

## Les recherches

1. Introduction	52
2. CSC et la recherche	54
2.1. Les axes de recherche et les résultats	
2.2. Des gènes différents, mais des mécanismes communs	
3. Exemples de recherches	57
3.1. Les maladies mitochondriales	
3.2. Exemples de recherches sur le gène SCA7	
3.3. Exemple de recherche sur les ataxies récessives	
4. Rôle de la banque d'ADN et de cellules	62
5. Le don de cerveaux	64
6. Recherche clinique et enfants atteints de syndromes cérébelleux sans cause connue	65
7. Tous les moyens sont-ils bons pour guérir ?	67
8. Comment patients, médecins, chercheurs et modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> se complètent	70
9. Conclusion	73

## Chapitre Les recherches

### **La recherche, pourquoi j'y crois !**

“

*Les responsables de nos centres de référence, les neurologues que nous consultons et les responsables de CSC, tous nous parlent continuellement de la recherche. Nous en avons assez de ce refrain que nous entendons depuis dix ans et... toujours rien.*

*Nos maladies continuent de progresser, et toujours zéro médicament, zéro traitement qui nous guérisse définitivement. Malgré cela, JE CROIS ! Je crois que seule la recherche nous apportera les solutions. Ce n'est pas une croyance spirituelle, ma foi en la recherche s'appuie sur des faits.*

*Croyez-vous que depuis les années 50, les progrès en cancérologie soient le fait du hasard ? Non, ils sont le fruit d'une collaboration de tous : malades, familles, associations de malades, chercheurs, médecins, entreprises pharmaceutiques, autres collectivités et État. Cette volonté commune a pu assurer le financement des recherches et contribuer à la mise au point de médicaments – notamment grâce à la participation des malades aux essais de nouvelles thérapies –, de méthodes d'investigation, de nouveaux matériels de radiothérapie, d'imagerie médicale, de chirurgie. Tous ensemble, ils ont fait régresser le nombre de cancers mortels.*

*Ce sont ces faits qui me font croire en la recherche. Avec nos maladies, c'est la même chose. Un neurone du cervelet est mort, nous en sommes certains. Pourquoi est-il mort ? Pour certaines ataxies génétiques, les chercheurs ont constaté une quantité importante de certaine molécule dans la cellule. Quelle est cette molécule ? Est-elle le poison de la cellule ? Si oui, pourquoi et comment ce poison agit-il ? Comment l'empêcher de nuire un peu ou totalement ? C'est ça, le travail des chercheurs : VOIR ce qui se passe, COMPRENDRE ce qui se passe ; puis, TROUVER le moyen de faire régresser la maladie et de la supprimer.*

*En dix ans, les recherches sur les ataxies ont bien progressé. CSC ne consacre pas pour rien tous les dons qu'elle reçoit à la recherche ! Je compare souvent la recherche avec le travail d'enquête de la police. Nous aussi, les victimes de la maladie, sommes comme les victimes des malfrats. L'enquête n'avance pas assez vite, mais elle avance, c'est cela le principal. Le plus grave serait de se trouver dans la situation d'absence de recherche, car, à ce moment-là, l'avenir serait identique au présent.*

Hubert

”

# Les recherches

Ce chapitre est destiné à donner un aperçu des recherches entreprises pour percer les secrets des syndromes cérébelleux depuis la création de CSC. En quinze ans, des avancées importantes dans la connaissance des mécanismes de ces maladies ont été réalisées, des résultats sont là, des hypothèses nouvelles ont été posées ; beaucoup de travail reste à faire. La lecture de ce chapitre sera plus facile si le lecteur a déjà parcouru le chapitre « Les maladies », notamment la partie intitulée « Un peu de biologie ».

## 1. Introduction

Que savait-on des syndromes cérébelleux en 1995 ? La réponse est simple : la seule information dont on était sûr était qu'ils provenaient d'une atteinte du cervelet. Les différentes formes de transmission (autosomiques dominante et récessive) étaient évoquées, mais on parlait peu de transmissions liées au chromosome X pour les ataxies. Le tableau de désignation des classifications des SCA (*spinocerebellar ataxia*) s'arrêtait à la SCA7, alors qu'il dépasse les 30 aujourd'hui. Les différences individuelles pour une même maladie sont telles qu'à partir des seuls signes cliniques initiaux il était possible de confondre certaines d'entre elles. L'identification des gènes permet désormais de confirmer sans erreur le diagnostic, et elle n'est possible que depuis quelques années. Autant dire que peu de connaissances scientifiques existaient sur ces maladies il y a quinze ans.

C'est sur ce constat que CSC a été créée, pour que soient reconnus les syndromes cérébelleux quelles qu'en soient les origines et pour encourager des recherches afin de mieux connaître et comprendre leurs mécanismes. La création de l'association avait aussi pour objectif de rompre l'isolement des

malades et de leur permettre d'être les acteurs de ces recherches.

Remarque : une maladie peut être comparée à un mécanisme plus ou moins complexe, un mécanisme à l'œuvre dans l'intimité du corps. Celui-ci peut être dérégulé, cesser son activité ou, au contraire, en faire trop. Dans tous les cas, différents acteurs interviennent dans ce mécanisme biologique : cellules, organites cellulaires comme les mitochondries, gènes, molécules (protéines, hormones, etc.).

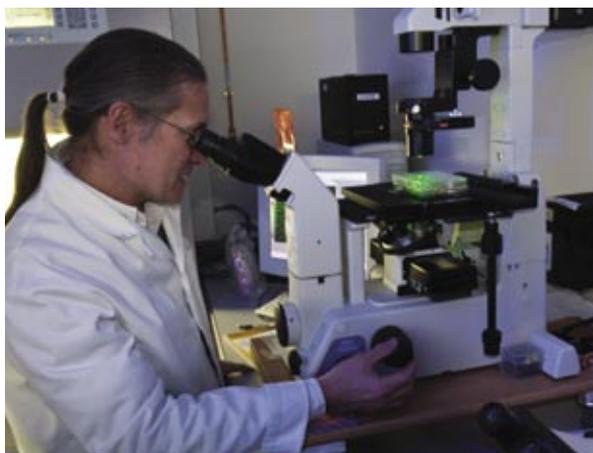
*Comprendre la maladie, c'est espérer pouvoir la traiter.*

En 1995, les syndromes cérébelleux sont des boîtes noires qu'il s'agit d'ouvrir, d'explorer et d'analyser. Pour pouvoir agir efficacement sur un mécanisme et atténuer ou supprimer ses effets indésirables, il faut commencer par comprendre comment il fonctionne. C'est le travail des chercheurs et des médecins. Ensemble, ils étudient les syndromes cérébelleux. On peut distinguer deux phases dans leurs travaux, même si ces deux phases sont imbriquées et s'alimentent l'une l'autre : la recherche fondamentale et la recherche clinique.

> La recherche fondamentale

La recherche fondamentale cherche des réponses à des questions de base, par exemple : quel est le gène déficient ? À quoi sert-il ? Où se trouve-t-il ? Pourquoi ce gène possède-t-il une anomalie ? Pourquoi celle-ci ? À quel moment s'est-elle produite ? Quelle est la conséquence de l'anomalie du gène ? Le gène anormal produit-il moins de protéine ou une protéine anormale ? Comment peut-on s'opposer aux conséquences ? Quelle molécule, quelle stratégie pourrait résoudre le problème ?, etc.

Pour cela, la recherche fondamentale a besoin d'outils et de matériel. Elle a notamment besoin de se fabriquer des « modèles réduits » de son sujet d'étude. Par exemple, des cellules de peau qu'elle cultive en laboratoire. Dans le cas des syndromes cérébelleux, ce sont des cellules de cervelet de souris, car il n'est pas possible de prélever des cellules de cervelet d'un malade. Elles peuvent être saines ou malades. Grâce à elles, un chercheur peut avancer : tester des hypothèses, essayer des molécules susceptibles de devenir des traitements, etc. Puis, d'autres modèles capables de reproduire les mêmes défauts de fonctionnement que ceux observés chez les malades sont nécessaires. De petits organismes comme la drosophile (mouche du fruit) et la souris sont utilisés. Ils sont souvent modifiés génétiquement pour reproduire au mieux les symptômes des maladies.



## Des modèles de la maladie

Le qualificatif de « modèle » signifie que les expériences effectuées sur ce type particulier d'organisme vivant (mouche du fruit, souris, poissons, vers, levures) peuvent donner des résultats généralisables au-delà de l'espèce considérée.

Comment est-ce possible ?

Les patrimoines génétiques de toutes les espèces vivantes ont de nombreuses similitudes entre eux, dans leur nature comme dans leur organisation. Par exemple, les gènes responsables des principes biologiques fondamentaux comme les processus de développement (croissance), de régulation (température du corps), de métabolisme (utilisation des aliments), etc. ont été largement conservés au cours de l'évolution et sont en grande partie communs à toutes les espèces. Ainsi, l'homme et la mouche ont le même gène sélecteur de l'œil. C'est-à-dire que le gène responsable de l'information « Ici il y aura un œil » est le même entre ces deux espèces, même si l'œil humain n'a rien à voir avec celui d'une mouche.

Aujourd'hui, les chercheurs français disposent de modèles animaux (souris, drosophiles, poissons, vers, levures) principalement pour les formes SCA7 et SCA3, chez lesquels des médicaments, dont certains déjà utilisés pour d'autres maladies, sont à l'essai. En parallèle, d'autres pistes sont étudiées. D'autres pays d'Europe, les États-Unis, le Japon, etc. ont aussi développé des modèles de ces maladies chez différents animaux. Ils sont complémentaires et font l'objet de collaborations scientifiques entre les pays.

