

# ELA

I N F O S

supplément n° 86

Revue trimestrielle de l'Association Européenne contre les Leucodystrophies

Juin 2014 • 4€



Colloque ELA  
Familles/Chercheurs 2014

# COLLOQUE ELA

## FAMILLES/CHERCHEURS 2014

### 5 et 6 avril 2014 - Paris

L'édition 2014 du Colloque Familles/Chercheurs d'ELA a réuni 360 personnes à Paris dont vingt-sept chercheurs experts en leucodystrophies et maladies de la myéline venus du monde entier. Ces derniers ont, à travers huit ateliers scientifiques et une session plénière, présenté de façon simple les résultats de leurs travaux de recherche et répondu aux interrogations des malades et de leurs familles. Ce supplément spécial rassemble le compte-rendu des différents ateliers scientifiques proposés aux participants.



**SUPPLÉMENT ELA INFOS N° 86 :**  
2 rue Mi-les-Vignes • CS 61024 • 54521 LAXOU CEDEX  
Tél. 03 83 30 93 34 • Fax 03 83 30 00 68 • Courrier  
électronique : ela@ela-asso.com • Directeur de la  
publication : Guy Alba • Conception et réalisation : Phonom  
Communication • Impression : La Nancéienne d'Impression  
• Crédit photos : Patrice Latron/INSERM  
• Abonnement annuel : 16 € • Numéro : 4 €

Commission paritaire : n°0111 H 84204 • Reproduction  
d'articles ou d'extraits d'articles autorisée après  
accord donné par la rédaction de la revue.  
Mention obligatoire : "Extrait du bulletin  
d'information d'ELA, Association Européenne  
contre les Leucodystrophies".



## Sommaire

Supplément numéro 86 - juin 2014

- Ateliers Scientifiques
  - Atelier ALD/AMN
  - Atelier Maladie de Refsum
    - Atelier MLD
    - Atelier Maladie de Krabbe
  - Atelier Syndrome CACH, maladie d'Alexander, maladie MLC et maladie de Canavan
  - Atelier PMD et autres leucodystrophies hypomyélinisantes
  - Atelier Leucodystrophies indéterminées
  - Atelier Syndrome d'Aicardi-Goutières

Lexique scientifique

# Ateliers Scientifiques

## Atelier ALD/AMN

### Essais thérapeutiques

### Évaluation de l'importance de la force sur l'activité fonctionnelle des patients AMN

Dr Kathleen Zackowski — Institut Kennedy Krieger, Baltimore, MD, USA



L'adrénoleucodystrophie liée à l'X est une maladie neurodégénérative progressive due à une anomalie du gène *ABCD1*. La maladie présente plusieurs formes, dont la plus courante est l'adrénomyélonéuropathie (ou AMN).

Lors de nos études précédentes, nous avons identifié les symptômes de l'AMN chez l'homme comme étant une spasticité, une faiblesse et un dysfonctionnement sensoriel lentement progressifs. L'aggravation de ces symptômes entraîne une difficulté

progressive à marcher et des problèmes d'équilibre.

Pour compléter cette étude, nous étudions leurs caractéristiques à la fois chez l'homme et la femme en mettant en évidence celles avec le plus d'impact sur l'activité fonctionnelle des malades. Parallèlement, nous évaluons l'impact d'un programme d'exercices physiques à domicile sur l'intensité des symptômes ou le degré d'invalidité des malades.

Les atteintes au niveau de la force, la sensation de vibration et la fonction des patients ont été mesurées chez soixante hommes et quatre-vingt femmes souffrant d'AMN durant une session de tests conduite dans le Laboratoire d'Analyse des Mouvements de l'Institut Kennedy Krieger. Les déficits affectant la force constituent un facteur majeur d'atteinte fonctionnelle chez ces malades. La faiblesse touche les hommes comme les femmes, mais de manière différente.

Hommes et femmes ont été classés en trois groupes en fonction de leur niveau de force. Chaque groupe varie de façon significative au niveau de la sensation de vibration et de la marche. Le degré de faiblesse observé chez les patients atteints de pathologies neurodégénératives, telles que l'AMN, peut donc être un indicateur renseignant le degré de sévérité de leur invalidité.

Dans notre autre étude, les effets d'un programme d'exercices physiques personnalisés sont évalués. Les données préliminaires de cette recherche montrent que la force peut être modifiée par ce biais.

Globalement, nos résultats indiquent que le degré de faiblesse chez les patients souffrant de maladies neurodégénératives telles que l'AMN peut être utilisé pour établir le degré de gravité de la maladie et guider les cliniciens dans le choix et l'évaluation des interventions thérapeutiques.

### Résultats d'un essai clinique Validation de marqueurs biologiques du stress oxydatif dans l'adrénoleucodystrophie en utilisant un cocktail d'antioxydants

Dr Aurora Pujol — IDIBELL, Barcelone, Espagne



L'adrénoleucodystrophie liée à l'X est une maladie rare, démyélinisante et neurodégénérative due à un défaut du gène *ABCD1* conduisant à une accumulation des acides gras à très longues chaînes. La forme la plus fréquente est l'adrénomyélonéuropathie (ou AMN) qui se caractérise par une dégénérescence des axones, ces prolongements du neurone, au niveau de la moelle épinière. Ceci se traduit par une paralysie légère spastique des membres inférieurs et une neuropathie périphérique. Au jour d'aujourd'hui,

aucun traitement efficace pour lutter contre l'AMN n'existe.

Notre travail, durant ces dix dernières années, nous a permis de démontrer le rôle fondamental joué par le stress oxydatif dans le processus neurodégénératif des axones conduisant à la maladie. Nous avons ensuite découvert, chez la souris malade, l'amélioration de la dégénérescence des axones et des symptômes cliniques par un cocktail d'antioxydants. Sur cette base, nous avons lancé un essai clinique testant la tolérance et l'efficacité du cocktail d'antioxydants, à savoir la N-acétylcystéine, la vitamine E et l'acide lipoïque, à corriger les marqueurs de stress oxydatif altérés chez les patients souffrant d'AMN. Une mesure de la spasticité, des tests de marche chronométrés, des IRM, des électromyogrammes et des potentiels évoqués ont également été réalisés chez ces malades. Les résultats préliminaires indiquent une normalisation des marqueurs de stress oxydatif sans modification des niveaux sanguins d'acides gras à très longues chaînes. Les données cliniques sont en cours d'évaluation. Cette recherche servira de base pour conduire éventuellement un essai clinique randomisé en double aveugle contre placebo.



### Le médicament MD1003 dans l'adrénomyélonéuropathie Une étude randomisée en double aveugle contre placebo

Dr Yann Nadjar —  
Hôpital de la Pitié  
Salpêtrière-Charles  
Foix, Paris, France

Dr Frédéric Sedel —  
MedDay Pharmaceuticals,  
Paris, France



Récemment, des données préliminaires ont montré que le médicament MD1003 pouvait stopper la progression de la maladie chez des patients atteints de sclérose en plaques (SEP) primaire ou secondaire progressive et améliorer leurs symptômes. Parmi les vingt-trois patients souffrant d'une SEP progressive traités en moyenne 9,2 mois avec le médicament MD1003, vingt-et-un patients (soit 91,3 % d'entre eux) se sont améliorés. Les effets positifs du médicament MD1003 pourraient être liés à une augmentation de la production d'énergie dans les neurones démyélinisés et une stimulation de la réparation de la myéline. Deux essais cliniques rassemblant deux cent cinquante patients souffrant de SEP progressive sont actuellement en cours et ont pour but de confirmer les résultats précédents.

L'adrénomyélonéuropathie (AMN) et la SEP progressive présentent des similarités, dont un problème énergétique secondaire conduisant à une dégénérescence axonale progressive. Un patient atteint d'AMN a été traité avec le médicament MD1003 pendant cinq mois et a montré une amélioration clinique comparable aux effets observés dans la SEP progressive.

Les objectifs de l'essai sont d'évaluer l'efficacité et l'innocuité du médicament MD1003 chez les patients souffrant d'AMN. Soixante patients issus de quatre centres différents (France, Espagne, Allemagne) seront initialement divisés en deux groupes : un groupe de vingt patients recevra un placebo tandis que le deuxième groupe de quarante malades recevra le médicament MD1003. L'étude contre placebo durera douze mois et sera suivie d'une phase d'extension de douze mois où tous les patients recevront le médicament. Le critère d'évaluation principal mesurera, avant et après douze mois de traitement, le changement moyen observé lors du test de marche 2MWT mesurant la distance parcourue en deux minutes. Les critères d'évaluation secondaires comprendront :

- le test de marche TW25FW mesurant le temps de marche sur une distance d'environ huit mètres,
- le temps pour se lever et marcher (ou test de la chaise chronométrée),
- les questionnaires sur la qualité de vie Euroqol ED-5D et MOS SF-36,
- un questionnaire sur la fonction urinaire Qualiveen.

Des analyses exploratoires seront également conduites dans certains centres comme des IRM, la mesure de la vitesse de conduction nerveuse et l'évaluation de la force musculaire.

### Thérapie génique pour l'adrénoleucodystrophie

Dr Asif Paker — bluebird bio, Cambridge, MA, USA



La forme cérébrale de l'adrénoleucodystrophie chez l'enfant est une maladie génétique très rare touchant les jeunes garçons incapables de dégrader les acides gras à très longues chaînes. L'accumulation de ces acides gras qui en résulte conduit à une inflammation cérébrale et une démyélinisation progressive dans le cerveau qui, sans traitement, provoquent une perte sévère des fonctions neurologiques et aboutissent au décès.

