

Compte-rendu du Séminaire sur l'Initiative MLD 28-29 mai 2005

Le séminaire sur la leucodystrophie métachromatique (MLD) s'est déroulé du 27 au 29 mai 2005 au Lansdowne Resort dans la proche banlieue de Washington (Etats-Unis), à l'instigation du Projet Myelin et de l'Association Européenne de Leucodystrophie. Ses objectifs principaux étaient de favoriser la collaboration et le partage des données entre les chercheurs les plus en pointe dans le domaine de la MLD, d'évaluer les techniques courantes de recherche, de diagnostic et d'évaluation et de discuter des futures orientations de ce secteur.

Les médecins et chercheurs suivants participaient au séminaire:

Patrick Aubourg	INSERM, France
Alessandra Biffi	Institut San Raffaele, Milan, Italie
Nathalie Cartier-Lacave	INSERM, France
Timothy Cox	Université de Cambridge, Angleterre
Maria Escolar	Université de Caroline du Nord – Chapel Hill, USA
Jens Fogh	Zymenex
Volkmar Gieselmann	Université de Bonn, Allemagne
Rupert Handgretinger	Hôpital de recherche en médecine infantile St. Jude, USA
Ingeborg Krägeloh-Mann	Clinique Universitaire de Tübingen, Allemagne
William Krivit	Université du Minnesota, USA
Holly Martin	Université de Caroline du Nord - Chapel Hill, USA
Hugo Moser	Institut Kennedy Krieger - Université Johns Hopkins, USA
Luigi Naldini	Institut San Raffaele, Milan, Italie
Charles Peters	Université du Minnesota, USA
Tony Rupar	Collège Canadien de Génétique Médicale
Maria Sessa	Institut San Raffaele, Milan, Italie
Takashi Shimada	École de Médecine Japonaise, Japon
David Wenger	Collège de Médecine Jefferson, Philadelphie, USA

Les représentants du projet Myelin, de l'Association Européenne de leucodystrophie, de la Fondation MLD, Bethany's Hope, de la Fondation Stennis et de différentes familles de patient concernées par la MLD étaient également présents.

Les Dr. Hugo Moser et Luigi Naldini ont co-présidé la réunion et prodigué un chaleureux accueil à chacun. Après une brève présentation par les chercheurs de leur domaine de recherche respectif, la session scientifique a démarré. Le lecteur trouvera ci-dessous un compte-rendu des deux journées.

Aspects génétiques, moléculaires et biochimiques de la MLD — Comment la maladie est-elle diagnostiquée ?

Diagnostic

Le Dr. Wenger qui a diagnostiqué à ce jour environ 550 cas de MLD et effectue chaque semaine environ 30 examens de dépistage indique que cette maladie est certainement l'une des leucodystrophies les plus communes et également celle la plus mal diagnostiquée en raison des allèles de pseudo-déficience (PD). Le Dr. Wenger note que la MLD est une maladie récessive autosomique résultant d'une insuffisance de l'enzyme Arylsulfatase A (ARSA) et cause une accumulation des sulfatides dans diverses cellules à travers le corps. Le niveau élevé des sulfatides dans les oligodendrocytes a comme conséquence la destruction de la myéline et des déficits neurologiques. Le diagnostic est basé sur les niveaux d'enzymes dans les leucocytes, la présence de sulfatides dans l'urine, l'analyse de mutation pour trois types principaux et la confirmation enzymatique et moléculaire.

Il affirme que la MLD se caractérise par son grand polymorphisme. Jusqu'à 14 mutations différentes peuvent se produire sur les mêmes antécédents ; bien que des valeurs d'enzymes faibles puissent être constatées chez 1 patient sur 200 individus, elles n'ont pas les symptômes cliniques de cette mutation. Un parent sur 14 a un niveau d'enzymes aussi bas que celui de leurs enfants MLD. Il affirme qu'un diagnostic prénatal précis peut être fait par un test de chargement en sulfatide si l'allèle de pseudo-déficience est identifié chez les parents.

Le Dr. Moser demande si les niveaux de sulfatide ont été mesurés en fonction du type de mutation et si un contrôle de qualité était exercé. Le Dr. Wenger indique que les niveaux de sulfatide n'avaient pas été mesurés entre le PD et les autres mutations. Le test était positif ou négatif.

Le Dr. Moser soulève la question du contrôle de qualité dans les laboratoires. Le Dr. Rugar affirme qu'il utilise la séquence de tests suivante dans le diagnostic de la MLD : enzymologie ; analyse génétique et sulfatides urinaires. Le Dr. Wenger note que les mutations génétiques n'étaient pas concluantes sauf lorsqu'elles étaient homozygotes. Il ajoute que l'excrétion de sulfatides était concluante en ce qui concerne la MLD.

