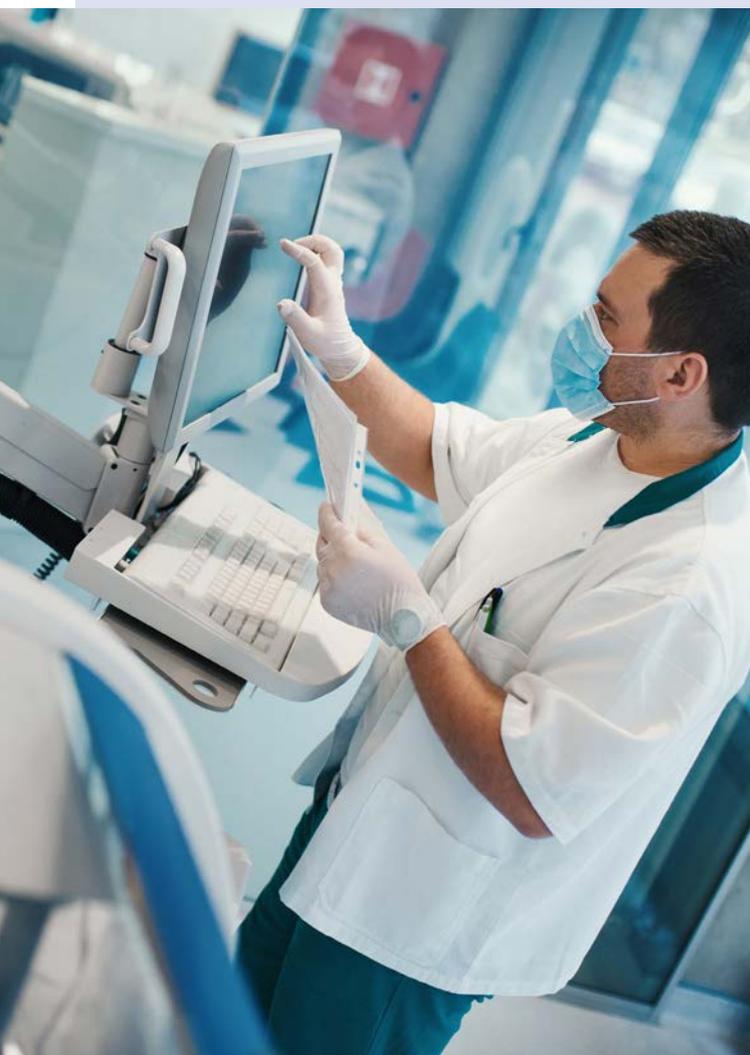


LES JOURNÉES SCIENTIFIQUES
DE L'INSTITUT SERVIER

**NEURODÉGÉNÉRESCENCE
MÉCANISMES ET CIBLES
THÉRAPEUTIQUES**

20^e COLLOQUE 2021



Que connaît-on
de la physiopathologie
de la SLA ?

Pierre-François PRADAT

Département des Maladies du Système Nerveux,
La Pitié-Salpêtrière, Paris, France



 **Springer** Healthcare Communications

Résumé

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative hétérogène qui résulte d'une cascade d'événements biologiques multiples conduisant à la mort des motoneurones. La SLA implique de nombreux réseaux neuronaux et afférences qui exercent un contrôle sur ces motoneurones. La connaissance de la physiopathologie de la SLA progresse grâce aux recherches sur les modèles animaux et les approches cellulaires, grâce aux observations cliniques de neuroimagerie et de neuropathologie, par la caractérisation toujours plus fine des anomalies génétiques qui sous-tendent les formes fami-

liales de la maladie. L'identification de ces gènes aide également à la compréhension des formes sporadiques de la SLA car ils convergent vers des processus et perturbations cellulaires impliqués dans la cascade neurodégénérative. La connaissance de ces mécanismes multiples permet ainsi d'identifier des cibles secondaires (protéosome, régulation transcriptionnelle, excitotoxicité, stress oxydant, stress du réticulum endoplasmique, dysfonctionnement mitochondrial, inflammation, muscle et jonction neuromusculaire) et de mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques.

