

UNIVERSITE DE ROUEN
UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

2015

N°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2015

par

Yoann VIAL

Né le 1^{er} Juillet 1984 à Le Chesnay (78)

**Quantification de transcrit par PCR numérique :
application au dosage des transcrits *SMN* pleine longueur
dans le contexte de l'amyotrophie spinale proximale**

Président du Jury

Madame le Professeur Isabelle LEROUX-NICOLLET

Directeur de Thèse

Madame le Docteur Pascale SAUGIER-VEBER

Membres du Jury

Madame le Docteur Myriam VEZAIN

Monsieur le Professeur Jean-Christophe PLANTIER

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014 - 2015
U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno BACHY (<i>surnombre</i>)	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (<i>surnombre</i>)	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Guy BONMARCHAND (<i>surnombre</i>)	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr Jean-François CAILLARD (<i>surnombre</i>)	HCN	Médecine et santé au travail
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition

Mme Danièle DEHESDIN (<i>urnombre</i>)	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologie
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (<i>urnombre</i>)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Philippe GRISE (<i>urnombre</i>)	HCN	Urologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Xavier LE LOET	HCN	Rhumatologie
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mr Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie

Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Bruno MIHOUT (<i>surnombre</i>)	HCN	Neurologie
Mr Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Jean-Marc PERON (<i>surnombre</i>)	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
Mr Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mr Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie

Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie MARTINET	Immunologie
Mme Sandrine DAHOT	Bactériologie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Romy RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie
Mr François HALLOUARD	Galénique
Mme Caroline LAUGEL	Chimie organique
Mr Souleymane ABDOUL-AZIZE	Biochimie
Mme Maïté NIEPCERON	Microbiologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mr Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mr Alain **MERCIER** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (phar)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline GAILDRAT (phar)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (phar)	Chirurgie Expérimentale
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (phar)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ – Saint Julien Rouen

Remerciements

A Madame le Professeur Isabelle Leroux-Nicollet qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous adresse l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-Christophe Plantier qui me fait l'honneur de juger ce travail. Je vous adresse l'expression de ma profonde considération.

A Madame le Docteur Pascale Saugier-Weber qui me fait l'honneur de diriger cette thèse. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez consacré pour l'élaboration et l'écriture de cette thèse. Je vous remercie également pour tous les enseignements et conseils que vous m'avez prodigués durant l'ensemble de mes 3 semestres passés au laboratoire de Génétique Moléculaire. Je vous adresse l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Myriam Vezain qui me fait l'honneur de prendre part à ce jury et qui a encadré mon travail de thèse. Je te remercie pour ton aide, tes précieux conseils et ta gentillesse. Je t'adresse mes remerciements.

Aux patients et à leur famille.

A Monsieur le Professeur Thierry Frébourg, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Génétique Moléculaire et de l'unité Inserm U1079. Je vous adresse l'expression de mon profond respect.

A Madame le Docteur Shirin Vasseur, je te remercie de m'avoir accueilli sur la plateforme de PCR numérique et de m'avoir formé à cette technique.

A l'ensemble de l'unité INSERM U1079, en particulier Nathalie pour l'ensemble des commandes, le groupe ARN (Xana, Pascaline) pour vos précieux conseils et Aurélie pour m'avoir aidé dans la recherche des échantillons, je vous remercie.

A Madame le Docteur Géraldine Joly-Hélas, Monsieur le Docteur Pascal Chambon et Madame le Docteur Baert-Desurmont, je vous remercie pour votre gentillesse et pour tout ce que vous m'avez appris.

A l'ensemble des techniciens que j'ai pu rencontrer lors de mes semestres à l'IBC, en cytogénétique ou en génétique moléculaire, un grand merci à vous tous pour le temps que vous m'avez consacré. Vous avez grandement participé à ma formation de biologiste.

A l'ensemble des Médecins et Pharmaciens que j'ai croisé des bancs de la fac de Paris Descartes jusqu'au CHU de Rouen, je vous remercie pour les connaissances que vous m'avez apportées.

A l'ensemble des internes que j'ai pu croiser pendant mes années passées à Rouen, un grand merci : sans vous c'est sûr ça n'aurait pas été la même chose.

A mes amis,
A ma famille,
A mes parents,
A ma sœur,
A Prune,

Merci d'être à mes côtés.
J'ai beaucoup de chance.

L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.

Table des matières

1. INTRODUCTION	18
2. AMYOTROPHIE SPINALE PROXIMALE	19
2.1. GENERALITES	19
2.2. PRESENTATIONS CLINIQUES	21
2.3. BASES MOLECULAIRES	24
2.3.1. GENE <i>SMN1</i>	24
2.3.2. GENE <i>SMN2</i> , PRINCIPAL GENE MODIFICATEUR DE LA SMA	25
2.3.3. TRANSCRITS <i>SMN</i> ET EPISSAGE	27
2.3.4. PROTEINE SMN	30
2.3.5. AUTRES GENES MODIFICATEURS DE LA SMA	33
2.4. THERAPEUTIQUES EMERGENTES	33
2.4.1. TRAITEMENTS NON SPECIFIQUES	34
2.4.2. TRAITEMENTS SPECIFIQUES	35
3. QUANTIFICATION DE TRANSCRIT	38
3.1. TRANSCRIPTION INVERSE	38
3.2. PCR EN TEMPS REEL	38
3.3. QUANTIFICATION RELATIVE VERSUS QUANTIFICATION ABSOLUE	39
3.4. PCR NUMERIQUE	40
4. OBJECTIFS DE L'ETUDE	41
5. MATERIEL ET METHODE	42
5.1. CONSTITUTION DES GROUPES DE PATIENTS ET DE CONTROLES	42
5.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS	42
5.3. MODELISATION DES SONDAS ET DES AMORCES	43
5.4. PROTOCOLE	46
5.4.1. TRANSCRIPTION INVERSE	46
5.4.2. PCR NUMERIQUE	47
5.4.3. LECTURE DES PUCES	49
5.5. GAMME D'ETALONNAGE	51
5.6. ETUDES STATISTIQUES	51
6. RESULTATS	51
6.1. VALIDATION DE LA METHODE	51
6.1.1. PLAN EXPERIMENTAL	52
6.1.2. GAMME	53
6.1.3. COMPARAISON DES PCR NUMERIQUES EN SIMPLEX ET EN DUPLEX	55
6.1.4. REPRODUCTIBILITE	56
6.1.5. REPETABILITE	57
6.2. ECHANTILLONS	60

6.2.1.	RESULTATS BRUTS	60
6.2.2.	INTERPRETATION EN QUANTIFICATION ABSOLUE	62
6.2.3.	INTERPRETATION EN QUANTIFICATION RELATIVE	64
7.	DISCUSSION	65
8.	CONCLUSION	76

Liste des tableaux, figures et annexe

TABLEAUX

TABLEAU 1. CLASSIFICATION CLINIQUE DES AMYOTROPHIES SPINALES PROXIMALES.	21
TABLEAU 2. DISTRIBUTION DU NOMBRE DE COPIES DU GENE SMN2 CHEZ 375 PATIENTS ATTEINTS DE SMA.	26
TABLEAU 3. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES EN COURS DE DEVELOPPEMENT.	34
TABLEAU 4. DESCRIPTION DES GROUPES DE PATIENTS ET DE CONTROLES.	43
TABLEAU 5. DESCRIPTION DES SONDAS ET DES AMORCES.	45
TABLEAU 6. RESULTATS BRUTS DE LA GAMME.	54
TABLEAU 7. COMPARAISON DES PCR EN MULTIPLEX ET EN SIMPLEX.	55
TABLEAU 8. REPRODUCTIBILITE.	57
TABLEAU 9. REPETABILITE (<i>TBP</i>).	58
TABLEAU 10. REPETABILITE (<i>SMN</i>).	59
TABLEAU 11. REPETABILITE (<i>SMN/TBP</i>).	60
TABLEAU 12. RESULTATS OBTENUS DANS LE GROUPE DE PATIENT (GENOTYPE <i>OSMN1/4SMN2</i>).	61
TABLEAU 13. RESULTATS OBTENUS DANS LE GROUPE D'INDIVIDUS SAINS (GENOTYPE <i>1SMN1/OSMN2</i>).	61

FIGURES

FIGURE 1. ANOMALIES MORPHOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES CLES INDUITES PAR UN DEFICIT EN PROTEINE SMN.	20
FIGURE 2. CARTE GENETIQUE DU LOCUS 5q11q13.	25
FIGURE 3. REGULATION DE L'EPISSAGE PAR LES SEQUENCES SPECIFIQUES ESE, ESS, ISE ET ISS.	28
FIGURE 4. TRANSCRITS <i>SMN</i> ET EPISSAGE.	30
FIGURE 5. ROLE DE LA PROTEINE SMN DANS LA BIOGENESE DES SNRNP.	32
FIGURE 6. MODULATION DE L'EPISSAGE.	37
FIGURE 7. MODELISATION DES AMORCES.	44
FIGURE 8. RESULTATS DE LA RT-QMPSF.	46
FIGURE 9. DETAILS D'UNE PUCE DE PCR NUMERIQUE.	48
FIGURE 10. PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE TAQMAN®.	49
FIGURE 11. VISUALISATION GLOBALE DES PUCES.	50
FIGURE 12. REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA REPARTITION DES FLUORESCENCES.	50
FIGURE 13. SCHEMATISATION DU PLAN EXPERIMENTAL.	53
FIGURE 14. REGRESSION LINEAIRE DU LOG DE LA CONCENTRATION MESUREE EN FONCTION DU LOG DE LA CONCENTRATION THEORIQUE.	54
FIGURE 15. COMPARAISON DE MOYENNE MULTIPLEX VS SIMPLEX.	56
FIGURE 16. COMPARAISON DE MOYENNE DE LA CONCENTRATION EN TRANSCRIT <i>TBP</i> DANS CHACUN DES DEUX GROUPES <i>1SMN1/OSMN2</i> VS <i>OSMN1/4SMN2</i> .	62
FIGURE 17. COMPARAISON DE MOYENNE DE LA CONCENTRATION EN TRANSCRIT <i>SMN</i> DANS CHACUN DES DEUX GROUPES <i>1SMN1/OSMN2</i> VS <i>OSMN1/4SMN2</i> .	63
FIGURE 18. CORRELATION RINE VS CONCENTRATION EN TRANSCRIT <i>TBP</i> .	64
FIGURE 19. COMPARAISON DE MOYENNE DU RAPPORT DE LA CONCENTRATION EN TRANSCRIT <i>SMN/TBP</i> DANS CHACUN DES DEUX GROUPES <i>1SMN1/OSMN2</i> VS <i>OSMN1/4SMN2</i> .	65

FIGURE 20. SCHEMA DES TRANSCRITS <i>SMN1</i> ET <i>SMN2</i> PLEINE LONGUEUR.	71
FIGURE 21. ASSEMBLAGE DE LA PARTICULE RIBONUCLEOPROTEIQUE AU COURS DE LA VIE DE L'ARN.	73
ANNEXE	
ANNEXE 1. MODELE DE CONSENTEMENT ECRIT.	78

1. Introduction

L'amyotrophie spinale proximale (SMA) est une des maladies neuromusculaires les plus fréquentes. C'est une maladie génétique, de transmission autosomique récessive, qui se caractérise par une dégénérescence progressive des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière, à l'origine d'un déficit musculaire progressif. La sévérité de l'atteinte est variable, allant de formes graves débutant précocement dans l'enfance à des formes de début plus tardif et dont l'évolution est plus lente. Quatre types ont été définis (I à IV) en fonction de l'âge de début et de l'évolution de la maladie, le type I, correspondant aux formes les plus sévères et le type IV à la forme adulte.

L'amyotrophie spinale proximale résulte d'une inactivation homozygote du gène *SMN1* localisé en 5q11q13. Dans cette même région chromosomique se trouve un gène copie, le gène *SMN2*. Ce gène possède une forte homologie avec le gène *SMN1* mais n'est que partiellement fonctionnel. En effet, l'une des cinq variations nucléotidiques qui le différencie du gène *SMN1* a un effet sur l'expression du gène. Cette variation nucléotidique est responsable d'un épissage alternatif avec saut de l'exon 7 lors de la maturation de l'ARN entraînant la traduction d'une protéine tronquée dont la stabilité est diminuée et qui est rapidement dégradée. Bien que ce transcrite avec saut de l'exon 7 soit majoritaire, le gène *SMN2* code aussi pour un ARN messager pleine longueur incluant l'exon 7. Le nombre de copies du gène *SMN2* étant variable, plus il est important, plus la quantité de transcrite pleine longueur est élevée. Le nombre de copies du gène *SMN2* est donc inversement corrélé à la sévérité de la SMA.

Pour l'heure, il n'existe aucun traitement spécifique pour les patients atteints de SMA mais plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours. Parmi ces traitements en cours d'évaluation, nombre d'entre eux visent à augmenter la quantité de transcrite *SMN* pleine longueur issu du gène *SMN2*. Le développement de nouveaux traitements nécessite la mise au point de marqueurs biologiques permettant de suivre à court terme leur efficacité et de déterminer des objectifs thérapeutiques à atteindre. Pour répondre à ces problématiques, nous nous sommes intéressés à la quantification des transcrits *SMN* pleine longueur, issus des gènes *SMN1* et *SMN2*. Tout d'abord, nous avons développé, pour la première fois dans l'unité Inserm U1079, une méthode de quantification de transcrite par PCR numérique couplée à la transcription inverse. Cette méthode est plus

reproductible que les méthodes couramment utilisées pour la quantification de transcrit. De manière à déterminer un objectif thérapeutique dans le cadre des thérapeutiques visant à moduler l'expression du gène *SMN2*, nous nous sommes intéressés à la concentration minimale de transcrit *SMN* pleine longueur nécessaire pour ne pas développer la maladie. Nous avons constitué deux groupes d'individus en fonction de leur génotype. Le groupe « patients » correspond au génotype le plus fréquemment associé à la forme adulte de la SMA (type IV), génotype *0SMN1/4SMN2*. Le groupe « témoins » regroupe des individus n'ayant qu'une copie des gènes *SMN*, génotype *1SMN1/0SMN2*. Ces deux génotypes représentent les génotypes extrêmes pouvant être rencontrés chez les patients et dans la population générale. En particulier, cette étude est la première à s'intéresser aux individus de génotype *1SMN1/0SMN2*. La comparaison du taux de transcrit *SMN* pleine longueur dans chacun de ces deux groupes devrait nous permettre de déterminer précisément le seuil de concentration de transcrit *SMN* pleine longueur qui distingue la population atteinte de SMA de la population générale.

2. Amyotrophie spinale proximale

2.1. Généralités

L'amyotrophie spinale proximale (en anglais *Spinal Muscular Atrophy* ou SMA) est caractérisée par la dégénérescence des motoneurons alpha de la corne antérieure de la moelle épinière à l'origine d'un déficit progressif de la force musculaire et d'une amyotrophie, sans atteinte sensitive, ni cognitive, ni des voies longues (Figure 1) (Chabrol *et al.*, 2010).

La SMA est la maladie neuromusculaire de l'enfant la plus fréquente après la dystrophie musculaire de Duchenne. La SMA se transmet sur un mode autosomique récessif. Son incidence est estimée de 1/6 000 à 1/10 000 naissances. La fréquence des hétérozygotes dans la population générale est d'environ 1/40 à 1/60 (Ogino *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2010), avec des fréquences variables en fonction des différents groupes ethniques (Hendrickson *et al.*, 2009). L'amyotrophie spinale proximale a été décrite pour la première fois dans les années 1890 par Guido Werdnig et Johann Hoffmann (Werdnig, 1891; Werdnig, 1894; Hoffman, 1893 ; Hoffman, 1900). A quelques années d'intervalle, ces neurologues autrichien et allemand ont observé, chez plusieurs enfants de mêmes

fratries, une atteinte neurologique associant une hypotonie et une faiblesse musculaire progressives, débutant avant l'âge d'un an et entraînant un décès précoce dans l'enfance suite à des complications respiratoires.

Par la suite, le spectre clinique de la SMA a été étendu aux formes modérées de l'adulte (Kugelberg and Welander, 1956).

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, certaines ayant abouti sur des essais cliniques (Nurputra *et al.*, 2013).

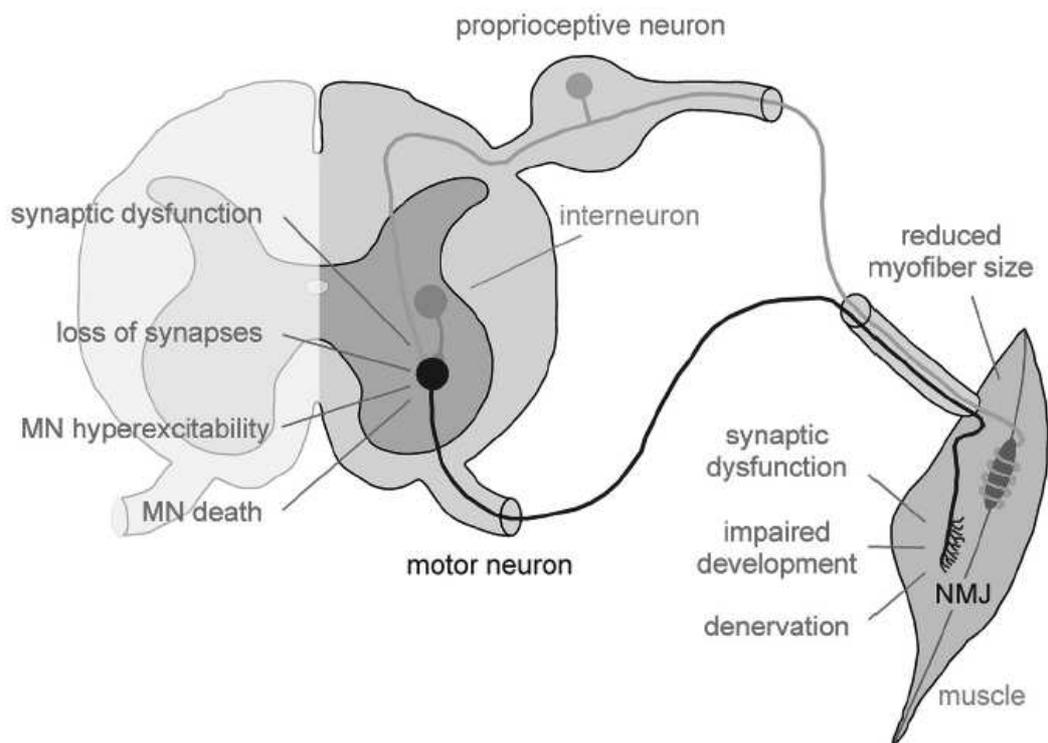


Figure 1. Anomalies morphologiques et fonctionnelles clés induites par un déficit en protéine SMN. Les motoneurones (bleu foncé) de la corne antérieure de la moelle épinière sont stimulés par les neurones proprioceptifs excitateurs (vert) et inhibés par les interneurones (bleu clair). Les motoneurones forment, avec le muscle, la jonction neuromusculaire. Ils stimulent ainsi leur contraction. Chez les patients atteints de SMA ces motoneurones sont défailants. (Tisdale and Pellizzoni, 2015)

2.2. Présentations cliniques

La SMA est classiquement divisée en quatre types en fonction de l'âge de début et de l'évolution de la maladie (Tableau 1). La première classification, établie au début des années 1990 par Munsat et Davis, était basée sur l'âge d'apparition des premiers signes de la maladie (Munsat and Davies, 1992). Une seconde classification, basée sur des critères fonctionnels, a été proposée par Wang *et al.* en 2007. Cette classification, plus objective, repose sur les dernières acquisitions motrices de l'enfant (Wang *et al.*, 2007). Le type I et le type II représentent les formes les plus fréquentes de SMA (Ogino *et al.*, 2004; Chabrol *et al.*, 2010).

Type de SMA	Age d'apparition des symptômes	Motricité du patient	Espérance de vie naturelle
Type I Maladie de Werdnig- Hoffman	0-6 mois	Incapable de s'asseoir	< 2 ans
Type II	7-18 mois	Incapable de se mettre debout	> 2 ans
Type III Maladie de Kugelberg- Welander	> 18 mois	Capable de se mettre debout et de marcher	Adulte
Type IV	2ème-3ème décade	Marche préservée	Adulte

Tableau 1. Classification clinique des amyotrophies spinales proximales. D'après (Wang *et al.*, 2007).

En réalité, la présentation clinique associée à la SMA est un continuum et il existe des chevauchements phénotypiques entre les différents types. La rapidité d'évolution et l'espérance de vie sont corrélées à l'âge de début : plus la maladie débute à un âge précoce, plus l'évolution est rapide et plus l'espérance de vie est réduite (Bertini *et al.*, 2005).

La SMA de type I ou Maladie de Werdnig-Hoffmann est caractérisée par une absence d'acquisition de la station assise. La maladie se manifeste avant l'âge de 6 mois, par une diminution de la force musculaire, initialement au niveau des racines et prédominant aux membres inférieurs.

Cette atteinte, à peu près symétrique, évolue vers une quadriparésie flasque. Les mouvements des extrémités sont longtemps préservés. L'examen met en évidence une abolition des réflexes ostéotendineux. Des fasciculations des mains et de la langue peuvent être observées. L'atteinte des muscles paraspinaux est à l'origine d'une hypotonie du tronc et d'une absence d'acquisition ou une perte précoce de la tenue de tête. L'atteinte des muscles intercostaux entraîne une insuffisance respiratoire progressive. La toux est inefficace. Le diaphragme étant préservé, une respiration abdominale paradoxale et une déformation du thorax en carène sont observées. Il peut exister une atteinte du tronc cérébral, principalement des paires crâniennes et du bulbe. L'atteinte des nerfs crâniens est à l'origine de troubles de la déglutition, de troubles de la succion, d'une faiblesse du cri. La motricité faciale et l'oculomotricité sont longtemps préservées. L'atteinte des centres bulbaires est à l'origine de troubles des fonctions respiratoire et cardiaque prenant souvent l'aspect de troubles dysautonomiques, pouvant aller jusqu'à la mort subite. Il n'y a pas de trouble sensitif, pas de trouble sphinctérien, et classiquement, pas d'atteinte des fonctions supérieures. L'évolution est marquée par une aggravation progressive. L'insuffisance respiratoire chronique, aggravée par les infections respiratoires et les fausses routes, entraîne un décès avant 2 ans, généralement avant 12 à 18 mois. Compte-tenu de la sévérité du pronostic et de l'absence de traitement curatif, la prise en charge de ces patients est essentiellement palliative (Bertini *et al.*, 2005; Chabrol *et al.*, 2010; D'Amico *et al.*, 2011).

