

LES ASPECTS GÉNÉTIQUES DES AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES

SIFI K^(1,2), SIFI Y^(2,3), HANACHI S^(1,2), BENLATRECHE C^(1,2), ABADI N^(1,2).

1) Laboratoire de Biochimie du CHU de Constantine.

2) Laboratoire de Recherche de Biochimie et de Génétique Moléculaire de la Faculté de Médecine Université 3 de Constantine.

3) Service de Neurologie du CHU de Constantine.

RÉSUMÉ :

Les amyotrophies spinales proximales (Spinal Muscular Atrophy) ou SMA sont des affections neuromusculaires de transmission autosomique récessive, caractérisées par une dégénérescence progressive des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et souvent des noyaux moteurs du bulbe. Les différentes formes cliniques de la SMA sont associées à une sévérité très variable. Cette sévérité est corrélée au taux de la protéine SMN. Sur le plan moléculaire, les SMA sont liées dans 98 % des cas à une délétion homozygote des exons 7 et/ou 8 du gène SMN1 ou SMNT. Il n'est pas possible à l'heure actuelle d'établir une corrélation entre l'étendue des délétions dans le locus SMN et la sévérité clinique ou de prédire un phénotype plus ou moins grave selon que la mutation soit une délétion ou une conversion génique de SMN1 en SMN2. L'identification du gène et de la protéine de cette pathologie a été une avancée majeure dans la compréhension des bases moléculaires de la SMA et a considérablement amélioré le conseil génétique des familles SMA. Le déchiffrement des mécanismes fondamentaux régulant la transcription de SMN et la production de modèles animaux ont permis de découvrir plusieurs approches thérapeutiques susceptibles de diminuer la sévérité du phénotype SMA des patients telles que l'activation du promoteur de SMN2. C'est ainsi que l'augmentation de l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits et la stabilisation des protéines est actuellement en cours d'élaboration pour augmenter l'expression de SMN2.

Mots clés : SMA, SMN1, SMN2, Protéine SMN, Gènes modificateurs.

ABSTRACT : GENETIC ASPECTS OF PROXIMAL SPINAL AMYOTROPHIES.

The proximal spinal muscular atrophy are autosomal recessive neuromuscular disorders, characterized by the loss of motor neurons in the anterior horn of the spinal cord and often motor neurons of the bulb. The clinical forms of SMA are associated with a wide range of severity correlated with the rate of SMN protein. From the molecular point of view, SMA are linked, in 98 % of cases, with homozygous deletion of exons 7 and or 8 of the SMN1 gene or SMNT. It is not possible currently to establish a correlation between the extent of the deletions in the SMN locus and clinical severity or to predict a more or less severe phenotype according to the type of mutation : deletion or gene conversion SMN1 to SMN2. The identification of the disease gene and protein was a major advance in understanding the molecular basis of the SMA. This finding has greatly improved the genetic counseling of SMA families. The deciphering of basic transcription mechanisms regulating SMN and animal models have uncovered several therapeutic approaches that may reduce the severity of SMA such as promoter activation. The increased inclusion of exon 7 and protein stabilization are currently being developed to increase SMN2 expression.

Key words : SMA, SMN1, SMN2, SMN protein, Modifier genes.

INTRODUCTION

Les amyotrophies spinales proximales ou SMA pour Spinal Muscular Atrophy, dont l'incidence varie de 1/6000 à 1/10 000 naissances et la fréquence des hétérozygotes à environ 1 porteur sur 35 à 50 en fonction des différents groupes ethniques [1,2], sont des affections neuromusculaires de transmission autosomique récessive, caractérisées par une dégénérescence progressive des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière et souvent des motoneurons du bulbe [3,4] à l'origine d'une atrophie et d'une faiblesse musculaire des muscles proximaux. Cliniquement, ce sont des affections très hétérogènes.

Malgré les progrès de la génétique humaine, la classification des différentes formes de SMA repose encore essentiellement sur des critères physiologiques et cliniques. Selon l'âge de début et l'évolution de la maladie, on distingue classiquement quatre formes cliniques [5,6] : Le type I ou maladie de Werdnig-Hoffmann est la forme la plus fréquente et la plus sévère avec un âge de début entre 0 et 6 mois et un décès avant 2 ans, le type II ou forme de gravité intermédiaire [6-18 mois], le type III ou maladie de Kugelberg-Welander [> 18 mois] et le type IV ou forme de l'adulte [30-40 ans] [5,6] .

Sur le plan moléculaire, les SMA sont liées dans 98 % des cas à une délétion homozygote des exons 7 et/ou 8 du gène SMN1 ou SMN2 [7]. Il n'est pas possible à l'heure actuelle d'établir une corrélation entre l'étendue des délétions dans le locus Survival of Motor Neuron (SMN) et la sévérité clinique ou de prédire un phénotype plus ou moins grave selon que la mutation soit une délétion ou une conversion génique de SMN1 en SMN2 [7,8].

Le diagnostic moléculaire de l'amyotrophie spinale par analyse de l'ADN génomique des patients SMA a désormais remplacé les méthodes diagnostiques dites invasives, telles les biopsies musculaires. Il permet de confirmer la délétion à l'état homozygote d'au moins l'exon 7 du gène SMN.

A l'heure actuelle, le traitement de la SMA demeure essentiellement symptomatique. Cependant, au cours de ces dernières années, les efforts de compréhension de la régulation de l'épissage du gène SMN1 ont permis d'ouvrir plusieurs pistes thérapeutiques dont certaines ont débouché sur des essais cliniques en attendant la thérapie génique, espoir attendu par tout patient présentant une amyotrophie spinale.

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DU GÈNE SMN

En 1990, afin de localiser le gène responsable de la SMA sur une région chromosomique, la stratégie du clonage positionnel fut adoptée et a permis d'identifier la région chromosomique associée à cette maladie. En effet, le locus SMA fut localisé sur le bras long du chromosome 5 en q11.2-13.3 [9,10] (figure 1).

Il s'agit d'une région chromosomique très complexe et très instable qui contient des séquences répétées, des pseudogènes et des transposons. Une telle configuration de la région peut conférer une instabilité à l'origine de remaniements génomiques telles des délétions [11]. Par la suite, une autre étude a montré l'existence de délétions de la région 5q13 chez un nombre élevé de sujets atteints de la forme sévère de la maladie SMA [11].

En 1995, Lefebvre et al. [7] ont décrit le locus SMA comme une région chromosomique particulière constituée d'une duplication inversée ou en miroir d'environ 500 kb dont chaque élément contient 4 gènes : le gène SMN [7], le gène codant la protéine NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) [12], le gène codant la protéine p44, qui est une sous-unité du facteur de transcription TFIIF et enfin le gène H4F5, dont la fonction est inconnue [13].

Le gène SMN est dupliqué, comme les autres marqueurs de la région, mais l'analyse comparative des séquences exoniques et introniques ont permis de détecter cinq différences nucléotidiques entre les deux versions du gène et donc de reconnaître le gène centromérique du gène télomérique.

L'analyse génétique d'une grande série d'individus sains (n = 246) ou de parents de malades (n = 127) a montré que le gène télomérique (SMN1) était toujours présent et que 95 % des sujets possédaient aussi le gène centromérique (SMN2). Les plus petites délétions caractérisées chez les patients présentant une SMA ont permis d'identifier le gène SMN comme le gène dont la mutation entraîne la SMA [7].

Le gène SMN2 est présent chez tous les patients, alors qu'il est absent chez 5 % des individus non atteints [7] sans aucune conséquence clinique, ce qui indique qu'il n'est pas indispensable à la survie des motoneurons. C'est à partir de ces observations que le gène SMN1 a été reconnu comme le gène lié à la maladie [7].

STRUCTURE DU GÈNE SMN

Chez l'homme, il existe deux gènes codant la protéine SMN : SMN1 (OMIM #600354) et SMN2 (OMIM #601627). La duplication de ce gène est également observée chez les primates, cependant, la copie SMN2 est propre à l'homme. Par contre, chez toutes les autres espèces, un seul gène code la protéine SMN [14].

En 1995, Lefebvre et al. [7] ont déclaré que le gène SMN humain était constitué de 8 exons ; cependant, ce n'est qu'en 1996 que Burglen et al. [15] ont mieux caractérisé le gène SMN en 9 exons. Afin de ne pas confondre les données de mutation précédemment publiées, à cette époque, l'exon 2 a été dénommé par Burglen et al. exons 2a et 2b [15].

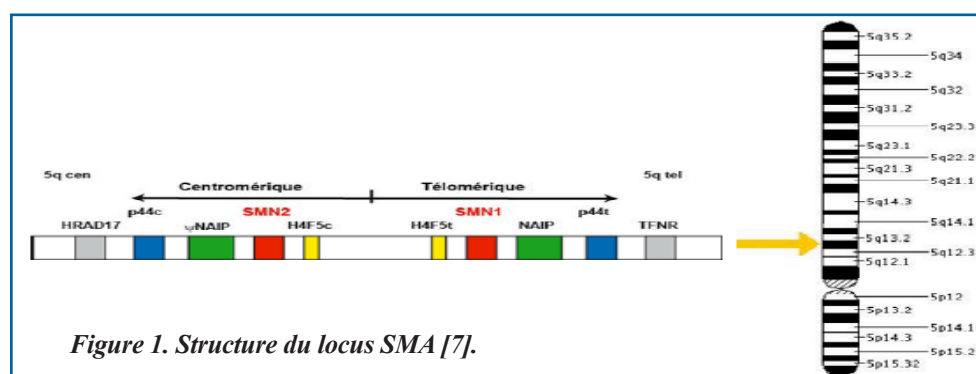


Figure 1. Structure du locus SMA [7].

Ce gène s'étend sur environ 27 kpb réparties en 9 exons, transcrit en un ARNm de 1,7 kb [15]. Son codon stop est situé après l'exon 7 et l'exon 8 est non codant.

Les neuf exons des copies à la fois télomérique et centromérique du gène ont été désignés historiquement comme l'exon 1, 2a, 2b et 3 à 8 (figure 2). Les deux gènes sont transcrits. L'analyse de leurs promoteurs a montré que ces éléments sont quasiment identiques tant au niveau de leur séquence qu'au niveau de leur activité [16].