Le Dr. Krivit demande s'il y avait un recouvrement des niveaux de sulfatide d'urine chez les porteurs et le patient MLD, ce à quoi le Dr. Wenger répond que les porteurs et les personnes avec l'allèle PD n'avaient pas excrété de sulfatides. Il affirme que les patients MLD n'ont jamais de test de sulfatide d'urine faussement positif.

Le Dr. Cox indique que la biopsie des nerfs périphériques est également une méthode de diagnostic pouvant être employée en l'absence d'une analyse de mutation.

Le Dr. Wenger explique que chez 1 % des patients, la protéine d'activateur est absente et l'enzyme est déficiente chez les 99 % restants. Mais ceci ne peut vraiment être élucidé que par analyse génétique.

Le Dr. Peters demande si des examens de dépistage chez le nouveau-né pouvaient être faits pour dépister très tôt la maladie; le Dr. Wenger indique que le sang du cordon pouvait être analysé pour détecter une insuffisance enzymatique éventuelle. Le Dr. Rugar explique que l'analyse à base d'enzyme des taches de sang sèches et l'analyse métabolique pouvaient être faites aussi chez le nouveau-né.

Le Dr. Cox mentionne le fait que les examens de dépistage sur le nouveau-né posent une question éthique et qu'un dépistage sans traitement pose beaucoup de problèmes.

Le Dr. Sessa demande s'il y a une corrélation entre l'activité résiduelle (% de mutation) et le phénotype. Le Dr. Wenger indique qu'il n'avait pas établi de telle corrélation. Le Dr. Gieselmann pense qu'il est important de mesurer l'activité résiduelle dans les leucocytes mais pas aussi important de la mesurer en termes génétiques. Selon lui, il y a un certain rapport entre le génotype et le phénotype pris en tant que groupe, mais il est difficile de le prévoir sur un individu.

Le Dr. Naldini se demande s'il n'est pas nécessaire de développer de meilleures analyses puisqu'il y a d'autres facteurs que le niveau de sulfatides affectant la progression clinique. Le Dr. Wenger répond positivement : de meilleurs tests pour prévoir la corrélation entre le génotype et le phénotype sont nécessaires. Selon lui, il est également important de trouver les autres variables affectant la progression de la maladie.

Le Dr. Moser a observé que lorsque les médecins attendent que les symptômes se développent pour faire un diagnostic précis, les chances d'un traitement efficace sont plus réduites. Un diagnostic précoce est donc important.

Dr. Aubourg : est aussi de l'avis que le dépistage chez le nouveau-né est prématuré et que le génotype et le phénotype peuvent être corrélés seulement pour des groupes et non pas pour des individus. Il ajoute que toute thérapie est difficile à évaluer lorsque l'évolution naturelle de la maladie n'est pas connue.

Le Dr. Krivit est d'accord avec le Dr. Aubourg, mais néanmoins se dit fortement en faveur du dépistage chez le nouveau-né, citant l'exemple de l'état de New York qui l'introduit pour de nombreuses maladies nouvelles.

Le Dr. Aubourg demande pourquoi la plasmaphérèse n'est pas été faite en cas de MLD pour évaluer les niveaux de sulfatides dans le plasma. Le Dr. Wenger indique que le plasma n'a pas de niveaux de sulfatides supérieurs. Il n'a pas pensé qu'ils seraient élevés dans le sang et note que les sulfatides dans l'urine proviennent des cellules du rein. Le Dr. Gieselmann appuie ce point de vue en notant que la composition en acides gras des sulfatides de l'urine était différente de celle trouvée dans le cerveau.

Le Dr. Krivit s'inquiète que de nombreux laboratoires puissent donner de faux résultats et demande ce qui peut être fait à ce sujet au niveau des associations de patients. Le Dr. Wenger explique que la plupart des laboratoires se fondent exclusivement sur des niveaux faibles d'ARSA pour diagnostiquer la MLD. Mais de faibles niveaux d'ARSA ne s'accompagnent pas nécessairement de la présence de MLD. Il pense donc souhaitable de réaliser une batterie de tests

complète pour éliminer les pseudo-déficiences avant d'envisager une intervention comme la greffe HSC.

Le Dr. Moser souligne l'importance du développement des contrôles qualité sur les tests de sulfatides urinaires. Le Dr. Cox se demande si ces laboratoires ne devraient pas être soumis à un processus d'agrément pour garantir la qualité du diagnostic. Le Dr. Mann suggère de créer un réseau de laboratoires certifiés comme en Allemagne pour assurer un diagnostic correct.

Le Dr. Escolar note que la question du contrôle qualité se pose aussi pour la mesure des résultats et le diagnostic des symptômes de retards mineurs initiaux de développement, etc. Elle pense que des centres et des programmes de formation spécialisés seraient nécessaires pour surmonter ces problèmes.