Actuellement, le traitement standard de ces malades consiste en une greffe de moelle osseuse provenant d'un membre compatible de la famille, mais non touché par la maladie. Pour qu'elle soit optimale, cette greffe doit être pratiquée tout au début de la maladie. Compte tenu de l'indisponibilité d'un donneur apparenté chez la majorité des patients, les autres traitements possibles incluent une greffe provenant d'un donneur non apparenté, comme les cellules de sang de cordon ombilical. Malheureusement, ce type de transplantation est associé à des risques considérables de rejet et de mortalité. La découverte de traitements novateurs est clairement nécessaire.

En comparaison, la thérapie génique offre des avantages potentiels au niveau sécurité. La thérapie autologue, c'est-à-dire utilisant les propres cellules du patient, diminue les risques de rejet du greffon, n'exige pas à long terme un traitement par immunosuppresseurs et ne présente pas non plus de risque d'infections opportunistes à long terme.

L'étude Starbeam est conçue pour évaluer l'efficacité et l'innocuité du médicament Lenti-D, une nouvelle thérapie génique pour le traitement d'enfants atteints de la forme cérébrale d'adrénoleucodystrophie sous la forme d'un vecteur-médicament contenant le gène *ABCD1* fonctionnel. Ce traitement vise à restaurer le fonctionnement normal du gène qui est anormal chez les patients. L'étude Starbeam est ouverte au recrutement des patients.



# Atelier Maladie de Refsum

## La maladie de Refsum infantile Une maladie du spectre de Zellweger relativement modéré

Pr Bwee Tien Poll-The — Centre Médical Académique,  
Amsterdam, Pays-Bas



Les maladies du spectre de Zellweger résultent de défauts touchant les fonctions de structures cellulaires nommées peroxysomes. On les appelle aussi troubles de la biogenèse du peroxysome, ou troubles peroxysomaux généralisés.

Au sein de la cellule, le peroxysome remplit plusieurs fonctions importantes nécessaires au bon fonctionnement de divers organes, comme le système nerveux, le foie et les glandes surrénales.

La gravité des maladies du spectre de Zellweger peut varier de relativement modérée à sévère, suivant un continuum d'au moins trois pathologies: le syndrome de Zellweger, forme la plus sévère, l'adrénoleucodystrophie néonatale et la maladie de Refsum infantile, forme la moins sévère. Ces différentes pathologies ont été baptisées à l'origine, avant que leurs bases biochimiques et moléculaires n'aient été déterminées. L'évolution clinique de la maladie de Refsum infantile est variable. Elle peut inclure un retard du développement intellectuel et moteur, une perte d'audition, une atteinte de la vision, un dysfonctionnement hépatique et des anomalies crânio-faciales modérées. La maladie peut attirer l'attention initialement, parce que l'enfant échoue à un test auditif et/ou présente des problèmes de vision. Le dysfonctionnement hépatique peut être observé en premier chez un enfant présentant des épisodes hémorragiques provoqués par une anomalie de la coagulation en réponse à la vitamine K. Ces enfants peuvent aussi être atteints d'insuffisance surrénale. L'évolution clinique globale peut être stable, mais la maladie est souvent lentement progressive, avec une détérioration de l'audition, de la vue et de la capacité de marche au fil du temps. Certains sujets peuvent développer une leucodystrophie avec pour conséquence la perte de compétences acquises. D'autres sujets peuvent présenter à l'âge adulte des déficits principalement sensoriels ou seulement une ataxie (mouvements anormaux). Compte tenu que les sujets souffrant de maladies du spectre de Zellweger peuvent atteindre l'âge adulte, les manifestations cliniques de ces pathologies doivent être surveillées et traitées comme :

- l'alimentation et la nutrition,
  - les prothèses auditives,
  - la correction de la vue,
  - pour le foie, une supplémentation en vitamines liposolubles,
  - pour l'insuffisance surrénale, une supplémentation en cortisol.
- Des traitements expérimentaux sont à l'étude, comme l'administration d'acides biliaires (acide cholique), d'acide docosahexaénoïque et un régime pauvre en acide phytanique. Jusqu'à présent, le traitement des maladies du spectre de Zellweger reste principalement symptomatique et de soutien.

Récemment, nous avons débuté un essai clinique où les patients sont traités par voie orale avec de l'acide cholique. L'objectif est de réduire les taux élevés et toxiques des acides di- et trihydroxycholestanoïques, les métabolites des acides biliaires. Les premiers résultats sont attendus dans un an.

Le diagnostic des maladies du spectre de Zellweger peut être établi par des examens biochimiques dans le sang et/ou les urines, et confirmé dans les cultures de cellules de la peau. Les dosages biochimiques spécifiques sont les suivants :

- dans le sang : les acides gras à très longues chaînes, les acides phytanique et pristanique, les acides biliaires, l'acide pipécolique plasmatique, les plasmalogènes des globules rouges ;
- dans les urines : l'acide pipécolique, les acides biliaires et l'oxalate.

Douze gènes PEX différents mutés ont été identifiés dans les maladies du spectre de Zellweger. Le gène *PEX1* est la cause la plus fréquente, présent chez environ 70 % des sujets.

## La maladie de Refsum adulte

Dr Marc Engelen — Centre Médical Académique, Amsterdam,  
Pays-Bas



En 1945, le Pr Refsum a décrit ce qui allait être plus tard connu comme la maladie de Refsum. Celle-ci combine une cécité nocturne, une perte de l'odorat, une surdité, une mauvaise coordination (ataxie), un engourdissement et une faiblesse au niveau des jambes (due à une "neuropathie périphérique"), ainsi qu'une peau squameuse sèche (ichtyose). Les premiers symptômes apparaissent généralement dans la vingtaine et progressent.

Plus tard, on a découvert que la maladie de Refsum est due à un défaut d'oxydation alpha, un processus qui permet la bonne élimination de l'acide phytanique. Cet acide gras saturé s'accumule donc dans tous les tissus de l'organisme. L'acide phytanique est un dérivé du phytol, un lipide présent dans les légumes verts, le plancton, chez les animaux qui mangent (et qui peuvent digérer) de la viande de bœuf et autres ruminants, de nombreux produits laitiers ou encore du poisson. En 1988, on a découvert que, pour les patients atteints de la maladie de Refsum, manger des légumes verts était sans danger car, contrairement aux animaux ruminants, l'homme ne peut pas digérer la chlorophylle où se trouve le phytol.

Le traitement de la maladie de Refsum consiste principalement à suivre un régime alimentaire faible en acide phytanique, vu que ce dernier provient de l'alimentation. Si le taux d'acide phytanique est réduit, la maladie peut être stabilisée (du moins l'ichtyose, l'ataxie et la neuropathie).

Il est important pour les patients atteints de la maladie de Refsum de ne pas perdre de poids rapidement car cela peut libérer dans l'organisme des quantités importantes d'acide phytanique stockés dans le tissu graisseux. En outre, la perte de poids doit être graduelle.

Actuellement, la recherche sur la maladie de Refsum explore la possibilité d'induire une voie alternative pour éliminer l'acide phytanique : l'oxydation oméga. À suivre...

## Atelier MLD

## Essais cliniques

## Thérapie génique associant une greffe de moelle osseuse pour la leucodystrophie métachromatique

Dr Laura Loroli — Institut Téléthon San Raffaele pour la Thérapie Génique, Milan, Italie



La leucodystrophie métachromatique (ou MLD) est un trouble dû au déficit d'une enzyme appelée l'ARSA (pour arylsulfatase A). Ce dysfonctionnement conduit à une démyélinisation sévère, une dégénérescence neurologique et la mort prématurée des malades.

Actuellement, il n'existe aucun traitement capable d'arrêter la progression de cette pathologie dévastatrice. Au vu des données précliniques démontrant la tolérance et l'efficacité d'une thérapie génique chez l'animal malade, et d'après les connaissances sur l'histoire naturelle

de la maladie, un essai clinique de thérapie génique a été approuvé par les autorités italiennes en mars 2010. Il est basé sur la transplantation des propres cellules de moelle osseuse du malade après correction du gène l'ARSA à l'aide d'un vecteur-médicament. Cet essai s'adresse à des patients souffrant de MLD de forme infantile tardive à un stade pré-symptomatique, ou de forme juvénile précoce à un stade symptomatique précoce. Les objectifs de l'étude sont d'évaluer :

- l'innocuité du traitement, en rapport avec celui utilisé pour détruire la moelle osseuse (traitement myéloablatif) et l'utilisation du vecteur-médicament,
- son efficacité, en mesurant les capacités motrices et cognitives des patients, ainsi que la démyélinisation du système nerveux.

Neuf patients ont à ce jour été inclus dans l'étude, sept souffrant de MLD infantile tardive et deux de MLD juvénile précoce. Trois des patients avec une forme infantile tardive ont achevé leur 30e mois de suivi.

Jusqu'à présent, la procédure utilisée pour la greffe a permis une bonne reconstitution de la moelle osseuse et a montré l'innocuité à court et moyen terme du traitement myéloablatif et du vecteur-médicament chez tous les patients. La reconstitution de l'activité ARSA est stable et souvent au-dessus des taux normalement observés dans les cellules de moelle osseuse et dans le liquide céphalorachidien. Les patients présentant une forme infantile tardive sont protégés de la progression habituelle et marquée de la maladie. Le suivi de ces patients jusqu'à trois ans et demi après le début attendu des symptômes (défini en fonction du début de la maladie chez les grands frères ou grandes sœurs malades) montre que la maladie n'a pas significativement progressé. La plupart des patients présentent un développement moteur et cognitif continu, à l'opposé de l'évolution naturelle de la maladie et à celle de leurs frères et sœurs.