La SMA de type II est définie par une absence d'acquisition de la marche. Le développement de l'enfant est normal au cours des premiers mois de vie, avec une acquisition possible de la station assise. La maladie débute entre 6 et 18 mois. Les premières manifestations peuvent être des difficultés à la station assise libérée, une absence d'acquisition de la station debout avec appui ou l'absence d'acquisition de la marche. Les réflexes ostéotendineux peuvent être initialement conservés mais disparaissent au cours de l'évolution. La motricité des membres supérieurs est initialement conservée. Il existe des fasciculations des mains et de la langue. Les fonctions cognitives sont habituellement très bonnes, avec une acquisition précoce du langage. L'évolution est marquée par une aggravation globale du déficit musculaire et par la survenue de complications orthopédiques (scoliose sévère, rétractions articulaires) et

respiratoires sévères (syndrome restrictif secondaire à l'atteinte des muscles intercostaux et abdominaux, difficultés à la toux secondaires à l'atteinte des muscles expirateurs et à une possible composante centrale par atteinte des centres bulbaires), des troubles de la déglutition, des difficultés de mastication, des troubles digestifs (dilatation gastrique aiguë, reflux gastro-oesophagien, constipation), des complications nutritionnelles et des troubles vasomoteurs. Avec une prise en charge intensive multidisciplinaire, la survie de ces enfants peut être prolongée jusqu'à l'âge adulte (Bertini *et al.*, 2005; Chabrol *et al.*, 2010; D'Amico *et al.*, 2011; Cuisset *et al.*, 2012).

La SMA de type III ou Maladie de Kugelberg-Welander débute après l'acquisition la marche par une présentation d'allure myopathique. Les premiers signes peuvent se manifester par une gêne à la marche dès son acquisition, ou plus tardivement par des difficultés pour courir ou monter les escaliers et des chutes, ou encore par une gêne lors d'épreuves sportives au cours de l'enfance. Le déficit et l'amyotrophie prédominent au niveau des racines et aux membres inférieurs. Les réflexes ostéotendineux sont conservés aux membres supérieurs. L'évolution peut être marquée par la survenue de complications orthopédiques (rétractions articulaires, scoliose) et respiratoires. La progression est plus lente que dans les types I et II. La sévérité est variable et le maintien de la marche à l'âge adulte est corrélé à l'âge de début de la maladie. Un meilleur pronostic est observé dans les formes débutant après l'âge de 3 ans. L'espérance de vie n'est pas significativement différente de celle la population générale (Bertini *et al.*, 2005; Chabrol *et al.*, 2010; D'Amico *et al.*, 2011).

La SMA de type IV débute au cours de la deuxième ou troisième décennie et se manifeste par une gêne motrice proximale. La marche est conservée à l'âge adulte, il n'y a pas d'atteinte respiratoire (Bertini *et al.*, 2005; Chabrol *et al.*, 2010; D'Amico *et al.*, 2011).

Le diagnostic, pour la SMA de types I et II, est généralement évoqué sur la présentation clinique et l'analyse moléculaire permet une confirmation rapide du diagnostic.

Pour les types III et IV, le recours à des examens neurophysiologiques est souvent nécessaire.

L'électromyogramme montre un tracé neurogène, avec des signes de dénervation. Les vitesses de conduction motrice et sensitive sont normales ou discrètement diminuées (Hausmanowa-Petrusewicz, 1988). Une présentation myopathique peut motiver la réalisation d'une biopsie musculaire. L'analyse histologique du muscle retrouve des fibres atrophiques, regroupées en îlots de fibres de même type («grouping») (Buchthal and Olsen, 1970).

Par extension du phénotype, il a également été défini un type 0, d'apparition prénatale, qui représente la forme la plus sévère de la maladie. Il se caractérise par une diminution des mouvements fœtaux au 3^{ème} trimestre de la grossesse et, à la naissance, un tableau neurologique correspondant aux stades terminaux de la SMA avec des rétractions articulaires, une atteinte bulbaire à l'origine de bradypnées et de malformations cardiaques. Le décès survient dans les 3 premiers mois de vie (Dubowitz, 1999; Grotto, 2013).

2.3. Bases moléculaires

Les présentations cliniques de la SMA sont très hétérogènes au regard de la sévérité et de l'évolution de la maladie. Il était difficile de concevoir qu'un seul défaut génétique puisse être à l'origine des différents types de SMA. Pourtant, en 1995, des mutations dans le gène *SMN1* (*Survival Motor Neuron 1*) ont été identifiées dans les 4 types de SMA (Lefebvre *et al.*, 1995).

2.3.1. Gène *SMN1*

Le locus impliqué dans les différentes formes de SMA a été localisé dans le même intervalle génétique en 5q11-q13 (Brzustowicz *et al.*, 1990; Melki *et al.*, 1990). Puis, en 1995, le gène *SMN1* a été identifié comme gène responsable de la SMA (Lefebvre *et al.*, 1995). Il siège dans une région qui s'est dupliquée au cours de l'évolution, générant deux éléments répétés inversés de 500 Kb qui impliquent au moins 4 gènes. Le gène *SMN1*, dans l'élément télomérique, responsable des amyotrophies spinales infantiles, a donc un gène copie, le gène *SMN2* dans l'élément centromérique (Figure 2). On retrouve une délétion à l'état homozygote du gène *SMN1* chez 95% des patients atteints de SMA. L'identification de mutations ponctuelles du gène *SMN1* chez les 5% des patients restants a permis d'impliquer de façon formelle le gène *SMN1* dans la SMA (Lefebvre *et al.*, 1995;

Wirth *et al.*, 1999). Les mutations intragéniques correspondent à des mutations ponctuelles, des micro- délétions/insertions, des petites duplications ou des mutations d'épissage (Cuscó *et al.*, 2006; Brichta *et al.*, 2008). Les délétions *de novo* du gène *SMN1* sont décrites dans 2% des cas (Wirth *et al.*, 1999).

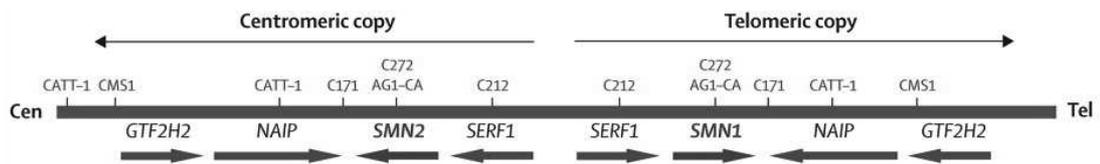


Figure 2. Carte génétique du locus 5q11q13. Élément inversé répété de 500kb (Lunn and Wang, 2008).

2.3.2. Gène *SMN2*, principal gène modificateur de la SMA

Les patients possèdent toujours au moins une copie du gène centromérique dupliqué, le gène *SMN2* (Feldkötter *et al.*, 2002). La duplication de la région 5q11.2-q13.3 étant un évènement récent dans l'évolution, les gènes *SMN1* et *SMN2* sont hautement homologues ; seuls 5 nucléotides différencient les deux séquences (Lefebvre *et al.*, 1995; Rochette *et al.*, 2001). L'une d'elles est localisée dans l'exon 7, elle est silencieuse sur le plan traductionnel et se situe au niveau de la sixième base de l'exon (c.840C dans *SMN1* et c.840T dans *SMN2*). Le gène *SMN1* produit uniquement un transcrit pleine longueur incluant l'exon 7 (FL) à l'origine d'une protéine SMN stable, tandis que le gène *SMN2* produit à la fois le transcrit pleine longueur incluant l'exon 7 mais en faible quantité (~20%) et plus abondamment le transcrit court sans exon 7 ($\Delta 7$, ~80%) (Lefebvre *et al.*, 1995; Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999; Helmken *et al.*, 2003). Le codon stop naturel étant localisé dans l'exon 7, l'isoforme tronquée utilise un codon stop situé dans l'exon 8, générant ainsi une protéine SMN $\Delta 7$ tronquée qui est instable et rapidement dégradée (Lorson *et al.*, 1999; Lorson and Androphy, 2000; Chang *et al.*, 2004; Vitte *et al.*, 2007). Ainsi, cette simple transition C>T ne permet pas au gène *SMN2* de compenser complètement l'absence de *SMN1*. En effet, plusieurs travaux ont montré que les taux d'ARNm SMN et de protéine SMN sont drastiquement réduits chez les patients atteints de

SMA de type I par rapport à un groupe contrôle (Coovert *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1997; Gavrillov *et al.*, 1998; Soler-Botija *et al.*, 2005).

Toutefois, la corrélation entre le nombre de copies du gène *SMN2* et la sévérité de la maladie n'est pas absolue. En effet, un même nombre de copies du gène *SMN2* peut être associé à plusieurs types de SMA et pour un type de SMA donné, le nombre de copies du gène *SMN2* n'est pas toujours identique. Feldkötter *et al.* ont analysé le nombre de copies du gène *SMN2* chez 375 patients atteints de SMA de différents types. Dans cette cohorte, 73% des patients atteints de SMA type I ont 2 copies du gène *SMN2*, 82% des patients atteints de SMA type II ont 3 copies du gène *SMN2* et, parmi les patients atteints de SMA type III, 51% ont 3 copies du gène *SMN2* et 46% ont 4 copies du gène *SMN2* (Feldkötter *et al.*, 2002)(Tableau 2). De plus, de rares cas de discordance phénotypique intrafamiliale ont été rapportés dans la SMA. Plusieurs observations ont rapporté des patients asymptomatiques porteurs d'une délétion homozygote du gène *SMN1* avec le même haplotype que leurs frères ou sœurs atteints (Hahnen *et al.*, 1995; Cobben *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996). Par la suite, d'autres auteurs ont rapporté, chez des membres d'une même fratrie atteints de SMA et donc porteurs d'un nombre identique de copies du gène *SMN2*, une évolution variable de la maladie. Ces différences intrafamiliales ont été observées pour des patients porteurs de 2, 3 ou 4 copies du gène *SMN2* et concernaient le plus souvent des frères et sœurs atteints de SMA de type III pour qui l'âge de début et l'évolution de la maladie était fortement variable au sein de la fratrie (Wirth *et al.*, 1999; Cuscó *et al.*, 2006; Petit *et al.*, 2011). Ces observations suggèrent l'existence d'autres facteurs modificateurs dans la SMA.

Type de SMA	Nombre de copies du gène <i>SMN2</i>			
	1	2	3	4
Type I	6,90%	73,40%	19,70%	0%
Type II	0%	10,90%	81,80%	7,30%
Type III	0%	3,90%	50,60%	45,50%

Tableau 2. Distribution du nombre de copies du gène *SMN2* chez 375 patients atteints de SMA. D'après (Feldkötter *et al.*, 2002).

2.3.3. Transcrits *SMN* et épissage

Une fois traduit, le pré-ARNm (pré-ARN messenger) subit une maturation médiée par le spliceosome, appelée épissage. Cette opération consiste à éliminer les introns et aboutit à la formation de l'ARNm (ARN messenger).

L'épissage de l'exon 7 des gènes *SMN* est soumis à une régulation complexe. D'une part, la contribution des éléments régulateurs d'épissage en son sein et dans son environnement immédiat est nécessaire à son épissage et, d'autre part, la variation en c.840 dans le gène *SMN2* altère cet équilibre instable (Singh, 2007).

Dans les cas classiques d'épissage alternatif, il a été montré que de courts éléments de séquence de l'ARN peuvent promouvoir l'inclusion de l'exon en se comportant comme des plates-formes de fixation pour des facteurs activateurs d'épissage. Localisés dans les exons, ces éléments riches en résidus purine sont définis comme des activateurs exoniques d'épissage ou ESE (*Exonic Splicing Enhancer*). La plupart des ESE sont reconnus par des protéines membres de la famille des protéines SR qui, une fois leur cible identifiée, vont favoriser le recrutement de la machinerie d'épissage au niveau de l'intron adjacent (Graveley, 2000). De tels éléments sont présents à la fois dans les exons épissés de manière alternative et dans les exons épissés de manière constitutive, ce qui suggère que les protéines SR se lient à des séquences retrouvées dans la grande majorité des exons. Ces mêmes éléments de séquence activateurs sont nommés ISE (*Intronic Splicing Enhancer*) lorsqu'ils sont retrouvés dans les introns. Néanmoins, la régulation de l'épissage des l'ARN pré-messagers est beaucoup plus complexe que le simple modèle de recrutement du spliceosome par les protéines SR fixées sur des ESE ou des ISE. En effet, il existe d'autres catégories d'éléments régulateurs qui ont un effet non pas activateur mais inhibiteur sur l'épissage. Ainsi, les éléments de séquence inhibiteurs sont des sites de fixation pour des répresseurs d'épissage et sont respectivement qualifiés d'ESS (*Exonic Splicing Silencer*) et d'ISS (*Intronic Splicing Silencer*) en fonction de leur localisation exonique ou intronique. Les ESS sont généralement décrits comme des motifs reconnus par des protéines de la famille hnRNP (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein*) et contribuent significativement à la régulation de l'épissage alternatif, en bloquant la fonction d'ESE ou d'ISE adjacents ou en recrutant des facteurs qui interfèrent avec l'assemblage du spliceosome sur des sites d'épissage proches (Figure 3).

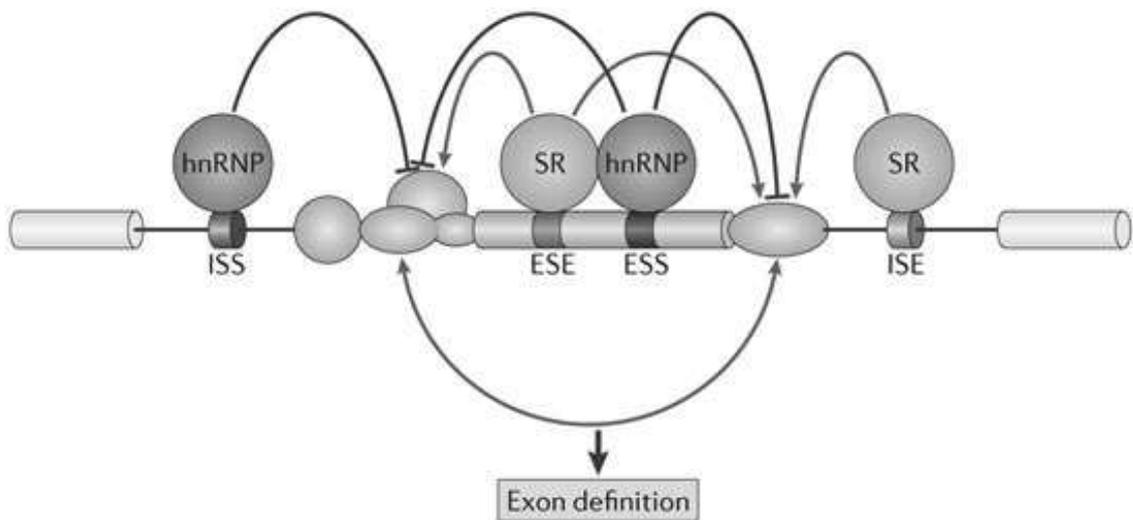


Figure 3. Régulation de l'épissage par les séquences spécifiques ESE, ESS, ISE et ISS. Les exons sont représenté en jaune, les composant du spliceosome en vert. Les séquences ESS et ISS, représentées en bleu inhibent l'action du spliceosome par l'intermédiaire des protéines hnRNP. Les séquences ESE et ISE, représentées en rouge activent l'action du spliceosome par l'intermédiaire des protéines SR (Kornbliht *et al.*, 2013).

Par exemple la transition c.840C>T présente à la sixième base de l'exon 7 du gène *SMN2* réduit d'un facteur deux la force du site 3' d'épissage (Lim and Hertel, 2001). Néanmoins, cette modeste réduction ne peut pas expliquer à elle seule l'exclusion massive de l'exon 7 dans les transcrits issus du gène *SMN2*. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette exclusion massive de l'exon 7. En 2002, deux équipes proposent deux modèles indépendants qui mettent en cause la modulation d'un élément exonique régulateur d'épissage au niveau de la position c.840C>T. L. Cartegni et A. Krainer proposent que la transition c.840C>T agisse par interruption d'un ESE essentiel à l'inclusion de l'exon 7 dans l'ARN mature. Le développement par cette équipe de l'algorithme ESEfinder, décrit pour ce motif ESE putatif un score élevé d'interaction avec la protéine SR SF2/ASF (Facteur activateur de l'épissage), alors que l'ESE portant la variation n'est plus reconnu par cette protéine (Figure 4).

Les résultats des tests d'épissage *in vitro*, de pontages UV site-spécifique, de déplétions, de transfections et de chromatographie d'affinité confirment ces prédictions (Cartegni and Krainer, 2002). La reconstruction de ce motif SF2/ASF-dépendant restaure l'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit issu du gène *SMN2* (Cartegni and Krainer, 2002). Ainsi, la

protéine SF2/ASF est décrite comme le principal déterminant de l'épissage de l'exon 7 (Cartegni *et al.*, 2006).

Dans un second modèle, T. Kashima et J. Manley suggèrent que l'exclusion de l'exon 7 du gène *SMN2* soit liée à la création d'un motif ESS par la transition c.840C>T. La région 5' de l'exon 7 contenant l'ESS est décrite comme une structure tige boucle inhibitrice (Singh *et al.*, 2004). Des expériences de pontage UV, de chromatographie d'affinité et de déplétions par ARN interférence ou oligonucléotides antisens mettent en évidence l'implication spécifique de la protéine hnRNP A1 sur le motif ESS (Kashima and Manley, 2003; Kashima *et al.*, 2007). L'interruption du motif ESS-hnRNP A1 putatif par des mutations ou par des méthodes d'extinction restaurent l'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit *SMN2*, mais n'altèrent pas l'épissage du transcrit issu du gène *SMN1* (Kashima and Manley, 2003). Les travaux effectués par cette équipe suggèrent que le recrutement de la protéine hnRNP A1 peut prévenir la formation et/ou la stabilisation du spliceosome nécessaire(s) à un épissage correct de cet exon. Même si ces modèles sont encore discutés à l'heure actuelle, il est possible qu'ils ne soient pas nécessairement mutuellement exclusifs mais plutôt coopératifs. En effet, plusieurs exemples de disparition d'une séquence activatrice au profit d'une séquence inhibitrice ont été décrits. L'exclusion de l'exon 7, observée lors de la maturation du pré-ARN issu du gène *SMN2*, pourrait donc résulter de l'effet conjugué de la perte d'une ESE et de la création d'une ESS ((pour revue : Black, 2003); Vezain, 2009; Singh *et al.*, 2015) (Figure 4).

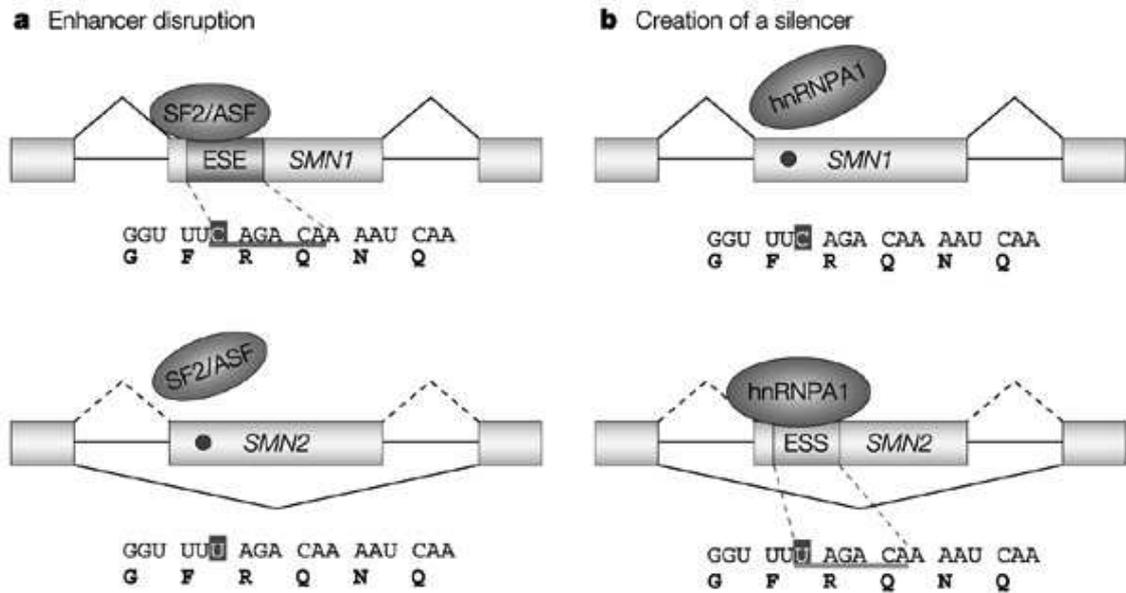


Figure 4. Transcrits *SMN* et épissage. En haut, l'épissage du gène *SMN1*. En bas, l'épissage du gène *SMN2*. a. Modèle de L. Cartegni et A. Krainer, disparition d'une ESE. b. Modèle de T. Kashima et J. Manley, création d'une ESS. (Pagani and Baralle, 2004)

Dans la SMA, le gène *SMN2*, responsable de la production d'un faible taux de protéine SMN fonctionnelle, ne compense que partiellement l'absence du gène *SMN1*. Plus le nombre de copies du gène *SMN2* est élevé, plus la production de protéine SMN fonctionnelle est importante et plus la sévérité du phénotype est atténuée. Ainsi, la sévérité de la présentation clinique dans la SMA est inversement corrélée au nombre de copies du gène *SMN2*.

2.3.4. Protéine SMN

Le gène *SMN1* code pour la protéine SMN (*Survival Motor Neuron*). L'insuffisance de production de protéine SMN fonctionnelle est à l'origine de la SMA. La sévérité de la maladie est corrélée au taux de protéine SMN, les formes les plus sévères étant associées à des faibles taux de protéine (Lefebvre *et al.*, 1997).

La protéine SMN est exprimée de manière ubiquitaire, dans les cellules neuronales et non neuronales. Elle est présente dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Dans le noyau, la protéine SMN est localisée au sein de structures nucléaires particulières appelées Gems pour *gemini of coiled bodies*. Les Gems semblent être étroitement associés aux corps de Cajal (ou *coiled bodies*). Les corps de Cajal contiennent un niveau élevé de *small nuclear*

RiboNucleoProteins (snRNP) qui jouent un rôle clé dans le mécanisme de l'épissage (Liu and Dreyfuss, 1996).