Aspects génétiques de la MLD

Le Dr. Gieselmann affirme que la pseudo-déficience est un phénomène compliqué à cause de son polymorphisme et de l'existence d'autres allèles de PD. Plus de 100 mutations dans le gène d'ARSA peuvent causer la MLD. Selon lui, le Dr. Wenger recherche seulement deux mutations parce que celles-ci sont les plus fréquentes. Les deux mutations "A " et "I " sont les causes des formes de MLD chez l'adulte et chez l'enfant de fin de 1^{er} âge. La fréquence de ces mutations est de 25 % pour chacune. 10 % des autres cas de MLD sont causés par une mutation *I 179S* découverte par un groupe de chercheurs de Vienne en Autriche. Ceux-ci affirment que les 40 % de cas de MLD restants seraient dus à 97 autres mutations.

Le Dr. Wenger précise qu'il ne fait pas d'analyse systématique des gènes puisque celle-ci ne peut prévoir l'évolution clinique de la MLD. Le Dr. Cox note que l'analyse génétique n'est utile que dans les cas où le test de sulfatides n'est pas concluant, lorsque la biopsie des nerfs périphériques doit être évitée et quand il est difficile de dire par analyse de l'enzyme si le patient est hétérozygote ou pas.

Le Dr. Peters affirme qu'un financement de l'état serait nécessaire pour séquencer les gènes chez tous les patients. Le Dr. Sessa est d'accord avec le Dr. Peters et demande si le séquençage permettrait d'aider à étudier l'évolution naturelle et à établir des corrélations et un pronostic de génotype-phénotype.

Le Dr. Gieselmann affirme qu'une mutation peut avoir deux effets – 1. L'enzyme ne sort pas du réticulum endoplasmique ER – ceci se produit dans la forme apparaissant chez l'enfant plus âgé, et 2. L'enzyme quitte l'ER mais est dégradée dans les lysosomes – ce qui apparaît dans la forme adulte.

Il est pertinent d'évaluer le génotypage si le patient produit des matières en réaction croisée. Ceci est important dans la thérapie de remplacement des enzymes pour estimer le risque de choc anaphylactique.

Le Dr. Mann observe que parfois il y a seulement une participation CNS ou une participation PNS. Le Dr. Gieselmann note que les patients ayant seulement une participation PNS ou CNS pourraient avoir une mutation identique.

Le Dr. Escolar affirme que les phénotypes ont été observés d'une manière rudimentaire. Elle estime qu'une analyse attentive est nécessaire pour comprendre le MRI, et des analyses des vitesses de conduction nerveuse et des analyses neurocognitives pour voir s'il y a une corrélation entre le génotype et le phénotype. Le Dr. Gieselmann affirme qu'il a observé différents génotypes sur les mêmes phénotypes.

Modèles de MLD chez l'animal — quelle similarité avec la MLD chez l'humain ?

Le Dr. Gieselmann affirme qu'il n'y a aucun animal ayant une MLD au naturel. Il expose son modèle MLD chez l'animal, des souris chez lesquelles le gène d'ARSA a été retiré (souris ARSA KO). Le stockage des sulfatides chez ces souris se fait juste comme chez l'homme par manque d'enzyme ARSA et le modèle de distribution de ce stockage est également semblable. Il affirme que les niveaux de stockage de sulfatides ont été doublés chez une souris âgée de deux ans, en comparaison avec une augmentation de 4 fois constatée à l'autopsie sur des cerveaux de patients MLD. Il affirme que la MLD entraîne une diminution des niveaux de céramide de sulfate galactosyl-3 (le précurseur des sulfatides). Cette diminution était moins importante chez les souris que chez l'homme. Le Dr. Gieselmann affirme que le rapport entre le céramide et le sulfatide de sulfate de galactosyl-3 était une mesure très sensible. Les souris n'avaient pas subi non plus de démyélinisation brute dans le PNS ou le CNS. Une certaine dégénérescence a été observée dans les nerfs périphériques à l'âge de 18 mois et dans le CNS à 26 mois.

Le Dr. Gieselmann estime que la similitude observée entre la forme animale et la forme humaine dépend du point de vue où l'on se place. Il souligne que la dégénérescence de la myéline se produit au même stade de la vie chez les souris et chez les humains. Les souris ont une durée de vie plus courte et par conséquent la démyélinisation observée n'est pas aussi répandue que chez l'homme.

Pour pouvoir développer un modèle de souris présentant un degré plus élevé de démyélinisation, des souris transgéniques ayant exprimé un excès de sulfatides dans 1. des oligodendrocytes et 2. des neurones, ont été produites et croisées avec la souris ARSA KO. Ce modèle (surproduction oligodendrogliale + ARSA KO) a développé une démyélinisation à l'âge de 12 mois, similaire à celle observée dans le nerf saphène humain. Ce modèle devrait être bientôt complètement développé. Le modèle de surproduction neuronale est mort au bout de 4-5 mois.

