

CNTF et maladies motoneuronales, le début d'une (autre) histoire

Les délais de publication dans les revues scientifiques créent parfois des télescopages chronologiques surprenants entre les démonstrations scientifiques et l'actualité médicale qui les rattrape, voire les dépasse. C'est en tout cas l'impression étrange que l'on peut ressentir en lisant les deux articles consacrés par Hiroshi Mitsumoto et l'équipe de Ron Lindsay des laboratoires Regeneron à l'effet du CNTF chez la souris *wobbler*, parus au mois d'août dans les revues *Science* et *Annals of Neurology* [1, 2]. En août, c'est-à-dire cinq mois après la suspension, sur ordre de la FDA, de l'essai clinique de phase III de grande ampleur (plus de 700 patients atteints de sclérose latérale amyotrophique) [3] que ces travaux expérimentaux étaient censés justifier !

Les lecteurs de *m/s* avaient été aux premières loges de cet essai clinique que Ron Lindsay avait annoncé à la tribune du congrès de la *Society for Neuroscience* en novembre 1991 (*m/s* n° 2, vol. 8, p. 176). Les fondements scientifiques comprenaient, déjà, des essais chez la souris *wobbler* – mais la première présentation réelle de ces résultats n'a toutefois eu lieu qu'au congrès de la même société en novembre 1993 – et, surtout, des études fonctionnelles chez la souris *mnd*. Nous nous étonnions à l'été 1992 que ces résultats n'aient pas été publiés (voir *m/s* n° 7, vol. 8, p. 744), alors que paraissait l'étude du groupe de Michael Sendtner et Hans Thoenen sur la souris *pmn* [4] qui restait, jusqu'à août dernier, la seule démonstration de l'effet neuroprotecteur du CNTF chez un mutant atteint d'une dégénérescence motoneuronale. A ce jour, les résultats sur *mnd*, qui ont donc été parmi les élé-

ments forts fondant l'essai clinique, restent non publiés, peut-être parce que l'étude histologique n'a pas été aussi convaincante qu'on l'espérait. Il n'en reste pas moins que l'étude clinique de l'administration systémique de CNTF recombinant humain a été lancée sur une grande échelle au début 1993... et interrompue en mars 1994, en raison d'effets secondaires graves à type, notam-

ment, de cachexie. Cette interruption a inévitablement provoqué des remous importants dans le monde scientifique et financier. Avec près de 20 % de baisse sur ses actions, Regeneron a immédiatement accusé le coup et annoncé 25 % de licenciements. Rachetée par AMGEN, la société subira, sans doute, encore bien des réorganisations. Surtout, les bouches se sont ouvertes et les spé-

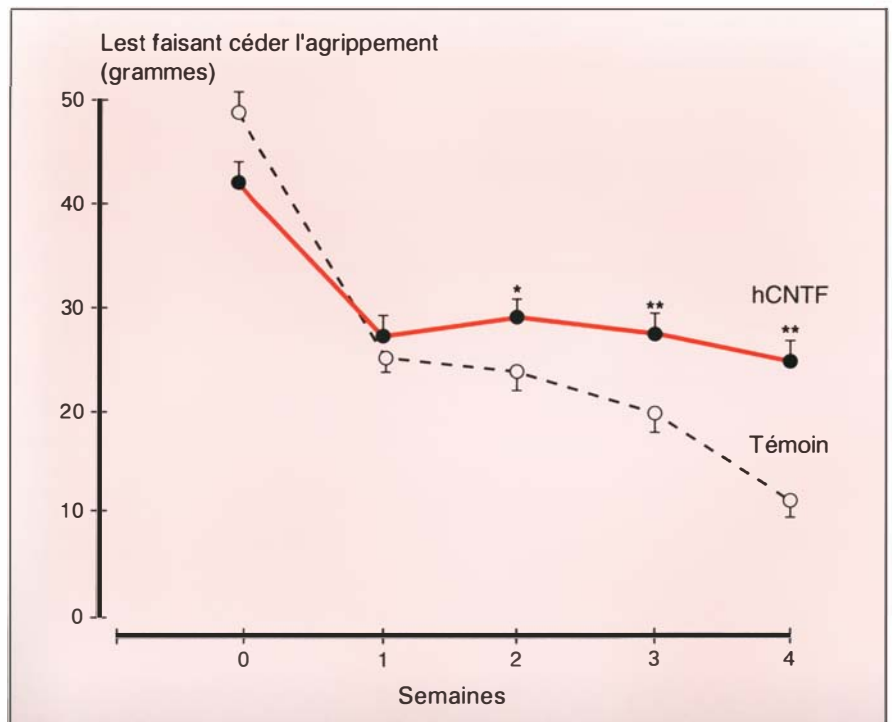


Figure 1. Capacité des souris *wobbler*, traitées par du CNTF recombinant humain (cercles pleins, ligne rouge), ou non traitées (cercles vides et ligne noire discontinue), de maintenir l'agrippement malgré un lest (indiqué en ordonnées) au cours de la période de suivi.