La protéine SMN appartient à un complexe multiprotéique composé de SMN sous forme oligomérisée, de Gemines, d'Unrip (*Unr-interacting protein*) et de protéines Sm (*RNA binding proteins*). Le complexe SMN intervient dans l'assemblage des snRNP du spliceosome dans le cytoplasme. Le complexe SMN permet la liaison des protéines Sm aux snRNAs. Les snRNP ainsi formés pourront subir une hyperméthylation de la coiffe et une maturation de l'extrémité 3' et être importés dans le noyau (Figure 5). Dans le noyau, les snRNP participent à l'épissage des ARN pré-messagers (Paushkin *et al.*, 2002; Pellizzoni *et al.*, 2002; Gabanella *et al.*, 2007). Zhang *et al.* ont montré, chez 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 (Zhang *et al.*, 2008). Il est intéressant de souligner que, chez un patient atteint d'une forme sévère de SMA, a été observé un effondrement du complexe mineur tri-snRNPs U4atac/U6atac/U5, associé à des anomalies d'épissage de certains introns, démontrant un lien entre le déficit en protéine SMN et les altérations d'épissage (Boulisfane *et al.*, 2011). A ce jour, aucun lien causal n'a pu être établi entre les anomalies d'épissage et la pathogenèse de la SMA, en particulier l'atteinte spécifique du motoneurone.

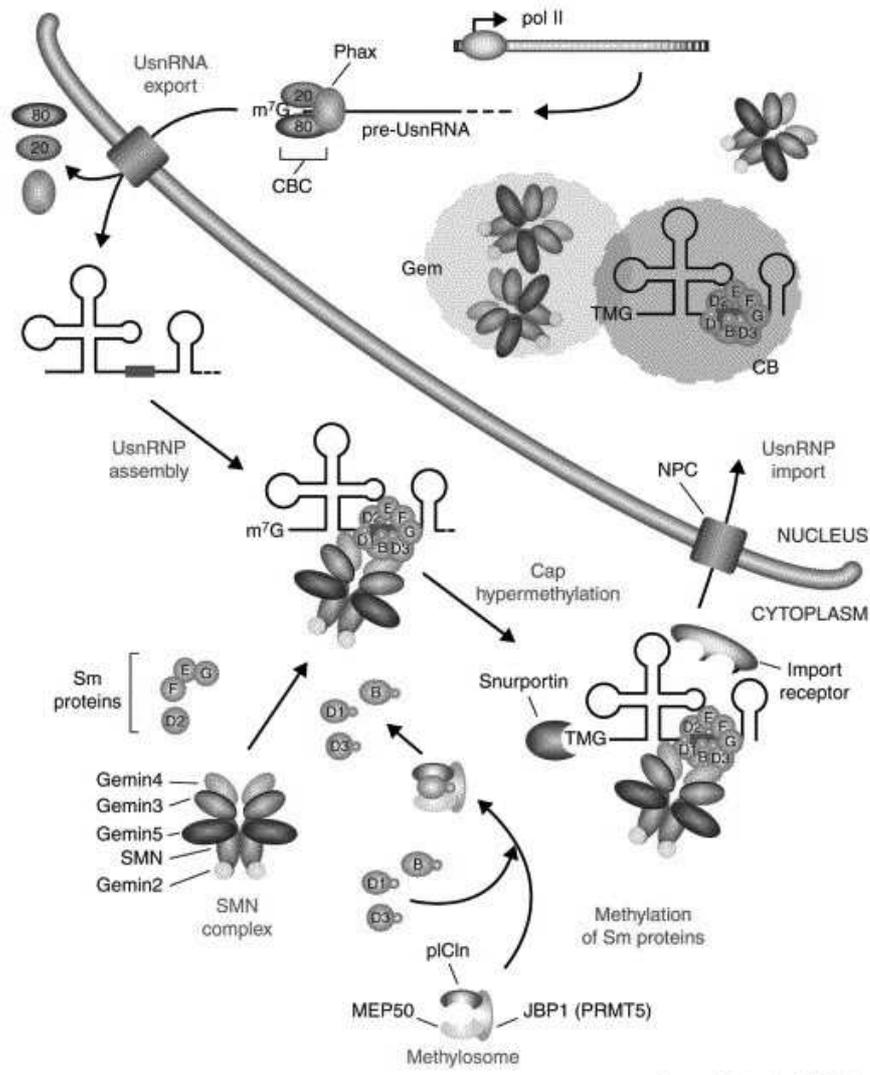


Figure 5. Rôle de la protéine SMN dans la biogénèse des snRNP. snRNA : *small nuclear RNA*, CB : *Cajal body*, NPC : *nuclear pore complex* (Paushkin *et al.*, 2002).

Par ailleurs, d'autres études suggèrent un rôle spécifique de la protéine SMN dans les cellules neuronales. Des études, chez le zebrafish 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 (Fan and Simard, 2002; McWhorter *et al.*, 2003; Shafey *et al.*, 2008).

Enfin, d'autres études se sont intéressées à l'implication de la dynamique du cytosquelette dans la pathogenèse de la SMA. En effet, les modifications de la dynamique du cytosquelette interviennent dans l'axonogenèse des motoneurones. Des observations

ont suggéré un lien, dans la SMA, entre le défaut de protéine SMN et la dérégulation du cytosquelette, à l'origine d'un défaut dans l'axonogenèse (Bowerman *et al.*, 2007; Oprea *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2010).

Ainsi, à ce jour, la physiopathologie de la SMA n'est pas parfaitement comprise.

2.3.5. Autres gènes modificateurs de la SMA

Le rôle, dans la SMA, de gènes localisés à proximité immédiate du gène *SMN1*, comme le gène codant pour la protéine NAIP (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*) ou le gène *GTF2H2* codant pour la protéine p44 (facteur de transcription) n'a pas été démontré (Bürglen *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998).

En 2008, Oprea *et al.* ont étudié six familles dans lesquelles était observée une discordance phénotypique pour la SMA. Dans ces familles, il existait 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 atteints. A partir d'analyses de transcriptomes, les auteurs ont mis en évidence, chez ces femmes, une surexpression du gène *PLS3* en comparaison à leurs apparentés atteints. Le gène *PLS3* est localisé sur le chromosome X et code pour la plastine 3. La plastine 3 est impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine et joue un rôle important dans l'axonogenèse. L'équipe d'Oprea a montré qu'une surexpression de *PLS3* dans des modèles animaux de SMA (souris et zebrafish), inactivation du gène *Smn* corrigeait le défaut de croissance des axones associé à la dégénérescence des neurones moteurs avec inactivation du gène *Smn*. Ainsi, ces auteurs concluent que le gène *PLS3* est un gène modificateur de la SMA (Oprea *et al.*, 2008).

2.4. Thérapeutiques émergentes

Dans la dernière décennie, une meilleure compréhension des bases moléculaires et physiologiques de l'amyotrophie spinale proximale (SMA) a permis le développement de traitements symptomatiques, non spécifiques. Aujourd'hui, différents traitements étiologiques, spécifiques de la SMA, sont en cours d'élaboration pour cette maladie jusqu'ici incurable. Ces nouvelles voies dans le traitement de la SMA incluent la thérapie génique, la thérapie moléculaire avec des oligonucléotides antisens ou de petites molécules et ont pour but d'augmenter l'expression de la protéine SMN (Tableau 3).

	Recherche	Développement préclinique	Développement clinique			Autorisation de mise sur le marché	
			Phase I	Phase II	Phase III		
Activation du promoteur du gène SMN2							Approches spécifiques
Repligen Pfizer (RG3039)							
Modulation de l'épissage du transcrite du gène SMN2							
ISIS Pharm/Biogen (ISIS-SMNRX)							
PTC/Roche (RG7800)							
Paratek Pharmaceutical (PTK-SMA1)							
Novartis (undisclosed)							
Expression exogène du gène SMN1							
AveXis (ChariSMA)							
Genzyme (undisclosed)							
Neuroprotection							Approche non spécifique
TROPHOS (olesoxime)							

Tableau 3. Traitements pharmacologiques en cours de développement. Ce tableau résume l'ensemble des stratégies thérapeutiques et l'état d'avancement du développement préclinique et clinique des médicaments pour le traitement des patients atteints de SMA. (d'après (d' Ydewalle and Sumner, 2015))

2.4.1. Traitements non spécifiques

A ce jour, il n'y a pas de traitement spécifique de le SMA approuvé par les autorités de santé (FDA, *Food and Drug Agency* ou ANSM, Agence Nationale de Sécurité du Médicament) et seules des thérapies palliatives, non spécifiques, sont disponibles pour les patients. Des traitements essentiellement non pharmacologiques sont utilisés dans la prise en charge des problèmes respiratoires (kinésithérapie, ventilation mécanique), des troubles de l'alimentation (compléments alimentaires, traitement pharmacologique des reflux gastro-œsophagiens, sonde nasogastrique) et dans la prise en charge de la faiblesse musculaire des patients (kinésithérapie, orthopédie, ergothérapie) (Wang *et al.*, 2007).

Ils existent également des traitements pharmacologiques en cours de développement qui ont pour but de moduler des voies cellulaires impliquées dans les mécanismes neuroprotecteurs, la survie cellulaire et la croissance axonale (Wertz and Sahin, 2015). Parmi

ces traitements, l'Olesoxime est en phase de développement clinique. C'est une molécule agissant sur les mitochondries dans le but d'inhiber la mort cellulaire et de permettre la croissance des neurites (Bordet *et al.*, 2007). De plus, le traitement Olesoxime a montré un effet pour accélérer la myélinisation en réponse à des lésions (Magalon *et al.*, 2012). Les essais ont montrés que deux ans de traitement par voie orale empêche la perte de la fonction motrice et l'apparition des événements indésirables liés à la maladie, par rapport au groupe contrôle traité par placebo. Si ce traitement est approuvé par les autorités de santé, il sera le premier traitement neuro-protecteur dans la SMA (Wertz and Sahin, 2015).

L'acide valproïque a également été testé chez les patients atteints de SMA. Il agit comme régulateur épigénétique et modifie l'expression génique en agissant comme un inhibiteur des histones déacétylases (HDAC, *histone deacetylase*). Ce traitement non spécifique a montré un effet sur les fibroblastes de patient en augmentant la quantité de protéine SMN fonctionnelle (Sumner *et al.*, 2003). Plusieurs essais cliniques de phase I et II ont également montrés une augmentation du taux de protéine fonctionnelle dans le sang périphérique de patient avec des améliorations de la fonction motrice modérées et inconstantes (Lunke and El-Osta, 2013).

2.4.2. Traitements spécifiques

Au cours des dernières années, plusieurs traitements prometteurs sont entrés en phase d'essai clinique avec des résultats prometteurs. Dans la majorité de ces essais, l'objectif thérapeutique est d'augmenter l'expression de la protéine SMN fonctionnelle, soit par l'activation du promoteur du gène *SMN2* dans le but d'augmenter l'expression de ce gène, soit par l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASO, *AntiSens Oligonucleotide*) spécifiques capables d'augmenter l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits du gène *SMN2* ou par l'expression exogène du gène *SMN1* à l'aide de vecteurs viraux dans le cadre d'une thérapie génique.

2.4.2.1. Activation du promoteur du gène *SMN2*

Des techniques de criblage, permettant de tester un grand nombre de molécules sur une construction génétique intégrant le promoteur du gène *SMN2*, ont montré un effet activateur de la quinazoline sur ce promoteur. Cette molécule testée sur des fibroblastes

de patient permet une augmentation de la production de transcrit *SMN* pleine longueur et une augmentation du nombre de corps de Cajal nucléaire (Jarecki *et al.*, 2005). Cette molécule agit en inhibant les décapases qui sont des enzymes permettant la dégradation de la coiffe 5' des ARN, entraînant ainsi leur dégradation (Singh *et al.*, 2008). Le mécanisme par lequel cette molécule active le promoteur n'est pas encore clairement établi (d' Ydewalle and Sumner, 2015). La molécule RG3039, appartenant à la famille des quinazolines, a montré un effet modéré sur l'augmentation du taux de protéine Smn et une amélioration de la survie et de la fonction motrice sur divers modèle de souris (Gogliotti *et al.*, 2013).

2.4.2.2. Modulation de l'épissage

Pour moduler l'épissage, les différentes stratégies utilisent des oligonucléotides antisens (*AntiSens Oligonucleotide*, ASO). Ce sont de petites molécules d'ADN simple brin, d'environ 15 à 35 nucléotides de long, qui peuvent moduler l'épissage d'un gène cible en s'hybridant au pré-ARNm. Les différentes stratégies en cours de développement visent à bloquer les séquences ISS (*Intronic Splicing Silencer*) situées dans l'intron 7 du pré-ARNm issu du gène *SMN2*. Par exemple, les ASO dirigés contre la séquence ISS-N1 augmente de façon spectaculaire l'inclusion de l'exon 7, proche de 100%, dans l'ARNm issu du gène *SMN2* chez des modèles de souris SMA (Hua *et al.*, 2007) (Figure 6). Cette observation a amené l'entreprise ISIS pharmaceuticals à développer un traitement ISIS-RMNRx actuellement en phase III d'essai clinique (d' Ydewalle and Sumner, 2015).

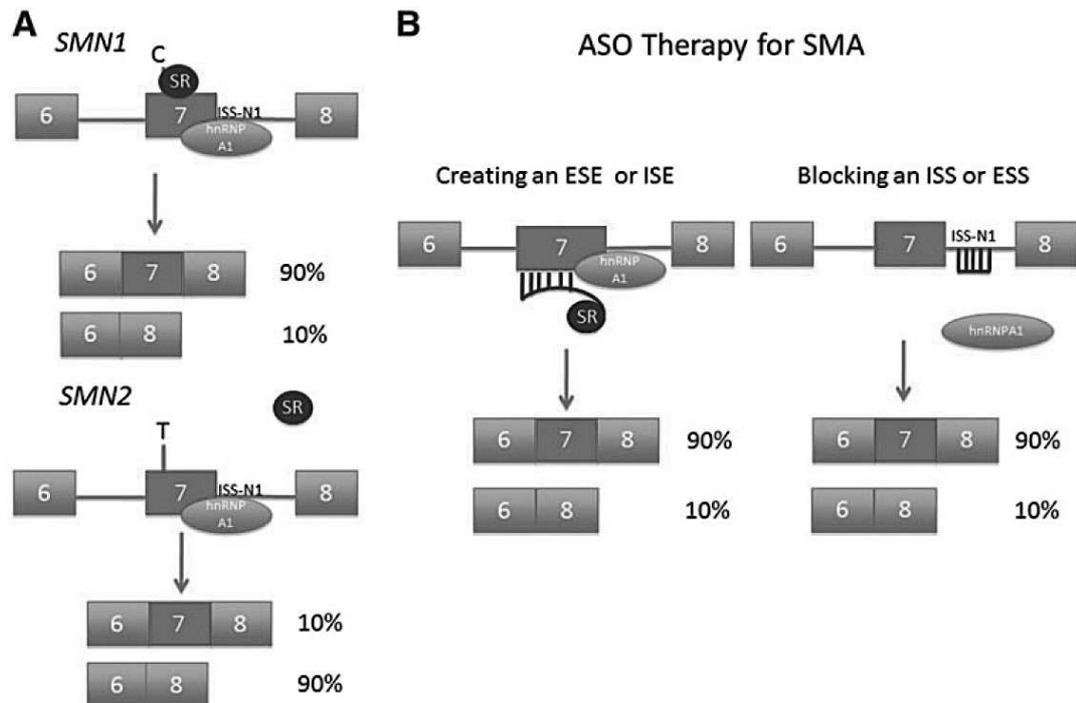


Figure 6. Modulation de l'épissage. Schématisation du mécanisme d'action des oligonucléotides antisens, ASO. A. Représentation des mécanismes naturels modulant l'épissage des gènes *SMN1* et *SMN2*. Le facteur SR se fixe au niveau d'une ESE (*Exonic Splice Enhancer*), le facteur hnRNP A1 se fixe au niveau d'une ISS (*Intronic Splice Silencer*), l'effet simultané de ces facteurs entraîne l'inclusion de l'exon 7 dans l'ARNm issu du gène *SMN1*. La perte de l'ESE dans le gène *SMN2* entraîne l'exclusion de l'exon 7 dans l'ARNm issu du gène *SMN2*. B. Représentation du mécanisme d'action des oligonucléotides antisens. Il est possible de moduler l'épissage du pré-ARNm issu du gène *SMN2* en recréant une ESE par la fixation d'un ASO au niveau de l'exon 7 ou en inhibant la fixation du facteur hnRNP A1 en aval de l'exon 7 du pré-ARNm issu du gène *SMN2* (Porensky and Burghes, 2013).

2.4.2.3. Thérapie Génique

Les thérapies géniques en cours de développement utilisent des virus scAAV9 SMN (*self-complementary Adeno-Associated Virus*). L'injection de cette construction en intraveineux ou en intracérébelleux a montré, chez les modèles de souris SMA, une augmentation de la concentration de protéine SMN dans le cerveau et la moelle épinière (Glascock *et al.*, 2012). AveXis a d'ailleurs commencé des essais cliniques de phase I utilisant cette construction (d' Ydewalle and Sumner, 2015).

3. Quantification de Transcrit

La transcription inverse (*Reverse Transcription*, RT), suivie par une réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), représente un outil puissant pour la détection et la quantification de transcrit. La RT-PCR en temps réel, ou RT-qPCR, couplant les techniques de transcription inverse et de PCR en temps réel est la technique la plus largement utilisée. Cependant, ces dernières années, de nouvelles techniques permettant de quantifier l'expression génique sont apparues comme la PCR numérique (*digital PCR*, d-PCR). En effet, cette technique couplée à la transcription inverse est beaucoup plus sensible et beaucoup plus reproductible que la RT-qPCR (Hindson *et al.*, 2013).

3.1. Transcription inverse

La transcription inverse permet la conversion de l'ARN en ADN simple brin, appelé ADN complémentaire (cDNA). L'efficacité, la spécificité et la sensibilité de cette conversion est une étape clé pour la quantification du transcrit (Pfaffl, 2004). La transcriptase inverse permettant cette conversion est une ADN polymérase ARN-dépendante. Il est admis que l'utilisation d'une transcriptase inverse issue de M-MLV (*Molony-Murine Leukemia Virus*) est l'enzyme de choix.

Cette étape de transcription inverse est la plus grande source de variabilité dans les expériences de quantification de transcrit. En effet elle est très sensible aux contaminations en sels, alcool et autres inhibiteurs issus de l'étape d'extraction de l'ARN qui peuvent affecter son efficacité (Pfaffl, 2004). Cette efficacité dépend également du type d'amorces utilisées : amorces spécifiques de gène ou non spécifiques (hexamères aléatoires, oligodT) et du kit de transcription inverse.

3.2. PCR en temps réel

Typiquement la réaction de PCR peut être séparée en plusieurs étapes (Tichopad *et al.*, 2003) : l'amplification de la cible est d'abord exponentielle puis linéaire et finalement elle atteint un plateau. La quantité de cible amplifiée est directement corrélée à la quantité initiale de matrice mais seulement pendant la phase exponentielle. Pour la quantification, on détermine le nombre de cycles à partir duquel le produit de PCR est détectable et se distingue du bruit de fond. Ce nombre de cycle est appelé cycle seuil (*cycle threshold*, Ct)

et est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales de matrice.

Deux méthodes sont largement utilisées pour la détection des produits d'amplification. Soit l'utilisation d'amorces spécifiques de gène couplées à un agent intercalant se liant à l'ADN double brin (Morrison *et al.*, 1998), qui émet alors une fluorescence (SYBR®Green), la spécificité de la réaction ne repose alors que sur la spécificité des amorces. Soit l'utilisation d'amorces spécifiques de gène couplées à des sondes fluorescentes elles-mêmes spécifiques du produit amplifié rendant la détection plus spécifique (Taqman®, FRET®,...) (Heid *et al.*, 1996).

3.3. Quantification relative versus quantification absolue

Deux stratégies peuvent être appliquées à cette RT-qPCR, l'expression génique peut être exprimée en quantification absolue ou en quantification relative.

Pour la quantification absolue, il est nécessaire de réaliser une gamme d'étalonnage. Ces gammes d'étalonnage doivent être très reproductibles puisque l'exactitude de la quantification absolue en temps réel (RT-qPCR) dépend entièrement de la précision des standards. Les standards utilisés pour les gammes d'étalonnage peuvent être de plusieurs types : des solutions contenant un ADN standard de concentration connue produit à l'aide de plasmide recombinant, de l'ADN génomique, ou un oligonucléotide de synthèse. Chaque modèle présente ses avantages et ses inconvénients. Les ADN génomiques et les ADN produits par les plasmides recombinants sont plus longs ce qui leur permet d'être plus résistant aux enzymes dégradant l'ADN et donc plus stables. En revanche, les étapes de production et d'extraction peuvent être lourdes. Il est ensuite nécessaire de déterminer les concentrations de ces standards. Un avantage des modèles impliquant des fragments plus courts, de type oligonucléotides de synthèse, est la connaissance précise de la concentration du standard (Pfaffl, 2004).

Le problème principal des gammes d'étalonnage à base d'ADN est qu'elles ne couvrent pas l'ensemble des étapes de la méthode puisque ces points de gamme ne sont soumis qu'à l'étape de PCR. Au contraire, l'utilisation d'une gamme réalisée à partir d'ARN nécessite une étape de transcription inverse. Cette étape est susceptible d'augmenter la variabilité des résultats obtenus et d'entraîner des problèmes de reproductibilité de la

gamme d'étalonnage. Cet ARN peut être un ARN obtenu à partir de bactéries ou de lignées cellulaires ou un oligonucléotide synthétisé. Les ARN peuvent être rapidement dégradés par les RNAses. L'utilisation d'une gamme est donc complexe et est susceptible d'entraîner des erreurs de mesures (Pfaffl, 2004).

Pour s'affranchir de cette gamme d'étalonnage, il est possible de réaliser une quantification relative. La quantification relative permet de mettre en évidence des variations du taux d'ARNm issu d'un gène d'intérêt, exprimés par rapport au taux d'ARNm issu d'un gène de référence, entre deux échantillons. Le gène de référence choisi est un gène de ménage, c'est à dire un gène dont l'expression est indispensable à la survie de la cellule, il s'exprime de la même manière dans les différents types cellulaires et chez les différents individus. Ils peuvent être co-amplifiés lors d'une manipulation unique en multiplex.

3.4. PCR Numérique

La PCR numérique repose sur le principe de la quantification par PCR en utilisant la dilution limite et la loi statistique de Poisson. Ce principe a été décrit en 1992 par Sykes *et al.* (Sykes *et al.*, 1992). La loi de Poisson est une loi qui permet de modéliser les événements rares : on dit qu'une variable aléatoire dénombrable X , à valeurs dans \mathbb{N} , suit une loi de Poisson de paramètre λ ($\lambda > 0$), si et seulement si, pour tout entier naturel k , $p(X = k) = e^{-\lambda} (\lambda^k/k!)$. On note $P(\lambda)$ cette loi, et on montre alors que son espérance, sa variance et son écart-type vérifient $E(X)=\lambda$, $V(X)=\lambda$ et $\sigma(X)=\sqrt{\lambda}$ (Bénazeth *et al.*, 2003).