### > La recherche clinique

La recherche clinique concerne l'être humain. Elle permet souvent d'établir un premier diagnostic et dirige le patient vers une recherche génétique qui pourra confirmer ou non le diagnostic. La recherche clinique a pour objectifs de mieux connaître la maladie, d'améliorer la qualité de vie, de trouver de nouvelles méthodes d'exploration (tests diagnostiques, méthodes d'imagerie, méthodes d'évaluation pour les essais de médicaments) et de développer des thérapies. Elle s'appuie sur la recherche fondamentale pour améliorer la connaissance de la maladie chez l'homme et mettre au point des traitements.

La recherche clinique essaie de trouver des réponses à des questions du type : pourquoi certains ataxiques présentent-ils un diabète, une atteinte auditive ou oculaire, une cardiomyopathie, etc., alors que d'autres non ? Pourquoi la maladie débute-t-elle à 5 ans chez certains et à 50 ans chez d'autres ?

Développer des thérapies consiste à mettre en place des essais cliniques sur des patients : essais de médicaments et de thérapies géniques ou cellulaires. Le but des essais est d'établir la fiabilité et l'efficacité d'une substance. Les essais cliniques sont encadrés par des lois et doivent obéir aux règles de bonnes pratiques cliniques.

### > La recherche translationnelle

Vous entendrez peut-être parler de recherche translationnelle. Elle a pour objet de mettre en application médicale les résultats scientifiques de la recherche fondamentale. Recherche multidisciplinaire, elle fait intervenir des cliniciens (neurologues, pneumologues, urologues, cardiologues) et des chercheurs qui travaillent dans des domaines variés tels que les ataxies, le cancer, la maladie de Parkinson et les maladies auto-immunes. Elle est un intermédiaire entre la recherche fondamentale et la recherche clinique.

## 2. CSC et la recherche

Les premiers travaux sur les maladies génétiques, réalisés grâce, en particulier, aux donateurs du Téléthon organisé par l'Association française contre les myopathies (AFM), ont permis d'établir à partir de 1993 pour un grand nombre de syndromes cérébelleux :

- la confirmation du diagnostic ;
- le caractère héréditaire de la maladie ;
- son origine monogénique (un seul gène atteint pour une famille) ;
- son caractère hétérogène (des gènes différents peuvent être à l'origine d'un même symptôme dans différentes familles).

Dans de nombreuses familles, à cette époque, le mode de transmission était inconnu, car la personne malade était la première de la famille. Il restait alors un doute quant à la transmission génétique de la maladie. Si certaines familles connaissaient leur maladie sans en connaître le mécanisme, d'autres ne savaient rien.

### 2.1. Les axes de recherche et les résultats

Les recherches soutenues par CSC se sont développées dans trois directions.

1. Mise en œuvre de la recherche du gène causant une ataxie pour les maladies dont l'anomalie génétique est localisée sur un chromosome particulier (localisations chromosomiques déjà caractérisées).
2. Pour les maladies dont les gènes sont déjà identifiés, comprendre, lorsqu'ils sont mutés, les mécanismes les conduisant à initier une ataxie cérébelleuse. Proposer alors des pistes de traitement.
3. Pour les autres maladies, recherche de l'origine génétique de la maladie (quel chromosome, puis quel gène).

Quatre ans après sa création, CSC adressait son premier appel d'offres aux équipes de recherche se consacrant aux maladies du cervelet. Chaque année depuis 1999, CSC lance ses appels d'offres d'un montant (35 000 euros en moyenne) équivalant à la totalité des dons reçus. L'association reçoit beaucoup plus de projets qu'elle ne peut en financer, faute de moyens. En moyenne, CSC s'engage annuellement sur un ou deux projets. La sélection des projets est effectuée après leur analyse par deux rapporteurs indépendants, suivie d'une évaluation comparative par le conseil scientifique de l'association. Le choix final est fait par le conseil d'administration de CSC grâce au compte rendu de la chargée de mission auprès du conseil scientifique.

Le choix se fonde sur cinq critères :

- adaptation à l'appel d'offres (intérêt pour l'association) ;
- faisabilité du projet (durée, lieu d'accueil...) ;
- originalité du projet ;
- solidité des bases scientifiques du projet (chances de succès) ;
- qualité du candidat.



L'aide apportée par CSC aux équipes de recherche a créé un véritable partenariat entre les chercheurs et les malades, qui se concrétise lors des exposés de suivi de projets présentés à l'assemblée générale de CSC.

Voici des exemples de recherches aidées par CSC, et leurs résultats.

#### 1. Recherche de gènes non identifiés

- 2003 : découverte d'un gène d'une ataxie liée à l'X.

- 2007 : exploration d'un nouveau locus (localisation précise du gène muté sur un chromosome) sur une ataxie congénitale.
- 2009 : découverte récente d'un nouveau gène d'une ataxie récessive.

#### 2. Compréhension du ou des mécanismes moléculaires du syndrome cérébelleux et recherche d'un traitement

- 2006 : avancement pour de futurs essais thérapeutiques grâce au modèle drosophile (modèle de la SCA7), mais aussi sur les maladies à polyglutamine : SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 et DRPLA (atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne).
- 2007-2008 : premiers essais de molécule sur la souris modèle de la SCA7 (interféron bêta).

CSC tient à la disposition de chacun le tableau des localisations chromosomiques et des gènes identifiés à ce jour.

#### Plus de recherches sur le gène SCA7 ?

Les études sur la SCA7 prédominent pour les raisons suivantes. Deux équipes françaises reconnues au plan international (à la Salpêtrière, à Paris, et à Illkirch-Graffenstaden, près de Strasbourg) sont totalement impliquées dans des recherches portant sur le gène SCA7. Les équipes étrangères dévolues aux autres gènes de transmission autosomique dominante ne peuvent répondre à l'appel d'offres lancé par CSC. En effet, pour des raisons fiscales, les dons consentis pour des recherches conduites à l'étranger ne peuvent donner lieu à une déduction fiscale. Par ailleurs, la SCA7 s'accompagne d'une dégénérescence de la rétine, tissu composé de cellules très proches des neurones du cervelet. La rétine est donc un modèle très intéressant à étudier.

## 2.2. Des gènes différents, mais des mécanismes communs

Même s'il existe de nombreux gènes impliqués dans les syndromes cérébelleux, la recherche a montré qu'il existait des mécanismes communs entre eux. Il est évident qu'une découverte intéressante sur l'une de ces maladies pourra servir à une autre. La SCA7, par exemple, est une maladie génétique dite « à polyglutamine ». C'est-à-dire que le gène muté « bégaye » (lire le chapitre « Les maladies ») et répète un trop grand nombre de fois un triplet, ici CAG. La protéine qu'il fabrique est alors inopérante, car constituée d'une succession anormale d'un acide aminé, la glutamine. Le groupe des maladies à polyglutamine comprend à ce jour les maladies du groupe SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 et DRPLA, mais aussi la maladie de Huntington et le syndrome de Kennedy.

*« Les progrès de la génétique ont permis de regrouper de nombreuses maladies à l'apparence disparate, note Pierre Rustin, président du conseil scientifique commun aux trois associations (CSC, AFAF, ASL). Avant, seuls les critères physiques, les symptômes visibles étaient disponibles pour comprendre ce à quoi nous avons affaire. Grâce aux nouvelles descriptions génétiques de ces maladies, il est possible de les regrouper en s'intéressant à leurs processus communs. Ce n'est pas pour rien que les trois associations ont le même conseil scientifique. Dans les trois cas, on traite quasiment des mêmes préoccupations. Ces maladies sont toutes trois des atteintes neurologiques qui touchent, en simplifiant, le même type de cellules, celles du cervelet. Des mécanismes*

### Le réseau Spatax

Encouragées par un appel d'offres européen, les docteurs Alexandra Dürr (Paris) et Chantal Tallaksen (Oslo) ont créé le réseau Spatax (*Spastic Paraplegia and Cerebellar Ataxia\**) en 2001. L'objectif était de rassembler et coordonner les moyens de recherche de ces deux types de maladies rares. Pourquoi ? Parce que les ataxies cérébelleuses et les paraparésies – le mot « paraplégie » est équivalent – spastiques résultent toutes deux d'altérations de la moelle épinière et/ou du cervelet et sont souvent associées dans leurs formes complexes. Elles sont donc diagnostiquées dans les mêmes centres cliniques et sont étudiées selon des protocoles de recherche similaires.

Grâce à une collaboration très active (en 2009, 27 équipes de recherche provenant de 14 pays travaillaient ensemble), les équipes de recherche membres du réseau ont rassemblé

le plus grand nombre au monde de familles et de cas sporadiques présentant ces pathologies.

La description très précise des symptômes a été possible grâce à l'élaboration d'une fiche de diagnostic clinique mise au point au sein du réseau. Cela a permis d'importants progrès dans la connaissance de ces pathologies très complexes, notamment en ce qui concerne les formes de transmission dominante.

Aussi, depuis cette date, CSC réserve un petit montant de son budget recherche (provision de 5 000 euros en 2010) pour soutenir le travail de ce réseau. CSC est tenue informée des résultats lors de réunions une fois tous les deux ans. Cela permet à CSC de consacrer une partie de son budget aux recherches sur l'ensemble des ataxies de transmission génétique.

\* Paraplégie spastique et ataxie cérébelleuse.