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) résulte d'une cascade d'événements biologiques multiples conduisant à la mort des motoneurons. Beaucoup de progrès ont été réalisés dans la caractérisation des anomalies impliquées et aujourd'hui on peut mieux comprendre la physiopathologie de la SLA par différentes approches, notamment par l'observation des patients, grâce aux études *post-mortem* en confrontant les observations cliniques à la neuropathologie, par la connaissance des anomalies génétiques et par des approches de neuro-imagerie. Il existe aussi un certain nombre de modèles animaux de la SLA, qui sont le plus souvent des modèles de surexpression de gènes dans différentes espèces (levure, vers, mouche, poisson zèbre, souris, cochon, chien, singe) et qui permettent d'analyser la physiopathologie et ainsi développer des nouveaux traitements. Des modèles cellulaires sont également développés, ils utilisent des motoneurons dérivés des cellules souches pluripotentes induites, directement prélevées, par exemple au niveau de la peau des patients. Toutefois, d'importantes différences existent entre ces modèles et la réalité clinique, elles peuvent expliquer les discordances entre les résultats précliniques prometteurs et les échecs en pratique clinique. Plus de 50 molécules ont été testées au cours de ces quinze dernières années sans que l'une d'entre elles n'ait fait preuve d'efficacité.

La SLA, une pathologie hétérogène

Comme pour la plupart des maladies neurodégénératives, il existe une grande variabilité dans la présentation clinique de la SLA : l'âge de début, la topographie des régions atteintes, la balance entre les signes centraux, motoneurons supérieurs et motoneurons inférieurs, la présence ou non d'une démence frontotemporale (DFT). Les différentes formes de SLA sont associées à des profils évolutifs et des survies très différentes : les formes de sclérose latérale primitive ont une survie plus longue de plusieurs dizaines d'années alors que d'autres formes vont avoir une évolution extrêmement rapide. Ainsi, au-delà de l'hétérogénéité phénotypique, la variabilité des profils évolutifs suggère la mise en jeu de mécanismes physiopathologiques distincts. L'hétérogénéité de la pathologie pourrait expliquer l'échec des nombreux essais cliniques conduits autour de nouveaux traitements. L'enjeu est donc de stratifier les patients en groupes de phénotypes homogènes, sur la base de mécanismes physiopathologiques et génétiques.

Que sait-on de ces mécanismes ? Grâce à la neuropathologie, il est établi depuis une quarantaine d'années qu'il existe des agrégats protéiques, marqués par l'ubiquitine

et pouvant prendre l'aspect d'inclusions compactes. En 2006, la découverte de la liaison de ces agrégats à la protéine TDP43 a été une avancée considérable.^[1] Cette protéine nucléaire intervient dans de nombreuses fonctions et joue notamment un rôle important dans l'épissage de l'ARN. Dans la SLA, la protéine TDP43 est clivée, hyperphosphorylée, ubiquitinée et, mal distribuée car présente dans le cytoplasme.

Une composante génétique de mieux en mieux connue.