cialistes du domaine ont mis sur la place publique les doutes qui, jusque-là, restaient dans les laboratoires. Les risques liés à l'injection systémique du CNTF n'étaient pas inconnus, comme l'a déclaré Michael Sendtner à la revue *Nature* [3] et l'on peut légitimement se poser la question des raisons de la hâte mise par Regeneron à lancer un essai clinique. Les conclusions auxquelles aboutissent les deux articles du mois d'août sont donc placées sous un éclairage un peu glauque. Elles n'en sont pas moins fort intéressantes, et stimulantes.

La souris mutante dite *wobbler* est née spontanément en 1955 dans la lignée C57B1/Fa. Elle présente une maladie des motoneurones, transmise sur le mode autosomique récessif, liée à un défaut localisé sur le chromosome 11 qui n'est pas encore identifié. Les souris homozygotes présentent, dès le premier mois, un retard staturo-

pondéral net, une instabilité à la marche et une démarche tremblante [5]. La fatigue musculaire devient apparente au cours de la quatrième ou cinquième semaine, l'agrippement étant particulièrement affecté. Les pattes arrière étant moins touchées, l'animal présente un comportement compensateur de plus en plus marqué, tentant de suppléer la perte de force antérieure par un élan postérieur. La détérioration est rapide jusqu'aux troisième et quatrième mois au cours desquels existe une mortalité accrue. Du point de vue histopathologique (voir [6] pour références), il existe typiquement une dégénérescence des motoneurones de grande taille, qui prédomine dans la région de l'élargissement cervical de la moelle épinière. Cette dégénérescence vacuolaire est particulièrement visible entre la quatrième et la huitième semaine de vie.

La souris *wobbler* est aujourd'hui

considérée comme l'un des meilleurs modèles animaux d'amyotrophie spinale infantile, même si la localisation du gène défectueux sur le chromosome 11, dans une zone ne présentant pas de synténie connue avec le bras court du chromosome 5 humain, qui contient le défaut génétique associé aux amyotrophies spinales, semble exclure une identité réelle.

Dans un premier article – paru dans *Annals of Neurology* [1] – l'équipe de Mitumoto montre que l'injection sous-cutanée de 1 mg/kg de CNTF humain trois fois par semaine pendant le second mois a un effet net sur différents tests moteurs, en particulier sur l'agrippement (*figure 1*) et la vitesse de course. Cet effet s'associe à une amélioration de la tension d'étiement des muscles, testée *in vitro*. Alors que l'effet du CNTF chez la souris *pnn* était essentiellement jugé sur la survie [4], on a ici une analyse fine, fondée sur des critères fonctionnels objectifs, plus intéressants dans le cadre d'un travail à visée pré-clinique. Il est, du coup, un peu dommage – et étonnant – que les auteurs n'accompagnent pas cette démonstration d'une étude histologique de la moelle épinière qui aurait, éventuellement, permis de déterminer le site d'action du CNTF puisque l'on sait que cette substance peut exercer un effet trophique, non seulement sur le motoneurone, mais aussi sur la fibre musculaire, et qu'il serait important d'apprécier la réalité d'une action neurotrophique.

Le second article – publié dans *Science* [2] – rapporte l'effet bénéfique d'une co-injection de CNTF et d'une neurotrophine connue pour son action protectrice sur les motoneurones, le BDNF (*figure 2*). Il existe clairement, sur les tests fonctionnels, une synergie entre BDNF et CNTF qui conduit à une bien meilleure préservation des fonctions motrices. Dans cet article, on trouve cette fois quelques données histologiques, et il semble bien que la conjonction des deux facteurs permette une réelle survie motoneuronale.