Le Dr. Biffi observe que le modèle de souris initial sur des antécédents C57 ont présenté une démyélinisation robuste à 5-6 mois et une vitesse de conduction nerveuse plus faible. Le Dr. Gieselmann, cependant, estime que ceci pourrait être une dégénérescence wallérienne (dégénérescence des fibres synaptiques y compris la gaine de myéline distale à l'emplacement de l'agression) et non pas une démyélinisation en tant que telle. Il a également noté que la maladie progressait beaucoup plus rapidement en présence de stockage neuronal de sulfatide dans le nouveau modèle de souris, ce qui indique que la MLD n'est pas simplement une maladie gliale mais également neuronale.

Le Dr. Cox demande si les souris piquées au transférase de cérébroside de galactosyl avaient été testées. Le Dr. Gieselmann affirme que celles-ci avaient été créées et croisées avec des souris ARSA KO. Cependant, aucun changement dramatique du phénotype n'avait été observé.

Le Dr. Cox affirme que des animaux plus grands seraient nécessaires pour tester davantage la thérapie génique et chez les animaux proches des humains et demande que ceci soit envisagé. Le Dr. Gieselmann affirme qu'il n'avait pas connaissance de grands animaux qui auraient présenté au naturel les symptômes de MLD et que cela était très difficile d'induire la mutation chez des animaux plus grands et que cela prendrait beaucoup de temps et d'argent.

Aspects cliniques de la MLD : Description et discussion des divers phénotypes.

Le Dr. Moser décrit trois types cliniques principaux de MLD : la forme infantile de fin de 1^{er} âge, la forme juvénile et la forme adulte; la forme infantile étant, selon lui, la plus fréquente et la forme adulte la moins diagnostiquée. Cependant, la situation est en voie d'amélioration grâce à l'IRM chez les patients présentant des problèmes comportementaux, qui aide à la détection des anomalies de substance blanche.

Il insiste sur l'importance du diagnostic précoce qui donne davantage de temps aux médecins et un plus grand choix de traitements. Le Dr. Cox observe que la forme de déclenchement tardif peut être plus facilement traitée et par conséquent l'argument peut être renversé dans le cas de la MLD. Il déclare également qu'il est difficile d'analyser la qualité de vie (QOL) qui dépend de la localisation de la lésion cérébrale. Il affirme qu'un patient ayant une lésion du lobe frontal ne peut pas exprimer d'opinion sur sa QOL.

Le Dr. Moser cite une nouvelle technique de neuro-imagerie développée par le Dr. Ali Fatemi à l'Université Johns Hopkins qui permettrait d'analyser différentes régions et lésions nerveuses et pourrait être employée pour classer les patients par catégorie en fonction de la localisation de la lésion et de l'évaluation QOL correspondante.

Le Dr. Peters insiste sur les mesures QOL spécifiques à la maladie et au phénotype et déclare que le QOL peut être vu selon quatre perspectives différentes : celle du patient, celle du membre de la famille, celle du médecin et celle de la société.

Le Dr. Moser affirme que les instruments de QOL n'avaient pas encore été validés et que la question devait être étudiée de façon quantitative. Il estime que l'évaluation (QOL) devrait être à l'avenir soumise également aux représentants des écoles et des employeurs.

Le Dr. Escolar note que les échelles d'évaluation de la QOL n'étaient pas très fiables et il donne l'exemple de l'échelle actuelle du trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité (ADHD) précisant que la cause du déficit d'attention n'est pas toujours liée à l'ADHD. Elle souligne que l'échelle QOL devrait être individualisée et spécifique à la maladie. Le Dr. Moser se dit d'accord avec elle et affirme que les mesures des résultats devaient être utiles biologiquement et personnellement.

Le Dr. Escolar note que la collecte des données devrait être standardisée et donc les outils devraient être standardisés d'un bout à l'autre de la chaîne, de sorte que les données soient fiables et comparables. Le Dr. Moser souligne que cette standardisation devrait être appliquée sur toutes les langues et les pays.

Le Dr. Mann affirme que d'autres études de QOL existent qui peuvent être employées pour la MLD avec certaines modifications. Elle propose également que des études d'imagerie et de spectroscopie à plusieurs étages soient employées pour étudier l'évolution naturelle de la MLD.

Le Dr. Escolar et le Dr. Sessa ont également souligné la nécessité de standardiser les paramètres et la conduite des tests pour mesurer les résultats de QOL; ils expliquent que ce serait également important pour évaluer les effets de la thérapie.

Le Dr. Moser résume la discussion en disant qu'il y a un certain nombre de tests et qu'il serait utile de distinguer les tests faciles et significatifs. Il suggère la formation d'un groupe de travail pour déterminer les tests biologiquement significatifs qui doivent être faits et propose que les biostatisticiens et les concepteurs d'études cliniques soient également associés au groupe dès le début.

Le Dr. Aubourg estime que ce sont surtout les patients de 0-4 ans qui seraient à évaluer et cette jeune catégorie posera des problèmes dans l'évaluation. Selon lui, en plus de l'évolution naturelle de la MLD, on connaît très peu de choses sur sa progression clinique, qui doit être aussi étudiée. Le Dr. Mann a proposé que des données soient collectées et documentées à toutes les étapes de la maladie.