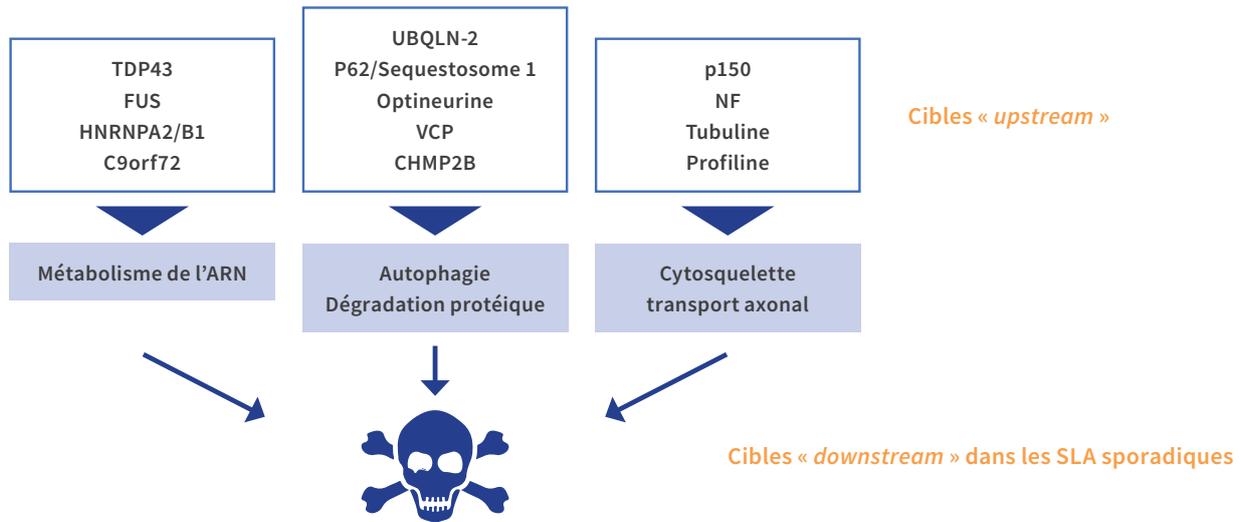
Beaucoup de progrès ont été réalisés dans la caractérisation des différentes SLA, notamment grâce à la connaissance des anomalies génétiques. L'évolution des technologies de cartographie génétique et d'analyse de l'ADN a facilité l'identification de plusieurs mutations de gènes reconnues causales de la SLA.^[2] Le premier gène de la SLA à avoir été identifié est le gène *SOD1*, qui code pour une protéine détoxifiante : la superoxyde dismutase 1. La physiopathologie de la SLA est notamment liée à un mauvais repliement de cette protéine. Le modèle murin transgénique de surexpression du gène *SOD1* est le plus utilisé dans les études précliniques, or ce modèle ne mime que 1 % des formes de SLA ; il n'y a pas d'inclusions TDP43 dans les motoneurons de ces souris alors que c'est un marqueur clé de la maladie chez la majorité des patients, notamment ceux atteints de SLA sporadique ou associée à une démence frontotemporale [3].

Les trois autres principaux gènes responsables des formes de SLA débutante à l'âge adulte sont : *C9orf72*, *TARDBP* et *FUS*.^[4, 5] Le gène *FUS* code pour une protéine qui a beaucoup de similitudes structurales et fonctionnelles avec la protéine TDP43. Les mutations du gène *C9orf72* sont observées dans plus de 40 % des formes familiales ; il s'agit de la mutation causale la plus fréquemment observée dans les formes familiales de DFT et de SLA.

Aujourd'hui, au moins 25 gènes de causalité ont été identifiés et des corrélations ont été définies entre les variantes génétiques et différents profils cliniques de la SLA, tels que l'âge d'apparition, la durée de la maladie et le site d'apparition. Cette multitude de gènes permet d'identifier des cibles « *upstream* » pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques comme la thérapie génique de l'amyotrophie spinale, les approches de blocage du gène *SOD1*, l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou ARN interférents (**Figure 1**).