*voisins, dans les mêmes cellules, avec des techniques identiques à mettre en œuvre d'un point de vue thérapeutique font qu'un même candidat médicament pourra être mis en test pour les trois. Donc, toute découverte qui sera faite pour l'une des maladies sera aussi une découverte pour les autres. Nous sommes dans un même grand chapitre de maladies. Et on peut même aller plus loin : chaque maladie, aussi rare soit-elle, fait partie d'un ensemble plus vaste. Beaucoup d'ataxies font partie de ce que l'on appelle les maladies mitochondriales (point commun : les mitochondries fonctionnent mal), au même titre que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou certaines formes de cancer... ce qui fait que ces maladies mitochondriales ne sont plus rares. »*

Par ailleurs, ces recherches s'inscrivent dans un réseau de recherche européen nommé Spatax, soutenu financièrement par CSC. Dans ce réseau, les équipes travaillent sur toutes les ataxies cérébelleuses et les paraplégies spastiques\*. Elles échangent leurs approches, leurs technologies et beaucoup d'informations. Cette mutualisation des connaissances permet des avancées beaucoup plus rapides. « *Un pour tous, tous pour un* », un principe évident qui s'applique d'autant plus à ces maladies neurologiques très rares.

\* Affection héréditaire autosomique rare et évolutive, la paraplégie spastique se caractérise par une diminution de la force des jambes.

CSC était également associée au réseau Euroasca (de 2004 à 2009), qui a validé en 2005 une échelle internationale d'évaluation des signes cliniques appelée SARA. Celle-ci facilitera la réalisation des essais cliniques lorsqu'un médicament aura franchi le stade de son évaluation sur les animaux.

Ces réseaux européens permettent aux

équipes de chercheurs de différents pays d'échanger leur expérience et leurs connaissances. Ces collaborations rassemblent un plus grand nombre de patients pouvant permettre d'expliquer, par exemple, les différences entre patients porteurs d'une même anomalie génétique et d'accélérer l'identification de nouveaux gènes.

### 3. Exemples de recherches

#### 3.1. Les maladies mitochondriales

Certaines ataxies sont dues à une mutation de l'ADN mitochondrial qui induit d'office un dysfonctionnement des mitochondries : ce sont les maladies mitochondriales. D'autres sont dues à une mutation génétique qui ne se situe pas sur l'ADN mitochondrial, mais qui peut entraîner, en deuxième intention, un déficit fonctionnel des mitochondries. C'est pourquoi, dans de nombreuses ataxies, on constate un dysfonctionnement des mitochondries, ces petites unités présentes dans toutes les cellules de l'organisme et responsables de la production d'énergie. 2 000 des 20 000 gènes humains sont nécessaires pour construire une mitochondrie et assurer son bon fonctionnement, soit environ 10 % du génome humain. On peut dire que le corps met les moyens pour les construire, traduisant peut-être l'importance de leur rôle. Quelle est donc leur fonction exacte ? En fait, une mitochondrie est une sorte de chargeur de batteries. Une cellule possède un grand nombre de « molécules-batteries », qui, lorsqu'elles sont déchargées, sont appelées ADP (pour « adénosine diphosphate »). La mitochondrie utilise l'oxygène présent dans la cellule – apporté grâce à la respiration – pour recharger les molécules d'ADP. Elles sont alors appelées ATP (pour « adénosine triphosphate »). Les molécules d'ATP vont aller libérer leur énergie partout dans la cellule pour réaliser toutes les réactions chimiques nécessaires. Elles

sont donc à la fois le lieu de stockage et le moyen de transport de l'énergie. « *Si la mitochondrie travaille mal, l'oxygène qu'elle n'utilise pas pour faire de l'ATP va servir à un autre usage, explique Pierre Rustin, directeur de recherche au CNRS et responsable de l'équipe Inserm-Université Physiopathologie et thérapie des maladies mitochondriales, située à l'hôpital Robert-Debré de Paris. Des molécules très réactives appelées "radicaux libres" vont être produites et semer le désordre partout dans la cellule. En principe, la cellule est capable de se défendre, mais dans le cas de l'ataxie de Friedreich, par exemple, ces défenses ne se mettent pas en place, les cellules finissent par dégénérer. Une partie des recherches du laboratoire est consacrée à comprendre pourquoi.* »

Pierre Rustin travaille depuis 1978 sur les mitochondries, étudiant au départ la respiration des plantes. En 1987, il a démarré des recherches sur les maladies mitochondriales de l'enfant. L'équipe a montré en 1997 qu'un antioxydant, l'idébénone, pouvait être utilisé pour soigner les problèmes cardiaques liés à l'ataxie de Friedreich. « *Jusqu'en 2004-2005, nous avons identifié de nombreux gènes, précise-t-il. C'est bien de trouver un gène responsable ou impliqué dans une maladie, cela permet en particulier le diagnostic prénatal pour certaines familles, mais avec cette information on n'en sait pas encore beaucoup sur la maladie. Nous avons beaucoup cherché de gènes ces dernières années, maintenant il faut*



*comprendre les mécanismes ! Depuis 2006, nous sommes passés sur le terrain de la thérapie en vue de traiter ces maladies mitochondriales, souvent neurologiques, pour lesquelles il y a peu de patients. Nous avons un très bon modèle, une souris naturelle qui a une ataxie. Elle reflète tout à fait l'évolution de la maladie humaine. Nous avons créé l'équipe de recherche quasiment autour de cette souris.* »

Dans le cas des maladies mitochondriales, le fonctionnement des mitochondries est affecté avec des conséquences possibles extrêmement diverses. En effet, les mitochondries produisent l'ATP, mais utilisent aussi l'oxygène, brûlent les constituants des sucres et des graisses que nous consommons, régulent pour partie le fer, le calcium dans les cellules, peuvent induire la prolifération (cancer) ou la mort (atrophie) des cellules, etc. On imagine donc facilement que les conséquences d'une atteinte du fonctionnement mitochondrial sont très complexes. Ces conséquences sont, de plus, variables selon les organes et les individus. Un dysfonctionnement des mitochondries peut parfaitement être secondaire à une anomalie survenant ailleurs dans la cellule, par exemple dans le noyau ; secondaire, mais central dans la maladie. Bien sûr, toutes les maladies neurologiques ne sont pas mitochondriales, mais de très nombreuses impliquent les mitochondries, d'où l'émergence d'une intense activité de recherche dans cette direction à travers le monde. Bien souvent, cependant, l'origine du mauvais fonctionnement des mitochondries reste à trouver, mais cela n'empêche pas de commencer à trouver des parades.

### **Les perspectives de traitement pour les maladies mitochondriales**

#### **1) Utilisation d'antioxydants**

Une molécule dite « antioxydante » a la capacité de piéger (on pourrait dire « consommer ») les molécules toxiques

qui peuvent dériver de l'oxygène, ce que l'on appelle les radicaux libres. Dans une cellule, l'essentiel des radicaux libres est produit par les mitochondries. Introduits dans une cellule, les antioxydants pourraient neutraliser ces radicaux libres. L'idée est d'empêcher la maladie d'évoluer, au moins de la freiner. Il existe de nombreuses molécules antioxydantes à tester.

2) Inciter la cellule à produire plus de mitochondries et de système antioxydant

Des molécules ont la propriété d'inciter la cellule à produire plus de mitochondries, même si celles-ci sont peu efficaces, avec tout leur équipement antioxydant. Le but est encore, ici, de tenter de déplacer l'équilibre vers une plus grande consommation d'oxygène, vers un seuil acceptable. Depuis 2010, des patients atteints d'ataxie de Friedreich testent un antidiabétique qui permet de produire plus de mitochondries dans les cellules. Des patients atteints de SCA3 ont fait une demande pour pouvoir le tester également. *« Les résultats ne seront pas connus avant début 2012, confie Pierre Rustin. Ces molécules sont censées ralentir la maladie, c'est donc par définition long à mettre en évidence. Par ailleurs, si cette molécule s'avère efficace, elle le sera sans doute chez certains et pas chez d'autres. Il faudra donc trouver d'autres molécules. »*

3) Traiter le gène directement

Pour guérir une maladie génétique, il est tentant d'essayer de remplacer le ou les gènes déficients. *« Même si cela n'a pas encore fonctionné dans les maladies mitochondriales et qu'il y a eu beaucoup de problèmes, remplacer le gène défectueux est, dans le principe, toujours possible, admet Pierre Rustin. La technique de la thérapie génique évolue. Des chercheurs de l'Institut de la vision avec qui nous travaillons sont récemment parvenus à soigner des*

*problèmes oculaires chez l'animal par thérapie génique. L'idée la plus folle est d'introduire le gène d'un organisme marin qui produit naturellement un outil capable d'éviter la "surchauffe" et la production de radicaux libres dans la mitochondrie. On soigne actuellement des cellules humaines et des mouches malades de cette façon. Il est tout à fait possible que les animaux aient eu un jour cette capacité et l'aient perdue car elle était devenue inutile. »*

*Observer, faire des hypothèses, expérimenter*

Observer, faire des hypothèses, expérimenter, voilà le cycle qui se répète pour les chercheurs pour comprendre les mécanismes et avoir des idées pour résoudre les problèmes. Des essais sur des cellules malades tout d'abord, puis sur des organismes entiers (insectes, petits animaux), puis avec des personnes malades, pour qu'un jour un traitement puisse être mis au point. *« Nous n'en sommes plus à mettre des noms sur des gènes déficients, rappelle Pierre Rustin. Nous sommes désormais dans une phase plus avancée, l'étude des mécanismes à l'œuvre dans ces maladies. Et si l'une de ces maladies rares progresse, les autres suivront. Pour cette raison, il est important de bien comprendre des processus qui peuvent sembler globaux ou généraux. »*

3.2. Exemples de recherches sur le gène SCA7 (appel d'offres CSC 2009)

En 2009, CSC a octroyé 10 000 euros à l'équipe de Didier Devys, maître de conférences et praticien hospitalier à l'université de Strasbourg. L'équipe de chercheurs est localisée à l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC) d'Illkirch, près de Strasbourg. L'axe principal de leur recherche est d'étudier comment les gènes devant produire des protéines

spécifiques pendant la vie d'une cellule sont actifs ou non. Il est désormais établi qu'il est possible d'« éteindre » ou d'« allumer » un gène, de réguler en quelque sorte son activité (le terme exact est son « expression »).