La maladie des deux patients présentant la forme juvénile précoce étant traitée à un stade différent des formes infantiles, il est impossible pour le moment de se prononcer sur le bénéfice thérapeutique.

Ces données sont globalement encourageantes, mais devront être validées par la poursuite du suivi à long terme.

## Essai d'enzymothérapie avec l'enzyme HGT-1110

Dr Eric Crombez — Shire Pharmaceuticals, Boston, MA, USA



La leucodystrophie métachromatique (ou MLD) est une maladie de surcharge du lysosome touchant principalement le système nerveux central. Ces maladies constituent une famille de maladies génétiques dues à des enzymes manquantes ou défectueuses. Il est possible de traiter efficacement un grand nombre des symptômes de certaines de ces pathologies par administration intraveineuse d'enzymes de synthèse. Ces enzymes sont de taille relativement importante pour pouvoir passer de la circulation sanguine vers

le système nerveux central lorsqu'on les administre par voie intraveineuse. De ce fait, il est improbable qu'elles puissent agir sur les troubles du système nerveux central associés à certaines formes de maladies de surcharge du lysosome, dont la MLD.

Le laboratoire Shire a conçu un programme de recherche clinique visant à étudier l'administration directe d'arylsulfatase humaine de synthèse (ou rhASA), dans le système nerveux central pour pallier son manque. Cet essai clinique pour la MLD est dans une phase précoce de développement.

Chez les modèles animaux, l'enzyme rhASA a été détectée dans toutes les zones du cerveau. L'enzyme administrée se dépose dans les lysosomes des oligodendrocytes, les cellules de la myéline du cerveau où s'accumulent anormalement des sulfatides lors de la maladie.

L'administration hebdomadaire de rhASA par voie intrathécale (c'est-à-dire par injection directe dans la zone qui entoure la moelle épinière) dans un autre modèle animal de MLD a permis de diminuer les sulfatides dans le système nerveux central, aussi bien dans la moelle épinière (à proximité du site d'injection) que dans les tissus profonds du cerveau. Ces séries d'expérimentations démontrent que l'administration de rhASA par voie intrathécale permet d'atteindre les tissus cibles du système nerveux central. Les données issues de ces études sont utiles pour passer à la recherche chez l'homme. Toutefois, les résultats observés chez l'animal ne sont pas automatiquement corrélés à ce qui est observé chez l'homme.

Le laboratoire Shire conduit actuellement un essai clinique pour évaluer l'innocuité d'une forme synthétique de l'ASA chez des patients MLD. Cette étude, outre l'innocuité, évaluera les modifications éventuelles de la motricité grossière et fine, la déglutition, la cognition, du comportement adaptatif et du système nerveux périphérique. Cette étude prévoit une phase d'extension qui permettra d'évaluer l'innocuité à plus long terme et l'effet au niveau clinique. Le laboratoire Shire étudie aussi l'histoire naturelle de la maladie afin de mieux en connaître l'évolution chez des enfants et adultes malades.





## Thérapie génique intracérébrale de la leucodystrophie métachromatique

Dr Caroline Sevin — Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France



La leucodystrophie métachromatique ou MLD est une maladie neuro-dégénérative causée par un défaut en activité enzymatique de l'arylsulfatase A (ARSA), conduisant à l'accumulation de sulfatides dans les cellules du système nerveux central et périphérique, en particulier les cellules fabriquant la myéline, mais aussi les neurones. La forme infantile tardive, forme la plus sévère et la plus fréquente, commence vers un ou deux ans. Elle est caractérisée par une dégradation motrice et cognitive très

rapides conduisant à un état grabataire et à un décès précoce. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement pour cette forme de la maladie, lorsque les enfants sont symptomatiques. La thérapie génique intracérébrale pourrait permettre l'expression rapide et soutenue de l'enzyme ARSA dans le cerveau, une condition nécessaire pour arrêter le processus neurodégénératif en temps voulu.

Nous avons démontré, dans le modèle de souris malade, l'efficacité et l'innocuité de l'administration par voie intracérébrale d'un vecteur-médicament contenant le gène thérapeutique ARSA dénommé AAVrh.10/ARSA.

Chez le primate, où le volume du cerveau est plus proche de celui d'un enfant, nous avons optimisé et validé la procédure neurochirurgicale pour permettre l'administration simultanée du vecteur-médicament dans douze régions du cerveau. Nous avons ainsi pu montrer que l'injection du vecteur AAVrh.10/ARSA entraîne une surexpression significative d'ARSA dans l'ensemble du cerveau des primates, sans aucun effet délétère. Les études toxicologiques requises ont été réalisées et nous avons obtenu de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), et du comité d'éthique les autorisations nécessaires pour débuter en mars 2013 un essai clinique de phase I-II (soit de tolérance et d'efficacité) chez des enfants atteints de MLD. Cet essai, actuellement ouvert au recrutement, inclura cinq enfants, âgés entre 6 mois et 5 ans, atteints de formes précoces de MLD (infantile tardive ou juvénile précoce), au tout début de leur maladie, suivant des critères spécifiques d'inclusion moteurs et cognitifs.

Le vecteur-médicament sera administré dans douze sites du cerveau, déterminés par imagerie cérébrale ou IRM. Des paramètres de sécurité et d'efficacité seront évalués pendant deux ans, une période qui devrait être suffisante pour évaluer la sécurité et l'efficacité thérapeutique de cette approche de thérapie génique.

# Atelier Maladie de Krabbe

## Les leçons après dix ans d'histoire naturelle et de traitements

Dr Maria Escolar — Hôpital d'Enfants, Pittsburg, PA, USA



Nous avons étudié l'histoire naturelle de la maladie de Krabbe de type infantile précoce et de type tardif. Par ailleurs, nous avons conçu une classification permettant d'évaluer le fardeau de cette pathologie.

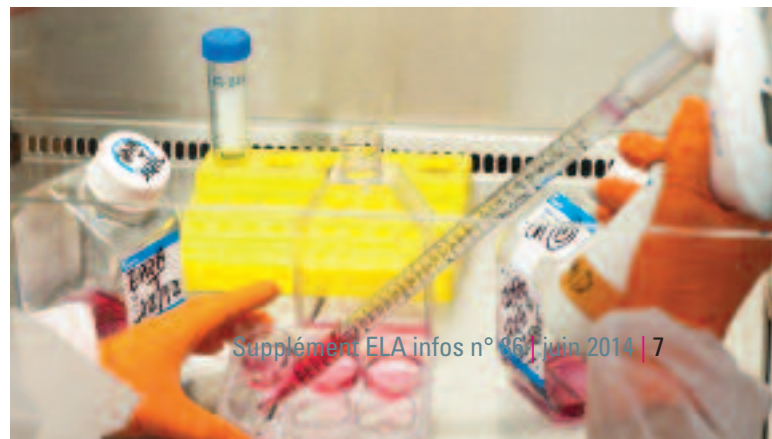
La greffe de moelle osseuse pour ces deux formes de la maladie corrèle bien avec cette classification au moment du traitement. D'autres examens, tels que l'imagerie cérébrale et les études neurophysiologiques, reflètent la progression de la maladie sans permettre de prédire les résultats après

une greffe.

Dans la forme débutant dans l'enfance précoce, une greffe de cellules de sang de cordon ombilical de donneur non apparenté n'est bénéfique aux bébés que si le diagnostic a été posé avant l'apparition des symptômes. Depuis août 2006, le dépistage des nouveau-nés est possible dans l'état de New York. Il est devenu disponible dans le Missouri plus récemment. Aux USA, plusieurs états ont introduit une législation et envisagent d'ajouter la maladie de Krabbe aux programmes larges de dépistage néonatal. Il devient donc urgent d'identifier des facteurs prédictifs indiquant quand la maladie va se déclarer, puisque nous ne savons pas si les bébés dépistés positivement développeront la maladie dès leur plus jeune âge ou à l'âge adulte.

Notre équipe étudie et développe de nouvelles méthodologies permettant d'identifier des différences au niveau d'une zone de la substance blanche du cerveau appelée la capsule interne. Pour cela, une technologie d'imagerie IRM spécifique mettant en évidence les faisceaux neuronaux connue sous le nom de tractographie cérébrale est utilisée. Notre nouvel outil permet de distinguer les bébés présentant une maladie débutant de façon précoce, de ceux qui développeront des symptômes bien plus tard. Il donne des valeurs très constantes permettant de détecter, durant les premières semaines de vie, de petites différences régionales et des modifications liées à l'âge. De plus, nous avons mis en place une banque de tissus biologiques et évalué les marqueurs biologiques potentiels pouvant prédire quand la maladie se déclarera.

Ces deux outils pourraient s'avérer des composants essentiels pour le dépistage de la population afin de déterminer quels patients doivent être traités avant l'apparition des symptômes.



# Atelier Syndrome CACH, maladie d'Alexander, maladie de Canavan et maladie MLC

## Syndrome CACH

### Mise au point d'un nouveau modèle

Pr Charles French-Constant - Centre MRC pour la Médecine Régénérative, Centre de Recherche pour la Sclérose en Plaques, Edimbourg, Royaume-Uni



Le syndrome CACH est une des formes les plus communes de leucodystrophie de l'enfant, un type de maladie héréditaire touchant la substance blanche du cerveau, qui conduit à des dommages progressifs au niveau du cerveau et aboutit au décès. Cette maladie dévastatrice est habituellement détectée tôt dans l'enfance, même si des enfants plus âgés et des adultes peuvent être aussi touchés.