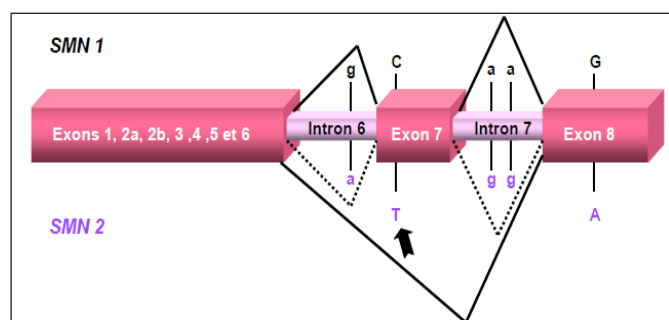


Figure 2. Structure génomique et différences d'épissage entre les gènes SMN1 et SMN2 [17].

Des événements de conversion génique ont touché les deux gènes, ce qui a conduit à une variation du nombre de copies de chaque gène.

Le gène SMN1 se distingue du gène SMN2 uniquement par 5 paires de bases, 1 dans l'intron 6, 1 dans l'exon 7, 2 dans l'intron 7 et 1 dans l'exon 8. Ces différences n'ont aucun effet sur la séquence en acides aminés de la protéine car elles sont silencieuses [7,15,17].

Les ARNm obtenus à partir de ces deux gènes sont identiques à l'exception de 2 nucléotides situés dans les exons 7 et 8. Plus précisément, une transition en position +6 de l'exon 7 est responsable de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène SMN2 (figure 2).

Quand le nucléotide est une cytosine (C) comme dans le gène SMN1, l'exon 7 est reconnu et inclus dans la protéine. S'il s'agit d'une thymine (T), comme dans le gène SMN2, l'exon 7 est exclus de la majorité des ARNm (figure 2).

L'analyse comparative des séquences de la région promotrice des gènes SMN1 et SMN2 a montré que ces derniers étaient régulés par des promoteurs ayant des séquences et des activités quasi-identiques [16], sauf pour le nombre de dinucléotides (CA) situé en position 2307 et correspondant au marqueur polymorphique C272 (D5F150S1 et S2) [11], qui était de 26 et 21 dans les gènes SMN1 et SMN2 analysés respectivement. Une région de 150 pb en amont du site d'initiation contient les séquences nécessaires pour une activité minimale du promoteur [18]. Plusieurs études ont conclu que le segment de 750 pb, s'étendant entre -450 et +300 pb par rapport au site d'initiation de la transcription, permettait l'activité transcriptionnelle maximale pour les gènes humains SMN1 et SMN2 [19]. Une TATA box a été aussi localisée dans la région promotrice à -249 pb à partir du site d'initiation de transcription [20].

Le promoteur de SMN contient aussi des sites de liaisons pour les protéines de la famille Sp, les facteurs de transcription c-Fos, c-Jun, CREB (c-AMP Response Element Binding protein) CREB : CRE-I (-443 [...]TGACGACA[...] -332) et CRE-II (+210 [...]TGACGACT[...] +283) (figure 3). Il s'avère que le site CRE-II est essentiel pour l'expression du gène SMN [21]. Une mutation sur ce site entraîne une diminution importante de l'activité du promoteur de SMN. Par ailleurs, il a été démontré que la surexpression de la protéine CREB augmenterait de 4 fois

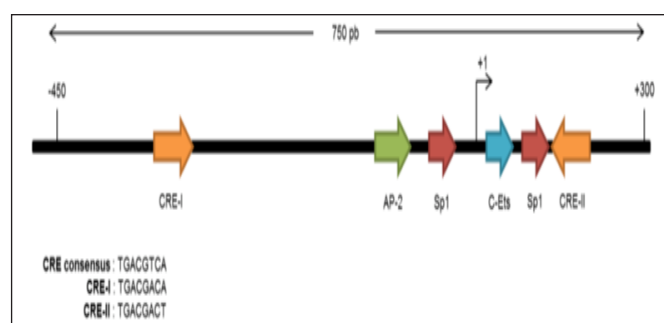


Figure 3. Diagramme schématisant la région comprise entre -450 et +300 du promoteur du gène SMN2 [21].

l'activité de ce promoteur suggérant que ces derniers pourraient participer à la régulation de l'expression du gène SMN. Toutes ces molécules sont capables de moduler l'activité du promoteur [21].

Des sites consensus de liaison pour AP-1 et CE (cAMP-responsive element) de l'AMPc ont été retrouvés au niveau des positions -21,-704, -21,-465 et -2741. Plusieurs sites de liaison consensus pour des facteurs de transcription impliqués ou associés à la différenciation et / ou la survie des cellules neuronales tel AP-2 (Activator protein 2) [22], E2F-1 [23], GATA-2, HNF-3 [24], N-Oct-3 [25] et YY1 [26] ont été aussi localisés dans cette région (figure 3). Il a également été noté la présence d'un élément de régulation du gène de l'interféron (IRE AAAAAG-GAAAGGA) [27] dans la région promotrice minimale de SMN, 65 nucléotides en amont du site d'initiation de transcription.

Les répétitions (CA) de la région promotrice ont la possibilité d'adopter *in vitro* une conformation d'ADN-Z conférant un effet régulateur sur la transcription génique [28]. En outre, selon certains auteurs, la différence dans la taille de la répétition (CA) de la région promotrice des gènes SMN1 et SMN2 peut être utilisée pour estimer le nombre de copies de ces gènes. Les analyses combinées de l'exon 7 de SMN et le marqueur C272 ont révélé une association entre le nombre de copies de SMNC et le phénotype SMA [7,15].

RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES GÈNES SMN1 ET SMN2

L'analyse des transcrits dérivés de SMN1 et de SMN2 a révélé la présence d'un épissage alternatif de l'exon 7 spécifique du gène SMNc. La transition d'un seul nucléotide dans l'exon 7 de SMN2 (c.840C> T p.Phe280Phe) par rapport à SMN1 provoque la formation d'une grande proportion d'ARN messagers sans exon 7 codant une protéine SMNΔ7 non fonctionnelle. Cependant, environ 10 % des ARNm de SMN2 sont normaux et peuvent être traduits en une protéine SMN de pleine longueur. Et c'est ainsi que SMN2 compense partiellement une délétion homozygote de SMN1 [15].

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer la modification du profil d'épissage du gène SMN2 par rapport au gène SMN1. D'une part, la substitution de la cytosine en thymine dans l'exon 7 crée un élément inhibiteur de l'épissage (exonic splicing silencer ou ESS) permettant la fixation d'un répresseur de l'épissage, hnRNP-A1 sur l'exon 7 du gène SMN2 induisant l'exclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN [29] (figure 4). Il a aussi été démontré récemment que cette substitution nucléotidique favorise la création d'un site de liaison de type TTTTA pour la protéine Sam68 qui en interagissant avec la partie C-terminale du facteur hnRNP-A1 déclencherait l'excision de l'exon 7 [30].

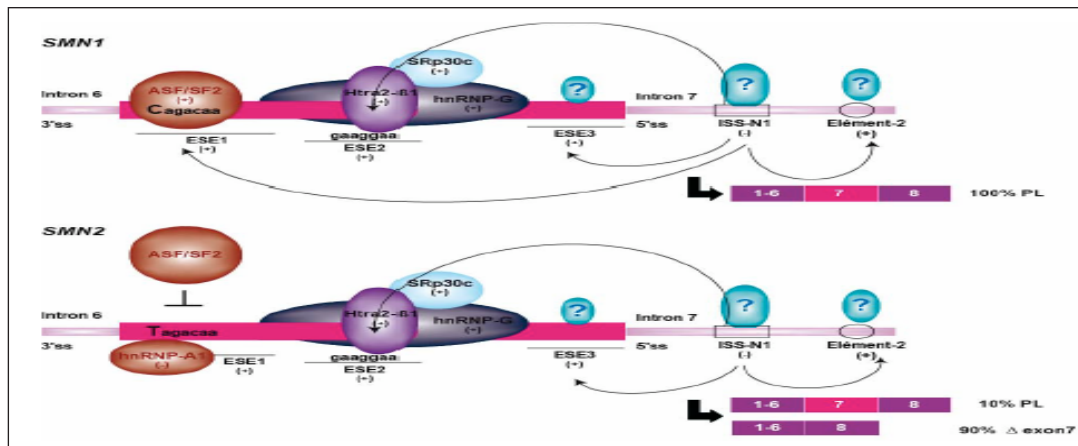


Figure 4. Régulation de l'épissage de SMN1 et SMN2 [17].

D'autre part, cette même substitution entraîne l'interruption d'un élément important de l'épissage. Il s'agit d'un ESE (Exonic Splicing Enhancer ou ESE) essentiel à l'inclusion de l'exon 7 dans l'ARN mature. D'habitude, ce site non muté interagit avec la protéine SR (SF2/ASF) un facteur activateur de l'épissage. L'ESE portant la variation n'est plus reconnu par cette protéine [31,32] (figure 4). De plus, cette transition dans l'exon 7 du gène SMN2 réduit d'un facteur deux la force du site 3' d'épissage sans jamais l'abolir. Néanmoins, cette modeste réduction ne peut pas à elle seule entraîner l'exclusion massive de l'exon 7 dans les transcrits issus du gène SMN2. Par ailleurs, dans la partie centrale de l'exon 7, un ESE riche en purine est reconnu par le facteur d'épissage SR Htra2-β1 et un certain nombre d'autres protéines d'épissage (SRp30c, hnRNP G, et RBM) (figure 4). Ces protéines ont un rôle dans l'inclusion de l'exon 7 et sont vraisemblablement responsables des 10 % de transcrits SMN2 correctement épissés. De plus, il a été démontré que la surexpression de Htra2-β1 restaure ce même niveau à près de 80 % [33]. Plusieurs études ont montré que les 6 premiers nucléotides de la partie 3' de l'exon 7 constituent également un site ESS. Cependant, aucun facteur d'épissage se liant à cet élément n'a été identifié pour le moment [34]. Les travaux réalisés par Chen et al. [35] ont montré que les modifications de pH intracellulaire pouvaient aussi moduler l'épissage de l'exon 7 du gène SMN2 dans les cellules de patients atteints de SMA, et qu'un pH bas augmenterait l'excision de l'exon 7 ainsi que l'expression de hnRNP A1 et Sam68, alors qu'un pH élevé permettrait l'inclusion de l'exon 7 [35].