L'aide financière de CSC a permis de financer une année de travail d'un doctorant de l'équipe, Guillaume Lang. Le sujet de son travail était intitulé « Dysfonctionnement du complexe transcrip-tionnel hSAGA dans l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 ».

Qu'est-ce que cela peut bien vouloir dire ? L'ataxie SCA7 fait partie des ataxies de transmission dominante. Elle partage avec d'autres ataxies une même mutation dans l'ADN : une augmentation du nombre de triplets CAG dans un gène, donc une expansion de polyglutamine dans la protéine produite par ce gène. L'ataxie SCA7 est par contre la seule à s'accompagner d'une atteinte oculaire. Des cellules de la rétine dégénèrent. Le noyau de ces cellules est anormal, beaucoup plus gros et moins dense que le noyau d'une cellule saine dans lequel l'ADN est « compacté » au sein d'une structure appelée « chromatine ». La chromatine se « décompacte », et avec elle l'ADN, à certaines occasions rendant l'ADN accessible à des molécules contrôlant l'expression des gènes. Dans le cas des cellules de la rétine, l'ADN reste bloqué en position décompactée, ce qui permet peut-être à des gènes de produire des protéines indésirables ou en trop grande quantité, entraînant la mort de ces cellules.

Un dysfonctionnement, ou l'absence, d'un groupe de protéines (appelé « complexe hSAGA ») responsable du compactage de la chromatine serait à l'origine des anomalies observées dans la rétine. Le travail de Guillaume Lang a montré que deux enzymes jouaient un rôle important dans le fonctionnement de ce complexe hSAGA. Les recherches

se poursuivent pour savoir si un apport supplémentaire de ces enzymes dans des cellules rétiniennes malades pourrait avoir un effet sur leur dégénérescence.

Une autre équipe de l'IGBMC, celle d'Yvon Trottier, directeur de recherche à l'Inserm, travaille sur le gène SCA7. Elle s'intéresse notamment aux mécanismes moléculaires et cellulaires menant à la neurodégénérescence dans les maladies à expansion de polyglutamine comme l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 et la maladie de Huntington. L'équipe, soutenue financièrement par CSC en 2009, souhaite déterminer pourquoi des protéines portant une expansion de polyglutamine sont « neurotoxiques » et comment les neurones atteints répondent aux stress toxiques, puis renoncent et dégèrent. Alice Karam, doctorante dans l'équipe, a observé que certaines cellules de la rétine proliféraient naturellement, ce qui correspondrait peut-être à une tentative, bien qu'infructueuse, de régénérescence de la rétine. Les recherches se poursuivent pour tenter de stimuler cette régénérescence afin de retarder la progression de la rétinopathie.

### 3.3. Exemple de recherche sur les ataxies récessives

Michel Koenig est professeur de génétique à la faculté de médecine de l'université de Strasbourg. Son équipe, située à l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC) d'Illkirch, s'efforce de comprendre les mécanismes moléculaires des ataxies récessives. Pour cela, elle identifie des gènes responsables de la maladie – par exemple, localisation des deux gènes responsables des ataxies avec apraxie oculomotrice AOA1 et AOA2 en 2000, et identification en 2001 et 2004 –, crée de nouveaux modèles cellulaires et murins (souris) afin de comprendre les mécanismes, identifie et teste de nouvelles approches thérapeutiques. À l'heure actuelle, quatorze gènes d'ataxie

progressive autosomique récessive ont été identifiés, dont cinq par l'équipe alsacienne. Quatre des quatorze gènes sont responsables de formes extrêmement rares, détectées dans moins de dix familles dans le monde ou spécifiques de certaines populations de taille restreinte. Les données épidémiologiques actuelles suggèrent qu'environ 30 % à 50 % des patients atteints d'ataxie progressive autosomique récessive ont des mutations dans des gènes encore non identifiés.

Le travail de Dorra H'mida, doctorante dans l'équipe de Michel Koenig, a été soutenu par CSC en 2007. Son projet portait sur l'identification de nouveaux gènes responsables d'ataxie progressive (ou dégénérative) de transmission héréditaire autosomique récessive.

En analysant le génome de plus de cinquante familles d'origine algérienne – l'étude est initialement limitée aux seules familles consanguines, qui sont pratiquement les seules permettant d'obtenir des informations de liaison génétique –, Dorra H'mida a confirmé qu'il existait encore un très grand nombre de gènes différents d'ataxie progressive autosomique récessive à découvrir.

Elle a aussi montré que trois familles sont probablement liées à une même localisation génétique, sur le bras long du chromosome 20. Cette localisation correspond à l'une des sept localisations génétiques déjà publiées lors de l'étude d'une très grande famille norvégienne où pas moins de sept oncles, tantes, cousins et petits-cousins étaient atteints d'une même forme d'ataxie récessive de début infantile, très peu progressive et associée à de très discrets signes de spasticité et à une petite taille.

Cette nouvelle forme d'ataxie a été appelée SCAR6, pour *spinocerebellar ataxia recessive type 6*. Les trois familles identifiées par Dorra H'mida présentent pour deux d'entre elles les mêmes caractéristiques cliniques que

la grande famille norvégienne.

La région pouvant contenir le ou les gènes mutés sur le chromosome 20 est très grande. Elle contient environ 200 gènes différents. Dorra H'mida s'est attachée à rechercher des mutations chez ces trois familles algériennes dans les gènes candidats les plus attractifs du chromosome 20, c'est-à-dire ceux dont la fonction s'apparente le plus à la fonction des gènes d'ataxie déjà connus.

Les travaux sont toujours en cours, mais suggèrent qu'il existerait plusieurs gènes d'ataxie récessive dans la région du bras long du chromosome 20, confirmant la complexité de l'analyse génétique des ataxies récessives. L'acquisition par l'IGBMC d'un appareil de nouvelle génération, un séquenceur d'ADN à ultrahaut débit permettant en théorie le séquençage d'un chromosome entier, sera sans doute d'une grande utilité pour l'identification des mutations dans les deux grandes familles SCAR6 algériennes. La mise au point de ce nouvel appareil et surtout l'exploitation informatique de la masse phénoménale des données qu'il générera prendront du temps. Mais cette nouvelle approche et la découverte de nouveaux gènes d'ataxie récessive pourront ensuite être appliquées au diagnostic des familles plus petites et non consanguines, qui représentent la majorité des cas en France.



#### 4. Rôle de la banque d'ADN et de cellules

Lorsqu'une personne présente les symptômes d'un syndrome cérébelleux et que le diagnostic clinique a été posé par un neurogénétiicien, il est important de pouvoir déterminer le type exact du syndrome. À ce stade, il existe deux possibilités.

1. Réaliser un test de diagnostic génétique. Cela est possible si les symptômes font penser à un type de syndrome cérébelleux dont le gène responsable est connu et si le test génétique a été développé pour une utilisation en routine, c'est-à-dire qu'il peut être pratiqué dans certains hôpitaux comme une simple analyse de sang. Le malade saura rapidement et avec précision le nom de sa maladie. C'est le cas avec les SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 et DRPLA. Dans ce cas, le patient signe un consentement de diagnostic, et son prélèvement sera traité et analysé par un laboratoire hospitalier spécialisé.

2. Si les symptômes font penser à un syndrome cérébelleux dont le gène n'est pas connu ou dont le gène est connu mais pour lequel aucun test génétique utilisable en routine n'a pu être mis en place – cas des ataxies très rares –, le patient peut participer à un programme de recherche sur les ataxies. Cette participation se fait en association avec une banque d'échantillons biologiques.

Le rôle de la banque d'ADN et de cellules du centre de recherche de l'Institut du cerveau et de la moelle épinière (CRICM) est de recueillir des prélèvements, en majorité issus de prises de sang réalisées lors des consultations et uniquement à des fins de recherche. L'ADN et les cellules sanguines des patients issus de ces prélèvements sont précieusement conservés et confiés aux chercheurs pour leurs travaux : identifier un nouveau gène, étudier le rôle des protéines correspondant à ces gènes (grâce aux globules blancs, par exemple), etc. La banque d'ADN et de

#### Les prélèvements de recherche, en pratique

Lors de la consultation, le neurogénétiicien pose un diagnostic et propose au patient de participer à un programme de recherche. Un consentement écrit est indispensable pour que le prélèvement à des fins de recherche soit légal. Les prélèvements (prise de sang et/ou biopsie de peau) sont tout d'abord enregistrés dans la banque sous un code anonyme correspondant à une personne unique (photo 1). Ils sont ensuite transformés, par différents protocoles de laboratoire, en échantillons dérivés : pour le sang, il s'agit en majorité de l'ADN (photo 2), des cellules sanguines blanches et du plasma (photo 3) et, pour la biopsie de peau, des cellules appelées « fibroblastes ». Ces échantillons sont stockés dans de petits tubes

spécifiques pour une conservation au froid de longue durée dans des congélateurs à  $-80^{\circ}\text{C}$  (photo 4) ou de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Enfin, la banque fournit une partie de chacun de ces échantillons aux chercheurs qui la contactent dans le cadre de projets de recherche biomédicale, pour étudier les pathologies.