Le Dr. Moser affirme qu'un groupe travaillant sur les troubles du cycle de l'urée avait préparé une proposition pour standardiser les tests et les laboratoires et autres et avait obtenu un financement pour la mettre en oeuvre. Une proposition semblable doit être développée pour la MLD.

Le Dr. Escolar affirme que dans 85 % des cas, les parents se doutaient que leur enfant avait un problème, même avant que les médecins aient pu détecter certaines anomalies de développement et que ceci pouvait être attribué au manque de formation et à la rareté des patients MLD vus par les médecins. Le Dr. Mann affirme qu'un manuel de formation existe qui utilise des clips vidéo de courte durée pour enseigner l'identification des symptômes neurologiques et effectuer la cotation fonctionnelle. De tels outils devraient être intégrés à la formation des professionnels.

Thérapies potentielles

Transplantation

Le Dr. William Krivit montre des photos de certains patients décrivant les dispositifs cliniques de trois types de MLD. Il cite également des exemples de divers patients MLD et de huit frères et sœurs des mêmes parents pour lesquels un des enfants avait subi une greffe de moelle et les autres non. Il note que ceux ayant subi une greffe avaient stabilisé leur état et dans certains cas, avaient regagné une certaine fonctionnalité à un faible niveau.

Il note également que la transplantation sanguine du cordon ombilical était une meilleure alternative à la greffe de moelle puisque le risque de la greffe par rapport à la maladie de l'hôte était moindre, et la greffe de cellules transplantées était préférable ; il existe davantage de

donneurs possibles car le type de sang du cordon est plus facile à trouver et les cellules avaient une activité plus ARSA élevée.

Le Dr. Krivit affirme qu'une gestion améliorée de la MLD pourrait à l'avenir inclure des remplacements d'enzymes, la thérapie génique, l'utilisation de cellules-souches mésenchymales (MSC) lors de la greffe pour assurer une prévention immunologique de la réaction de GVHD (réaction de greffe contre hôte), la réduction de l'inflammation pour empêcher l'apoptose (mort de cellules), le dépistage du nouveau-né et l'injection directe de MSC dans le liquide céphalo-rachidien (CSF). Il déclare travailler déjà sur un composé appelé Galactocol destiné à empêcher l'apoptose.

En réponse aux questions posées par plusieurs scientifiques, le Dr. Krivit explique que tous ses patients présentaient les symptômes lorsqu'ils se sont présentés. Il indique que la greffe des MSC pouvait être obtenue même lorsque celle-ci est faite en même temps avec des cellules-souches, mais qu'aucune société de biotechnologie ne produisait de MSC purifiées. Néanmoins, elles sont collectées à partir de sang de cordon à Duke University.

Le Dr. Peters affirme qu'il avait transplanté 37 patients MLD entre 1984 et 2004. Trois d'entre eux avaient présenté une forme précoce et avaient été suivis sur une période de neuf ans au maximum. Trente quatre autres étaient des cas de début tardif (juvénile et adulte). Les périodes de suivi moyennes des patients MLD juvéniles et adultes étaient de 4,4 ans et 6,2 ans respectivement. Il observe que l'évaluation neurocognitive chez les patients juvéniles et adultes donne des résultats similaires. En outre, on a observé une diminution moyenne de 10 points de Q.I. après la greffe de ces patients. Le Dr. Peters note que la récupération fonctionnelle est rare chez ces patients après la greffe et que le taux de survie pour la forme de maladie non maligne était de 80-85 %. Il remarque également que les niveaux d'enzymes dans le sang du cordon sont inférieurs à celui qui serait nécessaire et que de meilleurs échantillons sont nécessaires.

Le Dr. Wenger affirme que les donneurs ayant une activité enzymatique élevée sont idéaux pour la greffe. La méthode de collecte est importante et il est difficile d'isoler les leucocytes sur les petits échantillons pour analyser les niveaux d'enzymes. Le Dr. Peters affirme que dans le dispositif actuel, les échantillons de sang du cordon sont bons pour le typage HLA, mais pas appropriés pour les mesures de niveau d'enzymes.

Le Dr. Rupert soulève la question de l'emploi de cellules-souches purifiées et de cellules enlevées. Le Dr. Peters répond que de meilleures techniques avaient été développées pour sélectionner des cellules-souches à partir de moelle ou de sang de cordon. Il estime qu'une chimiothérapie et une thérapie radiologique complètes devraient être employées comme régime préparatoire jusqu'à ce que de meilleures techniques soient développées pour les greffes. Abordant les complications et les événements défavorables, le Dr. Peters indique qu'il avait observé au fil des années un taux d'échec des greffes dans 10-15 % des cas. Sur la cohorte entière des patients présentant des troubles du lysosome (environ 250) et traités par une greffe, une affection maligne a été observée dans trois cas, un lymphome post-greffe par virus d'Epstein Barr (EBV) a été observé dans 10-15 % des cas.