Le transcrit tronqué, ne possédant pas l'exon 7, code une protéine amputée des 16 acides aminés de la partie C-terminale. Il est appelé SMNΔ7. Par ailleurs, il a été constaté, récemment, que les niveaux de la protéine SMN exerceraient un rétrocontrôle sur l'épissage de l'exon 7 dans les transcrits SMN. Ainsi, une faible expression de la protéine SMN induirait une diminution de l'inclusion de l'exon 7 [36].

RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE CHEZ LES PATIENTS PRÉSENTANT UNE SMA

Le phénotype SMA résulte probablement de 2 événements : une mutation du gène SMN1 et une déficience constitutive du gène SMN2 qui conduit à la production d'une quantité insuffisante de la forme intacte de la protéine SMN. La forme tronquée SMNΔ7 issue de ce gène étant produite de façon prédominante. Il existe une étroite corrélation inverse entre la sévérité clinique de la maladie et la quantité de protéine intacte

codée par SMN2 [37, 38].

Les ARNm complets sont donc presque exclusivement produits par le gène SMN1, alors que la forme prédominante codée par le gène SMN2 (90 % environ) est dépourvue de l'exon 7 [39]. L'ARNm tronqué SMNΔexon7 code une protéine raccourcie instable *in vivo*.

Plusieurs travaux ont montré l'existence d'un élément actif en cis dans la région régulatrice du promoteur [40,41] impliqué dans le contrôle de la transcription au cours de la différenciation cellulaire mais également au cours du développement [40]. Le site utilisé pour déclencher la transcription varie en fonction de l'origine fœtale ou adulte du tissu. La protéine SMN exprimée pendant la phase fœtale est codée en grande partie par le gène SMN1 qui est transcrit en un ARN plus long contenant l'exon 7. Ce qui explique pourquoi la SMA se manifeste si précocement chez les patients les plus sévèrement affectés. Les facteurs de transcription capables de se lier à la région promotrice de SMN1 ou SMN2 varient en nombre et en nature selon les types cellulaires considérés.

Parmi les éléments cis régulateurs de l'épissage, l'élément 1, localisé dans l'intron 6, paraît responsable de l'épissage de l'exon 7 de SMN. Lorsque cet élément 1 est muté, une hausse de l'inclusion de l'exon 7 est observée [41]. Le déchiffrement des mécanismes fondamentaux régulant la transcription de SMN pourrait conduire à la découverte de traitements susceptibles d'augmenter l'expression du gène SMN2 et de diminuer par conséquent la sévérité du phénotype SMA des patients atteints d'amyotrophie spinale progressive en tenant compte du type de mutation porté par SMN1.

LA PROTÉINE SMN

La protéine SMN est une protéine ubiquitaire de 294 acides aminés, ayant un poids moléculaire de 36 kD. Elle est composée de plusieurs domaines distincts : une région de liaison aux acides nucléiques codée par l'exon 2b [42], un domaine Tudor codé par l'exon 3 important pour l'interaction de la protéine SMN avec des protéines contenant des motifs riches en arginines-glycines (RG) [43], un domaine majeur d'oligomérisation de la protéine qui avec la région constituée par de multiples paires tyrosine-glycine [44], codée par l'exon 6, sont les régions les plus conservées de la protéine SMN [26] et une région riche en prolines polyproline codée par les exons 4 et 5 [7,45]. Les polypeptides qui possèdent ce domaine interviennent dans la polymérisation de l'actine ou sont des ligands des profilines [PFN] [41]. Le domaine polyproline de la protéine SMN normale interagit avec le site de liaison correspondant des PFN [46]. Il se pourrait que

l'oligomérisation de SMN serait nécessaire non seulement à l'expression de sa fonction mais aussi à son transport entre le cytoplasme et le noyau et qu'elle serait modulée par les PFN et plus particulièrement par la PFN II neuronale. Ce fait permettrait d'expliquer, au moins en partie, pourquoi le défaut d'une protéine ubiquitaire comme l'est SMN, provoque une dégénérescence spécifique des motoneurons alors que les autres cellules restent intactes, en cas de SMA.

La région C-terminale de SMN est la plus hautement conservée au cours de l'évolution, elle est requise pour son homo-oligomérisation [47]. Sa liaison efficace aux protéines Sm [48] et sa propre translocation dans le noyau [49] ont démontré qu'une protéine en doigt de zinc essentielle, appelé ZPR1, est également importante pour la localisation nucléaire de la protéine SMN.

De nombreuses études ont montré qu'il existe deux domaines indispensables pour l'homodimérisation de la protéine SMN : un mineur codé par l'exon 2 et un majeur codé par l'exon 6 [47,50]. Les mutations qui interrompent l'homodimérisation et la formation du complexe multimérique exposent les monomères mutants à la dégradation cellulaire [51].

La protéine SMN est présente à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules. Dans ce dernier, elle est localisée dans des structures particulières, appelées gems pour « *gemini of coiled bodies* » [48]. Il s'agit de structures nucléaires de 0,1 à 1 µm de diamètre. Ces gems semblent être étroitement associées aux coiled bodies (CB) ou corps spiralés nucléaires. La protéine SMN appartient à un complexe multiprotéique composé de SMN sous forme oligomérisée, de Gemin (Gemin 2 à Gemin 8), d'Unrip (Unr-interacting protein) [52,53] et de protéines Sm (RNA binding proteins). Le complexe SMN intervient dans l'assemblage des snRNP (small nuclear ribonucleoproteins) du spliceosome dans le cytoplasme. Il permet la liaison des protéines Sm aux snRNAs du spliceosome dans le cytoplasme. Les snRNP ainsi formés pourront subir une hyperméthylation de la coiffe et une maturation de l'extrémité 3' ensuite sont importés dans le noyau. Dans le noyau, les snRNP participent à l'épissage des ARN pré-messagers [14,54]. Zhang et al. [55] ont montré, dans des modèles murins, que le déficit en protéine SMN est responsable de défauts d'épissage de divers gènes et dans différents tissus tels que la moelle épinière, le cerveau et le rein, suggérant que la SMA est une maladie générale de l'épissage [55]. Par ailleurs, d'autres études ont suggéré un rôle spécifique de la protéine SMN dans les cellules neuronales. Des études, chez le zébrafish et chez des modèles murins de SMA, ont montré un rôle spécifique de la protéine SMN dans la croissance neuritique, la différenciation neuronale, la maturation des voies axonales et le développement de la jonction neuromusculaire [56]. Plusieurs isoformes de la protéine SMN sont produites suite aux épissages alternatifs de certains exons du gène SMN. La forme complète, issue du gène SMN1 est majoritaire. Le gène SMN1 code aussi pour l'isoforme axonale des motoneurons, appelée a-SMN, elle résulte de la rétention de l'intron 3 [57].

La forme SMN Δ 7 codée par le gène SMN2 est instable et incapable de se lier à d'autres protéines, ni de constituer des homodimères. Cette forme tronquée possède un signal de dégradation sur ces 15 derniers acides aminés [30,39].

Dans la SMA, les interactions entre SMN et les protéines Sm sont perturbées et peu fonctionnelles. En effet, ce sont les exons 6 et 7 du gène, où siègent la plupart des mutations retrouvées chez les patients atteints de SMA, qui codent les domaines de liaison de SMN aux protéines Sm. De plus, il a été constaté que la mobilité des snRNPs augmentait en absence de SMN, ce qui altère la formation du spliceosome et ses interactions avec ses

différents partenaires [58,59].

LES MUTATIONS DE SMN

La région chromosomique 5 q11.2-13.3 est d'une très grande instabilité et elle est propice à l'apparition de mutations surtout à type de délétions. L'importante fréquence de néo-mutations chez 2 % des patients atteints de SMA est secondaire à des crossing-over inégaux survenant entre unités répétitives au cours des méioses paternelles à l'origine de délétions et de duplications de tailles variables.

Une grande majorité (95-98 %) des patients SMA ont des délétions homozygotes des exons 7 et 8 de SMN1 [7] ou une conversion de SMN1 en SMN2 et les 2 % -5 % restants sont hétérozygotes composites pour une délétion de SMN1 ou une conversion de SMN1 en SMN2 et une mutation intragénique [7,60,61], avec une fréquence plus élevée dans le type I que dans des types II et III.

De nombreux travaux ont montré que les délétions emportant tout ou une grande partie du gène et même des gènes avoisinants sont plus fréquentes dans les formes sévères [62]. La plupart des mutations faux-sens sont localisées dans une région très conservée des exons 6 et 7. Il a été démontré que ces mutations réduisent la capacité d'oligomérisation de la protéine SMN [41,63].

Les mutations intragéniques de petite taille de SMN1 sont beaucoup moins fréquentes que des délétions complètes de SMN1 et les conversions géniques de SMN1 en SMN2 [64].

Plus de 40 mutations ont déjà été identifiées, parmi lesquelles des mutations non-sens et faux-sens, des décalages du cadre de lecture, des délétions, des inversions et des mutations dans un site d'épissage. La plupart des mutations faux-sens sont localisées dans une région très conservée des exons 6 et 7 (Y272C, T274I, G275S et G279C/V). Ces mutations perturbent les fonctions de la protéine SMN [42]. La mutation E134K est une autre mutation fréquemment retrouvée. Il semble qu'elle abolirait l'interaction de la protéine SMN avec certains de ses partenaires protéiques telles que les protéines Sm [42].

Ogino et Wilson [65,66] ont souligné la persistance du problème de la nomenclature des petites mutations intragéniques de SMN1, notant que les appellations publiées pour de nombreuses mutations étaient en contradiction avec les directives de la nomenclature standard [67,68]. A titre d'illustration de cette variance, il a été souligné que la mutation 439delGAAGT (600.354,0009), qui a été signalée comme 425del5 par Sossi et al. [69], l'a été comme aux 472del5 par Brahé et Bertini [70].