Photo 1



Photo 2



Photo 4



Photo 3

cellules est un maillon indispensable de la chaîne de la recherche, entre les cliniciens qui rencontrent les patients et font les prélèvements et les chercheurs qui analysent les échantillons pour comprendre les pathologies. **En acceptant de donner un peu de leur sang, les patients entrent dans cette chaîne, participent à la recherche.** Leur intérêt ne s'arrête pas là. Ils peuvent bénéficier d'analyses hors routine pouvant aboutir à l'identification du gène muté responsable de leur maladie. En ce qui concerne les malades atteints d'une ataxie inconnue, leurs prélèvements sont bien entendu très utiles pour étudier leur pathologie, mais ce n'est pas tout : le jour où un nouveau gène est découvert, ils sont automatiquement testés sur ce gène, si les symptômes cliniques associés à cette forme correspondent à leur pathologie.

*« La collaboration entre la banque, les cliniciens et les chercheurs est fructueuse en résultats scientifiques, explique Sylvie Forlani, coordonnatrice de la banque. Elle a permis de découvrir ou de contribuer à la découverte de nombreux gènes et localisations génétiques, avec des applications en diagnostic génétique et en modèles pour la recherche fondamentale : SCA5, SCA13, SCA28, AOA1, AOA2 pour les ataxies ; SPG11, SPG15 pour les parapariésies spastiques, avec un test de diagnostic génétique pour SPG11, réalisé sur le site de la Pitié-Salpêtrière. Le dialogue entre la banque et ses utilisateurs est constant pour répondre aux besoins de la recherche. Par exemple, la banque s'est lancée en 2010 dans la culture d'un certain type de cellules, les fibroblastes, obtenues à partir de petites biopsies de peau des patients. Il a été montré que les fibroblastes sont un modèle cellulaire plus proche des cellules nerveuses que les cellules du sang utilisées jusqu'à présent. Le prélèvement de biopsies de peau est aujourd'hui proposé en consultation dans le cadre de projets de recherche spécifiques. »*

### Quelques chiffres

- > Un total de 3 002 familles atteintes de formes diverses d'ataxies (Friedreich, spinocérébelleuse de transmission dominante ou récessive ou cas isolé) sont enregistrées dans la banque.
- > Ces familles représentent 5 887 patients et apparentés provenant de France et d'autres pays. Pour ces personnes, 17 000 tubes d'ADN et 6 250 tubes de cellules sont stockés.

Créée en 1990 par les professeurs Yves Agid et Alexis Brice et le docteur Alexandra Dürr, la banque d'ADN et de cellules est rapidement devenue une banque de référence pour les pathologies neurologiques et psychiatriques. Elle gère actuellement une vingtaine de collections d'échantillons biologiques correspondant chacune à une pathologie. Les pathologies représentées sont assez fréquentes, comme la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer, ou plus rares, comme les ataxies cérébelleuses, les parapariésies spastiques ou l'autisme. Toutes pathologies confondues, ces collections représentent 140 000 échantillons stockés issus de 37 000 personnes.

Environ 2 500 prélèvements sont reçus et traités chaque année. La banque est partenaire de plusieurs réseaux de recherche nationaux ou internationaux, dont le réseau Spatax.

Depuis sa création, la banque d'ADN et de cellules a connu plusieurs évolutions importantes pour l'utilisation en recherche des échantillons biologiques qu'elle gère. Elle a en particulier obtenu la certification nationale de son assurance qualité selon une norme spécifique pour les biobanques (norme NF S 96-900). *« Cette certification est une garantie et une reconnaissance de la qualité des échantillons biologiques produits, stockés et distribués, de*

la qualité de l'organisation et de la gestion de la banque, et de la qualité des services rendus aux cliniciens et aux chercheurs, ajoute Sylvie Forlani. Pour les personnes qui participent aux projets de recherche, cette certification garantit que la banque et son équipe prennent le plus grand soin de leurs prélèvements et des actions entreprises sur ces prélèvements. » Cette évolution est générale dans le domaine des biobanques. Les biobanques pourront, si elles suivent les mêmes normes de qualité, travailler en réseau et mettre en commun leurs échantillons biologiques pour une même pathologie. C'est important pour la recherche en général, d'autant plus pour les maladies rares. Les chercheurs pourront avoir accès à d'importantes collections de différents échantillons biologiques pour étudier d'une façon globale plusieurs aspects d'une même pathologie. La banque d'ADN et de cellules est impliquée dans deux projets de ce type, l'un français, l'autre européen, en collaboration avec, entre autres, le Neuro-CEB dirigé par le professeur Charles Duyckaerts pour le don de cerveaux *post mortem*.

### Contacts

La banque d'ADN et de cellules est une plateforme d'échantillons biologiques dirigée par le professeur Alexis Brice et le docteur Alexandra Dürr. Elle fait partie du centre de recherche de l'Institut du cerveau et de la moelle épinière (CRICM), nouvel établissement spécialisé dans la recherche sur les maladies neurologiques et psychiatriques.

Banque d'ADN et de cellules du CRICM, pavillon de l'Enfant et de l'Adolescent, 2<sup>e</sup> étage, hôpital de la Salpêtrière, 47, bd de l'Hôpital, 75013 Paris. [www.cricm.upmc.fr](http://www.cricm.upmc.fr)  
Contact : [sylvie.forlani@upmc.fr](mailto:sylvie.forlani@upmc.fr)

### 5. Le don de cerveaux

CSC finance pour partie la banque de cerveaux issus de dons *post mortem*. « Pour les chercheurs, c'est le seul moyen d'observer la morphologie des syndromes cérébelleux, explique Charles Duyckaerts, chef de service de neuropathologie à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et responsable du groupement d'intérêt économique appelé Neurologie-Collection d'échantillons biologiques (GIE Neuro-CEB). Nous pouvons étudier les lésions associées à la maladie, détecter et analyser des corps étrangers dans les cellules du cervelet, comme les inclusions nucléaires découvertes dans les années 1990. Nous pouvons également valider des hypothèses émises par la recherche fondamentale, comme une possible accumulation de fer dans les cellules, etc. Les modèles animaux nous donnent accès à des processus dynamiques, la création des inclusions dans le cervelet de l'animal, par exemple, tandis que les cerveaux nous révèlent l'état réel du cervelet du patient. Les deux approches sont indispensables et se complètent. »

Dans un but de confirmation de diagnostic, pour permettre une description la plus fiable possible des conséquences de la maladie sur le cerveau et le cervelet, et pour aider à comprendre les mécanismes de celle-ci, CSC invite ses adhérents à faire don de leur cerveau pour la recherche médicale. Pour faciliter ce don, l'association prend en charge les frais de prélèvement, de stockage et de conservation des organes et tissus. CSC a créé, au sein du GIE Neuro-CEB, une collection spécifique « syndromes cérébelleux neurodégénératifs » avec un conseil scientifique chargé de l'attribution des échantillons aux chercheurs.

Vous trouverez de plus amples informations sur le don de cerveaux *post mortem* dans le chapitre dédié à ce thème page 74 de ce livret.

## 6. Recherche clinique et enfants atteints de syndromes cérébelleux sans cause connue

En 2003, Évelyne Delion et Francine Sion font part au professeur Arnold Munnich, alors chef du service de génétique à l'hôpital Necker-Enfants malades, de la difficulté à aider les parents d'enfants atteints de syndromes cérébelleux non identifiés. Le professeur Munnich demande alors au professeur Pascale de Lonlay, pédiatre métabolicienne à l'hôpital Necker, de créer une consultation pour les enfants atteints de syndromes cérébelleux sans cause connue. L'objectif de cette consultation et de l'étude qui en découle est de créer des groupes homogènes grâce à l'observation clinique et surtout radiologique, afin d'aider au diagnostic et au pronostic de ces maladies.

Aujourd'hui, grâce à cette étude, certains parents ont obtenu une identification génétique pour la maladie de leur enfant. Ils ont pu connaître ainsi le statut génétique de leur enfant malade, leur propre statut génétique et celui d'un éventuel enfant à venir dans le cadre d'un projet parental. Pour d'autres cas, il a été possible de déterminer s'il s'agissait d'une maladie métabolique. Avoir une meilleure connaissance de la maladie et de ses mécanismes permet de bénéficier des traitements qui, s'ils ne guérissent pas la maladie, améliorent considérablement le quotidien des malades, et de concevoir un programme de recherches ayant pour objet de comprendre le pourquoi de cette maladie.

D'autres parents n'ont pas obtenu de diagnostic génétique pour la maladie de leur enfant. Mais le fait de prendre part à cette étude leur a permis de participer à des recherches internationales ayant pour objet le gène, la maladie et ses causes, mais surtout d'être répertoriés dans une base de données. Ainsi, lorsque le gène sera découvert, le diagnostic pourra être posé plus rapidement.

Il n'y a que comme cela que nous avancerons, ensemble, pas après pas, découverte après découverte, pour dans un premier temps identifier les maladies et à plus long terme traiter ces maladies. C'est pourquoi nous avons tous besoin les uns des autres. Les malades et leur famille ont besoin des médecins et des chercheurs, les médecins ont besoin des familles pour comprendre nos maladies et proposer des traitements lorsqu'ils existent.

L'étude a porté sur 158 enfants atteints de syndromes cérébelleux.