Le syndrome CACH est dû à des anomalies dans la fabrication de protéines dans une cellule. Ces troubles

touchent deux types de cellules, appelées les oligodendrocytes et les astrocytes, localisées dans le cerveau. Ces cellules fournissent un soutien et une protection aux cellules nerveuses. Plus particulièrement, les oligodendrocytes produisent une substance grasseuse appelée la myéline qui enveloppe les cellules nerveuses et permet une transmission rapide du signal nerveux. Les effets de ces anomalies sur les oligodendrocytes et les astrocytes sont mal compris, tout comme la façon dont cela aboutit aux lésions cérébrales observées.

Il est donc essentiel d'étudier les cellules touchées, sauf que les oligodendrocytes et les astrocytes provenant de cerveaux de malades sont difficiles à obtenir. Pour contourner ce problème, nous avons pris avantage de la capacité des cellules souches embryonnaires à se transformer en n'importe quel type de cellule de l'organisme. En utilisant les signaux chimiques adéquats, nous pouvons transformer ces cellules souches en oligodendrocytes et astrocytes dans des boîtes de culture.

Les cellules souches embryonnaires ont un autre avantage : il est relativement facile de modifier leur ADN pour y introduire les anomalies liées au syndrome CACH. Nous avons choisi d'étudier deux de ces anomalies et avons modifié les cellules souches embryonnaires avec succès pour les y inclure. Nous pouvons maintenant convertir ces cellules souches anormales en astrocytes et oligodendrocytes et les ajouter aux cellules nerveuses en culture. Avec le temps, les oligodendrocytes enveloppent les cellules nerveuses avec de la myéline comme elles le font dans le cerveau. Ce modèle simplifié de cerveau dans

une boîte de culture nous permettra d'essayer de comprendre quels effets ont ces anomalies du syndrome CACH sur les oligodendrocytes et les astrocytes et comment ces cellules altérées peuvent induire la maladie chez l'homme.

## Maladie d'Alexander

### Le point sur la recherche

Dr Diana Rodriguez — Hôpital Trousseau, Paris, France



La maladie d'Alexander est liée à des mutations dominantes du gène *GFAP* codant pour la protéine de structure du même nom : le filament intermédiaire majoritaire des astrocytes matures, ces cellules de forme étoilée du système nerveux central assurant le soutien de la structure du système nerveux et participant à la réparation des tissus nerveux.

Dans la grande majorité des cas, cette maladie génétique est sporadique, liée à l'apparition d'une nouvelle mutation du gène *GFAP* chez le patient sans

qu'aucun membre de la famille de sa génération, ou de générations antérieures, soit touché. La maladie est beaucoup plus rarement familiale.

L'âge d'apparition, les symptômes, l'évolution et la sévérité de cette maladie sont très variables. Classiquement, les formes débutant chez le nourrisson, dites infantiles, sont plus sévères que les formes débutant plus tardivement, juvéniles et adultes. Le travail de recherche clinique visant à décrire l'histoire naturelle de la maladie est donc essentiel pour pouvoir, à l'avenir, apprécier les effets de traitements potentiels dans le cadre d'essais thérapeutiques.

En l'absence de marqueur biochimique pour cette pathologie, nous poursuivons actuellement l'étude de l'évolution de la maladie chez quarante-cinq patients d'un point de vue clinique, IRM et électrophysiologique. Nos résultats mettent en évidence une grande hétérogénéité dans l'évolution et la sévérité de la maladie, y compris entre les patients atteints de forme infantile.

Les études réalisées jusqu'à présent pour comprendre les mécanismes de cette pathologie ont montré que les mutations du gène *GFAP* entraînent une surexpression de cette protéine et la formation d'agrégats (appelés fibres de Rosenthal) et contenant de la GFAP et des protéines du stress cellulaire dans les astrocytes.

Cette accumulation de protéine GFAP est à l'origine d'une augmentation du stress cellulaire qui favorise également la surexpression de la protéine GFAP. Notre travail de recherche a pour but d'identifier des drogues permettant de rompre ce cercle vicieux.

Lors de travaux initiaux dirigés par le Dr Danielle Pham-Dinh, de nombreuses drogues ont été testées sur des cultures d'astrocytes de souris exprimant le gène *GFAP* muté. Ces travaux nous ont permis de sélectionner deux drogues entraînant une diminution des agrégats sans effet toxique.

Nous disposons actuellement de deux types de souris, chacune porteuses de deux mutations différentes du gène *GFAP*. Ces souris sont plus proches de la maladie d'Alexander que le modèle cellulaire antérieur. Nous avons montré qu'elles expriment la protéine GFAP en excès et présentent des fibres de Rosenthal aussi bien dans le cerveau des souris que dans les astrocytes en cultures. Les deux drogues sélectionnées diminuent le nombre d'agrégats et la surexpression de protéine GFAP dans les cultures d'astrocytes issus de ces souris mutées. Nous testons



actuellement l'effet de ces drogues sur d'autres signes de dysfonctionnement astrocytaire récemment identifiés sur les cultures. Ces deux drogues seront également testées chez les souris mutées. En parallèle, nous poursuivons la caractérisation de ces dernières qui ne présentent pas les signes cliniques de la maladie d'Alexander de façon évidente, mais seulement quelques anomalies comportementales. Ces souris présentent toutefois des anomalies importantes au niveau de leur cerveau semblables à celles décrites chez les patients.

## Maladie de Canavan

### Le point sur la thérapie génique

Dr Guangping Gao — Centre de Thérapie Génique, Faculté de Médecine de l'Université du Massachusetts, Worcester, MA, USA



Les leucodystrophies constituent un groupe de maladies touchant principalement la substance blanche du système nerveux central (par contraste avec la substance grise). Ce terme peut être cependant trompeur, sachant que de nombreuses maladies peuvent entraîner un trouble de la substance blanche même lorsque la cause principale ne se situe pas au niveau du cerveau. C'est le cas, par exemple, du stade terminal de l'infection par le virus VIH. Dans le contexte de thérapie génique, le terme de leucodystrophie renvoie habituellement

à un groupe de maladies héréditaires caractérisées par un trouble de la substance blanche. Malheureusement, ce type de trouble est associé à des symptômes sévères et à une réduction significative de la qualité de vie pour les malades et leurs familles.

La maladie de Canavan est l'une des maladies appartenant au groupe des leucodystrophies. C'est une pathologie héréditaire récessive (ce qui signifie que l'anomalie génétique doit être héritée des deux parents) causée par une mutation du gène de l'aspartoacylase (*AspA*). À cause de cette mutation, cette enzyme ne peut pas métaboliser le N-acétylaspartate (NAA) ce qui entraîne une accumulation de NAA dans le sang et l'urine (acidurie). Les patients présentent des symptômes très tôt (dans les premiers mois suivant la naissance) ou au contraire au bout de plusieurs années (à l'adolescence). Et ils sont très divers : mauvaise alimentation et irritabilité chez le nourrisson, macrocéphalie (augmentation de la circonférence de la tête), hypotonie (tension musculaire réduite) et convulsions à partir de l'âge d'un an. De plus, les enfants sont frappés de cécité, perdent du poids, développent un tremblement et présentent un retard de développement sévère. Une observation fréquente à l'imagerie cérébrale (IRM) est une accumulation d'eau dans le tissu cérébral (œdème cérébral), qui est aussi caractéristique des leucodystrophies en général. Actuellement, seul un traitement symptomatique est disponible, comme des médicaments contre les convulsions ou des plâtres pour soutenir la posture ou les articulations.

La thérapie génique représente une stratégie très prometteuse pour le traitement des patients souffrant de leucodystrophies héréditaires comme la maladie de Canavan. Ce traitement suit un principe simple : il s'agit de remplacer le gène malade (muté) par un gène sain. Lors des premières tentatives d'utilisation, le gène sain a été soit inclus dans des gouttes de lipides, soit placé dans un virus non pathogène pour l'homme et les primates, le virus adéno-associé (AAV). Pour ces études, le gène sain devait être directement injecté dans le cerveau, car les gouttes de lipides, ou les vecteurs AAV de première génération, ne pouvaient pas traverser la barrière hémato-encéphalique protégeant le cerveau

contre les substances et les organismes susceptibles de lui nuire, comme les virus, bactéries ou toxines. Les premières études menées sur la souris et sur l'homme ont permis de montrer une certaine diminution de l'accumulation d'eau autour du site d'injection. Ces traitements sont sûrs pour les patients lorsque le gène *AspA* sain est injecté dans le cerveau. Ces résultats, pourtant prometteurs, n'ont pas permis d'améliorer significativement les atteintes pathologiques.

Il y a quelques années, un saut important a été effectué lorsque nous avons constaté que certains des vecteurs AAVs découverts par notre laboratoire sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique. Notre groupe a commencé à injecter par voie intraveineuse ces AAVs de deuxième génération contenant le gène *AspA* sain à des souris âgées d'un jour et portant une mutation du gène *AspA*. Ces souris malades présentent des symptômes très sévères, comme les patients, et décèdent systématiquement dans les quatre premières semaines de vie (tandis que les souris saines peuvent vivre deux ans). Afin d'évaluer la réussite de notre traitement, nous avons mesuré plusieurs paramètres : leur poids, leur espérance de vie, leur fonction motrice (coordination, force et équilibre) et leur taux de NAA dans le cerveau et l'urine. Des IRM ont été réalisées chez les souris traitées et non traitées. Globalement, les performances des souris traitées sont similaires à celles de souris saines quel que soit le paramètre mesuré. De façon frappante, les souris traitées ont survécu jusqu'à deux ans, donc, autant que les souris en bonne santé. Nous souhaitons par ailleurs déterminer s'il était possible de sauver les souris malades en pratiquant des injections plus tardives. Nous avons traité avec succès les animaux jusqu'à une semaine avant la date présumée de leur décès. Autrement dit, le traitement a permis d'allonger l'espérance de vie des souris malades, pour atteindre celle de souris saines, même en cas de traitement tardif.