CORRÉLATIONS PHÉNOTYPE - GÉNOTYPE

Les différentes formes cliniques de la SMA sont associées à une sévérité très variable. Cette sévérité est corrélée au taux de la protéine SMN. C'est ainsi que les formes les plus sévères sont associées à des faibles taux de protéine [36]. En effet, les patients présentant une forme sévère ont un taux de protéine SMN compris entre 5 et 20 % par rapport à une population normale et pour environ 50 % des patients atteints de SMA de type II, ce taux est compris entre 30 et 80 %. Par ailleurs, ces réductions du niveau d'expression de la protéine SMN sont corrélées avec le nombre de copies de SMN2 et l'étendue des altérations des gènes NAIP et p44 [71].

LES GÈNES MODIFICATEURS DANS LA SMA

1. Le nombre de copies de SMN2

Le nombre de copies de SMN2 influence la sévérité du phéno-

type. Plus ce nombre est bas, plus le phénotype est sévère pour un individu présentant une délétion homozygote du gène SMN1. En effet, en raison de la nature instable de la région contenant le locus SMA, les patients qui présentent, majoritairement, une délétion du gène SMN1 peuvent porter un nombre variable de copies du gène SMN2 influençant la sévérité de la maladie [71]. Le nombre de copies de SMN2 dans le génome varie entre 0 et 8. De nombreuses études ont démontré une relation inverse entre le nombre de copies de SMN2 et la gravité de la maladie [7, 36, 72, 73].

Les patients présentant une forme modérée de SMA ont un nombre de copies SMN2 plus élevé que les patients ayant une forme grave de SMA.

Les patients atteints de SMA de type I et II (96 % et 94 % respectivement) présentent une délétion homozygote du gène SMN1 plus fréquemment que chez les patients atteints de SMA III (86 %). Alors que la majorité des patients SMA de type I sont porteurs de réelles délétions de SMN1, la majorité des patients de type SMA II et III présentent une absence du gène SMN1 à l'état homozygote en raison de la conversion de SMN1 en SMN2. Il y a donc augmentation du nombre de copies du gène SMN2 [71,74]. Les patients SMA de type II ont une délétion de SMN1 sur un chromosome et une conversion de SMN1 en SMN2 sur l'autre chromosome (trois copies de SMN2). Chez les patients de type III, il existe une conversion de SMN1 en SMN2 sur les deux chromosomes homologues (quatre copies). Cette conversion intéresse soit le gène entier, soit sur une partie de celui-ci. Dans ce dernier cas, des gènes SMN hybrides possèdent en général l'exon 7 du gène SMN2 et l'exon 8 du gène SMN1.

Une étude du nombre de copies de SMN1 et SMN2 exprimé par la population générale et par les patients atteints de SMA a prouvé qu'il peut y avoir conversion de SMN2 en SMN1 et que, dans la population générale, un haut nombre de copies de SMN1 est associé à un faible nombre de copies de SMN2 [75]. Alors que la relation inverse entre le nombre de copies de SMN2 et la gravité de la maladie est généralement vraie dans les SMA, quelques exemples d'exceptions à la règle ont été repérés dans certaines familles. Par exemple, certains patients présentant une SMA de type II et III possèdent seulement deux copies de SMN2 au lieu des prévisibles trois ou quatre copies. Le séquençage de SMN2 dans ces cas a révélé la présence d'une mutation rare (SMN2 c.859G>C) dans l'exon 7 [76,77].

2. La régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle est un autre mécanisme proposé pour expliquer les différentes sévérités observées chez les patients atteints de SMA. En effet, il a été démontré que les copies du gène SMN2 ne sont pas équivalentes d'un patient à l'autre du point de vue fonctionnel. En effet, les quantités de protéine complètes issues du gène SMN2 sont très variables [78]. Par exemple, la substitution de la base c.859G>C dans le gène SMN2 a été identifiée chez différents patients. Ce simple changement crée une nouvelle séquence ESE qui augmente le nombre de transcrits complets, diminuant ainsi la sévérité du phénotype [8,79].

Cette variante peut soit créer un site supplémentaire de liaison des protéines SF2 / ASF pour promouvoir l'inclusion de l'exon 7 [80] ou perturber un élément silencieux d'épissage dépendant de hnRNP A1.

De plus, les copies du gène SMN2 diffèrent d'un patient à l'autre par leur méthylation. Ainsi, les porteurs de groupements méthyles sur les îlots CpG -290 et -296 sont plus atteints par la maladie que les autres [80].

3. Le gène NAIP

Le gène NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) voisin de SMN, est également dupliqué en miroir, code pour une protéine intervenant [80] dans la différenciation et la survie des cellules [81]. En effet, la protéine NAIP protège les neurones de la mort induite par le calcium en interagissant avec l'hippocalcine et peut aussi inhiber directement les caspases 3 et 7 [82].

45-50 % des patients présentant une SMA de type I et 18 % des SMA de type II [80,83] présentent une délétion du gène NAIP. L'absence de la protéine NAIP entraîne la survenue précoce de la mort motoneuronale et contribue donc à l'augmentation de la sévérité clinique de la maladie [84].

Il a été rapporté que le nombre de copies du gène NAIP est corrélé avec la sévérité clinique de la SMA. Les patients SMA ayant un faible nombre de copies de NAIP ont des phénotypes plus sévères que les patients ayant un plus grand nombre de copies [85,86]. De plus, le nombre de copies de SMN2 et NAIP ont été associées à l'âge d'apparition de la maladie et au risque de décès et de survie des patients SMA [87] montrant par conséquent que le nombre de copies et la structure de SMN1, SMN2 et NAIP est important pour l'analyse du mécanisme moléculaire des SMA [88].

De nombreuses études ont cependant démontré que le gène NAIP est plus fréquemment muté chez les patients affectés par la SMA que dans la population générale, avec des délétions homozygotes dans 45-67 % des cas de SMA de type I et dans 20 à 42 % chez les patients de type II/SMA type III [89].

3.1. Le gène P44

Le gène P44 situé à proximité de la région critique SMA [10] est voisin du gène NAIP en position télomérique. Il code pour l'une des sous unités du complexe de transcription TFIIH [15]. Il est impliqué dans la transcription, le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN [90]. Le gène p44 pourrait être à l'origine dans les grands réarrangements génomiques présents chez les patients présentant une SMA de type I [91]. Des délétions homozygotes de P44 ont été observées chez des témoins. De plus, près de 27 % des patients atteints de forme sévère présentent des délétions de petite taille emportant uniquement le gène SMN, ou bien encore uniquement des mutations intragéniques. Ce qui suggère que les délétions de NAIP et de P44 seules ne sont pas impliquées dans la survenue d'une SMA, mais que leur association avec une mutation du gène SMN pourrait aggraver la maladie [91].

4. Le gène de la plastine 3 ou PLS3

En 2008, Oprea et al., [92] ont étudié six familles de SMA dans lesquelles était observée une variabilité phénotypique. Ces familles possédaient des femmes asymptomatiques porteuses d'une délétion homozygote du gène SMN1. Ces femmes étaient porteuses du même nombre de copies (3 ou 4 copies) du gène SMN2 que leurs frères ou sœurs malades. Cela suggère qu'il existe d'autres modificateurs de la sévérité de la maladie indépendants de SMN2. A partir d'analyses de transcriptomes, les auteurs ont mis en évidence, chez ces femmes, une surexpression du gène PLS3 en comparaison avec leurs apparentés malades.

Le gène PLS3 est localisé sur le chromosome X et code pour la plastine 3, une protéine se liant à l'actine impliquée dans la dynamique du cytosquelette. Elle joue un rôle important dans l'axonogenèse. L'équipe d'Oprea et al., a montré qu'une surexpression de PLS3 dans des modèles animaux (souris et zebrafish) corrigeait le défaut de croissance des axones associé à la dégénérescence des neurones moteurs dans la SMA [92].

Il est cependant possible que la propriété de modulation du phénotype par la PLS3 est âge et sexe-dépendante alternativement, la PLS3 ne peut pas en fait être un modificateur majeur du phénotype de la SMA. D'autres facteurs moléculaires modificateurs de gravité de la maladie dans la SMA indépendamment de SMN2 doivent exister. Il est important d'identifier et de caractériser ces nouveaux facteurs modificateurs pour le développement de nouveaux biomarqueurs de la SMA et des cibles pour le développement de stratégies thérapeutiques pour la SMA [93].

LE CONSEIL GÉNÉTIQUE DANS LE CADRE DE L'AMYOTROPHIE SPINALE

Le conseil génétique joue un rôle primordial pour prévenir la récurrence de la SMA dans la famille, dont le diagnostic préimplantatoire (DPI) reste la meilleure approche vu notre contexte socioculturel.

La SMA est une maladie grave avec une fréquence relative élevée de porteurs hétérozygotes dans la population, et un diagnostic génétique de cette maladie, un diagnostic prénatal et un conseil génétique sont disponibles [94].

Il est important de souligner qu'un diagnostic nosologique peut être posé rapidement, mais seule la confirmation génétique permettra de donner un conseil génétique fiable. Dans une affection autosomique récessive, chaque parent d'un enfant atteint est hétérozygote pour une anomalie du gène en cause. Pour un couple ayant un premier enfant atteint, le risque de récurrence est de 25 % à chaque grossesse [94].

Dans l'amyotrophie spinale, la fréquence d'hétérozygotie est estimée à 1/50 environ. Ceci justifie que l'on propose le conseil génétique pour les apparentés du couple et la fratrie d'un enfant atteint [95]. Lorsque la mutation est identifiée dans la famille, le conseil génétique est aisé et il est possible de rechercher la mutation chez les apparentés à risque.

Mais, dans certains cas, la mise en évidence de la mutation causale n'est pas toujours possible, avec les techniques actuelles. Dans ce cas, le conseil génétique est plus difficile. Il est possible, si la famille est informative, de réaliser des études indirectes, par l'analyse de microsatellites par exemple. Mais le risque de recombinaison, non négligeable dans cette région, rend cette méthode parfois peu fiable, en particulier si un diagnostic prénatal est envisagé.