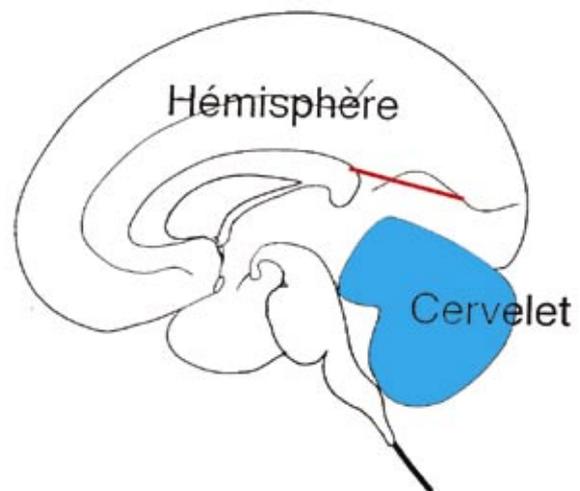


Schéma du cerveau : coupe latérale. Cette coupe fait bien ressortir le pont (trait rouge) d'où l'appellation d'atrophie olivo-ponto-cérébelleuse.

Le cervelet est situé sous le cerveau, à l'arrière du crâne, dans la région occipitale. Au-dessus de la tente du cervelet (région sus-tentorielle) se trouvent les deux hémisphères cérébraux. En dessous (région sous-tentorielle), dans la fosse postérieure, se situent les éléments du tronc cérébral et le cervelet.

« Nous avons proposé un algorithme radiologique basé sur l'aspect du cervelet, ajoute Pascale de Lonlay. Nous avons établi un lien entre l'imagerie cérébelleuse et le diagnostic biochimique et/ou génétique réalisé. Nous avons constitué sept groupes de patients selon l'image cérébelleuse, en fonction de divers critères : anomalies de développement, de volume, de taille,

de localisation, etc. Par la suite, nous avons pu classer ces pathologies en deux groupes :

1. Les maladies cérébelleuses «malformatives» : 9 patients ont eu une cause identifiée avec une mutation sur un gène connu. Les autres patients sont en cours d'investigation pour les gènes nouvellement connus ;

2. Les maladies métaboliques : 46 enfants ont eu un diagnostic.

Au total, la classification selon l'imagerie cérébelleuse est importante pour guider vers un diagnostic de maladie génétique malformative ou

métabolique, puisque 55 enfants sur 158 ont pu avoir un diagnostic précis. Ces enfants sont classés dans une base de données clinique, d'analyses biologiques et radiologiques. Tout nouveau gène publié par d'autres équipes internationales ou par nos équipes peut être immédiatement comparé à cette base de données. »

Maintenant que certaines de ces maladies sont identifiées et sorties du grand sac dans lequel étaient fourrés tous les syndromes cérébelleux des jeunes enfants, les recherches vont pouvoir commencer.

### État des lieux de l'étude portant sur les enfants atteints de syndromes cérébelleux sans cause connue (janvier 2010)

Madame le professeur de Lonlay s'est fixé trois objectifs :

1. Identifier parmi les 158 enfants présentant des syndromes cérébelleux les différentes causes de ceux-ci ;

2. Proposer aux parents, non pas de guérir leurs enfants, car ce n'est pas encore possible aujourd'hui, mais de les aider pour améliorer le quotidien de ces enfants par des soins de kinésithérapie, d'orthophonie, de motricité, de diététique, un suivi psychologique, la scolarité, etc. ;

3. Engager des recherches fondamentales sur le métabolisme de ces enfants.

Pour atteindre ces objectifs, Pascale de Lonlay a constitué une solide équipe et a su introduire la multidisciplinarité. Ainsi, des radiologue, biochimiste, généticien, neurologue, métabolicien, psychologue, kinésithérapeute, orthophoniste, diététicien, ergothérapeute, psychomotricien, orthoptiste et enseignant travaillent ensemble. Cette équipe a mis au point une méthode qui permet de faire le lien entre l'imagerie médicale, les analyses biologiques et

génétiques et les signes cliniques. Ainsi, un tiers des 158 enfants a pu connaître très exactement quelle était sa maladie. De grandes espérances d'identification pour un autre tiers des enfants sont permises. Il a fallu sept ans de travail pour mettre au point cette méthode de diagnostic. « *Le but du travail était de proposer un algorithme\* de l'imagerie cérébrale pour aider au diagnostic des syndromes cérébelleux liés à des maladies génétiques malformatives et des maladies génétiques métaboliques,* précise Pascale de Lonlay. *Nous avons ainsi étudié 158 patients avec un syndrome cérébelleux et une IRM\*\* cérébrale. Nous avons exclu les patients avec des anomalies sustentorielles associées.* »

\* Un algorithme est composé d'une succession d'étapes nécessaires à la résolution d'un problème. En d'autres termes, c'est le processus permettant de donner, par le calcul, la réponse à un problème. Ce travail a été réalisé par le professeur Bodaert, radiologue, en collaboration avec les équipes de métabolisme, de neurologie, de génétique, d'ophtalmologie et de neurochirurgie de l'hôpital Necker-Enfants malades.

\*\* Imagerie par résonance magnétique nucléaire

## 7. Tous les moyens sont-ils bons pour guérir ?

Lorsque l'on est atteint par une maladie pour laquelle il n'existe aucun médicament ni traitement, quoi de plus légitime que de vouloir s'informer, comprendre et chercher des solutions ? Il est naturel qu'une personne malade, ses parents, accompagnants et amis cherchent des moyens pour guérir ou pour atténuer les effets de la maladie. *« Nous sommes tous passés par cette étape et, tous, nous avons fait usage de divers expédients, confie Hubert Bœuf, administrateur de CSC. Nous nous trouvons dans une situation de faiblesse. Certains en profitent et proposent des offres qui peuvent paraître intéressantes. Ils sont guérisseurs, magnétiseurs, marabouts, ou même professionnels de santé avec des titres honorifiques. Ils peuvent faire partie d'organismes confessionnels, sectaires, etc. Leur pouvoir de nuisance a bien évidemment été décuplé avec l'arrivée du réseau Internet. »* En effet, en permettant la circulation de très nombreuses informations à l'échelle de la planète, Internet offre des possibilités quasi infinies dans tous les domaines. Une grande quantité de médicaments, d'analyses ou d'interventions médicales sont proposés. Ces offres s'accompagnent généralement de témoignages de personnes en ayant bénéficié.

La lecture de ces témoignages fait apparaître que :

1. Tous sont rédigés au cours du traitement ou dans la semaine qui suit la fin de celui-ci ;
2. Tous sont favorables aux traitements proposés ou appliqués ;
3. Aucune possibilité de contacter le témoin n'est offerte ;
4. Aucune référence de publications scientifiques dans des ouvrages reconnus n'est donnée ;
5. Aucun témoignage ne donne la situation du patient six mois ou un an après le traitement.

*« À ce jour et à notre connaissance, aucun de nos adhérents n'a trouvé un bénéfique, même minime, un an après un traitement de ce type, ajoutent Hubert Bœuf et Évelyne Delion, après quinze ans d'écoute des patients ou de leur famille. Le moindre mal serait de s'être simplement fait rouler : avoir dépensé beaucoup d'argent (plusieurs milliers d'euros, parfois) pour rien. Mais les offres proviennent souvent d'organismes situés hors de l'Union européenne, dans des pays n'ayant ni la même conception de la santé ni la même réglementation que nous. Nos lois et réglementations n'y sont pas applicables, et nous n'avons aucune possibilité de recours. Mais le plus grave, c'est que nous n'avons aucune assurance de l'absence de dangerosité de ce qui nous est proposé. »*

Comment être sûr, effectivement, que le médicament reçu contient bien le principe actif ou qu'il n'est pas une contrefaçon contenant un produit nocif ?

Une offre particulièrement attirante est aujourd'hui disponible *via* Internet : le traitement à base de cellules souches. Une cellule souche peut, dans certaines conditions, être transformée en n'importe quelle cellule de l'organisme, par exemple en neurone. Il est tentant de penser que de telles cellules pourraient venir remplacer celles qui sont manquantes ou défectueuses dans un cervelet malade. *« Les cellules souches constituent une révolution pour la recherche, indique Alexandra Dürr, neurogénéticienne à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et présidente du conseil médical et paramédical de CSC. Grâce à elles, nous allons pouvoir mieux comprendre les mécanismes de la maladie, tester des candidats médicaments, etc. Mais il n'est pas question de les injecter directement dans le corps du malade, sauf si l'on souhaite voir se développer une tumeur. »*

### > L'information sur Internet : comment sélectionner les sites fiables ?

Voici une liste non exhaustive de questions à se poser face aux offres proposées *via* le réseau Internet. Dans tous les cas, il convient de rester critique face aux informations recueillies sur Internet, et particulièrement vigilant au regard du caractère commercial de certaines offres.

#### 1. Quelle est la source ?

– La source est-elle identifiée ? Interroger les rubriques « Qui sommes-nous ? » ou « Contactez-nous ».

– S'agit-il d'une page personnelle, d'un site associatif ou institutionnel, d'un site privé ou public ?

#### 2. Quelle est la nature du site ?

– S'agit-il d'un portail, d'un site d'information, d'un forum de discussion, d'un chat ?

– Celui-ci est-il libre ou filtré par un modérateur ? Qu'est-ce qui légitime le modérateur dans sa fonction : est-il responsable du site, médecin ? Comment peut-il vérifier le sérieux des informations échangées ? Il faut pouvoir identifier la personne qui répond aux questions posées.

Même pour une maladie identique, chaque cas est unique, et ce qui conviendra à une personne ne conviendra pas à une autre, *a fortiori* pour nos pathologies aux mécanismes complexes.

#### 3. Comment est financé le site : publicité, partenaires financiers ou par l'auteur du site ?

#### 4. À qui est destiné le site ?

– Quels sont les lecteurs ciblés : grand public ou professionnels ?