En divisant l'échantillon et le mélange réactionnel de qPCR dans un très grand nombre de petits volumes distincts de telle sorte qu'il n'y ait que 0 ou 1 molécule cible par réaction individuelle (réacteur), la répartition des échantillons peut alors être modélisée par une loi de Poisson. Lorsqu'un réacteur contient au moins une molécule cible, alors cette molécule est amplifiée et révélée selon le principe de la qPCR. Chacun des réacteurs est analysé. Il est soit positif et il prend la valeur de 1, soit négatif et il prend la valeur de 0. A partir de la loi de Poisson, on peut alors déterminer la concentration initiale de molécules cibles : $C(\text{copies}/\mu\text{L}) = (N \times \ln \frac{N}{N-x})/V$ où N est le nombre total de réacteurs, x le nombre de réacteurs positifs et V le volume de la PCR numérique.

L'étape clé consiste donc à diviser l'échantillon et le mélange réactionnel dans un grand nombre de réacteurs. Deux méthodes différentes peuvent être utilisées (Vogelstein and Kinzler, 1999). La première est la PCR numérique sur puce, chaque puce contient plusieurs milliers de puits qui interviennent chacun comme un réacteur. La seconde correspond à la PCR numérique en goutte (*digital droplets* PCR, ddPCR). Ce système dérivé des techniques de microfluidique permet d'isoler l'échantillon dans des émulsions titrées contenant de l'huile, de l'eau et un agent chimique stabilisateur, chaque goutte intervient alors comme un réacteur.

L'un des grands avantages de cette technique de PCR numérique est qu'elle permet une quantification absolue sans avoir à utiliser une gamme d'étalonnage. De plus, elle est plus précise et plus reproductible que la qPCR (Hindson *et al.*, 2013).

4. Objectifs de l'étude

L'objectif primaire de cette étude est de développer une nouvelle méthode de quantification du transcrit *SMN* pleine longueur, par PCR numérique, à partir de sang périphérique. Cette méthode est plus accessible que la RT-PCR, elle peut être une méthode de choix pour le suivi des concentrations de transcrits chez les patients traités par des thérapeutiques visant à en augmenter la concentration. De plus, cette méthode est plus robuste ce qui présente un intérêt pour nous permettre de déterminer le seuil de transcrit *SMN* pleine longueur qui distingue les 2 groupes *1SMN1/0SMN2* et *0SMN1/4SMN2*. Ce seuil qui sépare les individus sains, présentant le plus faible nombre de copie des gènes *SMN* (1 copie du gène *SMN1*, aucune copie du gène *SMN2*), des patients ayant le phénotype le plus atténué et le plus grand nombre de copies du gène *SMN2* (aucune copie du gène *SMN1*, 4 copies du gène *SMN2*), pourrait permettre de fixer un objectif thérapeutique à atteindre lors de l'utilisation de traitement visant à augmenter la quantité de transcrit *SMN* pleine longueur.

5. Matériel et méthode

5.1. Constitution des groupes de patients et de contrôles

Nous avons constitué 2 groupes distincts de patients et de contrôles.

Le premier groupe comprend 10 patients atteints de SMA présentant une délétion à l'état homozygote du gène *SMN1*. Ces individus ont été recrutés exclusivement en fonction de leur génotype, sans critère clinique. Ils ont la particularité de présenter 4 copies du gène *SMN2* (génotype *0SMN1/4SMN2*). Ce groupe de patients est constitué de 2 femmes et 8 hommes, âgés en moyenne de 28 ans [9-66 ans], atteints de SMA de type III à IV (Tableau 4).

Le second groupe comprend 10 individus sains qui ont aussi été recrutés en fonction de leur génotype. Ils présentent une délétion à l'état hétérozygote du gène *SMN1* et aucune copie du gène *SMN2* (génotype *1SMN1/0SMN2*). Ces individus ont été recrutés parmi des apparentés d'individus atteints de SMA. Ce groupe d'individus sains est constitué de 6 femmes et 4 hommes, âgés en moyenne de 46 ans [29-66 ans] (Tableau 4).

La totalité des 2 groupes a été recrutée en France par le Dr Pascale Saugier-Weber, responsable du diagnostic de SMA au sein du laboratoire de génétique moléculaire de Rouen.

Le nombre de copies des gènes *SMN1* et *SMN2* a été déterminé par QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments*) à l'aide des prélèvements sanguins reçus au titre du diagnostic. Dans un second temps, chacun des médecins prenant en charge ces individus a été contacté afin d'expliquer les objectifs de cette étude et de recueillir le consentement écrit des individus donnant leur accord pour mettre à disposition de ce projet un nouvel échantillon biologique (Annexe 1).

Le recrutement des individus a été réalisé entre le mars 2011 et avril 2015.

5.2. Préparation des échantillons

Les prélèvements sanguins des individus ont été réalisés sur des tubes Blood RNA tube PAXgene® (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Suisse) et acheminés à température ambiante jusqu'au laboratoire de génétique moléculaire de Rouen. A partir de ces tubes, nous

avons extrait l'ARN à l'aide du kit Blood RNA kit PAXgene® (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Suisse). Pour chaque produit d'extraction, nous avons mesuré la concentration en ARN par spectrophotométrie sur NanoDrop® (Thermo Scientific, Waltham, USA) et nous avons estimé la qualité des ARN en mesurant le RINe (*RNA Integrity Number equivalent*) par électrophorèse à l'aide du kit RNA analysis ScreenTape System® (Agilent technologies, Santa Clara, USA) sur l'automate Agilent 2200 TapeStation® (Agilent technologies, Santa Clara, USA) (Tableau 4).

Les échantillons ont été aliquotés dans différents tubes de 1,5mL de manière à éviter les congélations-décongélations.

Groupe	Identifiant expérience	Identifiant laboratoire	Génotype	Phénotype	Sexe	Age	Concentration (ng/μL) (NanoDrop®)	RINe (TapeStation®)
Patients	A	29518.001	4C0T	SMA type III	H	15	37,15	7,7
	C	23572.001	4C0T	SMA type III	H	33	124,95	7,4
	E	28964.001	4C0T	SMA type III	H	23	121,04	7,3
	G	23950.001	4C0T	SMA type IV	F	34	99,08	7,2
	I	22932.003	4C0T	SMA type IV	F	21	144,07	7,1
	K	23498.001	4C0T	SMA type III	H	66	136,09	7,1
	M	8321.001	4C0T	SMA type IV	H	32	112,12	7,1
	O	21842.001	4C0T	SMA type IV	H	35	109,4	6,9
	Q	27101.001	4C0T	SMA type III	H	11	86,26	6,5
S	27746.001	4C0T	SMA type III	H	9	65,74	5,5	
Contrôles	B	29473.004	0C1T	Sain	F	54	94,96	7,2
	D	23439.003	0C1T	Sain	F	66	153,43	7,1
	F	27814.005	0C1T	Sain	F	60	225,05	6,9
	H	21908.002	0C1T	Sain	F	29	73,41	6,9
	J	27150.002	0C1T	Sain	H	35	103,96	6,8
	L	27798.003	0C1T	Sain	H	48	151,24	6,7
	N	26243.005	0C1T	Sain	F	34	105,49	6,6
	P	27239.009	0C1T	Sain	H	40	182,74	6,5
	R	27284.003	0C1T	Sain	F	29	71,11	6,5
T	24356.003	0C1T	Sain	H	62	35,97	6,4	

Tableau 4. Description des groupes de patients et de contrôles. Les principales informations sur les individus (âge, sexe et génotype) et sur les échantillons d'ARN utilisés (dosage, qualité) sont indiquées.

5.3. Modélisation des sondes et des amorces

Pour l'amplification du transcrit *SMN* pleine longueur, nous avons choisi d'utiliser un couple d'amorces déjà publié par Simard *et al.*, en 2007 (Simard *et al.*, 2007).

Identifiant	Séquence	Localisation	Type
SMNfl-F	5'-AAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTC-3'	exon 7	Amorce sens
SMNfl-R	5'-TGGTGTCATTTAGTGCTGCTCTATG-3'	exon 8	Amorce antisens
SMN-sonde	5'-FAM-CAGCATTCTCTCTTAATTT-NFQ-MGB-3'	exon 7-8	Sonde
TBP-F	5'-GCACTTCGTGCCCGAAAC-3'	exon 4	Amorce sens
TBP-R	5'-CCTCATGATTACCGCAGCAA-3'	exon 5	Amorce antisens
TBP-sonde	5'-VIC-CGAATATAATCCAAGCGG-NFQ-MGB-3'	exon 4-5	Sonde

Tableau 5. Description des sondes et des amorces. Les identifiants, les séquences, la localisation et le type d'oligonucléotide sont indiqués.

Pour l'amplification d'un transcrit de référence, nous avons d'abord testé l'expression de divers contrôles endogènes sur 10 individus sains, par RT-QMPSF (*Reverse Transcription – Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragment*) de manière à choisir un contrôle présentant une faible variabilité inter-individuelle et dont le niveau d'expression était similaire à celui du transcrit *SMN* pleine longueur. La RT-QMPSF est une méthode couplant une transcription inverse et une QMPSF (Vezain *et al.*, 2007). La QMPSF est une méthode semi-quantitative basée sur une PCR multiplex de courts fragments fluorescents. Cette technique repose sur une amplification en phase exponentielle des amplicons. Pour ne pas atteindre le plateau et de manière à obtenir une amplification dépendante de la quantité initiale de matrice, le nombre de cycles de PCR est limité. Les amplicons sont ensuite séparés, sur un séquenceur, en fonction de leur taille. Chaque pic que l'on observe sur l'électrophérogramme correspond à un amplicon, identifié en fonction de sa taille. La hauteur du pic est proportionnelle à la quantité initiale de matrice. Les différents échantillons ayant été traités de la même manière, il est possible de les comparer entre eux.

Nous avons testé 3 transcrits issus de gènes de ménage : *TOP1*, *HPRT* et *TBP*. Notre choix s'est porté sur le transcrit issu du gène *TBP*. En effet, le niveau d'expression de ce transcrit est comparable à celui du transcrit *SMN* pleine longueur. De plus, le niveau d'expression de ce transcrit présente la plus faible variabilité (Figure 8). Nous avons donc modélisé des amorces, pour la PCR numérique, à l'aide du logiciel Primer Express® v.3.0.1 (Life Technologies, Carlsbad, USA). L'amorce sens TBP-F est située dans l'exon 4, l'amorce antisens TBP-R est située dans l'exon 5 du gène *TBP*. Le produit d'amplification de cette PCR après transcription inverse est un amplicon de 60 paires de bases contenant la

jonction des exons 4 et 5 sur laquelle s'hybride une sonde TaqMan® (Applied Biosystems, Waltham, USA), TBP-sonde, marquée par un fluorochrome VIC® (Tableau 5 et Figure 7).

Les amorces antisens utilisées pour la transcription inverse et la PCR numérique sont identiques. Toutes les amorces ont été commandées chez Integrated DNA Technologies, Coralville, USA. Elles ont été purifiées en HPLC.

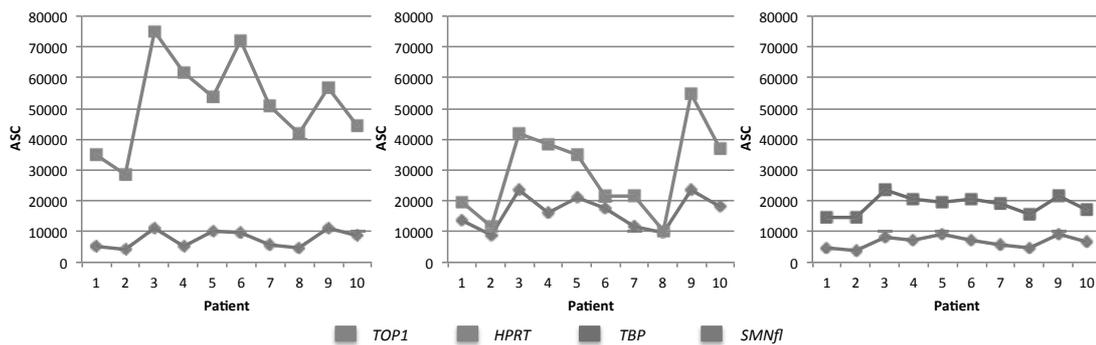


Figure 8. Résultats de la RT-QMPSF. Sur l'axe des abscisses, les individus de génotype *1SMN1/OSMN2* sont numérotés de 1 à 10. L'axe des ordonnées représente les aires sous la courbe (ASC). Chaque graphique représente une RT-QMPSF différente avec 2 amplicons : l'amplicon *SMNfl*, correspondant au transcrit *SMN* pleine longueur et un transcrit issu d'un gène de ménage (*TOP1* en vert, *HPRT* en marron et *TBP* en rouge).

5.4. Protocole

5.4.1. Transcription inverse

Après avoir évalué l'efficacité de différents kits soit avec des hexamères aléatoires soit avec des amorces gène-spécifique, nous avons opté pour le kit High-Capacity cDNA reverse Transcription contenant l'enzyme MultiScrib™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Waltham, USA) et pour des amorces gène-spécifiques (amorces antisens *TBP* et *SMN*) à la concentration 25 µmol/L.

La réaction de transcription inverse est réalisée sur un thermocycleur (Bio-Rad®, Hercules, USA) à une température de 25°C pendant 10 minutes puis à 37°C pendant 120 minutes, sur un volume de réaction de 20 µL. Pour chaque échantillon, 125 ng d'ARN ont été utilisés.

L'eau utilisée pour cette réaction est de l'eau sans RNase (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne).

5.4.2. PCR numérique

Pour ce projet, nous avons utilisé la technique de PCR numérique, Quantstudio® 3D (Life technologies, Carlsbad, USA). Le mélange réactionnel est déposé sur une puce contenant 20000 nano-puits à l'aide de l'automate QuantStudio® 3D Digital PCR chip loader (Life technologies, Carlsbad, USA). La puce est ensuite recouverte d'huile puis scellée avec de la colle UV. La réaction de PCR numérique est réalisée sur un thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700® (Applied Biosystems, Waltham, USA) selon les conditions suivantes : après 10 minutes de dénaturation à 96°C, la PCR consiste en 38 cycles de 2 minutes d'élongation puis 30 secondes de dénaturation à 98°C et finalement une élongation finale de 2 minutes à 60°C. Ensuite, la fluorescence est lue sur l'automate QuantStudio® 3D Digital PCR instrument (Life technologies, Carlsbad, USA). Les résultats sont ensuite chargés sur le logiciel en ligne QuantStudio® 3D AnalysisSuite™ pour la lecture des puces.

Le mélange de réaction comprend 7,5 µL de QuantStudio® 3D Digital PCR Master Mix 0,75 µL de mélange de sondes et d'amorces, 0,5 µL d'eau et 6,25 µL d'ADNc, produit de la transcription inverse.

Ce système fonctionne comme 20000 PCR individuelles, en point final en présence de sondes TaqMan®. Cette partition de l'échantillon dans des milliers de compartiments est la véritable innovation de cette technique (Figure 9). Certains compartiments seront vides tandis que d'autres contiendront la cible d'ADN recherchée. Dans chaque compartiment auront lieu des réactions de PCR indépendantes en présence des sondes TaqMan® spécifiques.

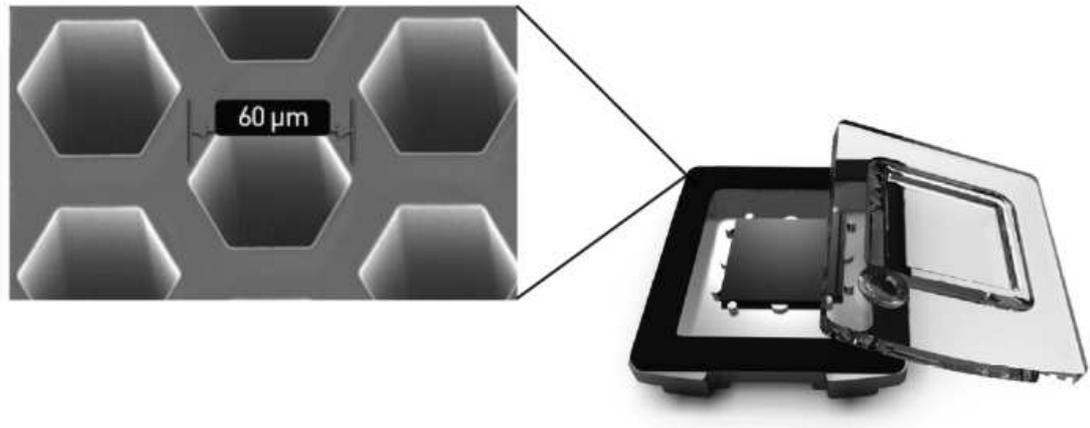


Figure 9. Détails d'une puce de PCR numérique. Technologie Quantstudio® 3D Digital PCR (Life Technologies, Carlsbad, USA).

Les sondes TaqMan® sont constituées d'un fluorophore (6-FAM™ ou VIC®), lié de manière covalente à l'extrémité 5' de la sonde oligonucléotidique, et d'un extincteur (MGB, *Minor Groove Binder* – NFQ, *Non Fluorescent Quencher*) à l'extrémité 3'. Selon le principe du FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), lorsque la molécule est excitée par une source de lumière, le fluorophore, à proximité de l'extincteur, lui transmet son énergie. L'extincteur agit comme un inhibiteur de la fluorescence du fluorophore.

Les sondes TaqMan® sont conçues de telle sorte qu'elles s'hybrident dans une région d'ADN amplifiée par un couple d'amorces spécifique (Figure 10). Lors de l'élongation, l'activité 5' exonucléase de la Taq polymérase est responsable de la dégradation de la sonde qui est hybridée à la matrice. Cette dégradation de la sonde permet la libération du fluorophore qui n'est plus à proximité de l'extincteur, libérant ainsi le fluorophore de l'effet inhibiteur de l'extincteur et permettant l'émission d'une fluorescence.

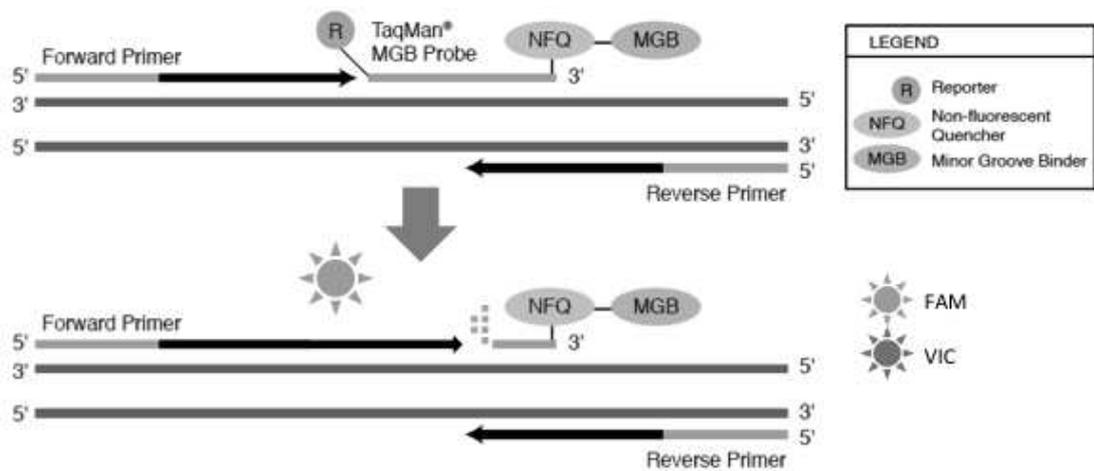


Figure 10. Principe de la technologie Taqman®. (Applied Biosystems, Waltham, USA) Reporter = fluorophore et NFQ-MGB = extincteur. La polymérase est représentée par l'extrémité de la flèche noire.

Après la PCR, si la cible est présente, un fort signal fluorescent apparaîtra. Si la cible n'est pas présente dans un compartiment, il n'y aura pas de fluorescence. Le lecteur de PCR numérique va lire chaque compartiment et comptera le nombre de réactions positives et le nombre de réactions négatives. Le rapport réactions positives sur réactions négatives est appliqué à la loi de Poisson (loi des petits nombres) ce qui permet une estimation précise du nombre de molécules dans l'échantillon de départ. Ainsi on obtient une quantification exacte sans devoir recourir à une courbe de calibration.

5.4.3. Lecture des puces

Les puces sont lues sur le système Digital PCR QuantStudio® 3D, Life technologies, Carlsbad, USA. Les fichiers numériques sont ensuite chargés sur QuantStudio® 3D AnalysisSuite™ Cloud Software (Life technologies, Carlsbad, USA). Ce logiciel permet la visualisation globale des puces, pour apprécier leur qualité, ainsi que la représentation graphique des fluorescences FAM en fonction de VIC, permettant de redéfinir les groupes de puits présentant soit une fluorescence FAM, VIC, FAM+VIC ou aucune fluorescence. Dans un premier temps, nous évaluons la qualité des puces (Figure 11), si celle-ci n'est pas optimale alors elle est éliminée et l'échantillon est à nouveau analysé dans une seconde série. Dans un second temps, nous redéfinissons les groupes de fluorescence si nécessaire (Figure 12).

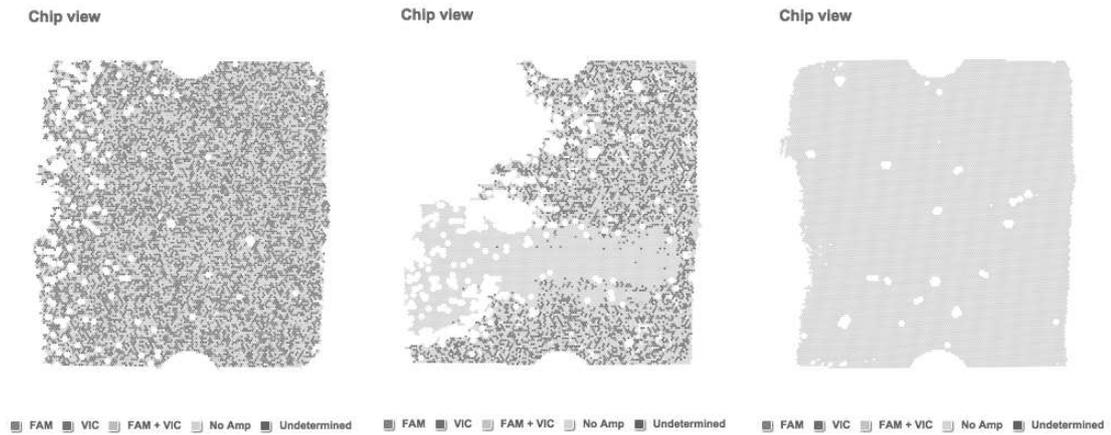


Figure 11. Visualisation globale des puces. Chaque point représente un puits, il peut être bleu (fluorescence FAM), rouge (fluorescence VIC), vert (fluorescence FAM+VIC) ou jaune (absence de fluorescence). A gauche : une puce de bonne qualité avec une répartition homogène des puits positifs sur l'ensemble de la puce. Au centre : une puce de mauvaise qualité, la répartition des puits n'est pas homogène. A droite, une puce entièrement négative (blanc).