Très encouragés par ces premiers résultats obtenus sur ces souris, nous travaillons maintenant à améliorer le traitement. Une première stratégie consiste à injecter notre vecteur AAV contenant le gène *AspA* sain dans le système ventriculaire cérébral. Celui-ci est constitué d'un système naturel de cavités reliées entre elles. Les premiers résultats sont très prometteurs. Ce traitement nécessitera 1/100<sup>e</sup> de la dose du médicament utilisée en intraveineuse. Une autre stratégie consiste à augmenter l'expression du gène *AspA*. Avant de produire une protéine fonctionnelle, un gène est lu plusieurs fois. Si nous pouvons augmenter le nombre de fois où le gène est lu, nous pourrions peut-être augmenter la puissance du traitement. Une expression plus efficace du gène pourrait également nous aider à réduire encore la dose utilisée actuellement. Cela pourrait être important pour diminuer le risque d'effets secondaires potentiels.

Outre ces études en cours, nous devons répondre aux questions suivantes avant d'envisager le passage à l'essai clinique :

- Jusqu'à quel stade de la maladie pouvons-nous traiter avec succès la maladie de Canavan ? D'autres interrogations découlent de cette question, principalement :

- > Il est possible qu'à un temps donné dans la maladie, notre stratégie ne soit plus efficace du point de vue thérapeutique, et qu'elle n'améliore plus l'état du patient. Si nous pouvons identifier ce temps-là, nous pourrions revoir notre stratégie pour éventuellement surmonter certaines de ses restrictions.

- > La barrière hémato-encéphalique semble moins étanche chez les sujets les plus jeunes et, à l'inverse, plus imperméable et plus développée chez l'adulte. Il est donc important de déterminer si ce changement au niveau de la barrière hémato-encéphalique aura un impact sur les résultats du traitement.

En répondant à cette autre question, nous pourrions améliorer la thérapie génique de la maladie de Canavan. Plus important encore, les résultats de ces études nous apporteront certainement des informations utiles pour traiter d'autres

leucodystrophies, car nombre de ces principes sont aussi applicables à d'autres maladies du cerveau.

- Compte tenu qu'aucun traitement n'est exempt d'effets secondaires, nous souhaitons aussi savoir quelle dose de vecteur sera la plus efficace et avec le moins possible d'effets indésirables pour traiter la maladie de Canavan. Tout ceci nous aidera à déterminer une dose qui pourra être ensuite rapportée à la taille d'un homme, ce qui devient très important pour le premier essai clinique.

En conclusion, nous sommes convaincus que notre stratégie de thérapie génique pour le traitement des leucodystrophies héréditaires, comme la maladie de Canavan, pourrait être transposée avec succès chez l'homme. Notre objectif est de répondre à toutes les questions restantes sur la thérapie génique de la maladie de Canavan avant de se lancer vers des applications cliniques. Nous avons une équipe solide qui travaille sur ces questions cruciales qui amélioreront la vie de nombreux patients et, peut-être, guériront les leucodystrophies.

### Maladie MLC

#### Développement de modèles expérimentaux pour la leucoencéphalopathie mégalencéphalique avec kystes sous-corticaux (MLC)

Pr Raúl Estévez — Université de Barcelone, Espagne



Des anomalies de la protéine MLC1 ou GlialCAM sont sous-jacentes à la leucoencéphalopathie mégalencéphalique avec kystes sous-corticaux (MLC). Ces deux protéines doivent interagir afin que la protéine MLC1 quitte l'intérieur de la cellule pour aller en surface et s'installer entre deux cellules. Par ailleurs, la protéine GlialCAM, en interagissant avec le canal chlore CIC-2, permet à ce dernier de se localiser entre deux cellules et de modifier les courants du canal chlore.

Des mutations de ce canal ont été récemment identifiées dans un autre type de leucodystrophie. Au vu de ces données, il est difficile d'expliquer pourquoi les patients présentant des mutations *MLC1* (patients de type MLC1) ou *GlialCAM* (patients de type MLC2A) présentent la même forme de maladie. Nos travaux se sont intéressés aux modèles de la maladie chez le poisson-zèbre et la souris, mais aussi à une biopsie de cerveau d'un malade. Nos données indiquent une relation fonctionnelle entre la protéine MLC1, localisée dans les cellules du cerveau de type astrocyte, et le canal CIC-2, lui situé dans d'autres cellules cérébrales, les oligodendrocytes, via des interactions avec la protéine GlialCAM. Un dysfonctionnement du canal CIC-2 dans ces cellules pourrait contribuer à l'apparition de la MLC. Pour finir, nous avons montré le rôle conservé de la protéine MLC1 pendant l'évolution lui permettant de réguler la quantité de protéine GlialCAM à la surface des cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes) qui expliquerait la symptomatologie similaire observée pour les malades de type MLC1 et MLC2A.



## Atelier PMD et autres leucodystrophies hypomyélinisantes

### Maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD)

Dr Geneviève Bernard — Université McGill, Montréal, Canada



Les leucodystrophies sont divisées en deux groupes principaux selon leurs caractéristiques à la résonance magnétique cérébrale : leucodystrophies hypomyélinisantes et leucodystrophies non-hypomyélinisantes.

La maladie de Pelizaeus-Merzbacher (ou PMD) est le prototype et, selon les données actuelles, la plus commune des maladies hypomyélinisantes. C'est une maladie liée au chromosome X causée par des mutations du gène *PLP1*. La présentation clinique des maladies liées au gène *PLP1* est variable et comprend plusieurs sous-types selon l'âge de début de la maladie et la sévérité de celle-ci. La forme conatale est la plus sévère avec un début dans la période néonatale, suivie de la forme classique qui débute dans la première année de vie, de la forme *PLP1*-nulle et enfin de la paraparésie spastique compliquée et non-compliquée (SPG2).

La forme classique se présente habituellement durant la période infantile avec une hypotonie (tonus musculaire diminué) et un nystagmus correspondant à des mouvements saccadés involontaires des yeux. L'enfant développe une quadraparésie spastique, c'est-à-dire une augmentation de tonus dans les bras et les jambes, de l'ataxie (problèmes d'équilibre) et des difficultés cognitives. Une équipe multidisciplinaire est nécessaire afin d'offrir une prise en charge en réadaptation, de traiter les symptômes problématiques, par exemple la spasticité et de prévenir les complications (exemple : mise en place d'une gastrostomie pour prévenir les pneumonies d'aspiration). Une étude clinique récente, proposant une transplantation de cellules souches, a été effectuée chez quatre patients atteints de la forme la plus sévère de la maladie, la forme conatale. Cette étude a montré que, sur la période d'observation, le traitement était sûr et que les cellules souches s'étaient implantées dans le cerveau des patients atteints. Davantage d'études seront nécessaires afin de déterminer l'innocuité et l'efficacité de cette thérapie, mais les résultats actuels sont encourageants.

## Thérapie génique chez l'animal développant une PMD

Dr Mélina Bégou — Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France



La maladie de Pelizaeus-Merzbacher (ou PMD) est liée à des mutations du gène des protéolipides de la myéline, le gène *PLP1*. Les protéolipides PLP/DM20 constituent environ 50 % des protéines totales de la myéline. Dans le cerveau, la myéline est synthétisée par des cellules appelées les oligodendrocytes pour former une gaine isolante autour de l'axone des neurones et permettre ainsi une conduction rapide de l'influx nerveux. Dans la majorité des cas, la PMD est provoquée par l'acquisition de copies supplémentaires du gène *PLP*

(duplication) et, dans une plus faible proportion des cas, on retrouve des anomalies de la séquence du gène responsables de la production d'une protéine anormale (mutation). La PMD restant actuellement sans aucune ressource thérapeutique, le challenge actuel consiste à développer une approche de thérapie génique visant à substituer, ou moduler, le gène pathologique.

Pour nos travaux, des souris modèles de la maladie exprimant des copies supplémentaires du gène *PLP1* ont été testées. Les mutations chez ces souris provoquent des troubles neurologiques et des anomalies du système nerveux similaires à ceux observés chez l'homme.

Nous conduisons une étude préliminaire visant à explorer l'effet d'oligonucléotides antisens, appelés Morpholino et commercialisés par la société Gene-tools®, sur l'expression surabondante de PLP et sur la maladie de la souris. Ce produit, choisi car en cours d'évaluation dans des essais cliniques de thérapie génique chez des enfants atteints de myopathie de Duchenne, ne nous semble pas constituer un outil pertinent dans le traitement de la PMD.

Notre projet de recherche en cours vise à évaluer, dans le même modèle de la maladie, l'effet d'ARN antisens délivrés dans le cerveau par un vecteur-médicament de type AAV, vecteur infectant de manière préférentielle les oligodendrocytes.