– Quel est le niveau de langage : général ou technique ? Certains sites sont destinés uniquement aux professionnels de santé et sont inaccessibles au grand public.

#### 5. Quelle est l'éthique du site ?

L'éthique et la fiabilité du site sont-

elles garanties par l'adhésion à un organisme de validation des sites de santé ou par la signature d'une charte reconnue pour ses critères de qualité ?

#### 6. Quels liens hypertextes ?

Il arrive qu'au fil d'une navigation sur Internet, on se laisse aller à passer de site en site au gré des liens hypertextes. On peut alors s'éloigner de son objectif premier et baisser la garde, être moins vigilant. Certains sites Internet sont une source d'information complémentaire de qualité, mais peuvent aussi renvoyer sur des sites moins fiables. C'est pourquoi il faut rester attentif à la fiabilité des liens hypertextes.

#### 7. Le site propose-t-il une publicité ou une offre de thérapie ou de médicament ?

**La publicité et la vente de médicaments par Internet sont interdites en France et en Europe.** Cette interdiction ne vaut pas pour tous les pays, et il arrive que ces médicaments soient vendus sur Internet sans aucun contrôle.

### > Acheter des médicaments sur Internet : la conduite à tenir

Lorsqu'on se trouve face à une offre de traitement sur Internet, il faut systématiquement se poser les questions suivantes.

– Quel est le vocabulaire employé : clair ou volontairement compliqué, technique et par conséquent obscur pour un large public ?

– Quelles sont les informations fournies : le nom du produit, le principe actif et le mode d'action, les indications, le nom du fabricant, la composition, la présentation et les formes pharmaceutiques, les conditions d'utilisation, les posologies, les effets indésirables, les modes de conservation ?

– Lorsqu'un médicament (ou une

analyse) est proposé, assurez-vous qu'il l'est par une entreprise réelle et non par une « boîte à lettres ». Le cas des analyses, *a fortiori* génétiques, est délicat : il faut s'assurer que vos résultats ne seront pas utilisés à d'autres fins et ne seront pas transmis à des tiers plus ou moins bien intentionnés.

### **Acheter des médicaments sur Internet peut s'avérer dangereux.**

Le médicament n'est pas un produit comme les autres. Il peut être contre-indiqué et provoquer chez une personne donnée des effets indésirables qu'il ne provoquera pas chez une autre. Attention aux associations non contrôlées de médicaments. Elles peuvent vous conduire aux urgences. C'est pourquoi l'avis d'un professionnel est indispensable avant de déterminer si ce médicament vous convient. **La prise d'un médicament doit s'accompagner d'un suivi médical.** Quel peut bien être le suivi dans le cas d'un médicament acheté sur Internet ?

Par ailleurs, rien ne garantit que le médicament contienne bien le principe actif annoncé. Contrairement aux médicaments vendus en pharmacie, il n'existe pour ces médicaments aucune garantie, ni aucun contrôle de qualité par les autorités compétentes. Aucune certitude non plus quant à la bonne livraison du produit, dans des conditions de conservation correctes, sans compter la possibilité de saisie par les douanes.

Face aux analyses, serez-vous capable d'interpréter les résultats ? Croyez-vous qu'un médecin qui n'a pas prescrit ces analyses et qui ne connaît pas le laboratoire acceptera de vous expliquer les résultats ?

Pour toutes ces raisons, il est prudent d'éviter les commandes de médicaments sur Internet et de demander systématiquement les conseils d'un médecin.

### **À corps perdu**

*« Permettez-moi de vous livrer quelques réflexions personnelles et mises en garde que chacun entendra s'il le désire. J'ai vu récemment sur Internet apparaître des traitements "miraculeux" dénués de tout fondement scientifique. J'ai rencontré des gens qui se sont lancés « à corps perdu », c'est le cas de le dire, dans des régimes alimentaires "sains" censés remplacer tous les médicaments si peu efficaces. J'ai été moi-même approché par des gens bien intentionnés, eux-mêmes embrigadés à leur insu, qui proposaient de soulager mes soucis en adhérant à un groupe qui cachait une secte. Une seule certitude : ce qui concrètement risquait le plus d'être soulagé était mon portefeuille !*

*Malades ou parents, devant une maladie encore aujourd'hui incurable, longue et éprouvante, nous sommes des cibles fragilisées, prêtes parfois à nous raccrocher à tout discours positif du type "On va vous guérir". À nous donc de faire la part des choses entre alimentation saine, qui ne peut qu'être bénéfique à tous, et amélioration de notre état général, qui ne signifie pas "guérir d'une ataxie". De même, sachons différencier l'effet placebo du prétendu bien-être apporté par des "ondes cosmiques".*

*Quant au prosélytisme de ces sectes qui recherchent les personnes fragilisées pour vendre leur idéologie fumeuse et intéressée, rejetez-le sans plus tarder. »*

Tribune libre de Jacques Dazin  
*Espoir* n° 120 – juillet 2010  
[www.afaf.asso.fr](http://www.afaf.asso.fr)

Sur Internet, tous les sites ne sont pas sérieux. Prenez la précaution de vérifier que le site que vous consultez a signé la charte de la fondation Health on the Net (HONcode). Elle permet de s'assurer qu'un site Internet respecte certains standards, notamment en termes de vérifiabilité des informations. Par contre, la charte ne garantit pas la véracité des informations présentes sur un site.



En France, le site le plus sérieux au sujet des maladies rares est Orphanet ([www.orphanet.fr](http://www.orphanet.fr)). **Avant de vous engager, questionnez le centre de référence de votre maladie.**

### 8. Comment patients, médecins, chercheurs et modèles *in vitro* et *in vivo* se complètent

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'identifier les causes génétiques d'un grand nombre de maladies héréditaires ou familiales durant les vingt dernières années. Dans le cas des ataxies cérébelleuses dominantes, par exemple, trente et un gènes ont déjà été localisés. Les mutations les plus fréquentes sont les expansions de triplets CAG présents dans les gènes SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 et DRPLA.

**Quelques questions posées à Giovanni Stevanin**, chercheur au laboratoire Neurologie et thérapeutique expérimentale situé à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, permettent d'en savoir plus.

#### Faut-il continuer à rechercher de nouveaux gènes en cause dans les ataxies dominantes ?

Beaucoup reste à faire sur les aspects génétiques des ataxies cérébelleuses héréditaires, car, en France, seulement la moitié des cas sont expliqués par les gènes connus ou localisés. C'est déjà plus qu'en Scandinavie, où seulement 10 % des patients ont

une explication génétique de leurs troubles. Continuer à rechercher les gènes en cause, c'est pouvoir répondre à chaque patient et sa famille avec la possibilité de proposer un conseil génétique adéquat. C'est également comprendre, par le suivi régulier des patients, chaque forme de la maladie et, à plus long terme, permettre de passer à une étape ultérieure qui est essentielle : inclure ces patients dans des études précliniques si des pistes médicamenteuses se dégagent. De plus, connaître l'anomalie génétique représente un atout indispensable pour comprendre les mécanismes cellulaires mis en jeu par la maladie : plus précisément, il s'agit de la possibilité de modéliser la maladie.

#### Pourquoi modéliser la maladie ?

La plupart du temps, connaître la mutation ne suffit pas à comprendre les conséquences qu'elle peut avoir au niveau de la cellule nerveuse (neurone). Il faut donc pouvoir reproduire la maladie et suivre les étapes successives qui mènent à la souffrance du neurone et à son dysfonctionnement, voire sa dégénérescence parfois. C'est en comprenant ces étapes que l'on pourra imaginer trouver une stratégie qui puisse interrompre ce processus.

#### Comment modéliser la maladie ?

Il existe plusieurs méthodes, et le choix de la méthode dépend de la nature de la mutation et du modèle choisi. On peut choisir d'étudier des modèles cellulaires en culture dans des boîtes maintenues à 37 °C (modèles *in vitro*) ou de produire un nouvel animal vivant porteur de la mutation, qui peut être soit un mammifère (souris, le plus souvent), soit un poisson vertébré (poisson-zèbre), soit un insecte (mouche drosophile) ou encore un ver (nématode *C. elegans*). Selon le modèle et l'animal, on peut introduire le gène anormal humain dans des cellules en culture ou des œufs, produits de la fusion d'un spermatozoïde et d'un

ovule. Dans ce dernier cas, on crée ainsi un nouvel organisme ayant intégré le gène anormal humain, modèle que l'on va pouvoir ensuite étudier. Il faut compter de un à deux ans et environ 20 000 euros pour une souris dite « transgénique ». Dans certains cas, on doit modifier le gène équivalent à celui présent chez l'homme pour y introduire la mutation, ce qui est généralement plus long et délicat. La biologie n'étant pas une science parfaitement maîtrisable, certains modèles n'aboutissent jamais et ne sont que pure perte de temps et d'argent, sans que cela puisse être prédit, malheureusement.

Après la création d'un modèle, son analyse peut nécessiter plusieurs années d'effort et plusieurs étudiants et chercheurs successifs, ainsi que de la chance, parfois... Le coût de l'analyse du modèle est globalement proportionnel à la taille de l'animal et à sa proximité avec l'homme. Ainsi, un modèle souris sera beaucoup plus coûteux à analyser (plusieurs milliers d'euros par mois pour entretenir une lignée) qu'un modèle drosophile ou un modèle *in vitro* (culture de cellules). De même, le temps nécessaire et les moyens humains requis sont beaucoup plus importants pour un modèle souris (plusieurs années) par rapport à des modèles *in vitro* (quelques mois). Mais, en contrepartie du temps et des moyens déployés, le rendement est souvent meilleur dans le cas d'un modèle vivant, alors que les modèles *in vitro* ne permettent que des réponses à des questions précises. Il faut noter qu'aucun de ces modèles n'est parfait, bien évidemment, mais, si l'on tient compte de leurs défauts, chacun d'eux peut apporter des réponses intéressantes et surtout complémentaires pour la compréhension de la maladie. Ainsi, bien souvent, plusieurs types de modèles sont créés pour une même maladie.