Le Dr. Sessa demande si le Dr. Peters avait pu trouver un accord sur ce que constitue le nombre idéal de patients pour la BMT et ce qui devrait être envisagé pour les autres solutions de

rechange. Le Dr. Peters affirme que les cas de maladie infantile et de début précoce étaient les candidats idéaux. Les effets bénéfiques pour les patients présentant les symptômes étaient moindres et les enfants de premier âge diagnostiqués de façon moléculaire pourraient avoir de meilleurs résultats mais le suivi n'était pas suffisant pour pouvoir le dire avec certitude. Il affirme que si la fonction neurocognitive se situait en dessous de la fourchette normale (Q.I. < 70), une question éthique se posait et la décision devait être prise par la famille, étant donné que les patients perdent environ 10 points de Q.I. après la greffe. L'état neurologique et neuroradiologique sont des éléments importants à prendre en compte avant une BMT. La vitesse à laquelle la maladie progresse est également un facteur important, pour lequel malheureusement il n'existe aucune bonne méthode d'évaluation.

Le Dr. Escolar présente les données obtenues par le Dr. Kurtzberg sur les greffes sanguines du cordon ombilical (UCB) dans les cas de MLD. Elle affirme qu'il est difficile d'arriver à des conclusions concrètes puisque le nombre de patients MLD transplantés par UCB était très faible. 13 patients ont subi une greffe UCB (4 cas infantiles à début tardif, huit cas juvéniles et un adulte). Un cas d'enfant à début tardif concernait un nouveau-né et trois des cas juvéniles ne présentaient pas les symptômes. Des échantillons de sang du cordon à activité enzymatique élevée ont été choisis. Les patients ont subi un régime préparatoire de chimiothérapie. Des évaluations motrices, cognitives, neuropsychologiques et autres ont été faites pour apprécier l'efficacité de la greffe.

Elle rapporte que les patients présentant les symptômes ont continué à s'améliorer. 8 sur les 13 patients avaient survécu et les complications principales concernaient l'échec de la greffe (1 patient avait pu être de nouveau transplanté avec succès), des réactions de GVHD aiguës (3 patients).

Le Dr. Escolar conclut que les patients à début précoce récupèrent une fonction neurologique mais ont un gros risque de complication pendant la greffe. Les patients présentant les symptômes étaient susceptibles d'avoir une fonction neurophysiologique anormale, sauf dans le cas des nouveau-nés. Les nouveau-nés avaient les meilleurs résultats.

Substitution des enzymes : Quelles perspectives pour la substitution ARSA dans les cas de MLD ?

Le Dr. Gieselmann affirme que les maladies lysosomales sont plus favorables que les maladies mitochondriales puisqu'elles sont justiciables d'une thérapie de substitution des enzymes (ERT). Il présente des données préliminaires sur ses expériences avec l'enzyme synthétique produite par Zymenex, qui est identique à l'ARSA. Il montre que le contenu de sulfatide avait baissé dans le rein d'un modèle de souris après 4 traitements hebdomadaires à 20mg/kg d'enzyme produit par Zymenex. La cinquième dose a provoqué le développement d'anticorps contre l'enzyme et un choc anaphylactique.

Il estime que le point commun était le fait que les enzymes étaient trop grandes pour passer par la barrière sanguine du cerveau. Cependant, on a observé une légère baisse des sulfatides dans le cerveau. Il affirme que les oligodendrocytes ont un petit moyen de stockage (matériel de stockage < 5 micromètres) et que celui des macrophages était généralement grand (> 20 micromètres). C'est pourquoi on a pu observer une réduction des macrophages.

Il poursuit en déclarant que des études d'immunofluorescence étaient nécessaires pour confirmer la présence de l'enzyme dans le cerveau. En réponse à des questions, il déclare qu'ils n'avaient pas encore essayé d'expérimenter en changeant la barrière hémato-méningée et que l'étude n'avait pas été entreprise sur des souris fragilisées sur le plan immunologique pour éviter le choc anaphylactique et pour étudier la substitution à long terme des enzymes. Cependant, l'étude n'en était qu'à un tout premier stade et les résultats obtenus semblaient encourageants.

Jens Fogh : le Président de Zymenex estime que des études détaillées sur le modèle animal sont nécessaires. Il déclare que des études sur l'évolution naturelle et des études de toxicologie seront également faites avant que l'enzyme puisse être testée dans un cadre clinique. Délai estimé de mise sur le marché du médicament, selon lui, en supposant que toutes les études aient réussi dans les délais prévus : 8 ans.

La thérapie génique

Le Dr. Naldini observe que l'apport génique directement dans le cerveau devait avoir une forme plus stabilisée. Il été réalisé par virus adéno-associé (AAV) et vecteurs (BT) lentiviraux. Selon lui, les vecteurs rétroviraux sont moins efficaces et a observé que les neurones avaient absorbé la majeure partie des transgènes. Il affirme que la question est de savoir comment faire pour que l'injection atteigne toutes les zones. Une activité enzymatique peut être observée sur le côté controlatéral de l'injection; celle-ci se produit non pas parce que les vecteurs ont voyagé mais parce que les enzymes s'acheminent le long des axones. C'est la correction croisée des cellules par les cellules produisant l'enzyme qui a conduit à une diffusion de l'enzyme à partir de la zone d'injection.