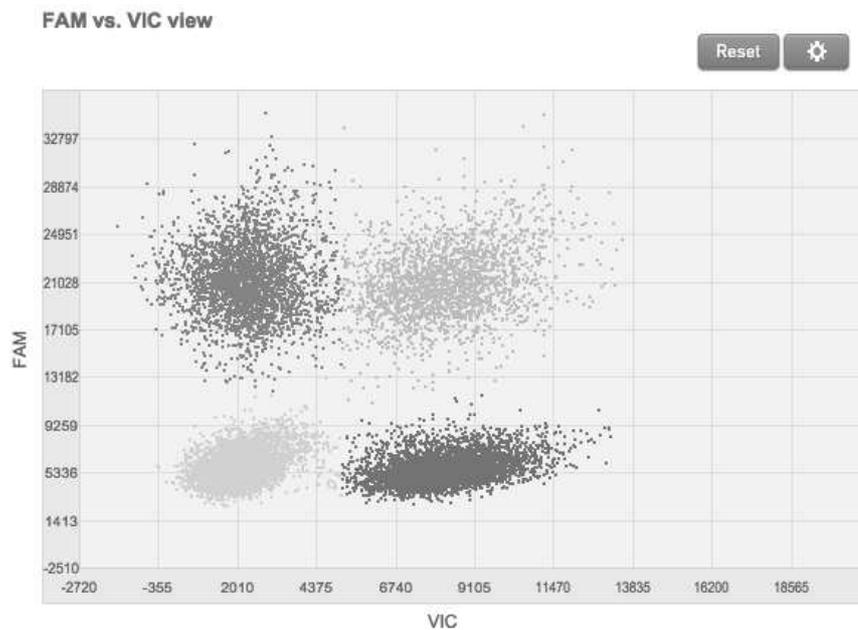


Figure 12. Représentation graphique de la répartition des fluorescences. L'axe des abscisses représente l'intensité de la fluorescence VIC (sonde *TBP*) et l'axe des ordonnées, l'intensité en fluorescence FAM (sonde *SMN*). Cette représentation permet de distinguer les 4 groupes : en bleu les puits présentant uniquement une fluorescence FAM, en rouge les puits présentant uniquement une fluorescence VIC, en vert les puits présentant à la fois une fluorescence FAM et VIC et en jaune les puits ne présentant aucune fluorescence.

5.5. Gamme d'étalonnage

De manière à évaluer l'efficacité des différentes étapes de cette expérimentation, nous avons commandé à la société Integrated DNA Technologies, Coralville, USA un ARN synthétique correspondant à une partie des exons 7 et 8 du transcrit *SMN* pleine longueur et qui contient les séquences reconnues par nos amorces spécifiques.

5'-AAUCAAAAAGAAGGAAGGUGCUCACAUUCCUUAUUAAUUAAGGAGAAAUGCUGGCAUAG
AGCAGCACUAAAUGACACCACUAAA-3'.

La concentration mère d'ARN est connue. Dans un premier temps, nous avons dilué à quatre reprises cette solution en effectuant des dilutions au centième, en cascade, dans de l'eau sans RNase (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), jusqu'à atteindre des concentrations de transcrit dans le domaine de mesure de notre technique. Puis nous avons réalisé des dilutions au demi pour établir les points de gamme. Ce travail nous permet d'estimer globalement l'efficacité de la transcription inverse couplée à la digitale PCR.

5.6. Etudes statistiques

Pour la réalisation des tests statistiques et la réalisation des figures nous avons utilisé le logiciel GraphPad Prism version 6.00 pour Mac (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com). Pour chacun des tests, nous fixons l'erreur statistique à 5%.

Des régressions linéaires et une corrélation (test de Pearson) ont été réalisées.

Pour les comparaisons des groupes, nous avons utilisé un test de Fisher-Snedecor (comparaison de variances) suivi d'un test de Student uni ou bilatéral (comparaison de moyennes).

6. Résultats

6.1. Validation de la méthode

Pour ce travail, nous avons suivi les recommandations du *digital MIQE guidelines* (*Minimum Information for publication of Quantitative PCR digital Experiments*) (Huggett *et al.*, 2013). Ce guide répertorie l'ensemble des informations indispensables ou

souhaitables lors de la publication d'un article contenant des expériences de PCR numérique.

6.1.1. Plan expérimental

Pour cette étude, de manière à respecter les recommandations du *digital MIQE guidelines* (Huggett *et al.*, 2013) et à limiter la variabilité due à la méthode, nous avons organisé l'expérience comme suit : l'ensemble des échantillons, en dehors des expériences de mise au point, est passé dans une série unique de transcription inverse (Figure 13). Pour chaque échantillon, deux aliquotes de transcription inverse ont été réalisés, ainsi qu'un contrôle en l'absence d'enzyme (NEC, *No Enzyme Control*). Ce contrôle permet de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN. De plus, 7 blancs sans matrice ont été ajoutés à cette série (NTC, *No Template Control*). Ces blancs permettent à la fois de vérifier l'absence de contamination inter-échantillon et de fixer la limite de positivité de la réaction de PCR numérique.

Ensuite, chaque série de PCR numérique a été modélisée comme suit : un échantillon de chacun des deux groupes a été analysé à 3 reprises avec son contrôle sans enzyme (NEC) et un blanc sans matrice (NTC).

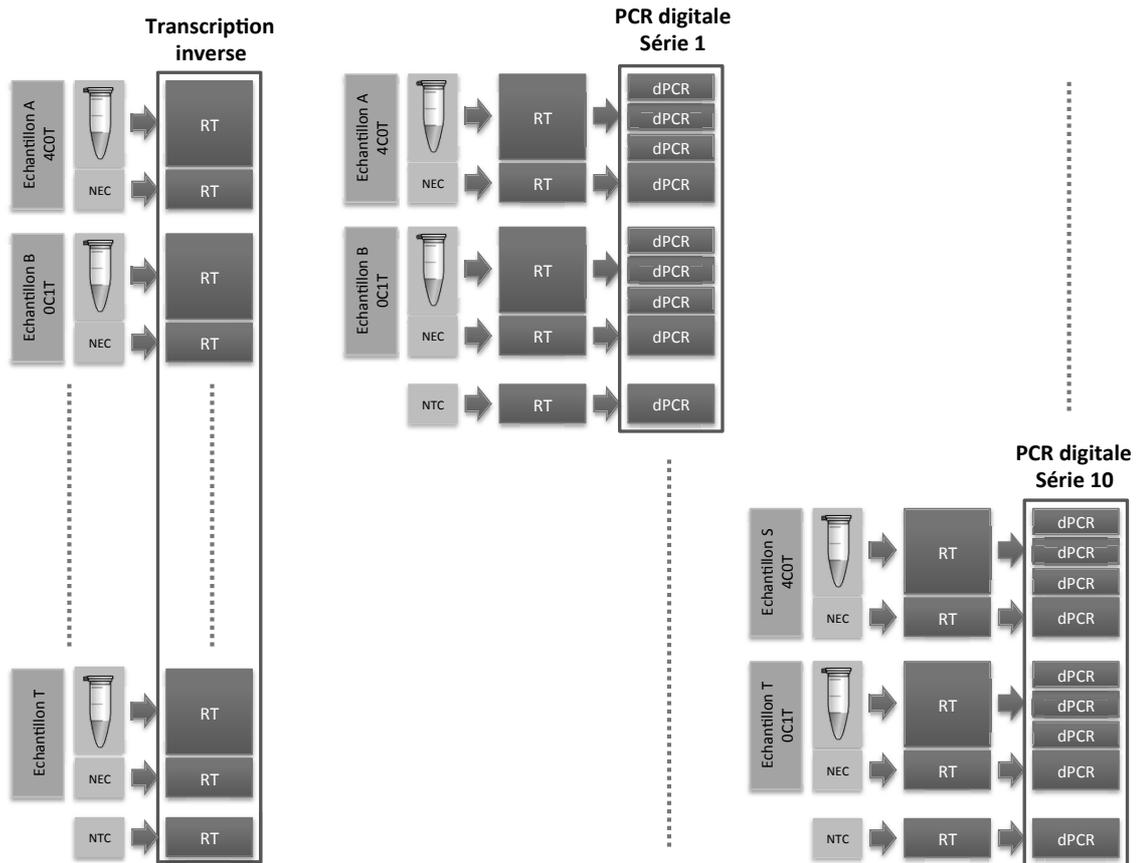


Figure 13. Schématisation du plan expérimental.

6.1.2. Gamme

De manière à déterminer l'efficacité de notre méthode pour la quantification de transcrite, nous avons réalisé une gamme à partir d'un ARN synthétique. L'équation de la droite est $Y=1,108X-0,9923$. La pente est significativement différente de 0, $p<0,0001$. On peut remarquer que la pente est très proche de 1 et est décalée vers le bas par rapport à la droite $Y=X$ correspondant à une efficacité de 100% de la RT-dPCR. Il est connu que l'efficacité de la RT n'est pas de 100% (Bustin and Nolan, 2004). On peut estimer ici l'efficacité moyenne sur les 6 premiers points de gamme à 66%. On peut remarquer que l'efficacité de la RT-PCR a tendance à diminuer lorsque la concentration en transcrite diminue. Le septième point de la gamme n'apparaît pas sur le graphique, il est en dehors de la limite de linéarité de cette méthode (Tableau 6 et Figure 14).

Echantillon	Concentration de transcrit <i>SMN</i> (copies/ μ L)		Efficacité
	Concentration théorique	Concentration mesurée	
1	2091	1622	78%
2	1045	756	72%
3	523	360	69%
4	261	179	69%
5	131	64	49%
6	65	38	58%
7	33	4	11%
		Moyenne	66%

Tableau 6. Résultats bruts de la gamme. Ce tableau représente les résultats des concentrations théoriques et mesurées du transcrit *SMN* pour les 6 points de gamme. Sur ce tableau figure également une estimation de l'efficacité de la RT-dPCR pour chacun des points de gamme. La moyenne de l'efficacité est calculée sur les 6 premiers points de gamme.

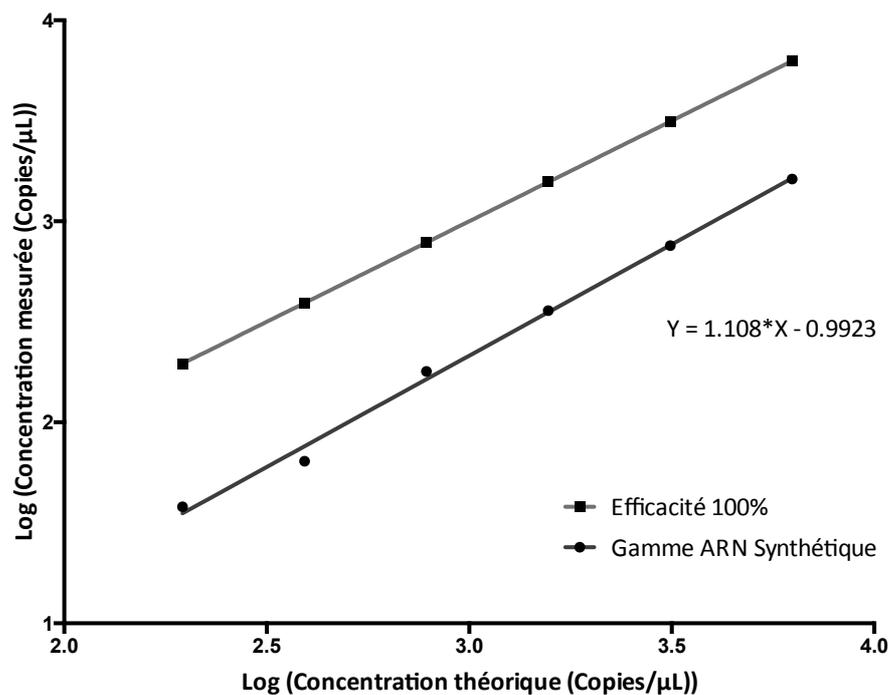


Figure 14. Regression linéaire du log de la concentration mesurée en fonction du log de la concentration théorique. La droite théorique $Y=X$ correspondant à une efficacité de 100% de la RT-dPCR est représentée en rouge. La droite obtenue à partir des valeurs expérimentales est représentée en bleu.

6.1.3. Comparaison des PCR numériques en simplex et en duplex

De manière à évaluer l'influence du multiplexage sur les résultats obtenus, nous avons mesuré à trois reprises la concentration des transcrits *TBP* et *SMN* sur un échantillon traité avec un mélange de réaction de dPCR contenant soit les amorces et les sondes permettant d'amplifier et de détecter les transcrits *TBP* et *SMN* (duplex), soit un seul des deux transcrits (simplex).

Cette expérience nous montre qu'il n'y a pas de réaction croisée entre les deux réactions. En effet, lorsque nous utilisons un mélange réactionnel ne contenant que la sonde *TBP*, nous ne détectons aucune fluorescence FAM et donc aucun transcrit *SMN* et, inversement, lorsque nous utilisons un mélange réactionnel ne contenant que la sonde *SMN* nous ne détectons aucune fluorescence VIC et donc aucun transcrit *TBP* (tableau 7).

De plus, en comparant les résultats obtenus en duplex à ceux obtenus lors des deux réactions en simplex, nous n'observons pas de différence significative dans les concentrations en transcrits *TBP* et *SMN* (Figure 15). **Il n'y pas d'influence du multiplexage sur le résultat.**

		Multiplex		Simplex (<i>TBP</i>)		Simplex (<i>SMN</i>)	
		<i>TBP</i>	<i>SMN</i>	<i>TBP</i>	<i>SMN</i>	<i>TBP</i>	<i>SMN</i>
		Concentration (Copies/ μ L)					
Echantillon	F	488,50	144,96	409,51	0,00	0,00	143,66
	F	498,68	168,50	503,96	0,00	0,00	165,72
	F	529,19	176,53	462,13	0,00	0,00	158,73
Moyenne		505,46	163,33	458,53	0,00	0,00	156,04

Tableau 7. Comparaison des PCR en multiplex et en simplex. Ce tableau rassemble l'ensemble des concentrations en transcrits *TBP* et *SMN* sur 3 expériences indépendantes pour l'échantillon F soit en présence des deux sondes (Multiplex), soit en présence de l'une des deux sondes (Simplex). Pour chaque colonne, une moyenne des 3 expériences est calculée.

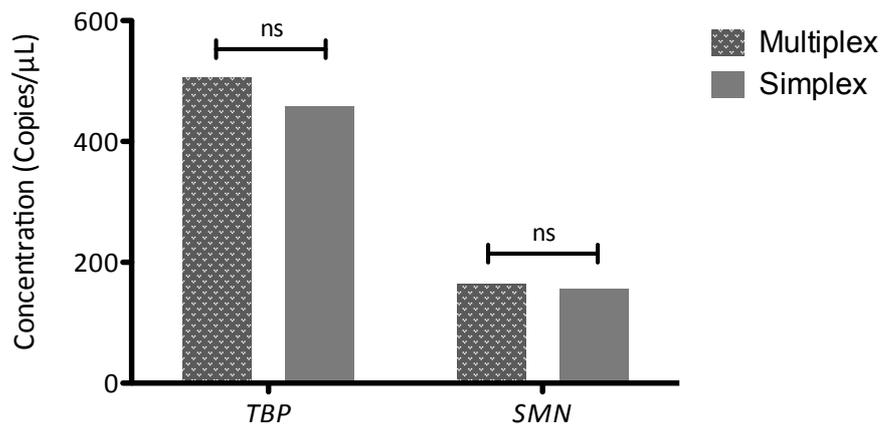


Figure 15. Comparaison de moyenne Multiplex vs Simplex. Cet histogramme représente la moyenne de chacune des 3 expériences pour chacune des sondes *TBP* ou *SMN*. En bleu sont représentés les résultats obtenus en multiplex et en rouge les résultats obtenus en simplex. Chacune des comparaisons de moyenne est non significative, ns.

6.1.4. Reproductibilité

De manière à évaluer la reproductibilité de notre méthode, nous avons mesuré la concentration de 2 échantillons traités dans des RT et des d-PCR indépendantes (Tableau 8).

Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs à 10% pour l'ensemble des échantillons à la fois pour la quantification du transcrite *TBP* et du transcrite *SMN*. Il est à noter que la quantification de faibles concentrations de transcrite <200 copies/μL est soumise à une plus grande variabilité. En effet, le coefficient de variation de la quantification de transcrite *SMN* dans l'échantillon F est de 7,51% pour une concentration moyenne de transcrite de 157,9 copies/μL alors que les coefficients de variation pour des concentrations de l'ordre de 500 copies/μL sont tous inférieurs à 5%. Nous observons également que la variabilité du ratio *SMN/TBP* (quantification relative) est moins importante que la variabilité de la concentration en transcrite *SMN* (quantification absolue) : pour l'échantillon A, respectivement 1,04% et 4,18%, et, pour l'échantillon F, respectivement 6,49% et 7,51%.

		Echantillon					
		A			F		
<i>TBP</i>	Concentration (Copies/ μ L)	551,79	523,20	576,94	488,50	498,68	494,12
	Moyenne	550,64			493,77		
	Ecart type	26,89			5,10		
	Coefficient de variation	4,88%			1,03%		
<i>SMN</i>	Concentration (Copies/ μ L)	502,55	486,05	528,00	144,96	168,50	158,41
	Moyenne	505,53			157,29		
	Ecart type	21,13			11,81		
	Coefficient de variation	4,18%			7,51%		
<i>SMN/TBP</i>	Ratio (<i>SMN/TBP</i>)	0,91	0,93	0,92	0,30	0,34	0,32
	Moyenne	0,92			0,32		
	Ecart type	0,01			0,02		
	Coefficient de variation	1,04%			6,49%		

Tableau 8. Reproductibilité. Ce tableau récapitule l'ensemble des résultats obtenus sur 3 expériences indépendantes. Les moyennes, écarts-types et coefficients de variation ont été calculés pour les concentrations obtenues avec chacune des sondes *TBP* et *SMN* ainsi que pour les concentrations *SMN/TBP*.

6.1.5. Répétabilité

Pour cette expérience, nous avons réalisé 3 dPCR pour chaque produit de RT ce qui nous a permis de calculer le coefficient de variation de chacune des mesures de dPCR. Il est à noter que, pour l'échantillon N, nous n'avons pu réaliser que 2 mesures suite à un manque de mélange réactionnel dû à un lot défectueux de puces qui nous a obligé à écarter un certain nombre d'entre elles et à reproduire l'expérience plus de fois qu'initialement prévu.

La moyenne du coefficient de variation de la quantification absolue de transcrit *TBP* est de 5,26% avec des valeurs comprises entre 0,64 et 12,21% (Tableau 9).

Echantillon	TBP (copies/ μ L)		
	Moyenne	Ecart type	CV
A	524,52	27,25	5,20%
C	644,57	78,72	12,21%
E	641,28	4,09	0,64%
G	365,96	34,84	9,52%
I	498,44	4,53	0,91%
K	543,00	17,90	3,30%
M	544,55	38,25	7,02%
O	728,41	57,66	7,92%
Q	472,13	24,72	5,23%
S	293,64	4,24	1,45%
B	581,24	13,41	2,31%
D	539,31	41,11	7,62%
F	529,94	31,31	5,91%
H	416,44	20,11	4,83%
J	500,69	8,73	1,74%
L	541,15	38,87	7,18%
N	615,26	14,08	2,29%
P	514,81	21,41	4,16%
R	496,90	22,79	4,59%
T	408,83	45,82	11,21%
		Moyenne	5,26%
		[Min - Max]	[0,64%-12,21%]

Tableau 9. Répétabilité (TBP). Ce tableau répertorie les moyennes, écarts-types et coefficients de variation de la concentration en transcrit *TBP*, obtenus sur 3 mesures réalisées en parallèle, pour chacun des échantillons.

La moyenne du coefficient de variation de la quantification absolue de transcrit *SMN* est de 5,65% avec des valeurs comprises entre 1,58 et 12,24% (Tableau 10).

Echantillon	SMN (copies/ μ L)		
	Moyenne	Ecart type	CV
A	465,85	33,96	7,29%
C	390,57	47,81	12,24%
E	435,21	13,87	3,19%
G	208,67	17,23	8,26%
I	325,30	5,18	1,59%
K	341,93	11,68	3,42%
M	382,91	28,60	7,47%
O	395,07	28,93	7,32%
Q	285,24	21,59	7,57%
S	168,17	2,65	1,58%
B	204,00	5,78	2,83%
D	192,05	7,66	3,99%
F	169,21	9,44	5,58%
H	154,21	10,63	6,89%
J	185,44	3,31	1,78%
L	262,10	24,35	9,29%
N	238,04	4,95	2,08%
P	194,51	12,85	6,61%
R	170,16	8,05	4,73%
T	170,65	16,03	9,39%
		Moyenne	5,65%
		[Min - Max]	[1,58%-12,24%]

Tableau 10. Répétabilité (SMN). Ce tableau répertorie les moyennes, écarts-types et coefficients de variation de la concentration en transcrit *SMN*, obtenus sur 3 mesures réalisées en parallèle, pour chacun des échantillons.

La moyenne du coefficient de variation de la quantification relative de transcrit *SMN/TBP* est de 2,25% avec des valeurs comprises entre 0 et 4,67% (Tableau 11).