Dans certains cas, il existe des populations où le risque d'être hétérozygote sera plus élevé. Une analyse génétique pourra alors être proposée au conjoint, soit pour une étude complète du gène ou alors, plus fréquemment, pour la recherche de certaines mutations spécifiques de la région d'origine [95].

Un conseil génétique doit être mis à la disposition de toute personne le demandant (ayant des antécédents de SMA ou porteur hétérozygote) [65]. Il est donc volontaire et nécessite un consentement éclairé. Il est important que tous les individus soumis à ce test comprennent que le porteur hétérozygote est un individu sain, qui n'a aucun risque de développer la maladie, mais plutôt de la transmettre à sa progéniture. Un couple hétérozygote pour la maladie doit être clairement informé sur les risques d'avoir un enfant malade suite à des grossesses actuelle ou future et sur la possibilité d'un diagnostic prénatal ou préimplantatoire.

Le conseil génétique doit également inclure les informations sur les limites du dépistage des porteurs hétérozygotes. Les couples doivent aussi comprendre que le test ne peut pas prédire la sévérité de la maladie (SMA type I ou de type II III) [95]. Une des délétions du gène SMN1 peut être apparue de novo chez l'enfant ce qui modifie le risque de récurrence, qui n'est plus celui d'une affection autosomique récessive classique.

Il peut exister une mutation ponctuelle dans le gène SMN1, qui sera à rechercher si le phénotype de l'enfant est évocateur, en l'absence de délétion à l'état homozygote.

Une duplication en cis du gène SMN1 : certaines personnes dans la population générale présentent sur un allèle une duplication du gène SMN1 qui peut masquer une délétion sur l'autre allèle [1,96]. Cette particularité est surtout importante lorsque des tests sont réalisés chez les apparentés asymptomatiques, qui peuvent se retrouver avec un résultat faussement rassurant. Certaines personnes portent une délétion homozygote du gène SMN1 et ont peu ou pas de signes de la maladie (indépendamment du nombre de copies SMN2) ceci pourrait être expliqué par le rôle des gènes modificateurs.

De ce fait, il est nécessaire d'être prudent dans le conseil génétique, même quand celui-ci semble simple, et de discuter avec le laboratoire effectuant l'analyse en cas de doute [95,96].

La transmission des délétions du gène SMN1 est autosomique récessive. Environ 2 % des cas sont dus à des mutations de novo [96]. Un conseil génétique doit être proposé aux patients et à leurs familles. Le diagnostic anténatal est possible par l'analyse moléculaire des prélèvements de choriocentèse ou d'amniocentèse.

LES MODÈLES ANIMAUX DANS LA SMA

1. Les modèles murins

Pour comprendre le rôle fonctionnel de SMN1 dans la SMA, la production de modèles murins a été entreprise car aucune mutation spontanée du gène SMN murin n'était disponible.

Plusieurs modèles murins de SMA ont été générés ces dix dernières années. Ainsi, des souris déficientes en Smn (Smn^{-/-}) ont été obtenues par recombinaison homologue [97]. L'embryon de ces souris se développe normalement au début mais présente, ensuite, des altérations morphologiques et des dégénérescences qui conduisent à la mort, indiquant que le gène SMN est essentiel au développement embryonnaire et à la survie chez la souris. Comme les souris invalidées pour le gène Smn ne peuvent pas être sauvées partiellement car le gène orthologue murin n'est pas dupliqué, il est devenu indispensable de construire des modèles transgéniques sophistiqués mimant la SMA.

Plusieurs stratégies ont permis de produire des modèles mimant le phénotype des patients atteints de SMA. Monani et al. [97] ont obtenu un modèle présentant des symptômes identiques à ceux des malades atteints de SMA de type I, par introduction du gène SMN2 humain entier dans des souris Smn^{-/-} [97]. Le gène SMN2 est donc capable de compenser le phénotype de létalité embryonnaire de ces souris. De plus, chez la souris, comme chez l'homme, une augmentation du nombre de copies du gène SMN2 diminue la sévérité de la maladie. Ainsi, l'introduction de 8 copies du gène SMN2 empêche le développement de la maladie [98].

Un autre modèle murin de SMA a été obtenu par délétion conditionnelle de l'exon 7 du gène SMN murin en utilisant le système de recombinaison Cre-loxP du bactériophage P1 [99]. Le gène de la recombinase Cre, exprimé sous le contrôle d'un promoteur spécifique des neurones, permet d'induire la délétion de l'exon 7 du gène SMN spécifiquement dans les neurones. Ces souris développent des déficits moteurs sévères, des tremblements et une paralysie après quelques semaines et meurent 3 à 5 semaines après leur naissance [99].

Le même système Cre-lox a aussi été utilisé pour cibler, spécifiquement, le muscle et les souris mutantes ont présenté une paralysie musculaire et une nécrose musculaire évoluant rapidement vers la mort [100].

2. La drosophile (*Drosophila melanogaster*)

Deux modèles de drosophile présentant des mutations ponctuelles différentes sont été générés (Smn73Ao et SmnB ou G202S et S201F respectivement) [101]. Ces mutations correspondent à des mutations identifiées dans le gène SMN1 de nombreux patients atteints de SMA (Y272C, T274I et G275S) à l'origine d'une anomalie dans la dimérisation de la protéine SMN. Les embryons qui ont présenté ces mutations ponctuelles ont survécu jusqu'au stade larvaire mais ont présenté des défauts de mobilité [101].

Un autre modèle de drosophile a été généré à partir de mutations hypomorphiques du gène SMN ayant entraîné des défauts dans le vol et une désorganisation neuromusculaire sévère [102].

3. Le poisson zèbre (*Danariorerio*)

In vivo, le poisson zèbre est un modèle exceptionnel d'observation du développement des motoneurones et des prolongements axonaux. Il a été utilisé afin de montrer le rôle de la protéine SMN dans le développement embryonnaire des motoneurones principalement par la technique d'ARN interférent basée sur l'emploi des morpholinos [103]. Cette méthode permet de diminuer le taux de protéine SMN au début du développement comme c'est le cas pour les patients atteints de SMA [103]. Cette diminution cause d'importants défauts dans la croissance des motoneurones. Par contre, la diminution du taux de protéine SMN ne semble avoir aucun effet sur les muscles, contrairement à ce qui a été observé chez la drosophile [104].

4. Les autres modèles

La levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) a été le premier modèle uni cellulaire utilisé chez les eucaryotes [105]. La levure *S.pombe* possède un gène SMN : ySMN essentiel à sa viabilité [106]. La surexpression de ySMN est délétère pour *S. pombe*, mais n'est pas létale et conduit à des retards de croissance contrairement à la surexpression de hSMN chez *S. pombe* qui est létale [106].

Caenorhabditis elegans est un modèle d'étude qui combine les avantages des organismes complexes (pluricellulaires) à des caractéristiques physiologiques qui en font un organisme particulièrement bien adapté à la neurobiologie. En effet, *C. elegans* possède un système nerveux simple avec moins de 100 motoneurones chez l'adulte [107]. Il possède également un gène SMN : CeSMN essentiel à la viabilité embryonnaire. L'extinction de CeSMN, par la technique d'ARN interférence, conduit à de nombreux défauts neuronaux, des mouvements non coordonnés et à la stérilité [108]. Sa surexpression conduit à la stérilité et à la létalité embryonnaire [108].

STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

Malgré les avancées thérapeutiques, les patients atteints de SMA ne bénéficient d'aucun traitement curatif permettant une guérison. Plusieurs stratégies, en cours d'étude, ont consisté à augmenter le taux de protéine SMN pleine longueur en testant des molécules candidates dans des cultures cellulaires. Par la suite, ces composés ont été testés sur des modèles animaux mimant la SMA visant l'activation de l'expression du gène SMN2, la modification de l'épissage des transcrits SMN2 par l'augmentation du taux d'inclusion de l'exon 7 dans le transcritSMN2 ou la stabilisation de la protéine SMN.

D'autres stratégies impliquent l'identification de molécules ayant un rôle protecteur des motoneurones présentant des taux faibles de protéine SMN tels le remplacement du gène SMN1 par thérapie génique et l'introduction de motoneurones

ou des cellules musculaires par l'emploi de cellules souches embryonnaires [109].

ACTIVATION DU GÈNE SMN2 PAR L'UTILISATION DES INHIBITEURS D'HISTONES DÉACÉTYLASES

Plusieurs études ont montré que des composés capables d'inhiber les histones déacétylases (HDAC), enzymes qui déacétylent et limitent la transcription des gènes [110,111], pouvaient augmenter la synthèse de la protéine SMN. Certains de ces inhibiteurs sont capables d'activer le promoteur du gène SMN2 par la modification du taux d'acétylation des histones de ce dernier [112,113].

Parmi ces composés, nous avons l'acide valproïque, le butyrate de sodium, le phénylbutyrate, le benzamide M344, la trichostatine et le SAHA (suberoyl anilidehydroxamic acid).

Ces études ont montré que ces composés sont capables d'augmenter le taux d'ARNm de la protéine SMN, dans des lignées dérivant de cellules de patients atteints de SMA, en activant le promoteur du gène et dans certains cas en favorisant l'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit du gène SMN2.

L'acide valproïque atténuerait la mort des motoneurones, augmenterait les fonctions motrices des souris SMA [114] ainsi que le niveau de la protéine SMN dans des cultures de fibroblastes de patients atteints de SMA [115]. Ce qui déclenche une atténuation de la perte des motoneurones et une correction partielle des fonctions motrices [114]. La trichostatine A est un inhibiteur des HDAC plus puissant et plus spécifique que les autres composés utilisés jusqu'alors [115]. L'acide valproïque (USA) [113] et le phénylbutyrate (Italie) en phase d'étude clinique chez l'homme ont montré une augmentation de la force musculaire chez les patients atteints de SMA de types III et IV. Le phénylbutyrate semble être bien tolérée par les patients mais n'a pas montré d'efficacité [113].