## Maladies liées à l'ARN polymérase III

### Le point sur la recherche

Dr Geneviève Bernard — Université McGill, Montréal, Canada

Les leucodystrophies liées à l'ARN polymérase III sont un groupe de leucodystrophies hypomyélinisantes relativement fréquentes qui inclut:

- le syndrome 4H (Hypomyélinisation, Hypodontie et Hypogonadisme Hypogonadotrope),
- l'ADDH (*"Ataxia, Delayed Dentition and Hypomyelination"*),
- la leucodystrophie TACH (*"Tremor-Ataxia with Central Hypomyelination"*),
- la leucodystrophie avec oligodontie
- le syndrome HCAHC (*"Hypomyelination with Cerebellar Atrophy and Hypoplasia of the Corpus Callosum"*).

Ce groupe de maladies est maintenant considéré comme un continuum clinique, c'est-à-dire que certains patients présentent des caractéristiques communes et d'autres distinctes, telles que les anomalies dentaires et le retard pubertaire.

Les leucodystrophies liées à l'ARN polymérase III sont causées par des mutations dans les gènes *POLR3A* et *POLR3B*. À ce jour, plus de quarante patients ont été identifiés. Les gènes *POLR3A* et *POLR3B* codent pour les deux plus grandes sous-unités protéiques d'une enzyme nommée ARN polymérase III. Ensemble, elles forment le centre actif du complexe composé de dix-sept sous-unités. Aucun patient ne possède deux mutations nulles, c'est-à-dire qui entraîneraient l'absence complète de la protéine correspondante. Ceci n'est pas surprenant étant donné le rôle primordial de l'ARN polymérase III dans la fabrication de petits ARNs, tels que les ARN de transfert, 5S, U6 et 7SK.

Nous avons amorcé les travaux afin de comprendre pourquoi les mutations des gènes *POLR3A* ou *POLR3B* induisent une leucodystrophie hypomyélinisante. Ces mutations pourraient avoir un effet sur l'assemblage des sous-unités de l'enzyme, ou sur la liaison de l'ADN avec le complexe.

L'étude comparative de tous les petits ARNs produits par l'ARN polymérase III chez les patients et des contrôles sains suggère que la fabrication des ARNs de transfert serait plus affectée que d'autres. L'implication de ces petits ARNs est aussi suspectée dans d'autres maladies héréditaires de la substance blanche du cerveau comme la LBSL (*"Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal cord involvement and Lactate elevation"*) et une autre leucodystrophie hypomyélinisante appelée HBSL (*"Hypomyelination with brainstem and spinal cord involvement and leg spasticity"*) causée par des mutations du gène *DARS*.

La découverte des gènes associés aux leucodystrophies liées à l'ARN polymérase III a permis à de nombreux patients et leurs familles d'obtenir un diagnostic moléculaire et un conseil génétique approprié. Des études cliniques, radiologiques et physiopathologiques sont toujours en cours afin de mieux comprendre l'étendue des manifestations cliniques et radiologiques, des anomalies génétiques et, bien entendu, la physiopathologie de ce groupe de maladies afin de pouvoir éventuellement développer des stratégies thérapeutiques.

\* *Ataxie, Dentition retardée et hypomyélinisation*

\*\* *Tremblements-ataxie avec hypomyélinisation centrale*

\*\*\* *Hypomyélinisation avec atrophie cérébelleuse et hypoplasie du corps calleux*

\*\*\*\* *Leucoencéphalopathie avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière et élévation de lactate*

\*\*\*\*\* *Hypomyélinisation avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière, et spasticité des jambes*

### Critères d'évaluation clinique et marqueurs d'efficacité IRM pour les essais cliniques ciblant les leucodystrophies hypomyélinisantes

Dr Adeline Vanderver — Centre Médical National des Enfants, Washington, D.C., USA



Les leucodystrophies hypomyélinisantes constituent un groupe hétérogène de maladies dont le point commun est un très faible développement de la myéline. Ces maladies incluent :

- l'hypomyélinisation avec atrophie des noyaux gris centraux et du cervelet (*H-ABC, hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum*),
- l'hypomyélinisation avec cataractes congénitales (HCC),
- l'hypomyélinisation des structures myélinisées précoces,
- l'hypomyélinisation avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière avec spasticité des jambes,
- la maladie de surcharge en acide sialique libre (maladie Salla),
- la fucosidose,
- la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD),
- la maladie de Pelizaeus-Merzbacher-like (PMLD),
- les leucodystrophies liées à l'ARN polymérase III/syndrome 4H,
- la dysplasie oculo-dento-digitale (ODD),
- la trichothiodystrophie avec hypersensibilité à la lumière du soleil,
- les troubles associés au gène *SOX10*.

Bien qu'il existe des caractéristiques cliniques spécifiques à un certain nombre de ces troubles, comme l'absence de puberté dans le syndrome 4H, la sensibilité cutanée dans la trichothiodystrophie, les cataractes dans l'HCC, les anomalies dentaires dans le syndrome 4H et l'ODD, ces maladies hypomyélinisantes présentent aussi plusieurs caractéristiques tendant à les réunir.

Ce recoupement clinique permet de considérer ces troubles conjointement lors du développement de critères d'évaluation pour des essais cliniques à venir, comme la fonction motrice globale, des échelles de dystonie et des échelles neuropsychologiques standardisées. Malheureusement, ils peuvent être difficiles à appliquer chez des patients présentant des déficits moteurs sévères, comme c'est le cas avec les leucodystrophies hypomyélinisantes. Les études de l'histoire naturelle de la maladie sont donc probablement l'outil clinique le plus important pour des futurs essais thérapeutiques. Par ailleurs, aucun marqueur biochimique ne peut servir d'indicateur des maladies hypomyélinisantes.

Nous devons donc envisager d'autres indicateurs biologiques, notamment l'imagerie neurologique. Les dernières modalités d'IRM découvertes pourraient être utiles dans l'identification d'une myélinisation en cours. Elles incluent la spectroscopie du proton par résonance magnétique (MRS), différentes approches quantitatives comme les approches de relaxation multicomposantes permettant des acquisitions complètes en trois dimensions (l'imagerie rapide spirale ou d'autres méthodologies d'imagerie sans écho de spin (GRASE ou mcDESPOT), le transfert de magnétisation et l'imagerie en tenseur de diffusion).

Ces approches deviendront particulièrement pertinentes à mesure que des traitements nouveaux pour les leucodystrophies hypomyélinisantes progresseront vers le stade d'essais cliniques.

## Atelier

### Leucodystrophies

### indéterminées

#### Présentation d'une nouvelle leucodystrophie

Pr Marjo van der Knaap — Centre Médical Vu, Amsterdam, Pays-Bas



Notre travail de recherche se concentre sur des patients souffrant d'une leucodystrophie indéterminée et a pour but de définir de nouveaux groupes homogènes de malades suggérant des anomalies génétiques communes, sur la base des observations cliniques et IRM. Ensuite, notre objectif est d'en identifier le défaut génétique responsable.

Nous avons sélectionné un groupe de treize patients présentant des images IRM similaires suggérant une nouvelle leucodystrophie. Des études

indépendantes de séquençage génétique de nouvelle génération (séquençage de l'exome) ont été réalisées sur deux de ces patients sans lien familial.

Chez ces patients, le séquençage a révélé des mutations hétérozygotes composites du gène *AARS2*. Des études fonctionnelles menées sur des levures ont confirmé le caractère pathogène des mutations chez un patient. Un séquençage génétique traditionnel, de type Sanger, a été effectué sur les onze autres patients et a révélé des mutations du gène *AARS2* chez quatre d'entre eux. Les six patients présentant des mutations du gène *AARS2* présentaient des signes de détérioration neurologique apparus pendant l'enfance ou à l'âge adulte, dont une ataxie, une spasticité et un déclin cognitif, avec un dysfonctionnement au niveau du lobe frontal du cerveau. Les IRM ont montré des anomalies de la substance blanche, avec une atteinte frappante des connexions gauche-droite et des voies ascendantes et descendantes, ainsi qu'une atrophie cérébelleuse. Toutes les femmes malades présentaient en outre une insuffisance ovarienne. Aucune atteinte du muscle cardiaque (cardiomyopathie) n'a été observée.

Depuis la fin de cette étude, sur ce premier groupe de malades, plusieurs autres patients ont été identifiés. Des mutations du gène *AARS2* ont également été observées dans une forme sévère de cardiomyopathie infantile dans deux familles.

Nous avons découvert une nouvelle forme de maladie due à des mutations du gène *AARS2*, caractérisée par une leucoencéphalopathie distinctive et une insuffisance ovarienne chez les femmes touchées.



## Actualité sur les maladies hypomyélinisantes

Dr Nicole Wolf — Centre Médical Vu, Amsterdam, Pays-Bas



Les maladies hypomyélinisantes constituent le groupe le plus important (20 % environ) des troubles héréditaires de la substance blanche. Comme pour les autres maladies de la substance blanche, 50 % de nos malades n'ont pas de diagnostic définitif. Le programme de reconnaissance spécifique IRM est très utile pour les troubles de la substance blanche et cruciale pour définir de nouvelles maladies. Pourtant, cette approche était jugée de façon négative pour les maladies hypomyélinisantes.

Ces dernières années, il est devenu évident que, au moins pour une partie des patients présentant une hypomyélinisation, ce programme IRM est utile pour définir de nouvelles maladies. Avec l'aide des nouvelles techniques génétiques, en particulier le séquençage de l'exome, il est devenu possible d'identifier le gène responsable d'une maladie, même dans de petits groupes de patients, comme cela a été démontré pour la nouvelle maladie hypomyélinisante HBSL (*Hypomyelination with Brain Stem and spinal cord involvement and Leg spasticity, pour hypomyélinisation avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière, et spasticité des jambes*), due à des mutations du gène *DARS*.