Selon lui, le transfert génique ex vivo dans les cellules-souches hématopoïétiques (HSC) et les greffes peut également assurer potentiellement la correction croisée d'autres cellules. L'efficacité de la transduction est un problème et les vecteurs lentiviraux sont plus efficaces que les vecteurs rétroviraux. Il affirme que le modèle de souris disponible était bénin, ce qui peut nous amener à penser que le niveau de transduction obtenu en utilisant des vecteurs lentiviraux était plus élevé que réel.

Le Dr. Biffi pense qu'il y a deux approches à la thérapie génique pour les cas de MLD : la thérapie génique ex vivo et la thérapie CNS dirigée in vivo. Selon elle, la thérapie génique ex vivo est meilleure que le greffe HSC de type naturel (greffe de donneurs) à cause des niveaux plus élevés d'enzymes obtenus.

Elle présente ensuite les résultats de ses recherches sur la thérapie génique ex vivo. Les HSC ont été isolées et transférées avec le gène ARSA et transplantées sur des sujets irradiés âgés de 2 mois et des souris présentant les symptômes âgés de 6 mois. On a observé une reconstitution de l'activité d'ARSA, ainsi que la correction de la fonction, par exemple on a observé une augmentation de la vitesse de conduction nerveuse. Le stockage de sulfatides a été réduit dans toutes les cellules de CNS et la démyélinisation empêchée dans les nerfs périphériques des souris traitées. Une correction croisée a pu être observée et réalisée grâce à la prise d'enzyme libérée des cellules corrigées par les cellules déficientes. Les neurones, cellules de Purkinje, oligodendrocytes, astrocytes et microglie ont été corrigées. Le Dr. Biffi affirme que cette

efficacité élevée de la correction a été obtenue grâce à l'excès d'expression de l'enzyme et pourrait être obtenue tout aussi bien chez l'homme.

Pour le Dr. Gieselmann, la différence observée dans l'efficacité de la transduction n'est pas due aux vecteurs, comme le prétend le Dr. Naldini. Il a pu en effet obtenir des résultats identiques avec des vecteurs rétroviraux.

Le Dr. Cartier présente les données qu'elle a recueillies par injection du gène ARSA en utilisant un vecteur de virus adéno-associé (AAV5) dans le cerveau d'un modèle de souris MLD. Une bonne expression de l'ARSA de recombinaison a pu être observée, principalement dans la zone de l'injection. L'expression a été observée dans la majorité des neurones et sur 50 % des astrocytes et des cellules microgliales. Elle note que les astrocytes et la microglie ne sont pas connus comme une cible du vecteur d'AAV. Elle affirme que la correction phénotypique a été démontrée par des améliorations de la fonction motrice et la réduction d'hyperactivité. Une amélioration histologique des lésions, la prévention d'astrogliose et l'amélioration du ratio entre les céramides de sulfate galactosyl-3 et les sulfatides a pu également être observée.

Actuellement, le Dr. Cartier effectue cette étude sur des singes sains (un modèle de singe avec la pathologie MLD n'est pas disponible). Le vecteur utilisé sera AAV5 et ARSA sera marqué (ARSA-HA) pour les études histologiques et la détection. C'est une étape pré-clinique qui, si elle réussit (si la thérapie n'est pas toxique), conduira aux épreuves cliniques dans un proche avenir, et pour lesquelles une demande sera déposée en 2007.

Le Dr. Shimada décrit son expérience avec les vecteurs d'AAV. Il affirme que les vecteurs d'AAV sont non pathogènes, non cytotoxiques et procurent une transduction efficace et une expression stable; cependant ils manquent d'un système de conditionnement efficace. Il affirme qu'on a observé un haut niveau de remplacement des enzymes dans un modèle de souris de la maladie de Fabry en utilisant des vecteurs d'AAV. Sur le modèle de souris MLD, l'intégration d'AAV et l'activité enzymatique ont été constatées dans les neurones, les astrocytes et la microglie ; on a également observé une diminution systémique du stockage de sulfatides et une activité accrue d'ARSA. Il note que certains des problèmes observés avec les vecteurs d'AAV étaient liés au fait que les mâles semblent avoir de meilleurs résultats que les femelles et le niveau d'expression est différent selon les tissus.

Lors de la séquence réservée aux questions/réponses à la fin de la journée, un représentant de la Fondation Stennis a demandé si un patient ayant subi avec succès une BMT pouvait être candidat pour une thérapie génique ex-vivo. Les médecins ont répondu négativement en déclarant que les HSC de type naturel transplantées auraient déjà été intégrées et qu'une nouvelle greffe n'apporterait rien.