D'autres molécules, différentes des HDAC, auraient la capacité d'activer l'expression du gène SMN2. L'hydroxyurée augmente le taux d'expression du transcrit SMN2, de la protéine SMN et des Gems dans des cultures de cellules provenant de patients atteints de SMA. Cette augmentation varie en fonction de la concentration d'hydroxyurée et de la durée de traitement des cellules. Cependant, des essais thérapeutiques de phases II/III de l'hydroxyurée, randomisés, en double aveugle, contre placebo réalisés au Japon [115] et aux USA, n'ont pas mis en évidence les effets cliniques bénéfiques de ce médicament [115].

Deux composés : la quinazoline et l'indole augmenteraient également le taux de protéine SMN et le nombre de Gems dans des cellules provenant de patients atteints de SMA. De plus, il semble que les effets de ces deux molécules s'additionnent lorsqu'elles sont utilisées conjointement [116].

INCLUSION DE L'EXON 7 DANS LE TRANSCRIT ISSU DU GÈNE SMN2

Une augmentation du taux de protéines pleine longueur peut aussi être obtenue par l'utilisation de molécules entraînant l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN2. L'aclarubicine favoriserait l'inclusion de l'exon 7 dans l'ARNm de SMN dans des fibroblastes de patients présentant une SMA ou du modèle de souris SMA [117]. Cependant, la toxicité élevée de cette molécule ne permet pas de l'utiliser comme traitement.

Le salbutamol (albuterol) a permis une augmentation rapide et significative des transcrits SMN2 pleine longueur dans des fibroblastes de patients atteints de SMA, en favorisant l'inclusion de l'exon 7 [118]. Au cours d'un essai pilote, le salbutamol avait

déjà montré des effets bénéfiques chez des patients atteints de SMA sans causer trop d'effets indésirables [119], cette molécule pourrait donc être adaptée à un traitement clinique. D'autres composés présentent des effets similaires : le 5-(Nethyl-N-isopropyl)-amiloride (EIPA) [120] et certains polyphénols.

De nombreuses stratégies non pharmacologiques, utilisant des oligonucléotides et des oligoribonucléotides antisens, ont également été utilisées pour favoriser l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN2 : l'utilisation d'oligonucléotides antisens réduisant la reconnaissance du site 3' d'épissage de l'exon 8 augmente l'incorporation de l'exon 7 dans les transcrits SMN2 [121]. L'utilisation d'oligonucléotides antisens contenant des groupement 2'-O-methylphosphorotioate ou des petits ARN U7 modifiés portant des séquences anti-sens spécifiques à l'ARNm SMN2, dans des réactions d'épissage *in vitro* ou introduits dans des cellules en culture, bloquent l'accès à la jonction intron7-exon 8 ou dirigés contre des éléments silencieux d'épissage (ISS) [122] conduisent à une augmentation de l'inclusion de l'exon 7.

Des oligonucléotides antisens hybrides ont également été étudiés. Ces oligonucléotides, complémentaires à l'exon 7, contiennent des éléments reconnus par des facteurs activateurs de l'épissage de l'exon (ESE). Ils restaurent l'incorporation de l'exon 7 dans les transcrits SMN2 de fibroblastes de patients atteints de SMA.

Des oligonucléotides, complémentaires à l'exon 7, ont également été couplés à des effecteurs synthétiques mimant les fonctions des protéines SR, activatrices d'épissage. Ces molécules, nommées ESSENCE (Exon-Specific Splicing Enhancement by Chimeric Effectors), sont capables de stimuler l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits SMN2 au cours de réactions d'épissage *in vitro* et dans des fibroblastes de patients SMA [123].

L'épissage en trans est un processus naturel mais rare chez les mammifères. Il implique un épissage entre deux transcrits produits séparément. L'utilisation de ce procédé offre la possibilité de corriger une mutation dans l'ARN pré-messager et de produire un ARNm sauvage. En effet, un ARN en trans contenant une région antisens à l'ARN pré-messager, des sites d'épissage et les exons nécessaires à la réparation de l'ARN pré-messager permet, par remplacement des exons, l'élimination de la région mutée de l'ARN pré-messager défectueux et la production d'un ARNm sauvage. Cette technique permet l'épissage en trans du transcrit SMN2 dans des fibroblastes issus de patients grâce à des ARN produits à partir de vecteurs viraux dérivés des adénovirus [124].

STABILISATION DE LA PROTÉINE SMN ET AUGMENTATION DE SA TRADUCTION À PARTIR DU GÈNE SMN2

L'indoprofen est un composé qui permet l'augmentation de la production de la protéine SMN à partir du gène SMN2. Ce composé n'agirait pas au stade transcriptionnel mais augmenterait plutôt l'efficacité de la traduction des transcrits SMN2 [125].

Les aminoglycosides auraient également la capacité d'augmenter le taux de protéine SMN et de Gens dans des fibroblastes dérivés de patients atteints de SMA [126]. Ces composés seraient capables d'induire le franchissement des codons stop par les ribosomes et donc de permettre la synthèse d'une protéine entière. Malheureusement, l'indoprofen comme les aminoglycosides ont une faible capacité de pénétration dans le système nerveux central, les rendant pour l'instant inutilisables pour traiter des patients atteints de SMA.

NEUROPROTECTION

Pour protéger les motoneurones, des substances pharmacologiques ont été sélectionnées pour leur effet connu dans des maladies neuro-dégénératives ou à partir de criblages de molécules augmentant la survie des motoneurones en culture ou stabilisant la pathologie sur un modèle animal. Les trois substances neurotrophiques, le riluzole, le TRO19622 et la cardiotrophine-1 ont révélé un faible bénéfice sur la survie des souris et sur la protection de la jonction neuro-musculaire [127,128].

THÉRAPIE GÉNÉTIQUE ET REMPLACEMENT CELLULAIRE

En 2004, L'injection de vecteurs lentiviraux (virus EIAV) portant le gène SMN1 dans le muscle d'une souris SMA a permis d'obtenir une expression durable du transgène et de prolonger la survie de l'animal [129]. En 2010, un modèle murin mimant la SMA sévère a été sauvé en utilisant un vecteur viral adéno-associé auto-complémentaire, le sérotype 9 (scAAV9). Les souris traitées ont survécues environ 400 jours, comparativement à 16 jours pour les animaux non traités. De plus, le scAAV9 a entraîné une diminution de la bradycardie et la dilatation associée à une baisse de contractilité du cœur chez ces souris [130].

D'autres groupes ont reproduit cette approche en utilisant à la fois les sérotypes 8 et 9. Ces deux virus adéno-associés ont été construits pour apporter SMN1 aux 46 motoneurones [131, 132, 133]. Cependant, les injections faites chez les souris ont donné un effet maximal lorsqu'elles ont été réalisées le premier jour après la naissance puis cet effet a diminué rapidement avec l'âge. Les injections réalisées le cinquième jour n'ont donné qu'un effet partiel et celles réalisées le dixième ont donné aucun effet. Ceci implique que les thérapies géniques visant à augmenter l'expression de SMN chez les humains devront être coordonnées avec un dépistage clinique précoce.

La thérapie cellulaire pourrait être obtenue par la transplantation de cellules souches qui ont subi une maturation *in vitro* ou par l'activation des cellules souches endogènes du système nerveux central. Les greffes de moelle osseuse et la transplantation de cellules mésenchymateuses sont les seules thérapies cellulaires actuellement en usage. Des progrès significatifs ont été obtenus chez des souris mimant la SMA suite à une transplantation de cellules souches neurales primaires dérivées de la moelle épinière ou une transplantation de cellules souches embryonnaires dérivées de précurseurs neuronaux [134].

Le nombre de copies des gènes SMN1 et SMN2 peut moduler la sévérité de la SMA ainsi que celle d'autres maladies du motoneurone. Il est actuellement bien établi que le nombre de copies de SMN2 est inversement corrélé à la sévérité de la maladie chez SMA. En raison de cette relation, SMN2 est une cible primaire pour le développement de thérapies pour les SMA.

Toutes les approches, développées précédemment, ont porté sur l'activation du promoteur de SMN2, l'augmentation de l'inclusion de l'exon 7 et la stabilisation des protéines pour augmenter l'expression de SMN2 [93]. Cependant, il est actuellement difficile de savoir si l'augmentation de l'expression SMN1 ou de SMN2 serait bénéfique ou nuisible. D'une part, l'augmentation de l'expression de SMN fournit des bénéfices neuro-protecteurs à des cellules en culture et à des modèles de souris transgéniques présentant une sclérose latérale amyotrophique (SLA). D'autre part certaines études génétiques ont suggéré que la duplication des SMN1 augmente le risque de SLA sporadique. Des études futures sont nécessaires afin d'évaluer la relation entre le nombre de copies de SMN1 et SMN2, le risque et l'évolution de

la SLA, de l'atrophie musculaire progressive (PMA) ainsi que celle d'autres maladies affectant le motoneurone [93].

CONCLUSION

Les amyotrophies spinales sont d'une grande hétérogénéité clinique et pronostique. Le diagnostic de certitude repose sur la découverte d'une délétion du gène SMN1 dans 95 à 98 % des cas. Le conseil génétique joue un rôle primordial pour prévenir la récurrence de cette maladie dans la famille, dont le DPI reste la meilleure approche vu notre contexte socioculturel.

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif permettant de guérir l'amyotrophie spinale. La connaissance de la pathogénie de cette affection a permis de dégager des stratégies thérapeutiques rationnelles qui pourront être testées sur les modèles développés. Les recherches dans les domaines physiopathologique et thérapeutique sont très étroitement liées et très prometteuses.