L'identification de ces gènes a été décisive pour la compréhension de la maladie en dehors des formes génétiques car ils convergent vers des processus et perturbations cellulaires en lien avec des mécanismes de dégénérescence, que l'on peut regrouper en trois grandes fonctions. Un premier

Figure 1 : De multiples gènes permettent d'identifier des cibles « upstream » dans les formes familiales et « downstream » dans les formes sporadiques de la maladie pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques



groupe de gènes (*TDP43*, *FUS*, *HNRNPA2/B1* et *C9ORF72*) est associé aux désordres du métabolisme de l'ARN. Un deuxième groupe comprend des gènes comme *UBQLN-2* ou *optineurine* qui sont impliqués dans les processus de dégradation des protéines ou encore d'autophagie (incluant des fonctions de dégradation des protéines anormales, de renouvellement des organites ou de réponse au stress cellulaire). Le troisième groupe comprend les gènes impliqués dans les anomalies du cytosquelette et du transport axonal (*p150*, *NF*, *Tubulin*, *Profilin*). L'ensemble de ces gènes, en lien avec des processus de dégénérescence, permettent d'identifier des cibles « downstream » secondaires, et de nouvelles approches thérapeutiques des formes sporadiques de la SLA.

Ces mécanismes secondaires sont extrêmement complexes et hétérogènes et font intervenir des motoneurons mais également d'autres cellules de l'environnement du motoneurone. Ainsi, les astrocytes impliqués dans la recapture du glutamate -et donc intervenant dans l'excitotoxicité-, la microglie, les cellules de l'inflammation, les vaisseaux ou encore le muscle, jouent un rôle clé et représentent autant de cibles thérapeutiques potentielles de la SLA, sans pour autant que l'on comprenne laquelle pourrait être un mécanisme central à la pathologie.

Les cibles secondaires (Figure 2)

Le protéosome

Les protéines ont une durée de vie de quelques heures puis sont dégradées par le protéosome, une structure complexe qui détruit les protéines de façon très régulée

et spécifique. Il a été montré dans le cerveau de patients décédés de SLA que le protéosome se colle aux agrégats protéiques pour les dégrader.^[6] Ce protéosome est dysfonctionnel dans la SLA. Pour donner une explication simpliste, les agrégats encombrant donc les cellules et empêchent leur métabolisme normal. Le rôle du protéosome dans les pathologies neurodégénératives suscite un grand intérêt car de nombreuses molécules ont potentiellement la capacité d'activer le protéosome et donc de rétablir ce travail de nettoyage des protéines toxiques.

