogen	Modificateur d'splicing (Oligonucleotide antisens)	Approuvée par la FDA (Décembre 2016) et par l'EMA (Mai 2017)	Administration intrathécale : 3 doses de charge dans l'intervalle de 14 jours, 4e dose de charge 30 jours après la 3e dose et dose d'entretien tous les 4 mois après	Tous les âges et tous les types d'AS	Jusqu'à 125 000 \$ par dose; coût des médicaments pour la première année : 750 000 \$ puis 375 000 \$ par année; des remboursements ont été obtenus par certains pays et organisations, mais dans la plupart des cas, cela n'est pas transparent.	Efficacité à long terme et effets secondaires peu clairs. L'administration intrathécale est difficile/impossible pour les patients qui ont subi une chirurgie pour la scoliose, ne quitte que la Nusinersen n'est pas une option pour ces patients. La posologie et le protocole optimaux n'ont été explorés, et des essais en cours évaluent le potentiel de dosage plus élevé (NCT04039566)
Onasemnogene APOB-pyridoxamine (Zincap) / Novartis	Remplacement du gène SMN1	Approuvée par la FDA (Mai 2019) et par l'EMA (Mai 2020)	Dose unique, par voie intraveineuse	FDA: traitement des patients pédiatriques de moins de 2 ans atteints de SMA avec des mutations bi-alleliques dans le gène SMN1. EMA : patients atteints de SMA avec une mutation hétérozygote dans le SMN1 et un diagnostic clinique de SMA de type 1, patients atteints de SMA avec une mutation bi-allelique dans le gène SMN1 et jusqu'à 3 copies du gène SMN2	2.125.000 \$ par dose/traitement	Approuvée pour une utilisation chez l'adulte, malgré l'absence d'essais cliniques chez l'adulte au moment de l'approbation et inconnu en ce qui concerne la dose; les premières études suggèrent qu'il pourrait être meilleur chez certains patients mais des essais supplémentaires sont nécessaires. Adresse: la SNC
Onasemnogene APOB-pyridoxamine (Zincap) / Novartis	Remplacement du gène SMN1	Approuvée par la FDA (Mai 2019) et par l'EMA (Mai 2020)	Dose unique, par voie intraveineuse	FDA: traitement des patients pédiatriques de moins de 2 ans atteints de SMA avec des mutations bi-alleliques dans le gène SMN1. EMA : patients atteints de SMA avec une mutation hétérozygote dans le SMN1 et un diagnostic clinique de SMA de type 1, patients atteints de SMA avec une mutation bi-allelique dans le gène SMN1 et jusqu'à 3 copies du gène SMN2	Expérience limitée chez les patients de plus de 2 ans. Il nécessite un régime immunomodulateur avec de la prednisolone avant et après la perfusion intraveineuse (pendant ou moins 2 mois, y compris la période de taper) pour diminuer la réponse à la capsule AAV9. Efficacité à long terme et innocuité incertaine. On pense qu'il reste principalement dans les cellules postmyotiques (par exemple, les neurones); par conséquent, un effet systémique n'est pas réel. Traitement irréversible.	Expérience limitée chez les patients de plus de 2 ans. Il nécessite un régime immunomodulateur avec de la prednisolone avant et après la perfusion intraveineuse (pendant ou moins 2 mois, y compris la période de taper) pour diminuer la réponse à la capsule AAV9. Efficacité à long terme et innocuité incertaine. On pense qu'il reste principalement dans les cellules postmyotiques (par exemple, les neurones); par conséquent, un effet systémique n'est pas réel. Traitement irréversible.

**Tableau 6. Continuation**

Médecine/en reprise	Mécanisme d'action	Phase de développement	Itinéraire d'administration et protocole	Populations spécifiques auxquelles il s'adresse	Coût	Commentaires/descriptions
<b>Thérapies approuvées</b>						
Risdiplam (Evvrdi)/Roche	Modificateur d'splicing (Petite molécule)	Approuvée par la FDA (Août 2020) et par l'EMA (Mai 2021)	Administration orale quotidienne	Patients à partir de 2 mois	Jusqu'à 340 000 \$ par année (moins cher chez les jeunes patients puisque la posologie est directement liée au poids)	Efficacité à long terme et innocuité incertaine L'administration orale permet un traitement systémique
<b>Thérapies en développement clinique</b>						
Branaplam/Novartis	Modificateur d' splicing (Petite molécule)	Encore en développement; Le recrutement dans les phases I et II a été achevé et il a reçu une désignation Fast Track** de la FDA en vue d'une étude de phase IIb chez des patients adultes présentant une manifestation MH à un stade précoce. (décembre 2021)	Orale; encore en cours de développement (administration hebdomadaire dans le cadre d'un essai clinique)	Sans objet encore Essai clinique actuel axé sur le type I avec 2 numéros de copie SMN2	Pas applicable encore	L'administration orale permettrait un traitement systémique

\*C'est-à-dire qu'il affecte tout l'organisme.