Le Dr. Naldini affirme que la transduction ex-vivo de cellules HSC et la transplantation est beaucoup plus sûre que la greffe de HSC de type naturel en termes de risque de réaction de GVHD et autres complications. Les niveaux d'activité enzymatique sont également beaucoup plus élevés. Des épreuves cliniques sont dès maintenant envisagées dans moins de deux ans. La technologie est en place ; mais la production des vecteurs reste un obstacle important parce que les sociétés de biotechnologie considèrent cette activité comme non rentable. L'autre obstacle est lié aux autorisations morales et réglementaires qui sont nécessaires.

Un représentant d'ELA demande s'il était possible d'inhiber la production de sulfatides. Le Dr. Gieselmann estime que c'est une bonne idée, mais pas à ce stade initial de la recherche. En effet, l'une des raisons pour lesquelles cette voie n'avait pas été tentée jusqu'à présent tenait au fait qu'elle était généralement perçue comme une chose très difficile à réaliser, cette protéine étant limitée par une membrane et difficile à atteindre.

Synthèse et Questions/Réponses

Le Dr. Moser déclare qu'il a été impressionné par les présentations faites et par le tour donné à la recherche. Il a l'intention de créer un groupe de planification pour préparer la formation d'un groupe de travail plus large. Le but de ce groupe serait de définir et de standardiser les techniques d'évaluation clinique. Selon lui, l'évaluation des nerfs périphériques peut être standardisée. Et il est possible de trouver un consensus sur l'utilisation de nouvelles approches de neuro-imagerie et de critères de substitution pour l'évaluation. Le Dr. Moser espère créer ce groupe dans un délai d'environ 2 mois.

Le Dr. Naldini demande aux chercheurs de récapituler les questions principales qui sont posées.

Diagnostic : le Dr. Wenger estime que les laboratoires n'ont pas été standardisés et qu'il n'existe pas de contrôles sur les méthodes de laboratoire. Le Dr. Ann Moser déclare que son laboratoire de la Johns Hopkins avait été standardisé pour les maladies peroxisomales et qu'elle avait échangé des échantillons avec les laboratoires européens. Ceci pourrait être fait dans d'autres laboratoires. Elle propose que le génotypage soit fait dans tous les cas de MLD.

Le Dr. Peters estime qu'une base de données devrait être créée, ce qui nécessitera la recherche d'un financement. Le Dr. Cox considère que celle-ci est importante avant que les thérapies atteignent le stade clinique et qu'un enregistrement commun serait important. Le Dr. Mann affirme que le modèle allemand de Leukonet pourrait être utilisé pour créer cette base de données.

Un représentant d'ELA – Espagne demande comment les avancées actuelles de la recherche pouvaient aider les patients présentant déjà les symptômes et/ou ayant eu une BMT et étant stabilisés à un niveau fonctionnel sensiblement bas.

Actuellement, les patients présentant les symptômes pourraient être utilisés dans des tests cliniques de la thérapie génique afin de vérifier la sécurité et l'efficacité du traitement. Mais les critères de sélection des patients devraient être spécifiquement adaptés à ces tests, car trop souvent les participants sélectionnés sont ceux qui sont les plus faciles à convaincre, c'est à dire ceux qui sont au premier stade de la maladie.

Les fonctions du groupe de travail ont été discutées et un consensus s'est dégagé sur les objectifs suivants à poursuivre :

- Définir des critères de diagnostic standard pour le diagnostic qui comporterait des tests de laboratoire et une évaluation neurophysiologique.
- Créer un réseau de laboratoires pour standardiser les procédures de diagnostic.

- Formuler et standardiser les critères d'évaluation du traitement. En identifiant les critères de substitution à cette fin et en les standardisant d'un bout à l'autre de la chaîne.
- Aborder les questions de qualité de vie. Formuler les marqueurs biologiques et fonctionnels pour mesurer l'amélioration après traitement.
- Faire des recommandations pour améliorer les programmes de formation pour les médecins et le personnel de laboratoire dans le diagnostic des symptômes neurologiques, des retards de développement et l'évaluation des patients selon les critères recommandés et la conduction des analyses de laboratoire.
- Conduire des études sur l'évolution naturelle et élucider la corrélation entre le génotype et le phénotype.
- Déterminer les équipements d'analyse génique pour faire une analyse complète pour tous les patients.
- Créer un registre d'information sur les patients.
- Rassembler et intégrer les bases de données/registres existants dans les différents pays.

Les représentants des groupes de patients et des fondations proposent de contribuer à l'alimentation de la base de données et à recueillir d'autres données sur les patients à cet effet. Il a été proposé de faire appel à des professionnels pour la constitution de la base de données en prenant en compte les questions éthiques posées par la collecte, la maintenance et l'échange des données, la confidentialité et la sécurité de celles-ci. Le groupe de travail serait chargé de faire la liste des données élémentaires qui pourraient constituer la base de données.