Le séquençage de l'exome peut aussi être réalisé à l'échelle d'une famille, mais le taux de réussite est considérablement plus faible que dans des groupes réunissant plusieurs patients présentant la même maladie et non apparentés. L'association de l'IRM et du séquençage de l'exome a permis de poser un diagnostic définitif pour les deux tiers des patients que nous suivons. La maladie de Pelizaeus-Merzbacher et le syndrome 4H sont les deux entités les plus fréquentes ; toutes les autres sont très rares.

Il est aussi devenu évident que la présentation clinique de l'hypomyélinisation est très variable. Nous connaissons des adultes dont les symptômes sont légers et, à l'inverse, des enfants sévèrement affectés, tous présentant une hypomyélinisation à l'IRM. Grâce aux nouvelles techniques d'IRM, nous tentons de quantifier la myéline présente chez ces patients afin d'essayer de mieux comprendre ces variations cliniques. Cette approche sera également importante pour des études thérapeutiques ultérieures.

## Découverte de nouveaux gènes

Pr Enrico Bertini — Hôpital Bambino Gesù, Rome, Italie



Les leucodystrophies sont un groupe de maladies neurodégénératives héréditaires rares touchant la substance blanche et son composant principal, la myéline. La plupart débutent dans l'enfance. Les leucodystrophies sont classées en deux groupes principaux :

- les troubles qui affectent la myélinisation et qui se caractérisent par une anomalie primaire de la myélinisation (leucodystrophies hypomyélinisantes),
- les troubles qui sont caractérisés par la destruction de la myéline (leucodystrophies démyélinisantes).

Au cours des quinze dernières années, l'IRM a émergé en tant qu'outil précieux pour le diagnostic différentiel des

leucoencéphalopathies. Ces cinq dernières années, les progrès de la technologie du séquençage génétique ont donné naissance au séquençage de nouvelle génération, qui permet d'accélérer l'identification de nouveaux gènes responsables de leucodystrophies jusqu'alors indéterminées.

Nous avons maintenant l'impression que nous connaissons la plupart des gènes responsables des leucodystrophies hypomyélinisantes et démyélinisantes, limitées au sous-groupe des leucodystrophies mégalencéphaliques avec kystes sous-corticaux et à celui du syndrome CACH. En revanche, la plupart des nouveaux gènes restant à découvrir concernent les leucodystrophies mitochondriales, un sous-groupe des leucodystrophies démyélinisantes.

## Leucodystrophies de cause indéterminée Étude d'une cohorte de quatre-vingt patients par analyse d'exome

Dr Imen Dorboz — Association ELA, Paris, France

Dr Florence Renaldo — Centre de référence des leucodystrophies, Hôpital Robert-Debré, Paris, France



La technologie de l'exome permet de séquencer tous les exons du génome. L'exon constitue la partie du gène qui sert à la fabrication de protéines. Le génome humain contient environ 180 000 exons, qui représentent environ 1 % de la totalité du génome. Au total, 85 % des maladies monogéniques (maladies dues à la mutation d'un seul gène) touchent les exons.

Les leucodystrophies sont un groupe de maladies génétiques qui affectent la substance blanche et principalement son composant majeur, la myéline. La diversité des anomalies déterminées génétiquement explique la large hétérogénéité dans cette pathologie. Durant la dernière décennie nous avons rassemblé, en collaboration avec l'Europe et le réseau LeukoFrance, 1 182 familles avec des leucodystrophies de cause indéterminée. Malgré les avancées faites dans l'identification des gènes, 60 % de nos familles restent sans anomalies génétiques retrouvées. Nous avons réalisé un séquençage de l'exome dans un groupe de quatre-vingt patients avec des leucodystrophies de cause indéterminée. Cette analyse nous a permis de diviser notre cohorte en trois sous-groupes :

- le 1<sup>er</sup> groupe avec des mutations dans des gènes connus de leucodystrophies et avec un tableau clinique très atypique,
- un 2<sup>e</sup> groupe avec des mutations dans des gènes déjà impliqués dans une autre maladie génétique. Cependant, la mutation identifiée est différente de celle qui est répertoriée pour cette maladie,
- un 3<sup>e</sup> groupe avec des mutations dans des gènes potentiellement candidats. Toutes ces mutations n'ont pas été retrouvées chez les contrôles. Elles sont par ailleurs décrites comme délétères par les sites de prédictions. Cependant pour prouver que l'anomalie qui a été trouvée dans un gène est bien causale, il est indispensable de faire des analyses fonctionnelles.

### Utilisation du séquençage à haut débit ciblé pour le diagnostic des leucodystrophies indéterminées : une approche efficace ?

Claire Redin — Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

Pr Jean-Louis Mandel — Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France



La famille des leucodystrophies est un ensemble vaste et hétérogène de maladies monogéniques résultant d'anomalies primaires du processus de myélinisation dans le système nerveux central. À ce jour, des mutations dans presque cinquante gènes différents ont été reportées et identifiées comme à l'origine de différentes formes de leucodystrophies.

Dans certains cas, les données du patient (analyses IRM, traits cliniques, marqueurs biochimiques...) permettent d'orienter le clinicien vers un gène candidat, conduisant ainsi à un diagnostic pour environ 35 % d'entre eux. Cependant, des formes incomplètes ou atypiques peuvent rendre cette approche peu fructueuse. Cette hétérogénéité au niveau moléculaire limite considérablement les possibilités diagnostiques pour les patients et les familles, rendant la recherche de mutations dans ces cinquante gènes impossible en termes de coût et de temps avec les stratégies de séquençage dites "classiques" comme le séquençage Sanger.

Nous avons donc développé une approche de recherche moléculaire par séquençage à haut débit ciblé, qui permet de capturer et de séquencer simultanément tous les parties codantes de soixante-dix gènes impliqués dans des formes de leucodystrophies ou leucoencéphalopathies, et ce chez un grand nombre de patients en parallèle.

Sur un groupe de cent-vingt-deux patients avec des leucodystrophies indéterminées, nous avons pu identifier la mutation à l'origine de la maladie dans 17 % des cas (chez vingt-et-un patients au total). D'autres variants potentiellement causaux ont été identifiés chez dix autres patients, dont la nature pathogénique reste à confirmer.

Des mutations ont été retrouvées chez plusieurs patients étudiés dans les gènes suivants :

- *EIF2B2* et *EIF2B5* (syndrome CACH),
- *PLP1* (maladie de Pelizaeus-Merzbacher),
- *POLR3A* et *POLR3B* (leucodystrophies à polymérase III ou syndrome 4H),
- *RNASEH2B* (syndrome d'Aicardi-Goutières),
- *SLC16A2* (syndrome d'Allan-Herndon-Dudley)

Et chez un seul patient pour les gènes :

- *ABCD1* (adrénoleucodystrophie),
- *ALDH3A2* (syndrome de Sjogren-Larsson),
- *DARS2* (Leucoencéphalopathie avec implication du tronc cérébral et de la moelle avec élévation de lactate, ou syndrome LBSL),

- *GFAP* (maladie d'Alexander),
- *MLC1* (leucoencéphalopathie mégalencéphalique avec kystes sous-corticaux),
- *POMGNT1* (Dystrophie musculaire/ $\alpha$ -dystroglycanopathie).

Parmi les 83 % des patients restants sans diagnostic positif, on peut imaginer que les mutations se trouvent soit dans des gènes non encore identifiés, ou bien pour certains patients, les anomalies de la substance blanche détectées en IRM ne sont en réalité pas spécifiques d'une anomalie de la substance blanche primaire (donc d'une leucodystrophie), mais plutôt secondaire (d'une leucoencéphalopathie, de certaines formes d'épilepsie ou de déficience intellectuelle avec atteintes de la substance blanche...).

## Atelier Syndrome Aicardi-Goutières

### Le point sur la maladie

Dr Yanick Crow — Institut Imagine, Paris, France

Dr Adeline Vanderver — Centre Médical National des Enfants, Washington, D.C., USA



Le syndrome Aicardi-Goutières est une maladie génétique liée à une activation anormale du système immunitaire. Des preuves de plus en plus nombreuses semblent indiquer qu'une accumulation d'acide nucléique (ARN et ADN), sans doute dérivé d'anciens virus intégrés à nos propres cellules, provoquerait une réponse immunitaire orchestrée par l'interféron de type I.

Le syndrome Aicardi-Goutières est une maladie grave qui nécessite des traitements. La mise au point d'approches thérapeutiques efficaces sera favorisée par une meilleure connaissance de ses mécanismes. Suite à des études menées chez la souris malade avec une mutation du gène *Trex1*, et grâce aux connaissances nouvelles sur les protéines associées à la maladie, les stratégies présentant un intérêt immédiat incluent le blocage de l'interféron de type I et d'autres composants des voies de l'inflammation qui y sont associées, l'interruption de la fabrication de produits de "transcription inverse" et une diminution des globules blancs. Des traitements en lien avec ces différents problèmes existent déjà.

Le syndrome Aicardi-Goutières n'échappe pas aux difficultés de recrutement pour des essais cliniques contre placebo observées pour les maladies rares et leurs populations limitées. L'étude d'un groupe de malades comme population contrôle pourrait être utile dans le cadre d'un essai thérapeutique. C'est pourquoi il est actuellement crucial de prêter une attention particulière à l'histoire naturelle de cette pathologie.