Dans le cas de l'ataxie spinocérébelleuse SCA7, des modèles simples en culture de cellules *in vitro* ont tout d'abord été utilisés afin de reproduire la maladie (équipe de la Pitié-Salpêtrière, à Paris). Cela a permis de montrer que l'introduction de la mutation SCA7 dans des cellules suffit à recréer un élément majeur de la maladie, à savoir la formation de dépôts de protéines (agrégats ou inclusions nucléaires) dans le noyau des neurones. La composition de ces agrégats a été étudiée finement afin de comprendre comment ils se forment, notamment en mettant en jeu des protéines de stress et des acteurs de la dégradation des protéines pointant une sous-structure du noyau de la cellule : les corps nucléaires. Ce sont ces observations qui sont à l'origine d'un essai préclinique d'interféron (afin de renforcer l'action des corps nucléaires) actuellement en cours chez un modèle de souris SCA7 dans l'équipe de la Pitié-Salpêtrière, avec le soutien de CSC. De tels essais sont coûteux en souris, en médicament à tester et en moyens humains.

Des modèles de souris SCA7 ont également été produits à Strasbourg (équipe de l'IGBMC, à Illkirch) et aux États-Unis. Ils sont toujours en cours de caractérisation depuis le début des années 2000. Ils ont permis d'étudier ce qui se passe au niveau du neurone, mais également au niveau de l'organisme entier. Ces modèles souris sont des outils indispensables et obligatoires pour valider toute idée thérapeutique avant de passer à l'homme. Un modèle drosophile de SCA7 a également été généré récemment grâce à une collaboration entre l'institut Jacques-Monod et la Pitié-Salpêtrière, et grâce au soutien financier de CSC. Ce modèle a permis de montrer que la diminution de la quantité de protéine anormale produite par le gène SCA7 muté chez la mouche adulte améliore les signes cliniques et la survie. Donc un traitement visant à

bloquer le gène SCA7 ou à dégrader la protéine SCA7 anormale pourrait en théorie fonctionner. Cela a permis de lancer des essais dans ce sens chez la souris et a conforté l'idée d'utiliser les corps nucléaires *via* l'interféron pour augmenter la dégradation des protéines anormales.

On voit bien, dans ces exemples, que les différents modèles se complètent et se renforcent, ce qui permet ensuite de lancer des projets d'essais thérapeutiques précliniques chez la souris qui soient cohérents et qui respectent le cadre éthique de l'utilisation de l'animal, car s'appuyant sur des données scientifiques solides.

#### Peut-on se passer des tissus de patients ?

Comme souligné plus haut, les modèles sont par définition imparfaits, et il est donc toujours indispensable de valider les observations ou les hypothèses, d'une part chez un mammifère (d'où un prérequis important qui est la nécessité d'avoir un modèle souris de chaque maladie), et surtout chez l'homme. Des échantillons biologiques de patients sont donc indispensables (sang, biopsies de peau ou de muscle et *don post mortem* de cerveau). Pour donner un exemple, après des suspicions faites sur les modèles cellulaires, c'est l'étude de cerveaux de patients SCA7, puis d'autres ataxies cérébelleuses héréditaires, qui a permis de démontrer que les corps nucléaires étaient une cible intéressante à tester en thérapeutique.

#### Peut-on imaginer des traitements communs aux différentes ataxies ?

La réponse est difficile. Il existe bien sûr des différences entre les formes d'ataxies cérébelleuses qui expliquent pourquoi la vitesse d'évolution, les lésions et certains signes cliniques sont différents. Toutefois, beaucoup de points communs existent. Les différentes formes d'ataxies causées par des expansions CAG (SCA1,

SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17 et DRPLA) partagent la même mutation et des mécanismes communs au niveau de la souffrance des neurones. Il est donc raisonnable de penser que l'identification de molécules thérapeutiques dans une SCA donnée puisse se révéler intéressante pour d'autres SCA. Un bel exemple est encore une fois l'identification des corps nucléaires comme cible thérapeutique dans l'ataxie SCA7. En effet, il a pu être montré que ces corps nucléaires sont également présents à proximité des agrégats protéiques d'autres SCA, ouvrant peut-être la perspective de l'interféron comme traitement dans plusieurs SCA si l'essai en cours dans SCA7 s'avère concluant. Mais cela devra d'abord être confirmé dans chaque modèle animal de SCA.

Les ataxies cérébelleuses non causées par des expansions CAG ont aussi des points communs, notamment avec celles causées par des expansions CAG : la formation d'agrégats, des dérégulations de mécanismes cellulaires communs, etc. Encore une fois, tout progrès dans une SCA pourrait donc avoir aussi des conséquences sur les autres. On fait également le pari, raisonnable, que des mécanismes communs existent entre les formes héréditaires et les formes sporadiques. Enfin, il existe des liens entre les ataxies et d'autres maladies neurologiques, notamment la maladie de Huntington, causée également par une expansion CAG, mais surtout les paraplégies spastiques, dont certaines formes associent des signes d'ataxie : par exemple, deux gènes qui coopèrent au sein de la mitochondrie de la cellule sont pour l'un responsable de l'ataxie SCA28 et pour l'autre de la paraplégie spastique SPG7, une pathologie dans laquelle il existe aussi une atteinte du cervelet.

## 9. Conclusion

Dans le but de comprendre les différents syndromes cérébelleux, d'identifier leurs mécanismes pour les traiter et guérir les malades, la recherche a besoin des patients et de leur famille pour identifier les causes des ataxies cérébelleuses. L'identification de l'ensemble des gènes permettra de mieux comprendre l'ensemble des ataxies en connaissant tous les systèmes qui peuvent être touchés au cours de l'atteinte du cervelet et de ses connexions. De plus, il faut pouvoir continuer à répondre aux besoins diagnostiques des patients et mieux connaître l'évolution de chaque forme pour améliorer le suivi des patients. L'identification des mécanismes au niveau de la cellule et de l'organisme ne peut pas se passer de l'établissement de modèles, qu'ils soient *in vitro* ou *in vivo*. Ils permettent de dégager les caractéristiques de la maladie et de définir les cibles sur lesquelles pourront être appliqués des traitements. Ces modèles sont en outre des outils indispensables pour tester les médicaments avant leur utilisation chez l'homme. Enfin, la comparaison des différents modèles, leur confrontation avec les observations cliniques et les examens *post mortem* des patients sont utiles pour définir les axes de recherche pertinents dans chaque maladie. Ainsi, le don de cerveau et de tissus est aussi un acte important pour la compréhension de ces maladies. Les patients ont besoin que la recherche avance, et le chercheur n'est rien sans les patients.

# Remerciements

Chef de projet pour CSC : Hubert Bœuf.

Conception et réalisation du livret : Alsace Média Science - [www.amscience.com](http://www.amscience.com)

Interviews, rédaction et réécriture : Frédéric Naudon.

Correction orthotypographique : Élodie Chanrion.

La réalisation de ce livret d'accueil a été possible grâce au concours financier de Sanofi-Aventis et du groupe Generali. Qu'ils en soient ici vivement remerciés.

## ***Sont remerciés pour leurs contributions à cet ouvrage :***

Les membres du comité éditorial : Hubert Bœuf, Évelyne Delion, Francine Sion.

Les chercheurs et médecins qui ont bien voulu être interviewés, fournir des textes et aussi relire certaines parties de ce livret : Pierre Rustin, Michel Koenig, Pascale de Lonlay, Didier Devys, Charles Duyckaerts, Marie-Claire Artaud, Jérôme Honnorat, Sylvie Forlani, Marcela Gargiulo, Cyril Goizet et Giovanni Stevanin.

Les bénévoles de CSC qui ont accepté de fournir leurs témoignages et des textes sur différents points, et qui ont surtout consacré beaucoup de temps à la lecture et relecture de ce livret : Rachel B., Sylvain, Dominique, Christian, Raymond, Jacqueline, Cécile, Nathalie, Hubert, Marie-Christine, Nicole, Laurent, Jean-Claude, Brigitte, Djamila, Évelyne, Rachel L., Ilham, Marie, Francine, Claude, Catherine, Marie, Frédéric, Franck, Valérie, Geneviève et Alain.

Juliette Dieusaert, présidente de l'AFAP, et son conseil d'administration, qui nous ont permis de nous inspirer de leur travail similaire déjà réalisé sous forme d'un classeur disponible sur leur site ([www.ataxie.com](http://www.ataxie.com)).

Claire Déat, directrice de la MDPH des Deux Sèvres et Brigitte Melotto-Corbet de la CPAM de Toulouse pour leur textes ressources sur la prise en charge médicale et sur les MDPH.

*« Que tous en soient chaleureusement remerciés au nom de tous les malades, leurs familles et accompagnants. MERCI, 1000 FOIS MERCI, pour votre générosité et gentillesse.*

*Si ce livret d'accueil permet aux lecteurs de mieux comprendre nos maladies et les aide à mieux les vivre, il aura atteint son objectif et ce sera le meilleur des remerciements que vous donnerez aux différents contributeurs à sa réalisation. Merci ».*

Hubert Boeuf