RÉFÉRENCES

1. **Mc Andrew E, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR et al.** Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am. J. Hum. Genet.* 1997 ; 60 : 1411–1422.
2. **Hendrickson BC, Donohoe C, Akmaev VR, Sugarman EA, Labrousse P, Boguslavskiy L et al.** Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America. *J. Med. Genet.* 2009 ; 46 : 641–644.
3. **Crawford TO, Pardo CA.** The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* 1996 ; 3 : 97–110.
4. **Kolb SJ, Kissel JT.** Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin Nov.* 2015 ; 33, 4 : 831–46.
5. **Munsat TL, Davies KE.** International SMA consortium meeting. (26–28) June, Bonn, Germany. *Neuromuscul Disord.* 1992 ; 2 (5–6) : 423–428.
6. **Russman BS.** Spinal muscular atrophy : clinical classification and disease heterogeneity. *J. Child. Neurol.* 2007 ; 22 : 946–951.
7. **Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L et al.** Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene. *Cell.* 1995 ; 80 : 155–165.
8. **Burghes AHM, Beattie CE.** Spinal muscular atrophy : why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick ? *Nat.Rev. Neurosci.* 2009 ; 10 : 597–609.
9. **Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R et al.** Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2–13.3. *Nature.* 1990 ; 344 : 540–541.
10. **Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, Frezal J, Munnich A.** Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12–q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet.* 1990 ; 336 : 271–3.
11. **Melki J, Lefebvre S, Bürglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P et al.** De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science.* 1994 ; 264, 5164 : 1474–1477.
12. **Roy N, Mahadevan MS, Mc Lean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R et al.** The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell.* 1995 ; 80 : 167–178.
13. **Bürglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A et al.** The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am. J. Hum. Genet.* 1997 ; 60 : 72–79.
14. **Paushkin S, Gubitz AK, Massenet S, Dreyfuss G.** The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 ; 14, 3 : 305–312.
15. **Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J.** Structure and organization of the human survival motor neuron (SMN) gene. *Genomics.* 1996 ; 32, 3 : 479–482.
16. **Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J.** The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet.* 1999 ; 64 : 1365–1370.
17. **Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmüller H, Blick S, Baasner A et al.** Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum.Genet.* 2006 ; 119 : 422–428.
18. **Rouget R, Vigneault F, Codio C et al.** Characterization of the survival motor neuron (SMN) promoter provides evidence for complex combinatorial regulation in undifferentiated and differentiated P19 cells. *Biochem J.* 2005 ; 385 : 433–443.
19. **Monani UR, McPherson JD, Burghes AH.** Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta.* 1999 ; 1445, 3 : 330–336.
20. **Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, and Darnell J.** Regulation of transcription initiation. *Molecular cell biology*, 3d ed. Scientific American Books. W.H. Freeman and Co, New York. 1995 : 405–484.
21. **Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST.** Identification of a novel cyclic AMP response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor,neuron (SMN) gene. *J Biol Chem.* 2004 ; 279 : 14803–14811.
22. **Mitchell PJ, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PW, and Tjian R.** Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 1991 ; 5 : 105–119.
23. **Dupont E, Sansal I, Evrard C, and Rouget P.** Developmental pattern of expression of NPDC-1 and its interaction with E2F-1 suggest a role in the control of proliferation and differentiation of neural cells. *J Neurosci Res.* 1998 ; 51 : 257–267.
24. **Jacob A, Budhiraja S, Reichel RR.** Differential induction of HNF-3 transcription factors during neuronal differentiation. *Exp Cell Res.* 1997 ; 234 : 277–284.
25. **Schreiber E, Tobler A, Molipiero U, Schaffner W, Fontana A.** cDNA cloning of human N-Oct-3, a nervous system specific POU domain transcription factor binding to the octamer DNA motif. *NAR.*

1993 ; 21 : 253–258.

26. Zambrano, N, De Renzis, S, Minopoli, G, Faraonio, R, Donini, V, Scaloni, A, Cimino, F et al. DNA-binding protein Pur alpha and transcription factor YY1 function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter. *Biochem J.* 1997 ; 328 : 293–300.

27. Goodbourn S, Zinn K and Maniatis T. Human β -interferon gene expression is regulated by an inducible enhancer element. *Cell.* 1985 ; 41 : 509–520.

28. Tripathi, J and Brahmachari, SK. Distribution of simple repetitive (TG/CA) $_n$ and (CT/AG) $_n$ sequences in human and rodent genomes. *J Biomol Struct Dyn.* 1991 ; 9 : 387–397.

29. Kashima T, Rao N, Manley JL. An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 ; 104 : 3426–3431.

30. Pedrotti S, Bielli P, Paronetto MP, Ciccocanti F, Fimia GM, Stamm S, Manley JL, Sette C. The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. *EMBO J.* 2010 ; 29 : 1235–1247.

31. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ; 96 : 6307–6311.

32. Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet.* 2002 ; 30 : 377–384.

33. Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B. Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 ; 97 : 9618–9623.

34. Singh NN, Androphy EJ, Singh RN. An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 ; 315 : 381–388.

35. Chen YC, Yuo CY, Yang WK, Jong YJ, Lin HH, Chang YS, Chang JG. Extracellular pH change modulates the exon 7 splicing in SMN2 mRNA. *Mol Cell Neurosci.* 2008 ; 39 : 268–272.

36. Jodelka FM, Ebert AD, Duelli DM, Hastings ML. A feedback loop regulates splicing of the spinal muscular atrophy-modifying gene, SMN2. *Hum Mol Genet.* 2010 ; 19 : 4906–4917.

37. Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 1997 ; 6 : 1205–1214.

38. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munich A et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 1997 ; 16 : 265–269.

39. Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, Novelli G, Dallapiccola B. Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 ; 213 : 342–348.

40. Germain-Desprez D, Brun T, Rochette C, Semionov A, Rouget R, Simard LR. The SMN genes are subject to transcriptional

regulation during cellular differentiation. *Gene.* 2001 ; 279 : 109–117.

41. Miyajima H, Miyaso H, Okumura M et al. Identification of a cis-acting element for the regulation of SMN exon 7 splicing. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277 : 23271–23277.

42. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet.* 1998 ; 19 : 63–66.

43. Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE. Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene : a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism ? *Hum Mol Genet.* 1997 ; 6 : 497–500.

44. Buhler D, Raker V, Luhrmann R, Fischer U et al. Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly : implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 1999 ; 8 : 2351–2357.

45. Di Donato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR. Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene : homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* 1997 ; 7 : 339–352.

46. Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.* 8,340–345. doi : 10.1038/sj.embor.7400941 Pellizzoni, 2007.

47. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Thanh L, Burghes AH, Androphy EJ. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet.* 1998 ; 19 : 63–66.

48. Young PJ, Le TT, thi Man N, Burghes AH, Morris GE. The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res.* 2000 ; 256 : 365–374.

49. Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H. A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem.* 1999 ; 274 : 37908–37914.

50. Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2000 ; 9 : 849–858.

51. Gangwani L, Mikrut M, Theroux S, Sharma M, Davis RJ. Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat Cell Biol.* 2001 ; 3 : 376–383.

52. Chang HC, Hung WC, Chuang YJ, Jong YJ. Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem Int.* 2004 ; 45 : 1107–1112.

53. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 1996 ; 15 : 3555–3565.

54. Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L. Ribonucleoprotein assembly defects correlate with

spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One*. 2007 ; 2 : e 921, 2007.

55. Zhang H, Xing L, Singer RH, Bassell GJ. QNKE targeting motif for the SMN-Gemin multiprotein complex in neurons. *J Neurosci Res*. 2007 ; 85, 12 : 2657-2667.

56. Fan L, Simard LR. Survival motor neuron (SMN) protein : role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet*. 2002 ; 11 : 1605-1614.

57. Setola V, Terao M, Locatelli D, Bassanini S, Garattini E, Battaglia G. Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 ; 104 : 1959-1964.

58. Cho S, Dreyfuss GA. Created by SMN2 exon 7 skipping is a principal contributor to spinal muscular atrophy severity. *Genes Dev*. 2010 ; 24 : 438-442.

59. Clelland AK, Bales AB, Sleeman JE. Changes in intranuclear mobility of mature snRNPs provide a mechanism for splicing defects in spinal muscular atrophy. *J Cell Sci*. 2012 ; 125 : 2626-2637.

60. Thomas W, Barry S Russman. Spinal Muscular Atrophy. *GeneReviews* February 24 2000 ; Last Update : November 14 2013.

61. Wirth GHJ B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human Mutation*. 2000 ; 15 : 228– 237.

62. Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlf A M et al. Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy : clinical laboratory analysis of 72400 specimens. *Eur J Hum Genet*. 2012 ; 20 : 27–32.

63. Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Wienker T, Zerres K. Quantitative analysis of survival motor neuron copies : identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet*. 1999 ; 64 : 1340-1356.

64. Ping Fang, Liang Li, Jian Zeng, Wan-Jun Zhou, Wei-Qing Wu, Ze-Yan Zhong Ti-Zhen Yan et al. Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *Disorders*. 2015 ; 16 : 11.

65. Ogino S, Wilson RB. Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet*. 2002 ; 111 : 477-500.

66. Ogino S, Wilson RB, Gold B. New insights on the evolution of the SMN1 and SMN2 region : simulation and meta-analysis for allele and haplotype frequency calculations. *Eur J Hum Genet*. 2004 ; 12 : 1015-23.

67. Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Nomenclature Working Group. Hum. Mutat*. 1998 ; 11 : 1-3.

68. Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestion to describe complex mutations : a discussion. *Hum. Mutat*. 2000 ; 15 : 7-12. Note : Erratum : *Hum. Mutat*. 20 : 403 only, 2002.

69. Sossi V, Giuli A, Vitali T, Tiziano F, Mirabella M, Antonelli A,

Neri G, Brahe C et al. Premature termination mutations in exon 3 of the SMN1 gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype. *Eur J Hum Genet*. 2001 ; 9 : 113–120.

70. Brahe C, Bertini E. Spinal muscular atrophies : recent insights and impact on molecular diagnosis. *J Mol Med*. 1996 ; 74 : 555-562.

71. Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Krawczak M, Muller Myhsok B et al. De novo rearrangement found in 2 % of index patient with spinal muscular atrophy : mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am. J. Hum. Genet*. 1997 ; 61, 5 : 1102-1111.

72. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time Light Cycler PCR : fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet*. 2002 ; 70 : 358–368.

73. Gómez-Curet I, Robinson KG, Funanage VL, Crawford TO, Scavina M, Wang W. Robust quantification of the SMN gene copy number by real-time Taq Man PCR. *Neurogenetics*. 2007 ; 8 : 271–278.

74. Burghes AHM. When is a deletion not a deletion ? When it is converted. *Am. J. Hum. Genet*. 1997 ; 61 : 9–15.

75. Ogino S, Gao S, Leonard DG, Paessler M, Wilson RB. Inverse correlation between SMN1 and SMN2 copy numbers : evidence for gene conversion from SMN2 to SMN1. *Eur. J. Hum. Genet*. 2003 ; 11 : 275-277.