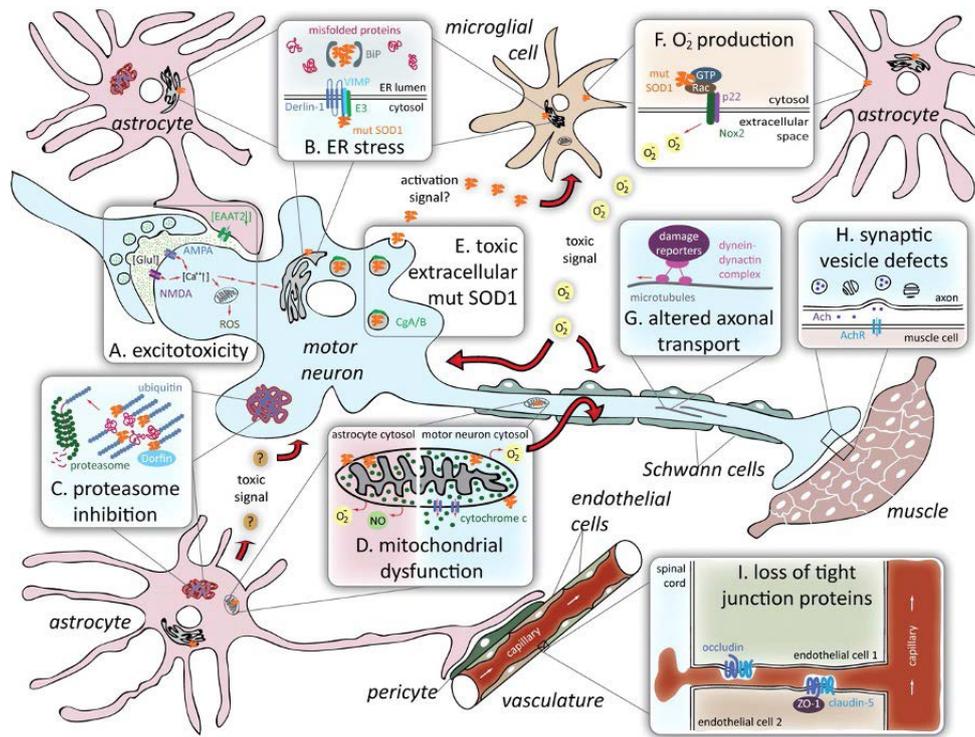
L'excitotoxicité, le stress oxydant

L'excitotoxicité est due à un excès de glutamate au niveau synaptique, qui provoque une entrée massive et toxique de calcium dans les motoneurons. Ce mécanisme est classiquement impliqué dans l'effet du riluzole, le seul médicament ayant démontré un effet protecteur partiel sur la survie des patients atteints de SLA.^[7] À ce jour, les essais thérapeutiques utilisant d'autres drogues ciblant l'excitotoxicité n'ont pas été concluants. Un autre mécanisme impliqué dans la SLA est le stress oxydant et la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Un seul médicament, l'édaravone, cible ce mécanisme mais ce traitement, seulement approuvé par la FDA et non par l'EMA, a un effet marginal, est très peu utilisé en pratique et ne peut être proposé que dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative stricte.^[8,9]

Le stress du réticulum endoplasmique, le dysfonctionnement mitochondrial

Le réticulum endoplasmique granuleux est le lieu de synthèse des protéines secrétées à l'extérieur de la cellule d'une part et des protéines et des lipides constituant les

Figure 2 : Des mécanismes et cibles secondaires pour de nouvelles approches thérapeutiques des formes sporadiques de la SLA. D'après [24] © J Cell Biol (2009). La permission de reproduire cette figure a été accordée.



membranes de multiples organites (appareil de Golgi, lysosomes, mitochondries, noyau, ribosomes, vésicules...) d'autre part. Le réticulum endoplasmique granuleux participe au bon repliement des protéines qui viennent d'être synthétisées. Le stress du réticulum endoplasmique résulte de l'accumulation de protéines mal repliées, comme celles observées dans les formes mutées *SOD1* causales de SLA. Le dysfonctionnement des mitochondries, organites cellulaires qui produisent l'énergie nécessaire au métabolisme des motoneurones, conditionne le motoneurone à entrer dans une voie finale de mort cellulaire où interviennent des phénomènes d'apoptose. Un traitement expérimental, AMX0035, cible à la fois les voies de dégradation neuronale dépendantes du réticulum endoplasmique et des mitochondries dans la SLA. AMX0035 est une association de phénylbutyrate de sodium, chaperon moléculaire conçu pour réduire la réponse aux protéines non repliées, prévenant ainsi la mort cellulaire résultant de la réponse aux protéines non repliées, et de taurursodiol, inhibiteur de *Bax* conçu pour réduire la mort cellulaire par apoptose. AMX0035 a montré des avantages significatifs en termes de capacité fonctionnelle et de survie chez les adultes atteints de SLA. [10, 11] Ils resteront à être confirmés par une étude de phase 3 qui a débuté en 2021 (NCT05021536).

Le rôle de l'inflammation

Même si les motoneurones sont les cellules qui dégèrent dans la SLA, les cellules gliales qui les soutiennent et

certaines acteurs du système immunitaire participent à la maladie. Certaines anomalies génétiques identifiées dans la SLA codent pour des protéines ayant un rôle direct dans l'immunité et la neuro-inflammation. [12] Des études conduites dans des modèles animaux de la SLA ont mis en évidence un état inflammatoire chronique dans lequel les astrocytes, les cellules microgliales et les macrophages présents dans l'environnement des motoneurones jouent un rôle délétère et participent à la progression de la maladie. [13, 14] Quand la microglie est activée, elle présente une réponse de phénotype M2 anti-inflammatoire bénéfique et protectrice, puis une réponse M1, avec la sécrétion de composés pro-inflammatoires, qui va accélérer l'aggravation de la maladie. Ces mécanismes neuro-inflammatoires pourraient constituer une cible thérapeutique ; l'enjeu étant de trouver des thérapies ciblant spécifiquement les mécanismes liés à la réponse de phénotype M2.