Ces deux articles arrivent-ils trop tard ? Certainement, si on les rattache à l'essai clinique lancé par Regeneron dont les fondements scientifiques apparaissent *a posteriori* un peu

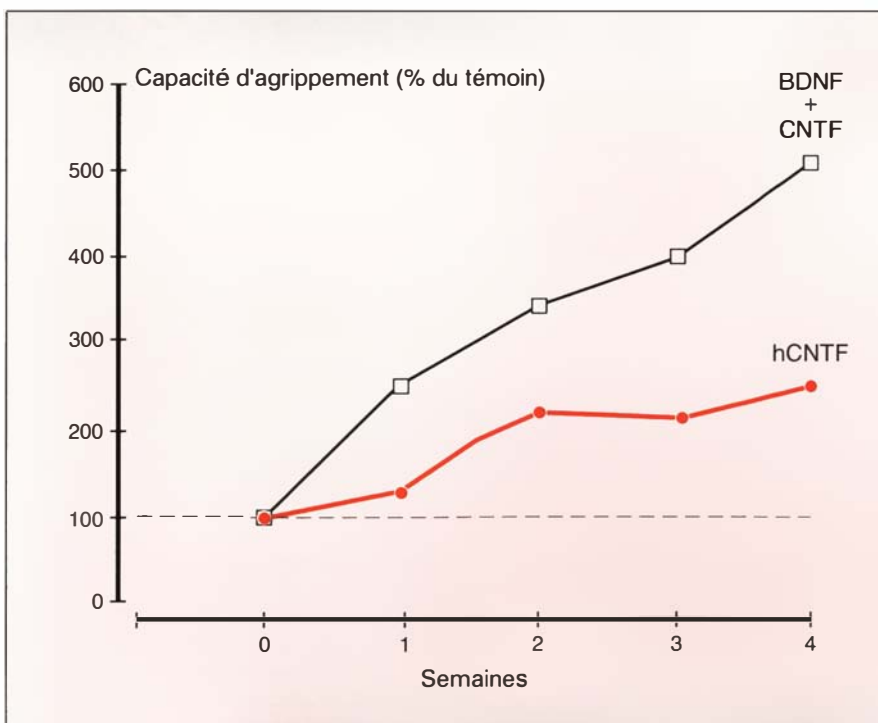


Figure 2. Capacité des souris *wobbler*, traitées par BDNF et CNTF (carrés, ligne noire) et par CNTF seul (cercles pleins, ligne rouge) de maintenir l'agrippement malgré un lest (indiqué en pourcentage par rapport aux résultats de souris non traitées) au cours de la période de suivi.

légers. Ne valait-il pas mieux attendre de vérifier la synergie au long cours entre BDNF et CNTF, et l'absence de toxicité, avant de lancer une expérience sur 700 patients avec CNTF seul ? Certainement pas, en revanche, pour le champ de recherche thérapeutique ouvert depuis des années par la démonstration de l'action neuroprotectrice de certains facteurs trophiques. Mitsumoto *et al.*, par leur analyse fonctionnelle notamment, et par l'utilisation de la souris *wobbler*, placent CNTF et BDNF au premier rang des facteurs protecteurs des motoneurons. L'expérimentation clinique de Regeneron, vue sous un angle positif, nous indique seulement que le CNTF n'est pas utilisable lui-même en administration systémique. On peut encore envisager de modifier la forme d'administration, ou celle de la molécule.

M.P.

1. Mitsumoto H, Ikeda K, Holmlund T, Greene T, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM. The effects of ciliary neurotrophic factor on motor dysfunction in *wobbler* mouse motor neuron disease. *Ann Neurol* 1994 ; 36 : 142-8.
2. Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM. Arrest of motor neuron disease in *wobbler* mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 1994 ; 265 : 1107-10.
3. Verral M. Lay-offs follow suspension of clinical trials of protein. *Nature* 1994 ; 370 : 6.
4. Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli KA, Carroll P, Kreuzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuropathy. *Nature* 1992 ; 358 : 502-4.
5. Duchon LW, Strich SJ. An hereditary motor neuron disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant «wobbler». *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1968 ; 31 : 535-42.
6. Junier MP, Couplier M, LeForestier N, Cadusseau J, Suzuki F, Peschanski M, Dreyfus P. Transforming growth factor α expression in degenerating motoneurons of the murine mutant *wobbler*: a neuronal signal for astrogliosis? *J Neurosci* 1994 ; 14 : 4206-15.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Les mutations de l'adheline sont responsables d'une myopathie autosomique récessive.** A côté de la myopathie de Duchenne, récessive liée à l'X et due à des mutations dans le gène de la dystrophine, on décrit une myopathie cliniquement proche mais de transmission autosomique, dont le ou les gènes en cause sont inconnus. Le premier *locus* a été localisé sur le chromosome 13 dans deux grandes familles tunisiennes [1]. Dans des familles d'origine algérienne, on a trouvé un déficit en une protéine, 50DAG ou adhaline, puis confirmé, dans certaines de ces familles, la liaison de la maladie aux marqueurs situés en 13q12. Cette protéine appartient au complexe des glycoprotéines de la membrane musculaire associées à la dystrophine (protéine déficiente dans la myopathie de Duchenne). L'équipe de K. Campbell ayant cloné l'adheline humaine et constaté sa localisation sur le chromosome 17, il devenait évident que le déficit observé dans les formes tunisiennes et algériennes était secondaire. Se posait alors la question de l'existence d'un déficit primaire en adhaline. Une séquence CA_n a été observée dans un intron de ce gène et a pu être utilisée pour placer l'adheline sur la carte du chromosome 17, par rapport aux autres marqueurs génétiques disponibles. Plusieurs équipes associées dont celle de K. Campbell Iowa City, USA), J.C. Kaplan et M. Fardeau (Inserm, Paris, France) ont établi une liaison génétique entre la maladie et ce gène dans une famille d'origine française et non consanguine comportant une fratrie de huit enfants dont quatre sont atteints et pour laquelle il avait été montré que la maladie n'était pas liée au chromosome 13 [2]. La symptomatologie est moins sévère que pour les formes algériennes et tunisiennes. Connaissant les séquences des exons et des régions génomiques adjacentes, les gènes de l'adheline de plusieurs malades ont été analysés et deux mutations faux-sens (Arg → His et Val → Ala) ont