Echantillon	SMN/TBP		
	Moyenne	Ecart type	CV
A	0,89	0,02	2,28%
C	0,61	0,01	1,57%
E	0,68	0,03	3,82%
G	0,57	0,02	2,75%
I	0,65	0,01	1,33%
K	0,63	0,02	3,21%
M	0,70	0,01	1,68%
O	0,54	0,01	2,66%
Q	0,60	0,02	3,17%
S	0,57	0,01	1,72%
B	0,35	0,01	1,72%
D	0,36	0,02	4,53%
F	0,32	0,00	0,36%
H	0,37	0,01	3,13%
J	0,37	0,00	0,31%
L	0,48	0,02	4,67%
N	0,36	0,00	0,00%
P	0,38	0,01	3,14%
R	0,34	0,00	1,18%
T	0,42	0,01	1,81%
		Moyenne	2,25%
		[Min - Max]	[0%-4,67%]

Tableau 11. Répétabilité (SMN/TBP). Ce tableau répertorie les moyennes, écarts-types et coefficients de variation du rapport des concentrations en transcrit *SMN/TBP*, obtenus sur 3 mesures réalisées en parallèle, pour chacun des échantillons.

A la lecture de ces résultats, la quantification relative présente une variabilité bien inférieure à la quantification absolue avec, pour chacun des échantillons, un coefficient de variation inférieur à 5%.

6.2. Echantillons

6.2.1. Résultats bruts

Les résultats présentés ici correspondent aux concentrations moyennes des transcrits *TBP* et *SMN* ainsi que le ratio moyen des concentrations de transcrit *TBP/SMN* obtenues pour chacun des échantillons sur 3 dPCR (Tableaux 12 et 13).

Echantillon	Génotype	Concentration moyenne <i>TBP</i> (copies/ μ L)	Concentration moyenne <i>SMN</i> (copies/ μ L)	Ratio moyen <i>SMN/TBP</i>
A	0SMN1/4SMN2	524,52	465,85	0,89
C	0SMN1/4SMN2	644,57	390,57	0,61
E	0SMN1/4SMN2	641,28	435,21	0,68
G	0SMN1/4SMN2	365,96	208,67	0,57
I	0SMN1/4SMN2	498,44	325,30	0,65
K	0SMN1/4SMN2	543,00	341,93	0,63
M	0SMN1/4SMN2	544,55	382,91	0,70
O	0SMN1/4SMN2	728,41	395,07	0,54
Q	0SMN1/4SMN2	472,13	285,24	0,60
S	0SMN1/4SMN2	293,64	168,17	0,57
	Moyenne	525,65	339,89	0,64
	Ecart type	130,05	95,64	0,10

Tableau 12. Résultats obtenus dans le groupe de patient (génotype 0SMN1/4SMN2). Ce tableau répertorie les moyennes de la concentration en transcrit *TBP*, *SMN* et le rapport des concentrations en transcrit *SMN/TBP* obtenus sur 3 mesures réalisées en parallèle, pour chacun des échantillons du groupe 0SMN1/4SMN2.

Echantillon	Génotype	Concentration moyenne <i>TBP</i> (copies/ μ L)	Concentration moyenne <i>SMN</i> (copies/ μ L)	Ratio moyen <i>SMN/TBP</i>
B	1SMN1/0SMN2	581,24	204,00	0,35
D	1SMN1/0SMN2	539,31	192,05	0,36
F	1SMN1/0SMN2	529,94	169,21	0,32
H	1SMN1/0SMN2	416,44	154,21	0,37
J	1SMN1/0SMN2	500,69	185,44	0,37
L	1SMN1/0SMN2	541,15	262,10	0,48
N	1SMN1/0SMN2	615,26	238,04	0,36
P	1SMN1/0SMN2	514,81	194,51	0,38
R	1SMN1/0SMN2	496,90	170,16	0,34
T	1SMN1/0SMN2	408,83	170,65	0,42
	Moyenne	514,46	194,04	0,38
	Ecart type	64,51	33,44	0,05

Tableau 13. Résultats obtenus dans le groupe d'individus sains (génotype 1SMN1/0SMN2). Ce tableau répertorie les moyennes de la concentration en transcrit *TBP*, *SMN* et le rapport des concentrations en transcrit *SMN/TBP* obtenus sur 3 mesures réalisées en parallèle, pour chacun des échantillons du groupe 1SMN1/0SMN2.

6.2.2. Interprétation en quantification absolue

Lorsque nous comparons les concentrations moyennes de transcrit *TBP* de chacun des 2 groupes *1SMN1/OSMN2* et *0SMN1/4SMN2* en utilisant un test de Student bilatéral, nous n'observons pas de différence significative (Figure 16).

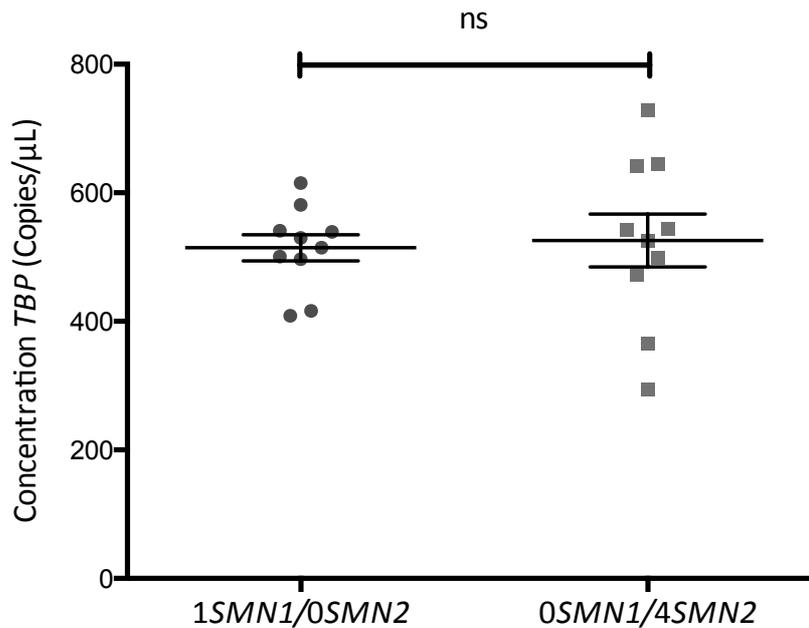


Figure 16. Comparaison de moyenne de la concentration en transcrit *TBP* dans chacun des deux groupes *1SMN1/OSMN2* vs *0SMN1/4SMN2*. En bleu sont représentées les valeurs moyennes pour chaque échantillon du groupe *1SMN1/OSMN2*. En rouge sont représentées les valeurs moyennes pour chaque échantillon du groupe *0SMN1/4SMN2*. ns : non significatif.

A l'inverse, lorsque nous comparons les concentrations moyennes de transcrit *SMN* de chacun des 2 groupes *1SMN1/OSMN2* et *0SMN1/4SMN2* en utilisant un test de Student unilatéral, nous observons que la concentration moyenne de transcrit *SMN* dans le groupe *0SMN1/4SMN2* est significativement supérieure celle du groupe *1SMN1/OSMN2* ($p=0,0001$) (Figure 17).

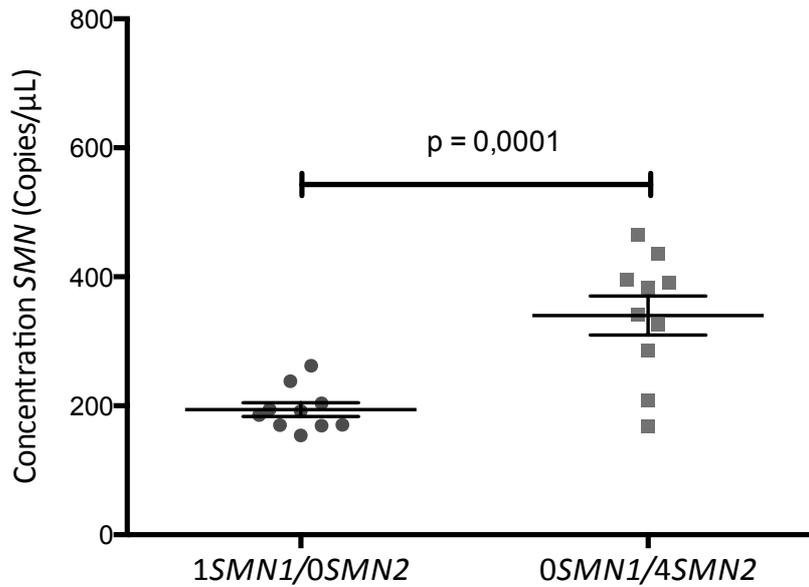


Figure 17. Comparaison de moyenne de la concentration en transcrit *SMN* dans chacun des deux groupes 1SMN1/OSMN2 vs OSMN1/4SMN2. En bleu sont représentées les valeurs moyennes pour chaque échantillon du groupe 1SMN1/OSMN2. En rouge sont représentées les valeurs moyennes pour chaque échantillon du groupe OSMN1/4SMN2. p : coefficient de significativité.

Sur les représentations graphiques (Figure 16), nous observons une grande variabilité dans la concentration de transcrit *TBP*, en particulier chez dans le groupe des patients (génotype OSMN1/4SMN2). Or, la concentration de ce transcrit produit par un gène de ménage ne devrait que peu varier d'un individu à l'autre.

Nous avons alors réalisé un test de corrélation entre le RINe de l'échantillon d'ARN (témoin de la qualité de l'ARN) et la concentration de transcrit *TBP*. Le test de corrélation de Pearson montre que cette concentration de transcrit est corrélée au RINe ($r=0,5231$) (Figure 18). Ce résultat montre qu'il existe une relation entre la concentration de transcrit (quantification absolue) et la qualité de l'ARN. Bien que d'autres éléments doivent entrer en compte dans la variabilité de la quantification des transcrits, ce résultat appelle à la plus grande prudence pour l'interprétation des résultats obtenus à partir de la seule quantification absolue.

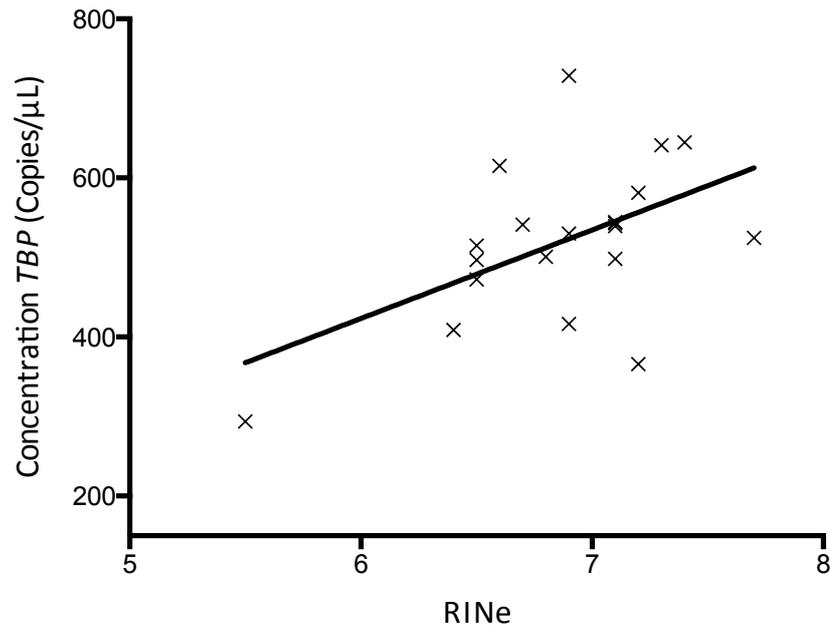


Figure 18. Corrélation RINe vs concentration en transcrit *TBP*. L'axe des abscisses représente le RINe, l'axe des ordonnées la concentration en transcrit *TBP*.

6.2.3. Interprétation en quantification relative

Lorsque l'on compare les moyennes des ratio de concentration de transcrit *SMN/TBP* (quantification relative) pour chacun des 2 groupes *1SMN1/OSMN2* et *OSMN1/4SMN2* en utilisant un test de Student unilatéral, nous observons que la quantité relative de transcrit *SMN* dans le groupe *OSMN1/4SMN2* est significativement supérieure celle du groupe *1SMN1/OSMN2* ($p < 0,0001$) (Figure 19).

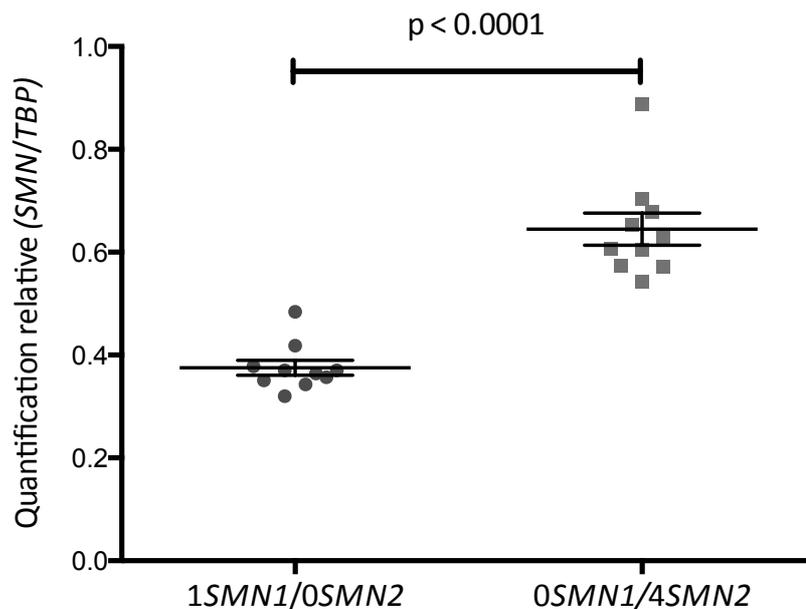


Figure 19. Comparaison de moyenne du rapport de la concentration en transcrit *SMN/TBP* dans chacun des deux groupes *1SMN1/OSMN2* vs *OSMN1/4SMN2*. En bleu sont représentées les valeurs moyennes pour chaque échantillon du groupe *1SMN1/OSMN2*. En rouge sont représentées les valeurs moyennes pour chaque échantillon du groupe *OSMN1/4SMN2*. Sur le graphique apparaît la conclusion du test statistique : p , la valeur du coefficient de significativité.

7. Discussion

Les dernières avancées thérapeutiques dans le traitement des patients atteints de SMA ont soulevé la nécessité de développer des échelles d'évaluation clinique fiables et reproductibles, et d'identifier des biomarqueurs utiles pour le suivi de la réponse des patients aux traitements pharmacologiques.

De nombreuses échelles d'évaluation clinique ont été développées et validées chez les patients atteints de SMA, comme l'échelle d'Hammersmith modifiée (Krosschell *et al.*, 2006). Lors de la conférence internationale de 2007, ces échelles permettant d'évaluer l'atteinte clinique des patients ont été intégrées dans la prise en charge standardisée des patients atteints de SMA (Wang *et al.*, 2007). Elles permettent d'évaluer l'évolution des patients sur le long terme mais semblent difficiles à utiliser pour l'évaluation des traitements pharmacologiques dans le cadre d'une pathologie d'évolution lente. Dans l'optique de développer le plus rapidement possible ces traitements pharmacologiques, il est nécessaire de développer des biomarqueurs permettant de juger l'efficacité du

traitement à court terme.

A l'heure actuelle, la quantification de produits du gène *SMN2* dans les leucocytes présents dans le sang périphérique est le seul biomarqueur disponible (quantification de transcrit ou de protéine (Sumner *et al.*, 2006). Récemment, des approches de protéomique, métabolomique et transcriptomique menée par le groupe BforSMA (*Biomarkers for SMA*) ont permis l'identification de différentes protéines et métabolites dont le suivi traduirait la progression de la maladie (Finkel *et al.*, 2012). Ces études ont permis le développement d'un panel commercial SMA-MAP, qu'il reste encore à évaluer (Kobayashi *et al.*, 2013).

Nous avons développé une nouvelle méthode permettant la quantification de transcrit *SMN* pleine longueur, dans les leucocytes issus du sang périphérique. Cette technique associe la transcription inverse à une technique de PCR numérique, plus sensible et plus reproductible que la PCR en temps réel.

Une étude sur la quantification de transcrit par RT-QMPSF a déjà été menée au sein de l'unité INSERM U614, à Rouen (Vezain *et al.*, 2011). Les résultats de cette étude montrant une corrélation faible entre le génotype des patients et la concentration relative en transcrit *SMN* pleine longueur imputée à la trop grande variabilité de la méthode, nous avons décidé de développer cette nouvelle technique de quantification.

Nous démontrons ici que la technique de transcription inverse couplée à la PCR numérique permet d'accéder à la quantification de transcrit dans le sang périphérique. Nous démontrons également que cette technique permet la quantification simultanée de deux transcrits. Cette méthode est très reproductible et la variabilité imputable à la PCR numérique semble peu importante. Nous notons cependant que l'étape limitante de cette technique est l'étape de transcription inverse. Cette étape est sensible à différents paramètres comme la qualité de l'ARN, le type d'amorce utilisé (hexamères aléatoires ou amorce spécifique de gène) et le choix de la transcriptase inverse.

Ce travail montre que la quantification de transcrits est dépendante de la qualité de l'ARN et qu'il convient de rester prudent sur les conclusions tirées à partir de la quantification

absolue de transcrit. Il reste donc préférable de réaliser simultanément une quantification relative du transcrit d'intérêt par rapport à un transcrit produit par un gène de ménage.

De manière surprenante, ce travail montre que la concentration de transcrit *SMN* pleine longueur est plus importante dans le groupe des patients, groupe *0SMN1/4SMN2*, que dans le groupe des porteurs sains de la délétion hétérozygote, groupe *1SMN1/0SMN2* et ceci tant en quantification absolue et qu'en quantification relative. Cette observation suggère que l'étape de transcription n'est pas le seul élément qui diffère lors de l'expression des gènes *SMN1* et *SMN2* mais qu'il existe également une différence de production de protéine par les transcrits *SMN1* et *SMN2* pleine longueur. En effet, le taux de protéine SMN fonctionnelle est l'élément fondamental de la physiopathologie de la SMA, l'hypothèse serait que la production de cette protéine fonctionnelle par le transcrit *SMN2* pleine longueur soit plus faible que celle issue du transcrit *SMN1* ou que la protéine SMN produite par le transcrit *SMN2* pleine longueur soit imparfaite.

Il faut cependant modérer cette conclusion par le fait que la quantification de transcrits a été réalisée sur sang périphérique. En effet, le profil d'expression des gènes *SMN1* et *SMN2* peut varier d'un type cellulaire à l'autre. Il est donc possible que ce profil d'expression soit différent selon que l'on s'intéresse aux motoneurones ou aux leucocytes.

Aucune étude, jusqu'à présent, n'a étudié aussi finement la limite entre la concentration de transcrit *SMN* pleine longueur chez les patients ayant le plus grand nombre de copies des gènes *SMN* (*0SMN1/4SMN2*) et les individus sains présentant le plus petit nombre de copie de ces gènes (*1SMN1/0SMN2*). Ceci rend difficile la comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature. En effet, la plupart des études considèrent un ensemble de témoins de génotypes variables ou, tout au plus, différencient les porteurs de la délétion à l'état hétérozygote des individus portant 2 copies du gène *SMN1* sans prendre en compte le nombre de copies du gène *SMN2*. Ces études intègrent donc l'ensemble des productions de transcrit *SMN* pleine longueur issu des gènes *SMN1* et *SMN2* comme une entité unique. De plus, la plupart des études classent les patients en fonction de leur phénotype (type de SMA) et non en fonction de leur génotype.

La première étude de quantification relative du transcrit *SMN* pleine longueur date de 2006 (Sumner *et al.*, 2006). Cette équipe a développé une technique de RT-qPCR (Transcription inverse couplée à la PCR en temps réel) ainsi qu'une technique de quantification de la protéine SMN sur le sang périphérique de 86 individus. Leurs résultats indiquent que le taux de transcrit *SMN* pleine longueur et le taux de protéine SMN sont corrélés au nombre de copies des gènes *SMN1* et *SMN2*. Ils ont également montré que, dans les cellules sanguines de patients atteints de SMA, 50% des transcrits *SMN2* contenaient l'exon 7 (transcrit pleine longueur). Dans cette étude, on peut remarquer que les taux de transcrit *SMN* pleine longueur des patients de génotypes *0SMN1/4SMN2* et *0SMN1/3SMN2* sont proches de ceux des individus de génotype *1SMN1/1SMN2*. De plus, Sumner *et al.* suggèrent que les niveaux de protéine SMN peuvent atteindre un plateau avec l'augmentation du nombre de copies du gène *SMN2* (plus de 2 à 3 copies) traduisant l'existence de mécanismes post-traductionnels qui régulent l'expression des protéines SMN.

En 2007, Simard *et al.* ont également mesuré les taux de transcrit *SMN* pleine longueur par RT-qPCR chez 42 patients atteints de SMA (Simard *et al.*, 2007). Cette équipe conclut qu'il n'existe pas de corrélation entre la quantité du transcrit *SMN* pleine longueur et le nombre de copies du gène *SMN2* ou le type SMA. Simard *et al.* suggèrent que l'absence de corrélation stricte entre le nombre de copies du gène *SMN2* et le taux de transcrit *SMN* pleine longueur est compatible avec le continuum de gravité clinique observée au sein d'un même type de SMA. Ils considèrent ainsi que tous les gènes *SMN2* ne sont pas égaux et que certains gènes *SMN2* peuvent ne pas être intacts ou peuvent abriter des mutations affectant l'expression ou l'épissage.

La même année, Vezain *et al.* développent une méthode de quantification de transcrit *SMN* pleine longueur par RT-QMPSF (Vezain *et al.*, 2011). Ils comparent les taux de transcrit dans le sang périphérique issu de 75 individus sains et 48 patients atteints de SMA, en fonction de leur génotype. Dans cette étude, les individus sains ont été génotypés de manière à obtenir deux groupes de témoins homogènes (génotype *2SMN1/1SMN2* et *2SMN1/2SMN2*). Cette équipe montre que les niveaux de transcrit *SMN* pleine longueur sont linéairement dépendant du nombre de copies du gène *SMN2*

chez les patients. Cette équipe montre un taux d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* de l'ordre de 50% dans le sang périphérique. Ils montrent également une corrélation inverse faible entre le niveau de transcrit *SMN* pleine longueur et la gravité de la maladie.