Le rôle du muscle et de la jonction neuromusculaire

Dans la SLA, l'atrophie du muscle a longtemps été considérée comme seulement une conséquence de la souffrance du motoneurone. Toutefois, la jonction neuromusculaire se dégrade très précocement dans la maladie, peut-être même avant qu'il y ait perte de motoneurones. La survie des motoneurones est dépendante de facteurs trophiques produits par les muscles et différentes voies de recherche explorent si le défaut de sécrétion de ces facteurs

trophiques est associé à la progression de la maladie. Des travaux ont été réalisés sur la surexpression d'une protéine Nogo A - un inhibiteur de croissance axonale - potentiellement impliquée car elle empêche les processus de réinnervation.^[15-17] Plusieurs données de la littérature suggèrent une perturbation de la voie de biogénèse et de sécrétion des exosomes chez certains patients atteints de forme monogénique de la SLA.^[18]

Nous avons récemment montré, en collaboration avec l'équipe du Dr Stéphanie Duguez (Université d'Ulster) que les cellules musculaires provenant de patients SLA sécrétaient des exosomes toxiques pour les motoneurones.^[19]

L'arrivée de des derniers développements de la physico-chimie dans le champ de la biologie, et notamment les techniques de séparation de phase liquide-liquide permettent aussi de mieux comprendre les mécanismes intimes impliqués dans la formation des inclusions neuronales cytoplasmiques de protéine TDP43.^[21] Quels mécanismes permettent à cette protéine de migrer de l'intérieur du noyau vers le cytoplasme ? Des équipes de recherche explorent l'implication des complexes de pore nucléaire qui sont responsables des échanges bilatéraux entre le noyau et le cytoplasme, avec, là aussi, pour objectif de nouvelles approches médicamenteuses.

Une maladie de réseaux

L'imagerie et les techniques d'analyse du connectome structurel et fonctionnel ont permis de mettre en évidence qu'au-delà de l'environnement des motoneurones, la SLA doit être envisagée comme une maladie impliquant de multiples réseaux neuronaux et afférences qui exercent un contrôle sur les motoneurones. Il est essentiel de comprendre comment les modifications de la neurotransmission dans ces multiples réseaux du tractus descendant, des voies réticulospinales, impliquant les fibres issues du cortex moteur des ganglions de la base, du tronc cérébral mais aussi des interneurones et des fibres sensorielles, peuvent affecter la fonction et la survie des motoneurones. En utilisant des approches avancées d'imagerie et d'électrophysiologie, nous avons montré que les afférences sensibles vers les motoneurones étaient affectées dans la maladie.^[20] L'atteinte du motoneurone central dans certaines formes, notamment dans les formes mutées *C9orf72*, pourrait être un mécanisme primaire de la pathologie, avec une propagation corticofuge sur le modèle de Braak, via un mécanisme de type prion ou excitotoxique qui expliquerait la diffusion progressive de la maladie.

Conclusion

La SLA est une pathologie multifactorielle et hétérogène. Les mécanismes de dégénérescence du neurone moteur sont interdépendants et ont probablement une importance relative qui varie en fonction des stades de la maladie. L'imagerie nous a également permis de mettre en évidence l'existence de phénomènes de compensation liée à la neuroplasticité et la réorganisation des réseaux.^[22] L'enjeu des efforts de la recherche est d'identifier des cibles thérapeutiques qui sont à la fois « *upstream* » dans les formes familiales et « *downstream* » dans les formes sporadiques de la maladie, afin de pouvoir proposer de nouvelles approches thérapeutiques qui pourraient être combinées. Il s'agit également de comprendre les mécanismes de propagation de la maladie au-delà des mécanismes initiaux. Les travaux menés par notre équipe, et d'autres groupes, chez des patients asymptomatiques et porteurs d'une mutation responsable de SLA permettent d'appréhender ces mécanismes précoces et d'ouvrir la voie vers des traitements préventifs de la SLA.^[23]

Cet article a été préparé avec l'aide éditoriale de Pierre-Alain Boyer, pour le compte de Springer Healthcare France, et avec le soutien institutionnel de l'Institut Servier.