été observées chez les malades de la grande fratrie mentionnée précédemment. Ces mutations ont été confirmées à l'aide d'enzymes de restriction et par ASO et n'ont pas été retrouvées chez plus de cent personnes non atteintes. Les conséquences de ces mutations ne pourront être étudiées qu'après isolement des autres gènes codant pour les glycoprotéines de la membrane musculaire, et en particulier le gène situé sur le chromosome 13, encore inconnu.

[1. Azibi K, *et al. Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 1423-8.]

[2. Roberds SL, *et al. Cell* 1994 ; 78 : 625-33.]

■■■ **Réversion de mutations dans la tyrosinémie de type I.** La tyrosinémie de type I est une affection autosomique récessive redoutable, qui provoque une dysfonction tubulaire rénale et une atteinte progressive du foie avec régénération. Elle peut conduire à des carcinomes hépatiques. Le traitement le plus efficace est la transplantation du foie, lorsqu'elle est réalisable. Elle résulte de l'absence d'activité de la dernière enzyme dans la voie de la dégradation de la tyrosine, la fumaryl-acétoacétase, qui scinde le fumaryl-acétoacétate en fumarate et acétoacétate (*m/s n° 10, vol. 8, p. 1111*). Dans cette maladie, aucune protéine n'est détectée par les méthodes immunologiques. Une équipe d'Oslo, Norvège, et Utrecht, Pays-Bas, a étudié, sur des foies prélevés au cours de transplantation chez dix-huit sujets d'origine ethnique variée, la nature des anomalies. L'immunoréaction a montré, chez quinze de ces sujets, une image en mosaïque, avec des plages négatives et d'autres positives. Certaines sections de biopsie montraient également des zones possédant l'activité enzymatique. Chez quatre malades, les auteurs ont effectué une recherche moléculaire, mettant en jeu à la fois un criblage

par des enzymes de restriction spécifiques et, le cas échéant, un séquençage direct. La conclusion fut que dans les régions immunopositives, la mutation avait disparu, et qu'on assistait à une réversion vers la séquence normale. Cette réversion ne portait que sur un des deux allèles mutés ; chez un sujet hétérozygote composite, c'est toujours le même allèle qui était normalisé dans plusieurs nodules examinés. Il semble donc que certaines mutations soient plus facilement réversibles que d'autres. Dans chaque cas, plusieurs nodules étaient analysés et montraient les mêmes résultats. En l'absence de données expérimentales, il est difficile d'expliquer la cause et le mécanisme de telles réversions, qui ne s'observent pas dans les fibroblastes en culture. La réaction observée ne parvient pas à enrayer l'évolution des lésions. Il n'en reste pas moins qu'une telle réversion, apparemment fréquente, et portant sur des mutations différentes, est d'un très grand intérêt.

[1. Kvittingen EA, *et al. J Clin Invest* 1994 ; 94 : 1657-61.]