\*\* Désignation fournie par la FDA pour un examen accéléré afin de faciliter le développement de médicaments qui traitent une maladie grave ou potentiellement mortelle et répondent à un besoin médical non satisfait.

**Tableau 7. Résumé des médicaments ayant un potentiel de réutilisation dans l'AS**

		Essais cliniques en AS				
Médicament/Nom de la molécule	Mécanisme d'action pour le traitement de l'AS	Licence (Indications)	Numéro d'identification de l'essai	Phase	Groupe de patients	Résultats
<b>Thérapies non spécifiques qui augmentent les niveaux de SMN</b>						
Acide valproïque	Inhibiteur de HDAC – augmente l'expression de SMN	Y (trouble bipolaire, migraine, épilepsie)	L'analyse des essais en 2017 a indiqué une amélioration de la fonction motrice, mais pas de la survie.			
Phénylbutyrate de sodium	Inhibiteur de HDAC – augmente l'expression de SMN	Y (trouble du cycle de l'urée)	NCT00528268	I/II	Types I/II	Accompli en 2015
				I/II		Résultats secondaires d'amélioration de la fonction motrice et d'une masse corporelle non informée
			NCT00439569	I/II	Types II/III	Résiliation en raison d'une mauvaise conformité
			NCT00439218		Type I	Licencié en raison d'une embauche lente
			NA			
		Y (limitées)				
		Y (supplémentaire)				
<b>Neuroprotection</b>						
Riluzol	Inhibiteur du glutamate	Y (SLN)	NCT00774423	II/III	Types II/III	Résultats non encore publiés
Cabapentina	Inhibiteur du VGCC	Y (attaques focales d'SLA)	-	II/III	Types II/III	Amélioration des tests de force des membres, mais ne fournit aucun changement dans les tests respiratoires.
<b>Qui s'adressent au muscle</b>						
Domagrozumab	Inhibiteur de la myostatine	N	NA			
Recombinant IGF-1 (mécanisme)	Effet anabolisant	Y (échec de la croissance)	NA			

Tableau 7. Continuation

		Essais cliniques en AS				
Médicament/Nom de la molécule	Mécanisme d'action pour le traitement de l'AS	Licence (indications)	Numéro d'identification de l'essai	Phase	Groupe de patients	Résultats
<b>Jonctions neuromusculaires (NMJ)</b>						
Piridostigmina	Inhibiteur de l'AChE	Y (Myasthénie grave <sup>***</sup> )	NCT02941328	II	Types II/III/IV	Essais terminés, les résultats n'ont pas encore été publiés; certains articles préliminaires montrent une réduction de la fatiguabilité musculaire.
Salbutamol	L'agoniste du récepteur $\beta$ -adrénergiques	Y (asthme)				Il n'y a pas d'essais cliniques à grande échelle. De petites études cliniques et des articles réalisés dans les conseils II et III d'AS proposant une amélioration de la fonction motrice et respiratoire.
<b>Cytosquelette</b>						
Fasudil	Inhibiteur de ROCK	Y (Seul dans des pays limités – prévention et traitement des vaisseaux cérébraux)	NA			
<b>Voies de mort cellulaire</b>						
Celecoxib	NSAID (douleur et inflammation)	Y	NCT02876094	II	Tous II/III	Étude terminée; résultats non encore publiés

\*\*\* Malaria auto-immune qui perturbe la communication entre les nerfs et les muscles, et qui a pour conséquence une faiblesse musculaire.

## 8.2 ANNEXE II : ANTICORPS POUR LE MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIE

Anticorps primaires et secondaires utilisés dans la coloration immunocytochimique, en particulier pour l'immunofluorescence dans les coupes de cryostat et pour l'ensemble de la technique de montage.

PRIMAIRES			
<u>Anticorps</u>	<u>Espèce/fluorochrome</u>	<u>Dilution</u>	<u>Maison commerciale</u>
CGRP 488	Rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich
MMP9 Cy3	Goat	1:10	Sigma-Aldrich
Nissl Blau	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:150	Invitrogen (Molecular Probes)
HA Cy5	Rabbit	1:50-200	VWR

SECONDAIRES			
<u>Anticorps</u>	<u>Espèce/fluorochrome</u>	<u>Dilution</u>	<u>Maison commerciale</u>
Anti-Rabbit	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-Goat	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:500	Jackson ImmunoResearch

### 8.3 ANNEXE III : ANTICORPS POUR LE MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIE

A continuation les anticorps primaires et secondaires utilisés pour la réalisation de la détection immunochimique dans la technique du Westen Blot sont détaillés.

PRIMAIRES			
<u>Anticorps</u>	<u>Espèces d'origine</u>	<u>Dilution</u>	<u>Maison commerciale</u>
SMN	Mouse	1:1000	BD
Anti-laminin	Rabbit	1:1000	Abcam

SECONDAIRES			
<u>Anticorps</u>	<u>Conjugué</u>	<u>Dilution</u>	<u>Maison commerciale</u>
Anti-Rabbit	Peroxidasa (HMP)	1:5000	Amersham Biosciences
Anti-Goat	Peroxidasa (HMP)	1:5000	Amersham Biosciences