Références

- [1] Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130-3.
- [2] Al-Chalabi A, van den Berg LH, Veldink J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. *Nat Rev Neurol* 2017;13:96-104.
- [3] Robertson J, Sanelli T, Xiao S et al. Lack of TDP-43 abnormalities in mutant SOD1 transgenic mice shows disparity with ALS. *Neurosci Lett* 2007;420:128-32.
- [4] Cappella M, Pradat PF, Querin G et al. Beyond the Traditional Clinical Trials for Amyotrophic Lateral Sclerosis and The Future Impact of Gene Therapy. *J Neuromuscul Dis* 2021;8:25-38.
- [5] Volk AE, Weishaupt JH, Andersen PM et al. Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Med Genet* 2018;30:252-8.
- [6] Guo Q, Lehmer C, Martinez-Sanchez A et al. In Situ Structure of Neuronal C9orf72 Poly-GA Aggregates Reveals Proteasome Recruitment. *Cell* 2018;172:696-705.
- [7] Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:585-91.
- [8] The Writing Group on behalf of the edaravone ALS19 study group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2017;16:505-12.
- [9] Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med Res Rev* 2019;39:733-48.
- [10] Paganoni S, Macklin EA, Hendrix S et al. Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 2020;383:919-30.
- [11] Paganoni S, Hendrix S, Dickson SP et al. Long-term survival of participants in the CENTAUR trial of sodium phenylbutyrate-taurursodiol in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2021;63:31-9.
- [12] McCauley ME, Baloh RH. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol* 2019;137:715-30.
- [13] Dahlke C, Saberi D, Ott B et al. Inflammation and neuronal death in the motor cortex of the wobbler mouse, an ALS animal model. *J Neuroinflammation* 2015;12:215.
- [14] Van Dyke JM, Smit-Oistad IM, Macrander C et al. Macrophage-mediated inflammation and glial response in the skeletal muscle of a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Exp Neurol* 2016;277:275-82.
- [15] Jokic N, Gonzalez de Aguilar JL, Dimou L et al. The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 2006;7:1162-7.
- [16] Miyazaki K, Nagai M, Ohta Y et al. Changes of Nogo-A and receptor NgR in the lumbar spinal cord of ALS model mice. *Neurol Res* 2009;31:316-21.
- [17] Wills AM. Blockade of the neurite outgrowth inhibitor Nogo-A in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2017;16:175-6.
- [18] Pregnotato F, Cova L, Doretti A et al. Exosome microRNAs in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Pilot Study. *Biomolecules* 2021;11.
- [19] Le Gall L., Duddy WJ, Martinat C et al. Muscle cells of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients secrete neurotoxic vesicles. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2022.
- [20] Iglesias C, Sangari S, El Mendili MM et al. Electrophysiological and spinal imaging evidences for sensory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open* 2015;5:e007659.
- [21] Conicella AE, Zerze GH, Mittal J et al. ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by alpha-Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain. *Structure* 2016;24:1537-49.
- [22] Abidi M, de MG, Couillandre A et al. Adaptive functional reorganization in amyotrophic lateral sclerosis: coexisting degenerative and compensatory changes. *Eur J Neurol* 2020;27:121-8.
- [23] Querin G, Bede P, El Mendili MM et al. Presymptomatic spinal cord pathology in c9orf72 mutation carriers: A longitudinal neuroimaging study. *Ann Neurol* 2019;86:158-67.
- [24] Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 2009;187:761-72.