De plus, les critères d'évaluation mesurant de l'efficacité de traitements doivent être définis. Les manifestations de ce syndrome - par exemple les observations radiologiques et les conséquences cliniques - sont souvent difficiles à mesurer de façon objective. Il convient donc d'établir la pertinence et la spécificité des marqueurs biologiques dans l'optique de ces futurs essais cliniques. De ce point de vue, nous nous intéressons particulièrement à une "signature interféron" détectée dans presque tous les cas de la maladie analysés à ce jour.

Un traitement sera très probablement bénéfique aux premiers stades de la maladie. Le diagnostic rapide de la maladie est donc d'une importance capitale. Toutefois, un traitement aura aussi probablement un rôle à jouer chez certains patients plus âgés vu les caractéristiques de la maladie et l'apparition de signes plus tardifs. Les incertitudes concernant l'adéquation d'un traitement pour cette maladie (quel que soit son type génétique) commenceront à se dissiper à mesure que notre compréhension de la fonction des protéines liées à cette maladie progressera.

## Lexique scientifique

- **Acide gras** : substance chimique formée d'une chaîne d'atomes de carbone, la plupart des acides gras du corps ont une longueur de seize à vingt atomes. On parle d'acide gras à longue chaîne pour une longueur de quatorze à vingt-deux carbones et à très longue chaîne ou AGTLC s'il y a plus de vingt-deux carbones.
- **Acide nucléique** : les acides nucléiques sont des molécules complexes et de très grande taille présentes dans les cellules. Il existe deux types d'acide nucléique dans nos cellules : acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN).
- **ADN** : acide désoxyribonucléique. C'est une longue chaîne (ou polymère) formée de quatre nucléotides (adénosine, cytosine, guanine et thymine). Elle forme le code génétique qui fait fabriquer des protéines à la cellule.
- **ARN** : acide ribonucléique. Il est produit à partir de l'ADN.
- **Allèle** : version d'un gène sur un chromosome. Chaque individu ne peut détenir que deux allèles d'un gène, un sur chaque chromosome, localisés dans la même région chromosomique.
- **Astrocyte** : cellule de forme étoilée du système nerveux central assurant le soutien de la structure du système nerveux et participant à la réparation des tissus nerveux.
- **Ataxie** : troubles de la coordination, maladrotes affectant l'équilibre et la marche, les mouvements des membres, des yeux et/ou l'élocution.
- **Axone/axonale** : prolongement long, mince et cylindrique d'un neurone qui conduit les impulsions électriques. Les nerfs sont constitués de faisceau d'axones.
- **Barrière hémato-encéphalique** : barrière qui isole partiellement le système nerveux central de la circulation sanguine pour protéger les cellules nerveuses d'influences externes.
- **Cellule gliale** : cellule assurant l'isolement des tissus nerveux, les fonctions métaboliques, le soutien et la protection vis-à-vis des corps étrangers en cas de lésions.
- **Cellule souche** : cellule pouvant donner des cellules spécialisées (différenciation) et pouvant se renouveler indéfiniment.
- **Cognitif** : faculté du cerveau à penser, à traiter et à emmagasiner de l'information afin de résoudre certains problèmes.
- **Démyélinisation** : se dit de ce qui détruit la gaine de myéline.
- **Dystonie** : trouble du tonus musculaire.
- **Electromyogramme** : enregistrement des potentiels d'action d'un muscle lors de la contraction musculaire.
- **Electrophysiologie** : étude des phénomènes électrochimiques qui se produisent dans les cellules des organismes vivants et, en particulier, dans les neurones et les fibres musculaires.
- **Enzyme/enzymatique** : molécule permettant des réactions chimiques biologiques, donnant un ou des produits à partir d'un ou de plusieurs éléments appelés substrats.
- **Exome** : partie du génome formée par les exons, c'est-à-dire les gènes exprimés pour synthétiser les produits fonctionnels de l'organisme sous forme de protéines.
- **Gastrostomie** : opération chirurgicale qui consiste à pratiquer une ouverture dans l'estomac reliée à un orifice (appelé stomie) pratiqué dans la peau au moyen d'une sonde ou d'un cathéter. Elle est proposée lorsqu'une alimentation par voie orale se révèle être insuffisante ou impossible.
- **Génome** : ensemble des gènes d'une cellule.
- **Hétérozygote** : personne ayant pour un gène un allèle normal et un allèle muté et

qui est donc conducteur. Une personne hétérozygote composite présente deux allèles mutés d'un gène à deux endroits différents dans le gène.

- **Histoire naturelle** : évolution spontanée de la maladie.
- **Hypomyélinisation** : défaut de myéline.
- **Immunosuppresseurs** : médicaments utilisés pour atténuer ou supprimer l'activité du système immunitaire. On les utilise pour prévenir le rejet de greffe.
- **Innocuité** : caractère de ce qui n'est pas toxique ou nocif.
- **Intrathécale** : injection directement dans la zone qui entoure la moelle épinière appelée l'espace intrathécal.
- **Leucoencéphalopathie** : désigne, de façon générale, toutes les atteintes de la substance blanche du cerveau.
- **Liposoluble** : se dit d'une substance soluble dans les graisses.
- **Liquide céphalorachidien** : liquide clair de couleur jaune, présent dans les ventricules cérébraux et la moelle épinière. Son examen est possible grâce à un prélèvement par ponction lombaire.
- **Lysosome** : structure spécialisée de la cellule contenant de nombreuses enzymes et ayant pour fonction la dégradation des nutriments.
- **Moelle épinière** : portion centrale du système nerveux chez les vertébrés, qui descend du cerveau à travers les arcs des vertèbres et distribue presque tous les nerfs aux divers organes du corps.
- **Monogénique** : maladie due à la mutation d'un seul gène.
- **Myéline** : enveloppe protectrice qui entoure la partie d'une cellule nerveuse (appelée axone) et permet la conduction des signaux électriques tout le long du nerf. La myéline agit comme un isolant électrique qui augmente l'efficacité de la conduction de l'influx nerveux.
- **Neuropathie périphérique** : maladie du nerf périphérique (bras, jambes). On parle de polyneuropathie lorsque différents nerfs périphériques sont atteints.
- **Nystagmus** : mouvements saccadés involontaires des yeux.
- **Oligodendrocyte** : cellule non nerveuse du système nerveux central fabriquant de la myéline.
- **Oligonucéotides** : courts segments d'acides nucléiques (ARN ou ADN).
- **Paraparésie** : désigne une paralysie légère des membres inférieurs.
- **Pathogène** : qui est à l'origine d'une maladie.
- **Peroxisome** : structure spécialisée de la cellule dépourvue de génome et chargée de la détoxification de la cellule.
- **Physiopathologie/physiopathologique** : étude du fonctionnement de l'organisme pendant la maladie.
- **Placebo** : produit inactif, dépourvu d'effet thérapeutique, mais ayant la même apparence que le produit actif.
- **Potentiels évoqués** : désigne le signal électrique produit par le système nerveux en réponse à une stimulation externe (son, lumière) ou interne (prise de décision, préparation motrice).
- **Randomisé** : se dit d'un essai clinique où la répartition des sujets entre les groupes est effectuée par tirage au sort afin de faire une étude objective et d'éliminer tout biais.
- **Récessif** : gène qui ne s'exprime pas par rapport au gène dominant, sauf si deux copies sont présentes dans le génome.
- **Spasticité/spastique** : augmentation de tonus de certains muscles, responsable d'une raideur et de contractures entraînant une restriction de la mobilité.
- **Stress oxydatif** : la production d'espèces réactives oxygénées se produit de façon normale dans l'organisme, mais elles sont éliminées grâce à un système complexe de détoxification dans les cellules. On parle de stress oxydatif lorsque survient une production élevée de ces composés qui ne peuvent être éliminés par les cellules, car le système naturel de détoxification est saturé. Différentes agressions peuvent alors avoir lieu, comme l'oxydation de protéines qui perdent leur fonction.
- **Substance blanche** : contient les axones. La couleur blanche est due à la gaine de myéline qui entoure ces fibres nerveuses.
- **Substance grise** : partie du système nerveux central composée essentiellement des corps cellulaires des neurones et de certaines cellules gliales. Elle a pour rôle de réceptionner les messages et d'analyser les informations afin d'élaborer les réponses.
- **Sulfatide** : constituant des membranes des neurones et des cellules gliales.
- **Système nerveux central** : le système nerveux central est la partie du système nerveux située dans la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Il se compose de tissu nerveux (neurones), glial et vasculaire. Il est entouré par les méninges.
- **Système nerveux périphérique** : partie du système nerveux formée de ganglions et de nerfs qui fait circuler l'information entre les organes et le système nerveux central, et réalise les commandes motrices de ce dernier.
- **Vecteur-médicament** : agent de transmission de l'information génétique d'une cellule à une autre ou d'un organisme à un autre.

# À chacun ses héros.



**Vous aussi vous pouvez devenir un héros en aidant les enfants malades.**

Lyna est atteinte d'une maladie génétique dégénérative du cerveau qui paralyse peu à peu toutes les fonctions vitales : une leucodystrophie. Mais elle est avant tout une petite fille qui se bat avec beaucoup de courage, et c'est ce qui force l'admiration de Frédéric Bouraly. Chaque semaine en France, entre trois et six enfants naissent avec cette maladie terrible. En faisant un don, vous ferez partie de la plus belle équipe du monde : celle qui veut gagner contre les leucodystrophies.

**Pour faire un don : [www.ela-asso.com](http://www.ela-asso.com)**

04 - 05 6724 - 54521 Dons, chèques • 007 55 494 574 ET à l'envoi



**L'espoir est là !**