76. Bernal S, Alías L, Barceló MJ, Also-Rallo E, Martínez-Hernández R, Gámez J et al. Thec. 859G>C Variant in the SMN2 gene is Associated with Types II and III SMA and originates from a common ancestor. *J. Med. Genet*. 2010 ; 47 : 640-642.

77. Vezain M, Saukkonen AM, Goïna E, Touraine R, Manel V, Toutain A et al. A rare SMN2 variant in a previously unrecognized composite splicing regulatory element induces exon7 inclusion and reduces the clinical severity of spinal muscular atrophy. *Hum. Mutat*. 2010 ; 31 : E1110–E1125.

78. Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, Akutsu T, Takeshima Y, Wada H et al. Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy : three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J. Neurol*. 2002 ; 249 : 1211-1219.

79. Prior TW, Krainer AR, Hua Y, Swoboda KJ, Snyder PC, Bridgeman SJ et al. A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *Am. J. Hum. Genet*. 2009 ; 85 : 408–413.

80. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*. 1995 ; 80 : 167-178.

81. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*. 1996 ; 379 : 349-353.

82. Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, Fetni R, Johnston A, Davoodi J et al. The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci*. 2002 ; 22 : 2035-2043.

83. Thompson TG, Di Donato CJ, Simard LR, Ingraham SE, Bur-

- ghes AH, Crawford TO et al. A novel cDNA detects homozygous microdeletions in greater than 50 % of type I spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet.* 1995 ; 9 : 56-62.
84. Akutsu T, Nishio H, Sumino K, Takeshima Y, Tsuneishi S, Wada H et al. Molecular genetics of spinal muscular atrophy : contribution of the NAIP gene to clinical severity. *Kobe. J. Med. Sci.* 2002 ; 48 : 25-31.
85. Watihayati MS, Zabidi-Hussin AM, Tang TH, Matsuo M, Nishio H, Zilfalil BA. Deletion analyses of SMN1 and NAIP genes in Malaysian spinal muscular atrophy patients. *Pediatr. Int.* 2007 ; 49 : 4-11.
86. Omrani O, Bonyadi M, Barzgar M. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Iranian spinal muscular atrophy patients. *Pediatr. Int.* 2009 ; 51 : 193-6.
87. Qu YJ, Ge XS, Bai JL, Wang LW, Cao YY, Lu YY et al. Association of Copy Numbers of Survival Motor Neuron Gene 2 and Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Gene With the Natural History in a Chinese Spinal Muscular Atrophy Cohort. *J. Child. Neurol.* 2014.
88. Ping Fang, Liang Li, Jian Zeng, Wan-Jun Zhou, Wei-Qing Wu, Ze-Yan Zhong et al. Molecular characterization and copy number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese patients with spinal muscular atrophy and unrelated healthy controls. *Disorders.* 2015 ; 16 : 11.
89. Sifi Y, Sifi K, Boulefkhad A, Abadi N, Bouderdia Z, Cheriet R et al. Clinical and Genetic study of Algerian patients with spinal muscular atrophy. *Journal of Neurodegenerative Diseases.* 2013 : 7.
90. Matsuno M, Kose H, Okabe M, Hiromi Y. TFIIF controls developmentally-regulated cell cycle progression as a holocomplex. *Genes Cells.* 2007 ; 12 : 1289-1300.
91. Carter TA, Bonnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, De Fatima Bonaldo M et al. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum. Mol. Genet.* 1997 ; 6 : 229-236.
92. Oprea GE, Kroeber S, Mc Whorter ML, Rossoll W, Mueller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B. Platin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science.* 2008 ; 320 : 524-527.
93. Matthew ER. Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes : Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Rontiers in Molecular Biosciences.* March 2016 ; 3 : Article 7.
94. Whalen S, Jacqueline A, Héron D. Le conseil génétique dans les maladies neuromusculaires de l'enfant. Volume 17, numéro 1, Janvier-Février-Mars 2014.
95. Altman C. Heine Foundation Inc. for the Prevention of Spinal Muscular Atrophy. Available at : www.prevent.sma.org.
96. Thomas W. Carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genet Med.* Nov 2008 ; 10, 11 : 840-842.
97. Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2000 ; 9 : 333-339.
98. Somers E, Stencel Z, Wishart TM, Gillingwater TH, Parson SH. Density, calibre and ramification of muscle capillaries are altered in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2011.
99. Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacene E, Roblot N, Joshi V et al. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J. Cell. Biol.* 2001 ; 152 : 1107-1114.
100. Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C, Thomas N, Trulzsch B, Sattelle DB et al. Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum. Mol. Genet.* 2003 ; 12 : 1367-1376.
101. Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, Shpargel KB, Salz HK, Matera AG. A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J. Cell. Biol.* 2007 ; 176, 6 : 831-841.
102. Schmid A, DiDonato CJ. Animal models of spinal muscular atrophy. *J. Child. Neurol.* 2007 ; 22, 8 : 1004-1012.
103. Jablonka S, Wiese S, Sendtner M. Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J. Neurobiol.* 2004 ; 58, 2 : 272-286.
104. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR et al. *Smn*, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell. Biol.* 2003 ; 163 : 801-812.
105. Pushkin S, Gubitzi AK, Massenet S, Dreyfuss. The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002 ; 14, 3 : 305-12.
106. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* developmental. *Biology.* 1983 ; 100 : 64-119.
107. Miguel-Aliaga I, Culetto E, Walker DS, Baylis HA, Sattelle DB, Davies KE. The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.* 1999 ; 8 : 2133-2143.
108. Sumner CJ. Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. *J. Child. Neurol.* 2007 ; 22 : 979-989.
109. Allfrey VG. Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Can. Cancer. Conf.* 1966 ; 6 : 313-335.
110. Jenuwein T, Allis. Translating the histone code. *Science.* 2001 ; 293 : 1074-1080.
111. Kernochan LE, Russo ML, Woodling NS, Huynh TN, Avila AM, Fischbeck KH, Sumner CJ. The role of histone acetylation in SMN gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 2005 ; 14 : 1171-1182.
112. Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehrnubel FA, Raschke H, Blumcke I et al. Valproic acid increases the SMN2 protein level : a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2003 ; 12 : 2481-2489.
113. Mercuri E et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology.* 2007 ;

68 : 51-55.

114. Liang WC, Yuo CY, Chang JG, Chen YC, Chang YF, Wang HY et al. The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patients. *J. Neurol. Sci.* 2008 ; 268 : 87-94.

115. Jarecki J, Chen X, Bernardino A, Covert DD, Whitney M, Burghes A et al. Diverse smallmolecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening : early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2005 ; 14 : 2003-2018.

116. Thurmond J, Butchbach ME, Palomo M, Pease B, Rao M, Bedell L et al. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy. *J. Med. Chem.* 2008 ; 51 : 449-469.

117. Ting CH, Lin CW, Wen SL, Hsieh Li HM, Li H. Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy. *Hum. Molec. Genet.* 2007 ; 16 : 499-514.

118. Kinali M, Mercuri E, Main M, De Biasia F, Karatza A, Higgs R et al. Pilot trial of albuterol in spial muscular atrophy. *Neurology.* 2002 ; 59 : 609-610.

119. Yuo CY, Lin HH, Chang YS, Yang WK, Chang JG. 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride enhances SMN2 exon 7 inclusion and protein expression spinal muscular atrophy cells. *Ann. Neurol.* 2008 ; 63, 1 : 26-34.

120. Sakla MS, Lorson CL. Induction of full-length survival motor neuron by polyphenol botanical compounds. *Hum. Genet.* 2008 ; 122, 6 : 635-643.

121. Madocsai C, Lim SR, Geib T, Lam BJ, Hertel KJ. Correction of SMN2 Pre-mRNA splicing by antisense U7 small nuclear RNAs. *Mol. Ther.* 2005 ; 12, 6 : 1013-1022.

122. Miyajima H, Miyaso H, Okumura M, Kurisu J, Imaizumi K Identification of a cis-acting element for the regulation of SMN exon 7 splicing. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 277, 26 : 23271-23277.

123. Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF et al. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature.* 2011 ; 478 : 123-126.

124. Lunn MR, Root DE, Martino AM, Flaherty SP, Kelley BP, Covert DD et al. Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism. *Chem. Biol.* 2004 ; 11 : 1489-1493.

125. Wolstencroft EC, Mattis V, Bajer AA, Young PJ, Lorson CL. A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity : the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels. *Hum. Mol. Genet.* 2005 ; 14 : 1199-1210.

126. Haddad H, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Roblot N, Joshi V, Melki J. Riluzole. attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model. *Muscle Nerve.* 2003 ; 28 : 432-437.

127. Russman BS, Iannaccone ST, Samaha FJ. A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy. *Arch. Neurol.* 2003 ; 60, 11 : 1601-1603.

128. Azzouz M, Le TT, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC et al. Lentivector mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* 2004 ; 114, 12 : 1726-1731.

129. Bevan AK, Hutchinson KR, Foust KD, Braun L, Mc Govern VL, Schmelzer L et al. Early heart failure in the SMNDelta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery. *Hum. Mol. Genet.* 2010 ; 19 : 3895-3905.

130. Passini MA, Bu J, Roskelley EM, Richards AM, Sardi SP, O'Riordan CR et al. CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* 2010 ; 120 : 1253-1264.

131. Valori CF, Ning K, Wyles M, Mead RJ, Grierson AJ, Shaw PJ et al. Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci. Transl. Med.* 2010 ; 2 : 35ra42.

132. Dominguez E, Marais T, Chatauret N, Benkhelifa-Ziyyat S, Duque S, Ravassard P et al. Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescue SMA mice. *Hum. Mol. Genet.* 2011 ; 20 : 681-693.

133. Glascock J, Osman EY, Wetz MJ, Krogman MM, Shababi M, Lorson C. Decreasing disease severity in symptomatic Spinal Muscular Atrophy mice following scAAV9-SMN delivery. *Hum. Gene. Ther.* 2011.

134. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D et al. Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. *Brain.* 2010 ; 133 : 465-481.