En 2010, Tiziano *et al.* étudient chez 51 patient atteints de SMA, 23 porteurs sains de la délétion hétérozygote du gène *SMN1* et 28 individus contrôles, les taux de transcrit *SMN* pleine longueur par RT-qPCR et, pour la première fois, réalisent une quantification absolue de ces transcrits grâce à l'utilisation d'une gamme de standard externe (Tiziano *et al.*, 2010). L'étude de Tiziano *et al.* montre que les concentrations de transcrit *SMN* pleine longueur mesurées par RT-qPCR sont plus faibles chez les patients atteints de SMA que chez les contrôles. Il n'est pas spécifié le nombre de copies du gène *SMN2* chez ces contrôles mais Tiziano *et al.* ont utilisé une méthode permettant de distinguer les transcrits *SMN1* et *SMN2* pleine longueur. Lorsque l'on regarde dans le détail les expériences de Tiziano *et al.* en isolant les patients *0SMN1/4SMN2*, leur concentration de transcrit *SMN2* pleine longueur est en moyenne de $75,70 \pm 26,91$ molécules/ng d'ARN. En comparant cette valeur à l'unique production du transcrit *SMN1* pleine longueur chez les porteurs de la délétion à l'état hétérozygote, $72,28 \pm 36,72$ molécules/ng d'ARN, nous observons que ces concentrations sont très proches. Ils ont également comparé la concentration de transcrit *SMN* pleine longueur et le nombre de copies du gène *SMN2* et n'ont pas trouvé de corrélation significative entre ces deux variables. Sur ce point, les conclusions diffèrent entre les différentes études. Selon Tiziano *et al.*, cette différence réside, au moins partiellement, dans l'utilisation de contrôles endogènes différents, utilisés pour la quantification relative et dont la concentration peut varier entre les différents individus.

Le groupe BforSMA a publié en 2012 une étude portant sur 108 patients atteints de SMA de différents types pour tenter de trouver un marqueur biologique dont la concentration dans le sang serait corrélée à la sévérité clinique (Crawford *et al.*, 2012). Par RT-qPCR, il montre ainsi que les sujets atteints d'une SMA de type I (le type le plus sévère) présentent la plus faible concentration de transcrit *SMN* pleine longueur et la plus faible

quantité de protéine confirmant ainsi les résultats de Tiziano *et al.*, 2010. Il affirme également que le nombre de copies de gène *SMN2* est corrélé au type de SMA.

Une partie de leur étude porte sur l'étude du transcrit *SMN2* pleine longueur, la conclusion évoque, sans présenter les résultats, qu'une corrélation existe entre la quantité de transcrit *SMN* pleine longueur et le type de SMA sans qu'il n'existe de corrélation entre le nombre de copies du gène *SMN2* et la concentration de transcrit.

Les différentes conclusions de ces études sont contradictoires, il semble difficile de montrer une corrélation forte entre le nombre de copies du gène *SMN2*, la quantité de transcrit *SMN* pleine longueur et le type de SMA. La variabilité des résultats peut provenir à la fois de la technique utilisée, RT-qPCR (peu reproductible), et de l'influence des différents gènes modificateurs qui modulent le phénotype. De plus, au moins un polymorphisme du gène *SMN2* est également connu pour induire une augmentation de l'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit issu de ce gène (Prior *et al.*, 2009; Vezain *et al.*, 2011). Différents mécanismes semblent donc moduler le phénotype : soit en compensant directement l'inactivation homozygote du gène *SMN1* (production de transcrit *SMN* pleine longueur par le gène *SMN2*), soit par des mécanismes indirects encore à élucider (gène *PSL3*) ou soit en modulant l'expression du gène *SMN2* (polymorphisme augmentant l'inclusion de l'exon 7). Tous ces mécanismes rendent complexe la compréhension des bases moléculaires de la SMA. Nos résultats viennent d'ailleurs surajouter un niveau de complexité dans la compréhension de cette pathologie. En effet, en comparant les patients à un groupe de témoin bien particulier, de génotype *1SMN1/0SMN2*, nous démontrons que ceux-ci présentent une concentration plus faible de transcrit *SMN* pleine longueur que les patients de génotype *0SMN1/4SMN2* suggérant, ainsi, une variabilité au niveau de la traduction du transcrit *SMN* pleine longueur qu'il soit issu du gène *SMN1* ou du gène *SMN2*.

Selon les séquences de référence RefSeq, nous observons deux variations nucléotidiques entre les séquences des transcrits *SMN1* (NM_000344.3) et *SMN2* (NM_017411.3) pleine longueur. La première variation est en c.840, c.840C dans *SMN1* et c.840T dans *SMN2*, située en +6 de l'exon 7 est la variation à l'origine de la différence d'épissage entre les pré-ARNm

issus des gènes *SMN1* et *SMN2* (Figure 20). Au niveau de la séquence protéique, cette variation est dite synonyme, c'est à dire qu'elle n'entraîne pas de substitution de l'acide aminé concerné. Ceci est la conséquence de la redondance du code génétique : un acide aminé peut être codé par un ou plusieurs codons. La deuxième variation en c.*239, c.*239A dans *SMN1* et c.*239G dans *SMN2*, n'affecte pas non plus la séquence en acide aminé de la protéine car elle est située en aval du codon stop, dans la région 3'UTR (3' *Untranslated Region*), transcrite non traduite. Bien que ces mutations n'aient pas d'impact sur la structure primaire de la protéine (séquence en acides aminés), il est maintenant acquis que des variations, dites silencieuses, peuvent jouer un rôle dans l'expression génique.

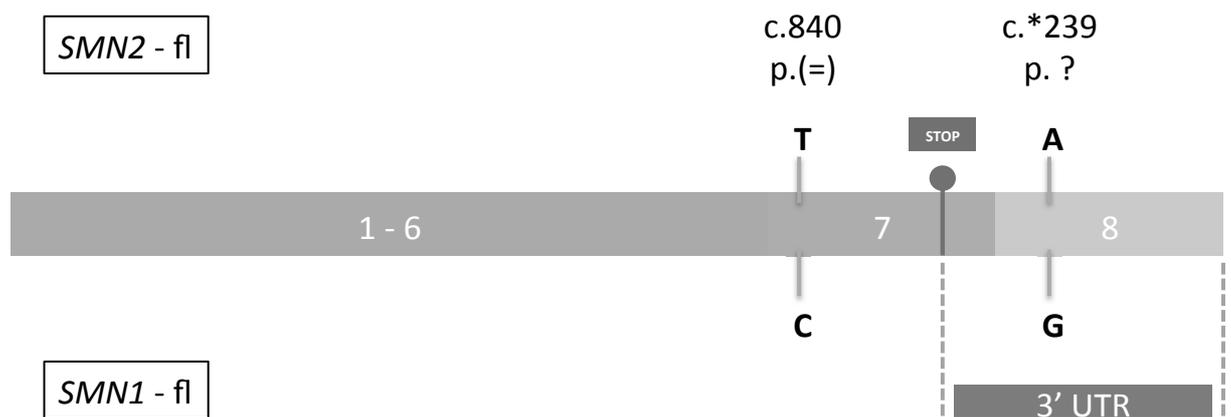


Figure 20. Schéma des transcrits *SMN1* et *SMN2* pleine longueur. Deux variations nucléotidiques différencient ces deux transcrits. Les deux variations sont situées dans les exons 7 et 8. La partie haute du schéma représente la séquence nucléotidique du transcrit *SMN2* pleine longueur et la description de ces variations par rapport à la séquence du gène *SMN1*. La partie basse du schéma représente la séquence nucléotidique du transcrit *SMN1* pleine longueur. En rouge est représentée la position du codon stop et en gris la région 3' UTR.

Hypothèse 1 : Les variations en c.840 et/ou c.*239 sur le transcrit *SMN2* pleine longueur ont un impact sur la formation de la particule ribonucléoprotéique.

Chez les eucaryotes, la molécule d'ARN, synthétisée à partir de la molécule d'ADN dans le noyau, subit, au fur et à mesure de sa synthèse, plusieurs évènements de maturation qui vont la modeler en une forme lisible par la machinerie de traduction. Il s'agit de remaniements de la molécule d'ARN (épissage), mais aussi d'association avec des facteurs protéiques (Mitchell and Parker, 2014), de longs (Yoon *et al.*, 2013) et de petits ARN non codants (ncRNAs, *non coding RNA*) (Maute *et al.*, 2014) qui se fixent sur l'ARN pour le protéger de la dégradation et surtout lui conférer une identité qui déterminera son devenir. Cette structure est appelée particule ribonucléoprotéique ou mRNP (*messenger ribonucleoprotein particle*). Au terme de la transcription, la particule ribonucléoprotéique qui contient l'ARN est relâchée du site de transcription et exportée vers le cytoplasme pour y être traduite en protéine (Figure 21).

L'assemblage d'un mRNP affecte presque toutes les étapes de la transcription et de la traduction. Ce complexe facilite le coiffage en 5' de l'ARN, intervient dans l'épissage (Reed, 2003), dans le clivage en 3' et lors de la polyadénylation (Gott and Emeson, 2000). Ce complexe intervient dans l'exportation de l'ARN du noyau vers le cytoplasme (Björk and Wieslander, 2014) et dans le contrôle de sa dégradation (Eberle and Visa, 2014).

Tous les constituants du mRNP s'associent au pré-ARNm ou à l'ARNm d'une manière spécifique de la séquence. Ainsi, l'association de composants du mRNP avec un ARNm est régi par une spécificité de séquence (Mitchell and Parker, 2014).

De plus, la séquence primaire nucléotidique détermine la structure secondaire de l'ARNm (Mortimer *et al.*, 2014). La structure secondaire est formée par appariement des acides nucléiques créant ainsi des tiges, des boucles et des épingles à cheveux. La forme finale d'un ARNm est aussi reconnue par les composants du mRNP et d'autres ligands (Mauger *et al.*, 2013). Cela implique donc qu'une variation nucléotidique qu'elle soit synonyme ou qu'elle touche une séquence non traduite, peut fortement influencer la nature du complexe mRNP ultérieur (Bali and Bebok, 2015). Les variations situées en c.840 et c.*239 pourrait, par modification de la structure primaire ou secondaire de l'ARNm, entraîner un défaut d'assemblage du mRNP. Cet assemblage peut influencer l'ensemble des étapes qui

va de la transcription jusqu'à la dégradation de l'ARNm et qui comprend aussi bien les étapes d'exportation de l'ARNm depuis le noyau vers le cytoplasme, l'initiation de la traduction ou le recrutement des facteurs d'élongation.

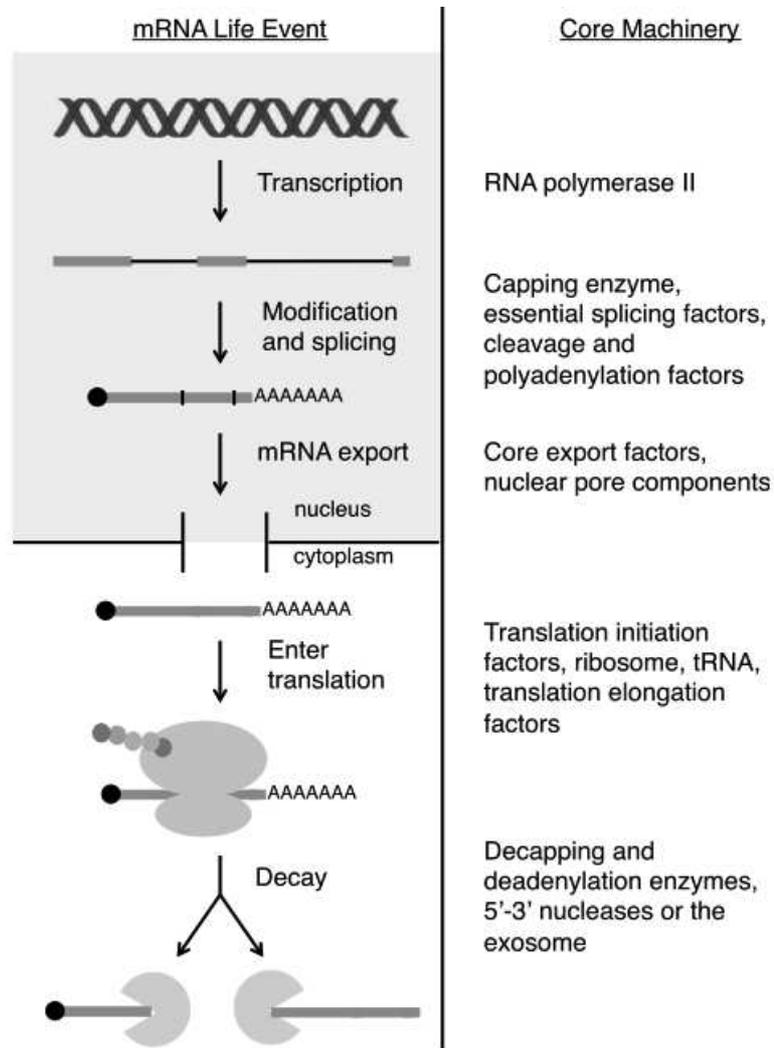


Figure 21. Assemblage de la particule ribonucléoprotéique au cours de la vie de l'ARN. La majorité des ARNm sont métabolisés selon ce schéma. Les étapes les plus essentielles sont résumées sur la partie gauche du schéma. Les principaux éléments qui s'associent à l'ARN durant ces étapes sont répertoriés sur la droite du schéma. Les ARNm sont transcrits, modifiés : les introns sont éliminés lors de l'épissage. Ensuite l'ARNm mature est exporté à partir du noyau à travers le pore nucléaire. Dans le cytoplasme, la mRNP est remodelée avant et pendant la traduction. La traduction implique de multiples étapes (l'initiation, l'élongation et la terminaison). Ces différentes étapes sont médiées via le ribosome et un certain nombre de facteurs. Finalement, cet ARNm est dégradé (Mitchell and Parker, 2014).

Hypothèse 2 : la variation en c.840 sur le transcrit *SMN2* pleine longueur entraine un ralentissement de la vitesse de traduction.

Comme nous l'avons déjà expliqué plus haut, il existe dans le code génétique des redondances, c'est à dire que plusieurs codons peuvent être associés à un même acide aminé. Une variation peut donc être dite « silencieuse » si elle n'entraîne pas de changement d'acide aminé au niveau de la structure primaire de la protéine. Lors de la traduction qui permet la synthèse de la protéine à partir de l'ARNm, les acides aminés sont apportés au ribosome par de petits ARN de transfert, ARNt. Ces ARNt peuvent s'hybrider de manière spécifique à la matrice d'ARNm et fournir ainsi au ribosome l'acide aminé spécifique correspondant à la séquence nucléotidique. Si tous les codons synonymes sont bien équivalents, on pourrait s'attendre à ce qu'ils soient répartis de manière homogène le long des séquences codantes pour les protéines. Or, différentes études ont montré que la distribution des codons n'était pas aléatoire, c'est ce que l'on appelle le biais de codon (Sharp and Li, 1986). De plus, il est démontré qu'il existe, chez les organismes unicellulaires, une corrélation positive entre la fréquence des codons et la concentration en ARNt avec un anticodon complémentaire : plus un codon est représenté dans le génome, plus la concentration de l'ARNt correspondant est élevée (Kanaya *et al.*, 1999). Plusieurs variations importantes de biais codon ont été récemment découvertes, tels que l'existence d'enchaînement de codons rares à l'extrémité 5' des séquences codantes pour des protéines, séquences qui sont donc traduites lentement (Tuller and Zur, 2015) ou la co-occurrence de certains codons, lorsque deux codons successifs codent pour le même acide aminé, l'utilisation du même ARN de transfert est favorisé (Cannarozzi *et al.*, 2010). Cette utilisation de codon rare influe sur la vitesse de traduction et affecte directement les niveaux d'expression des protéines, elle influe également sur leur repliement (structure tertiaire) (Pechmann and Frydman, 2013) et la régulation différentielle de leur expression (Gingold *et al.*, 2014). La variation nucléotidique située en c.840 des gènes *SMN1* et *SMN2* entraine une variation de codon en position p.280 de la protéine SMN. Le transcrit *SMN1* contient le codon UUC qui est retrouvé, chez l'homme, à la fréquence de 2,03% des codons contenus dans les séquences codantes pour les protéines. Le transcrit *SMN2* contient le codon UUU qui, lui, est retrouvé, chez l'homme à la fréquence de 1,76% (<http://gtrnadb.ucsc.edu/>). Les fréquences sont très

proches. De plus, pour certains codons dont le codon UUU, il n'existe aucun gène codant pour l'ARNt présentant l'anti-codon complémentaire. En effet, dans une certaine mesure, l'appariement des ARNt avec l'ARN peut se faire de manière imparfaite au niveau de la troisième base du codon, ce phénomène est appelé *wobble base-pairing* (Pour revue : Mauro and Chappell, 2014). Ceci permet qu'un ARNt puisse s'apparier avec plusieurs codons synonymes. L'ARNt qui s'apparie aux deux codons UUC et UUU est donc le même. Si l'on peut écarter l'hypothèse d'un ralentissement de la vitesse de traduction par l'utilisation d'un codon rare, en revanche l'hypothèse d'un ralentissement de la vitesse de traduction par un phénomène de *wobble base-pairing* est très intéressante. En effet, il a été démontré récemment que ces phénomènes de *wobble base-pairing*, pouvait diminuer jusqu'à 3 fois la vitesse de traduction dans les cellules HeLa, en particulier l'appariement imparfait via une liaison G:U comparé à la liaison G:C (Stadler and Fire, 2011). La variation en c.840 implique ce type d'appariement imparfait. Il est donc possible que cette variation soit à l'origine d'un ralentissement de la traduction, non pas par l'utilisation d'un codon rare mais par un appariement imparfait, entraînant un repliement inapproprié de la protéine. Ce repliement inapproprié pourrait modifier en partie la fonctionnalité de la protéine ou sa stabilité.

Hypothèse 3 : la variation en c.*239 du transcrit *SMN* pleine longueur crée ou supprime un site de fixation pour un miARN

Nous pouvons également émettre l'hypothèse que la variation en c.*239 située dans la région 3' non traduite puisse également affecter la traduction de la protéine SMN par le transcrit *SMN2* pleine longueur. En effet, les régions transcrites, non traduites peuvent également jouer un rôle dans l'expression génique par différents mécanismes, elle contiennent, comme nous l'avons dit, des régions spécifiques permettant la fixation d'un certain nombre de protéines mais également des sites de fixations pour les miARN (micro-ARN) (Pichon *et al.*, 2012). Les miARN sont de petits ARN non codants qui peuvent à la fois réprimer l'expression des gènes en modifiant la stabilité de l'ARNm, en inhibant la traduction des protéines ou en dégradant les polypeptides mais aussi activer leur expression (Valinezhad Orang *et al.*, 2014). Les miARN agissent associés à des protéines

au sein de complexes, les miRNP (*micro RiboNucleoParticule*), ils permettent la fixation spécifique du complexe (Valinezhad Orang *et al.*, 2014). Nous pourrions donc imaginer que la variation en c.*239 soit à l'origine de la création ou de la disparition d'un site de fixation d'un miARN modulant ainsi la traduction du transcrit *SMN2* pleine longueur.

Il peut donc exister plusieurs pistes pour expliquer nos résultats qui vont à l'encontre des hypothèses de la littérature : le phénotype observé chez les patients atteints de SMA résulte d'un défaut de production du transcrit *SMN* pleine longueur à l'origine d'une diminution de la quantité de protéine SMN fonctionnelle, protéine nécessaire à la survie des motoneurones. Nous montrons ici qu'un certain nombre de patients est capable de produire une quantité plus importante de transcrit *SMN* pleine longueur que les porteurs sains de la délétion du gène *SMN1* à l'état hétérozygote.

Dans l'hypothèse que le défaut en protéine SMN fonctionnelle est à l'origine du phénotype alors ces résultats suggèrent que les transcrits *SMN1* pleine longueur et *SMN2* pleine longueur ne sont pas équivalents. Jusqu'ici, personne n'a évoqué l'hypothèse selon laquelle un défaut dans le processus de la traduction pouvait, également, différencier l'expression des gènes *SMN1* et *SMN2*, soit par une diminution de la production de protéine, soit par la production d'une protéine imparfaite. Pour confirmer cette hypothèse, il est fondamental de poursuivre cette étude au niveau protéique. Tout d'abord, il est nécessaire de quantifier la protéine SMN dans chacun des deux groupes étudiés ici. Il faut également étudier la fonction et la stabilité de la protéine qu'elle soit traduite à partir du transcrit *SMN1* pleine longueur ou du transcrit *SMN2* pleine longueur.

8. Conclusion

Nous avons développé et validé une méthode de quantification du transcrit *SMN* pleine longueur par PCR numérique couplée à une transcription inverse.

Cette nouvelle méthode nous a permis d'accéder au taux de transcrit *SMN* pleine longueur à partir du sang périphérique de patients de génotype *0SMN1/4SMN2* et des individus sains de génotype *1SMN1/0SMN2*. Ces deux groupes représentent chacun un génotype extrême : le génotype *0SMN1/4SMN2*, 4 copies du gène *SMN2* est le plus grand

nombre de copies du gène *SMN2* pouvant être associé à une inactivation à l'état homozygote du gène *SMN1* chez les patients atteints de SMA tandis que le le génotype *1SMN1/0SMN2*, 1 gène *SMN1* et 0 gène *SMN2* est le plus faible nombre de gène *SMN* pouvant être retrouvé dans la population générale.

De manière inattendue, la concentration relative de transcrit *SMN* pleine longueur est plus importante chez les patients que chez les témoins, respectivement 0,64 et 0,38. Ces résultats surprenants que nous observons, soulèvent des questions importantes pour la compréhension des bases moléculaires de la SMA. Ces résultats suggèrent que, non seulement l'expression du gène *SMN2* diffère du gène *SMN1*, par un mécanisme de maturation du pré-ARN différent mais, fait nouveau, également lors des étapes post-transcriptionnelles.

Pour étudier les différentes pistes évoquées dans ce travail, il est nécessaire de poursuivre l'étude par la quantification de la protéine SMN (Western-Blot) et l'étude de sa fonctionnalité et de sa stabilité (Western-Blot après traitement par cycloheximide), qu'elle soit codée par le gène *SMN1* ou par le gène *SMN2*.



CONSENTEMENT ÉCRIT POUR UNE ÉTUDE GÉNÉTIQUE
À DES FINS DE RECHERCHE

Je soussigné(e), Monsieur, Madame (1) -----atteste que conformément aux prescriptions de l'article R. 145-15-4 du Code de la Santé Publique, j'ai donné mon accord pour que soit effectuée une analyse génétique à partir d'un prélèvement biologique.

- sur moi-même
 sur mon enfant mineur (2)

Cette analyse repose sur l'étude de mon patrimoine génétique (ADN, ARN). L'objectif de cette étude est la mise au point d'une méthode de quantification des ARNm (ARNm) dans le but de déterminer le seuil d'ARNm SMN à produire au cours des essais cliniques chez des personnes atteintes d'amyotrophie spinale infantile.

Cette prise de sang ne pourra être utilisée à une autre fin, sans mon accord préalable.