■■■ **Traitement de la polyarthrite rhumatoïde par des anticorps dirigés contre le TNF α .** Les résultats d'une immunothérapie spécifique, dirigée contre le TNF α , chef d'orchestre du processus pathogène destructeur dans la polyarthrite rhumatoïde, sont rapportés dans le *Lancet* du 22 octobre. Il s'agit de deux essais thérapeutiques avec le même anticorps monoclonal anti-TNF α appelé cA2 ; c'est un anticorps de type IgG1 κ , chimère homme-souris, produit par Centrocor, une firme de Pennsylvanie (USA). Le premier essai thérapeutique est un vaste essai randomisé multicentrique, effectué en double aveugle ; il comportait 73 malades, tous en poussée rhumatismale, ayant au moins six articulations gonflées et douloureuses, divisés en trois groupes, l'un recevant un placebo, le deuxième, le médica-

ment à la dose de 1 mg/kg et, le troisième, le médicament à la dose de 10 mg/kg. L'anticorps était administré en une seule perfusion et l'effet jugé selon l'indice de Paulus, un indice reposant sur des données cliniques et biologiques. Quatre semaines après le traitement, seuls deux malades du groupe placebo avaient une amélioration de leur état (+20% à l'indice de Paulus), 11/25 du deuxième groupe et 19/24 du troisième groupe. Une amélioration de 50% fut constatée chez quatorze des malades du groupe 3. Les deux groupes traités réagissaient donc favorablement au traitement, mais les malades ayant reçu la forte dose eurent un bénéfice beaucoup plus durable. Ce qui conduit au second essai thérapeutique dont l'objet était d'étudier les résultats de traitements répétés lors des rechutes de malades ayant répondu favorablement à un premier essai (à la dose de 20 mg/kg). Il s'agit d'un essai ouvert, portant sur sept malades. Chacun des malades a eu une bonne réponse aux cycles successifs de traitement (1 à 4 cycles, dose : 10 mg/kg) ; en particulier, les articulations dégonflent et la *C reactive protein* retrouve toujours des valeurs normales, mais on constate un raccourcissement du délai avant rechute au cours du traitement : 12 semaines entre les cycles 1 et 2, et 8 semaines entre les cycles 3 et 4. L'efficacité du traitement semble pouvoir être rapportée à la suppression des effets du TNF α ; en effet, le TNF α , très élevé dans cette maladie, est un puissant inhibiteur de l'hématopoïèse et on a constaté, au cours du traitement, une élévation de la concentration d'hémoglobine chez tous les malades traités, à l'exception de ceux recevant un placebo. Les effets secondaires semblent peu marqués : une crise d'urticaire, une sinusite, une pneumonie. Des anticorps dirigés contre la partie murine de l'anticorps monoclonal sont apparus chez quatre malades, sans incidence évidente chez ces malades sur l'efficacité des cycles successifs

du traitement. Un malade a développé des anticorps anti-ADN. Ces résultats montrent pour la première fois qu'un blocage spécifique des cytokines peut être efficace dans une maladie inflammatoire ; il reste maintenant à maîtriser la réponse immunologique provoquée par ce genre de traitement.

[1. Elliott MJ, *et al. Lancet* 1994 ; 344 : 1105-10.]

[2. Elliott MJ, *et al. Lancet* 1994 ; 344 : 1125-7.]

■■■ **La lésion moléculaire de la fructosurie bénigne.** La fructosurie bénigne est une maladie rare due à un déficit en fructokinase. Le fructose, ne pouvant être phosphorylé en fructose-1-phosphate, est éliminé dans l'urine. Le risque principal est que le sujet soit pris pour un diabétique et traité en conséquence. Le seul travail de recherche consacré jusqu'à présent à cette affection était celui de F. Schapira *et al.* [1], montrant le déficit par dosage enzymatique sur une biopsie de foie. Une équipe britannique et suisse [2] vient d'en établir la base moléculaire. La séquence des acides aminés, dérivée de celle de l'ADNc, en compte 298. L'expression est limitée au foie, au rein et à l'intestin. L'analyse a porté sur une famille suisse, dont trois enfants sur huit étaient atteints. Bien que les parents soient consanguins, les 3 malades examinés étaient des hétérozygotes composites pour deux mutations, Gly 40 \rightarrow Arg et Ala 43 \rightarrow Tyr. Cette observation conduit à rappeler que l'existence d'une consanguinité n'implique pas nécessairement que le malade, dans une affection récessive, soit un homozygote vrai (*m/s n° 4, vol. 7, p. 385*).

[1. Schapira F, *et al. Enzymol Biol Clin* 1961-1962 ; 1 : 170-5.]

[2. Bonthron DT, *et al. Hum Mol Genet* 1994 ; 3 : 1627-31.]