Fait à _____, le _____

Signature (3)

Visa du médecin demandant l'étude génétique

- (1) Rayer la mention inutile
(2) - Préciser le lien de parenté pour l'étude sur le mineur
(3) - Nécessité : signature des titulaires de l'autorité parentale

Annexe 1. Modèle de consentement écrit. Les consentements remplis par les individus inclus dans cette étude et leur médecin sont disponibles au laboratoire.

Bibliographie

- Bali, V., and Bebok, Z. (2015). Decoding mechanisms by which silent codon changes influence protein biogenesis and function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *64*, 58–74.
- Bénazeth, S., Boniface, M., Demarquilly, C., Lasserre, V., Lemdani, M., and Nicolis, I. (2003). *Biomathématiques* (MASSON).
- Bertini, E., Burghes, A., Bushby, K., Estournet-Mathiaud, B., Finkel, R.S., Hughes, R. a. C., *et al.* (2005). 134th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Treatment of Spinal Muscular Atrophy, 11-13 February 2005, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord. NMD* *15*, 802–816.
- Björk, P., and Wieslander, L. (2014). Mechanisms of mRNA export. *Semin. Cell Dev. Biol.* *32*, 47–54.
- Black, D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 291–336.
- Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Drouot, C., Galéa, P., Delaage, P., *et al.* (2007). Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *322*, 709–720.
- Boulisfane, N., Choleza, M., Rage, F., Neel, H., Soret, J., and Bordonné, R. (2011). Impaired minor tri-snRNP assembly generates differential splicing defects of U12-type introns in lymphoblasts derived from a type I SMA patient. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 641–648.
- Bowerman, M., Shafey, D., and Kothary, R. (2007). Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J. Mol. Neurosci.* *MN 32*, 120–131.
- Brichta, L., Garbes, L., Jedrzejowska, M., Grellscheid, S.-N., Holker, I., Zimmermann, K., *et al.* (2008). Nonsense-mediated messenger RNA decay of survival motor neuron 1 causes spinal muscular atrophy. *Hum. Genet.* *123*, 141–153.
- Brzustowicz, L.M., Lehner, T., Castilla, L.H., Penchaszadeh, G.K., Wilhelmsen, K.C., Daniels, R., *et al.* (1990). Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* *344*, 540–541.
- Buchthal, F., and Olsen, P.Z. (1970). Electromyography and muscle biopsy in infantile spinal muscular atrophy. *Brain J. Neurol.* *93*, 15–30.
- Bürglen, L., Amiel, J., Viollet, L., Lefebvre, S., Burlet, P., Clermont, O., *et al.* (1996). Survival motor neuron gene deletion in the arthrogyrosis multiplex congenita-spinal muscular atrophy association. *J. Clin. Invest.* *98*, 1130–1132.

- Bustin, S.A., and Nolan, T. (2004). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J. Biomol. Tech. JBT* 15, 155–166.
- Cannarozzi, G., Cannarozzi, G., Schraudolph, N.N., Faty, M., von Rohr, P., Friberg, M.T., *et al.* (2010). A role for codon order in translation dynamics. *Cell* 141, 355–367.
- Cartegni, L., and Krainer, A.R. (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* 30, 377–384.
- Cartegni, L., Hastings, M.L., Calarco, J.A., de Stanchina, E., and Krainer, A.R. (2006). Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 63–77.
- Chabrol, B., Mancini, J., Dulac, O., Ponsot, G., and Arthuis, M. (2010). *Neurologie pédiatrique. (Médecine-Sciences Flammarion)*, pp. 689–693, 740–751, 761–767.
- Chang, H.-C., Hung, W.-C., Chuang, Y.-J., and Jong, Y.-J. (2004). Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem. Int.* 45, 1107–1112.
- Cobben, J.M., van der Steege, G., Grootsholten, P., de Visser, M., Scheffer, H., and Buys, C.H. (1995). Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 805–808.
- Covert, D.D., Le, T.T., McAndrew, P.E., Strasswimmer, J., Crawford, T.O., Mendell, J.R., *et al.* (1997). The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1205–1214.
- Crawford, T.O., Paushkin, S.V., Kobayashi, D.T., Forrest, S.J., Joyce, C.L., Finkel, R.S., *et al.* (2012). Evaluation of SMN protein, transcript, and copy number in the biomarkers for spinal muscular atrophy (BforSMA) clinical study. *PLoS One* 7, e33572.
- Cuisset, J.-M., Estournet, B., and French Ministry of Health (2012). Recommendations for the diagnosis and management of typical childhood spinal muscular atrophy. *Rev. Neurol. (Paris)* 168, 902–909.
- Cuscó, I., Barceló, M.J., Rojas-García, R., Illa, I., Gámez, J., Cervera, C., *et al.* (2006). SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings. *J. Neurol.* 253, 21–25.
- D’Amico, A., Mercuri, E., Tiziano, F.D., and Bertini, E. (2011). Spinal muscular atrophy. *Orphanet J. Rare Dis.* 6, 71.

- Dubowitz, V. (1999). Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 3, 49–51.
- Eberle, A.B., and Visa, N. (2014). Quality control of mRNP biogenesis: networking at the transcription site. *Semin. Cell Dev. Biol.* 32, 37–46.
- Fan, L., and Simard, L.R. (2002). Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1605–1614.
- Feldkötter, M., Schwarzer, V., Wirth, R., Wienker, T.F., and Wirth, B. (2002). Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 358–368.
- Finkel, R.S., Crawford, T.O., Swoboda, K.J., Kaufmann, P., Juhasz, P., Li, X., *et al.* (2012). Candidate proteins, metabolites and transcripts in the Biomarkers for Spinal Muscular Atrophy (BforSMA) clinical study. *PLoS One* 7, e35462.
- Gabanella, F., Butchbach, M.E.R., Saieva, L., Carissimi, C., Burghes, A.H.M., and Pellizzoni, L. (2007). Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One* 2, e921.
- Gavrilov, D.K., Shi, X., Das, K., Gilliam, T.C., and Wang, C.H. (1998). Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat. Genet.* 20, 230–231.
- Gingold, H., Tehler, D., Christoffersen, N.R., Nielsen, M.M., Asmar, F., Kooistra, S.M., *et al.* (2014). A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation. *Cell* 158, 1281–1292.
- Glascocock, J.J., Osman, E.Y., Wetz, M.J., Krogman, M.M., Shababi, M., and Lorson, C.L. (2012). Decreasing disease severity in symptomatic, *Smn*(-/-);*SMN2*(+/+), spinal muscular atrophy mice following scAAV9-SMN delivery. *Hum. Gene Ther.* 23, 330–335.
- Gogliotti, R.G., Cardona, H., Singh, J., Bail, S., Emery, C., Kuntz, N., *et al.* (2013). The DcpS inhibitor RG3039 improves survival, function and motor unit pathologies in two SMA mouse models. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4084–4101.
- Gott, J.M., and Emeson, R.B. (2000). Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu. Rev. Genet.* 34, 499–531.
- Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA N. Y.* 6, 1197–1211.

Grotto, S. (2013). Amyotrophie Spinale Proximale Type Ia : Caractérisation du phénotype pré- et postnatal à partir de 12 patients porteurs d'un génotype *OSMN1/1SMN2*. Th D Méd, Univ Rouen.

Hahnen, E., Forkert, R., Marke, C., Rudnik-Schöneborn, S., Schönling, J., Zerres, K., *et al.* (1995). Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 1927–1933.

Hausmanowa-Petrusewicz, I. (1988). Electrophysiological findings in childhood spinal muscular atrophies. *Rev. Neurol. (Paris)* *144*, 716–720.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* *6*, 986–994.

Helmken, C., Hofmann, Y., Schoenen, F., Oprea, G., Raschke, H., Rudnik-Schöneborn, S., *et al.* (2003). Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum. Genet.* *114*, 11–21.

Hendrickson, B.C., Donohoe, C., Akmaev, V.R., Sugarman, E.A., Labrousse, P., Boguslavskiy, L., *et al.* (2009). Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America. *J. Med. Genet.* *46*, 641–644.

Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte, E.N., Ruf, I.K., Hindson, B.J., *et al.* (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods* *10*, 1003–1005.

Hoffman, J. (1893). Ueber chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiärer Basis. *Dtsch. Z Nervenheilk* *3* (427–470).

Hoffman, J. (1900). Ueber die hereditäre progressive spinale Muskelatrophie im Kindesalter. *Munchen Med Wschr* *47* (1649–1651).

Hua, Y., Vickers, T.A., Baker, B.F., Bennett, C.F., and Krainer, A.R. (2007). Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol.* *5*, e73.

Huggett, J.F., Foy, C.A., Benes, V., Emslie, K., Garson, J.A., Haynes, R., *et al.* (2013). The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin. Chem.* *59*, 892–902.

Jarecki, J., Chen, X., Bernardino, A., Coover, D.D., Whitney, M., Burghes, A., *et al.* (2005). Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 2003–2018.

- Kanaya, S., Yamada, Y., Kudo, Y., and Ikemura, T. (1999). Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* 238, 143–155.
- Kashima, T., and Manley, J.L. (2003). A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 34, 460–463.
- Kashima, T., Rao, N., David, C.J., and Manley, J.L. (2007). hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum. Mol. Genet.* 16, 3149–3159.
- Kobayashi, D.T., Shi, J., Stephen, L., Ballard, K.L., Dewey, R., Mapes, J., *et al.* (2013). SMA-MAP: a plasma protein panel for spinal muscular atrophy. *PloS One* 8, e60113.
- Kornblihtt, A.R., Schor, I.E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., and Muñoz, M.J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 153–165.
- Krosschell, K.J., Maczulski, J.A., Crawford, T.O., Scott, C., and Swoboda, K.J. (2006). A modified Hammersmith functional motor scale for use in multi-center research on spinal muscular atrophy. *Neuromuscul. Disord.* NMD 16, 417–426.
- Kugelberg, E., and Welander, L. (1956). Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* 75, 500–509.
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., *et al.* (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165.
- Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., *et al.* (1997). Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 16, 265–269.
- Lim, S.R., and Hertel, K.J. (2001). Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing. *J. Biol. Chem.* 276, 45476–45483.
- Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1996). A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 15, 3555–3565.
- Lorson, C.L., and Androphy, E.J. (2000). An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum. Mol. Genet.* 9, 259–265.
- Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J., and Wirth, B. (1999). A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6307–6311.

- Lunke, S., and El-Osta, A. (2013). Applicability of histone deacetylase inhibition for the treatment of spinal muscular atrophy. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *10*, 677–687.
- Lunn, M.R., and Wang, C.H. (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet Lond. Engl.* *371*, 2120–2133.
- Magalon, K., Zimmer, C., Cayre, M., Khaldi, J., Bourbon, C., Robles, I., *et al.* (2012). Olesoxime accelerates myelination and promotes repair in models of demyelination. *Ann. Neurol.* *71*, 213–226.
- Mauger, D.M., Siegfried, N.A., and Weeks, K.M. (2013). The genetic code as expressed through relationships between mRNA structure and protein function. *FEBS Lett.* *587*, 1180–1188.
- Mauro, V.P., and Chappell, S.A. (2014). A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends Mol. Med.* *20*, 604–613.
- Maute, R.L., Dalla-Favera, R., and Basso, K. (2014). RNAs with multiple personalities. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *5*, 1–13.
- McWhorter, M.L., Monani, U.R., Burghes, A.H.M., and Beattie, C.E. (2003). Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J. Cell Biol.* *162*, 919–931.
- Melki, J., Sheth, P., Abdelhak, S., Burlet, P., Bachelot, M.F., Lathrop, M.G., *et al.* (1990). Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet Lond. Engl.* *336*, 271–273.
- Mitchell, S.F., and Parker, R. (2014). Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell* *54*, 547–558.
- Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H., *et al.* (1999). A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1177–1183.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., and Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* *24*, 954–958, 960, 962.
- Mortimer, S.A., Kidwell, M.A., and Doudna, J.A. (2014). Insights into RNA structure and function from genome-wide studies. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 469–479.
- Munsat, T.L., and Davies, K.E. (1992). International SMA consortium meeting. (26–28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul. Disord. NMD* *2*, 423–428.

- Nurputra, D.K., Lai, P.S., Harahap, N.I.F., Morikawa, S., Yamamoto, T., Nishimura, N., *et al.* (2013). Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials. *Ann. Hum. Genet.* *77*, 435–463.
- Ogino, S., Leonard, D.G.B., Rennert, H., Ewens, W.J., and Wilson, R.B. (2002). Genetic risk assessment in carrier testing for spinal muscular atrophy. *Am. J. Med. Genet.* *110*, 301–307.
- Ogino, S., Wilson, R.B., and Gold, B. (2004). 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. EJHG* *12*, 1015–1023.
- Oprea, G.E., Kröber, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Müller, S., Krawczak, M., *et al.* (2008). Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* *320*, 524–527.
- Pagani, F., and Baralle, F.E. (2004). Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 389–396.
- Paushkin, S., Gubitza, A.K., Massenet, S., and Dreyfuss, G. (2002). The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 305–312.
- Pechmann, S., and Frydman, J. (2013). Evolutionary conservation of codon optimality reveals hidden signatures of cotranslational folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 237–243.
- Pellizzoni, L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2002). Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* *298*, 1775–1779.
- Petit, F., Cuisset, J.-M., Rouaix-Emery, N., Cancés, C., Sablonnière, B., Bieth, E., *et al.* (2011). Insights into genotype-phenotype correlations in spinal muscular atrophy: a retrospective study of 103 patients. *Muscle Nerve* *43*, 26–30.
- Pfaffl, M.W. (2004). *A-Z of quantitative PCR* (S.A. Bustin).
- Pichon, X., Wilson, L.A., Stoneley, M., Bastide, A., King, H.A., Somers, J., *et al.* (2012). RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation. *Curr. Protein Pept. Sci.* *13*, 294–304.
- Porensky, P.N., and Burghes, A.H.M. (2013). Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum. Gene Ther.* *24*, 489–498.
- Prior, T.W., Krainer, A.R., Hua, Y., Swoboda, K.J., Snyder, P.C., Bridgeman, *et al.* (2009). A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 408–413.

- Prior, T.W., Snyder, P.J., Rink, B.D., Pearl, D.K., Pyatt, R.E., Mihal, D.C., *et al.* (2010). Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *Am. J. Med. Genet. A.* *152A*, 1608–1616.
- Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 326–331.
- Rochette, C.F., Gilbert, N., and Simard, L.R. (2001). SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens*. *Hum. Genet.* *108*, 255–266.
- Shafey, D., MacKenzie, A.E., and Kothary, R. (2008). Neurodevelopmental abnormalities in neurosphere-derived neural stem cells from SMN-depleted mice. *J. Neurosci. Res.* *86*, 2839–2847.
- Sharp, P.M., and Li, W.H. (1986). An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. *J. Mol. Evol.* *24*, 28–38.
- Simard, L.R., Bélanger, M.-C., Morissette, S., Wride, M., Prior, T.W., and Swoboda, K.J. (2007). Preclinical validation of a multiplex real-time assay to quantify SMN mRNA in patients with SMA. *Neurology* *68*, 451–456.
- Singh, R.N. (2007). Evolving concepts on human SMN pre-mRNA splicing. *RNA Biol.* *4*, 7–10.
- Singh, J., Salcius, M., Liu, S.-W., Staker, B.L., Mishra, R., Thurmond, J., *et al.* (2008). DcpS as a therapeutic target for spinal muscular atrophy. *ACS Chem. Biol.* *3*, 711–722.
- Singh, N.N., Androphy, E.J., and Singh, R.N. (2004). An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*, 381–388.
- Singh, N.N., Lee, B.M., and Singh, R.N. (2015). Splicing regulation in spinal muscular atrophy by an RNA structure formed by long-distance interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1341*, 176–187.
- Soler-Botija, C., Cuscó, I., Caselles, L., López, E., Baiget, M., and Tizzano, E.F. (2005). Implication of fetal SMN2 expression in type I SMA pathogenesis: protection or pathological gain of function? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 215–223.
- Stadler, M., and Fire, A. (2011). Wobble base-pairing slows *in vivo* translation elongation in metazoans. *RNA N. Y. N* *17*, 2063–2073.
- Sumner, C.J., Huynh, T.N., Markowitz, J.A., Perhac, J.S., Hill, B., Coovert, D.D., *et al.* (2003). Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann. Neurol.* *54*, 647–654.

- Sumner, C.J., Kolb, S.J., Harmison, G.G., Jeffries, N.O., Schadt, K., Finkel, R.S., *et al.* (2006). SMN mRNA and protein levels in peripheral blood: biomarkers for SMA clinical trials. *Neurology* *66*, 1067–1073.
- Sykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hughes, E., Condon, J., and Morley, A.A. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques* *13*, 444–449.
- Taylor, J.E., Thomas, N.H., Lewis, C.M., Abbs, S.J., Rodrigues, N.R., Davies, K.E., *et al.* (1998). Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *6*, 467–474.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., and Pfaffl, M.W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* *31*, e122.
- Tisdale, S., and Pellizzoni, L. (2015). Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *35*, 8691–8700.
- Tiziano, F.D., Pinto, A.M., Fiori, S., Lomastro, R., Messina, S., Bruno, C., *et al.* (2010). SMN transcript levels in leukocytes of SMA patients determined by absolute real-time PCR. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *18*, 52–58.
- Tuller, T., and Zur, H. (2015). Multiple roles of the coding sequence 5' end in gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* *43*, 13–28.
- Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R., and Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int. J. Genomics* *2014*, 970607.
- Vezain, M. (2009). Implication des altérations de l'épissage de l'ARN dans les cancers héréditaires et dans l'amyotrophie spinale infantile. Th D Bio, Univ Rouen.
- Vezain, M., Saugier-veber, P., Melki, J., Toutain, A., Bieth, E., Husson, M., *et al.* (2007). A sensitive assay for measuring SMN mRNA levels in peripheral blood and in muscle samples of patients affected with spinal muscular atrophy. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *15*, 1054–1062.
- Vezain, M., Gérard, B., Drunat, S., Funalot, B., Fehrenbach, S., N'guyen-Viet, V., *et al.* (2011). A leaky splicing mutation affecting SMN1 exon 7 inclusion explains an unexpected mild case of spinal muscular atrophy. *Hum. Mutat.*
- Vitte, J., Fassier, C., Tiziano, F.D., Dalard, C., Soave, S., Roblot, N., *et al.* (2007). Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am. J. Pathol.* *171*, 1269–1280.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1999). Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9236–9241.

- Wang, C.H., Xu, J., Carter, T.A., Ross, B.M., Dominski, M.K., Bellcross, C.A., Penchaszadeh, G.K., *et al.* (1996). Characterization of survival motor neuron (SMNT) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 359–365.
- Wang, C.H., Finkel, R.S., Bertini, E.S., Schroth, M., Simonds, A., Wong, B., *et al.* (2007). Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J. Child Neurol.* *22*, 1027–1049.
- Wen, H.-L., Lin, Y.-T., Ting, C.-H., Lin-Chao, S., Li, H., and Hsieh-Li, H.M. (2010). Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 1766–1778.
- Werdnig, G. (1891). Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. *Arch Psychiat Nervenkr* *22* (437–480).
- Werdnig, G. (1894). Die frühinfantile progressive spinale Amyotrophie. *Arch Psychiat Nervenkr* *26* (706–744).
- Wertz, M.H., and Sahin, M. (2015). Developing therapies for spinal muscular atrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*
- Wirth, B., Herz, M., Wetter, A., Moskau, S., Hahnen, E., Rudnik-Schöneborn, S., Wienker, T., *et al.* (1999). 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.* *64*, 1340–1356.
- D' Ydewalle, C., and Sumner, C.J. (2015). Spinal Muscular Atrophy Therapeutics: Where do we Stand? *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *12*, 303–316.
- Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2013). Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J. Mol. Biol.* *425*, 3723–3730.
- Zhang, Z., Lotti, F., Dittmar, K., Younis, I., Wan, L., Kasim, M., *et al.* (2008). SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* *133*, 585–600.

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



VIAL Yoann

Quantification de transcrit par PCR numérique : application au dosage des transcrits *SMN* pleine longueur dans le contexte de l'amyotrophie spinale proximale.

Thèse de Docteur en Pharmacie, Rouen, 2015, 91 p.

RESUME

INTRODUCTION : L'amyotrophie spinale proximale (SMA) est une maladie neuromusculaire d'origine génétique, de sévérité variable. La SMA résulte d'une inactivation homozygote du gène *SMN1*. Le principal gène modificateur de cette maladie est le gène *SMN2* qui possède une forte homologie avec le gène *SMN1*. Une des variations qui le différencie du gène *SMN1* est responsable d'un épissage alternatif du pré-ARNm. Bien que le transcrit court soit majoritaire, le gène *SMN2* code également pour un transcrit pleine longueur, similaire au transcrit issu du gène *SMN1*. Le nombre de copies du gène *SMN2* étant variable, plus il est important, plus la quantité de transcrit pleine longueur est élevée, et, moins le phénotype est sévère.

OBJECTIFS : Les objectifs sont le développement d'une nouvelle méthode de quantification du transcrit *SMN* pleine longueur et la détermination de la quantité minimale de transcrit nécessaire pour ne pas exprimer la maladie.

MATERIEL ET METHODE : La quantification du transcrit *SMN* pleine longueur par PCR numérique a été réalisée sur 20 échantillons d'ARN. Parmi ces 20 échantillons, 10 sont extraits à partir du sang de patients présentant 4 copies du gène *SMN2*, la plus grande quantité de gène *SMN2* retrouvée chez les patients et 10 à partir d'individus sains présentant 1 copie du gène *SMN1* et 0 copie du gène *SMN2*, la plus faible quantité de gènes *SMN* pouvant être retrouvée dans la population générale.

RESULTATS : La concentration relative moyenne de transcrit *SMN* pleine longueur est de 0,64 dans le groupe patient et de 0,38 dans le groupe témoin.

DISCUSSION : La quantité de transcrit *SMN* pleine longueur est plus importante dans le groupe des patients que dans le groupe des contrôles suggérant une différence de production de protéine par le transcrit qu'il soit issu du gène *SMN1*, ou, *SMN2*.

CONCLUSION : Nous avons développé et validé une méthode de quantification du transcrit *SMN* pleine longueur par PCR numérique. Les résultats surprenants que nous observons soulèvent des questions importantes pour la compréhension des bases moléculaires de la SMA.

MOTS CLES : Quantification de transcrit, PCR numérique, amyotrophie spinale proximale, génotype 0*SMN1*/4*SMN2*, génotype 1*SMN1*/0*SMN2*.

JURY :

Président du Jury	Madame le Professeur Isabelle LEROUX-NICOLLET
Directeur de Thèse	Madame le Docteur Pascale SAUGIER-VEBER
Membres du Jury	Madame le Docteur Myriam VEZAIN
	Monsieur le Professeur Jean-Christophe PLANTIER

DATE DE SOUTENANCE : 19 octobre 2015