



HAL
open science

Développement d'un nouveau modèle cellulaire de l'ataxie de Friedreich : différenciation de cellules pluripotentes induites de patients en cardiomyocytes

Aurore Hick

► **To cite this version:**

Aurore Hick. Développement d'un nouveau modèle cellulaire de l'ataxie de Friedreich : différenciation de cellules pluripotentes induites de patients en cardiomyocytes. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ064 . tel-01227388

HAL Id: tel-01227388

<https://theses.hal.science/tel-01227388v1>

Submitted on 10 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS UMR 7104 – INSERM U 964 – Université de Strasbourg

THÈSE présentée par :

Aurore HICK

soutenue le : 4 avril 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

**Développement d'un nouveau modèle
cellulaire de l'ataxie de Friedreich :
différenciation de cellules pluripotentes
induites de patients en cardiomyocytes**

THÈSE dirigée par :

Le Dr Hélène PUCCIO

Institut de Génétique et de Biologie Cellulaire et
Moléculaire (IGBMC), Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Le Dr Alexandra DÜRR

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) - Paris

Le Dr Stéphane ZAFFRAN

UMR S910, Faculté de Médecine de la Timone - Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Le Dr Frank YATES

Ecole de Biotechnologies Sup'Biotech - Paris

Le Dr Nicolas CHARLET-BERGUERAND

Institut de Génétique et de Biologie Cellulaire et
Moléculaire (IGBMC), Université de Strasbourg

Tous droits réservés

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Alexandra Dürr, Stéphane Zaffran, Nicolas Charlet-Berguerand et Frank Yates d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et pour la discussion que nous avons eue lors de ma soutenance.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux membres passés et présents du laboratoire d'Hélène Puccio. Merci pour votre bonne humeur et pour les bons moments que nous avons passés ensemble. Je tiens à remercier plus particulièrement :

Hélène, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir proposé de faire une thèse dans ton laboratoire malgré mes réticences. Merci de m'avoir fait confiance pour la conduite du projet « iPS » après le départ de Marie. Grâce à cela, j'ai énormément appris au niveau scientifique, mais aussi humain.

Nadège, tu as été une aide très précieuse pour moi. J'ai vraiment adoré travailler avec toi, d'autant plus que tu t'es adaptée à toutes mes petites manies (la plus célèbre : mes checklists !). Je crois d'ailleurs avoir un peu déteints sur toi ;-). Merci pour ta gentillesse, ta volonté et ton efficacité redoutable. En deux ans je t'ai vu évoluer, prendre davantage confiance en toi. Continue comme ça. Je suis vraiment fière de toi. Et encore merci !

Morgane, Floriana et Leïla : Radio Potins ! Qu'est-ce qu'on a pu rigoler ensemble ! Plus sérieusement, merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir écoutée et m'avoir aidée à traverser les moments difficiles. C'est avec un petit pincement au cœur que je vois nos chemins s'écarter aujourd'hui, mais j'espère qu'ils vous mèneront chacune au bonheur et à la réussite. Ah, mais ne débranchez pas Radio Potins ! J'attends de vos nouvelles !

Laurence, tu égrènes tes petits « trucs et astuces » pour le bonheur des étudiants qui défilent dans le laboratoire. Merci de m'en avoir aussi fait profité. Au fait, je suis très fière d'avoir contribué à l'évolution technologique qui a consisté à te faire passer de 96 à 384 puits pour tes qPCR ! ;-)

Marie, tu m'as fait découvrir le monde merveilleusement impitoyable des iPS... Merci pour ta patience et ton soutien. Je suis contente d'avoir été (malgré moi) à l'origine de ton nouveau poste, dans lequel tu t'épanouies aujourd'hui.

Je tiens aussi à remercier :

- Les équipes de génétique humaine
- Les services communs de l'IGBMC : en particulier le service de culture, la plateforme d'imagerie et la plateforme de criblage.
- Les Zumba girls (Morgane, Caroline et Laure) : parce que faire du sport entre copines dans la bonne humeur ça permet de se défouler et d'oublier les contrariétés de la journée !

Petit message à l'attention de ma famille (côté Hick et côté Colin) : merci pour votre soutien indéfectible et pour votre compréhension. Je n'ai pas compté les retards aux repas du dimanche liés aux imprévus de la culture des iPS, ni les nombreuses visites écourtées pour cause de « protocole de différenciation en cours », mais je sais qu'il y en a eu beaucoup. Encore merci.

Enfin, mes chères lignées iPS : vous m'en avez fait voir de toutes les couleurs, mais c'est quand même avec un petit pincement au cœur que je conclus ce projet aujourd'hui...

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	8
ABREVIATIONS	9
PREAMBULE	11
PARTIE 1 : INTRODUCTION	12
<u>I. L'ataxie de Friedreich</u>	12
A. Epidémiologie	12
B. Tableau clinique	12
1- Symptômes et évolution de la maladie	12
a) Premiers symptômes	12
b) Progression de la maladie	13
c) Pronostic	14
2- Variabilité clinique	14
C. Origine génétique	15
1- Mutations dans le gène codant pour la frataxine	15
a) Identification du gène	15
b) Les deux types de mutations à l'origine de l'AF et leurs conséquences	15
2- Extinction du gène FXN par l'expansion (GAA) _n	17
a) Hétérochromatinisation du locus	17
b) Formation de structures secondaires	18
D. Anatomopathologie et physiopathologie	19
1- Atteintes neurologiques	19
a) Atteinte périphérique	19
b) Atteinte de la moelle épinière	20
c) Atteintes du cervelet	20
2- Cardiomyopathie	20
a) Fonctionnalité du cœur des patients AF	21
b) Atteintes tissulaires et cellulaires	22
c) Énergétique du cœur des patients AF	23
3- Diabète	23
4- Physiopathologie : observations faites chez les patients AF	24

E. La frataxine	26
1- Structure, localisation et maturation	26
2- Fonction de la frataxine : régulation de la biosynthèse des centres Fe-S	26
a) Les centres Fe-S	26
b) La biosynthèse des centres Fe-S	27
II. Les modèles animaux et cellulaires de l'ataxie de Friedreich	28
III. Les cellules pluripotentes induites « iPS » et leurs cellules dérivées	29
A. Définition	29
1- Caractéristiques	29
2- Culture	29
B. Obtention d'iPS	29
1- La reprogrammation	29
a) Principe	29
b) Méthodes de reprogrammation	31
2- Sélection et validation des iPS après reprogrammation	32
C. Proximité des cellules iPS avec les cellules ES	33
D. Applications des iPS et de leurs dérivés	34
1- Généralités	34
2- Cas des pathologies cardiaques	35
3- Limites à l'utilisation des iPS pour la modélisation de maladies	36
a) Choix des contrôles	36
b) Comparaison de cellules ES et iPS pour une même maladie	37
c) Effet de la reprogrammation sur les « maladies épigénétiques »	37
d) Difficultés lors de la reprogrammation	38

PARTIE 2 : RESULTATS

I. Intérêt des iPS pour modéliser l'ataxie de Friedreich	40
II. Contexte et objectifs de mon travail de thèse	41
A. Point de départ	41
B. Travaux sur les iPS de patients AF des autres équipes du domaine	41
C. Problématique et questions posées	42
D. Mon cheminement	43

III. <u>Manuscrit : « Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia »</u>	44
A. <u>Démarche expérimentale</u>	44
1- Choix d'une stratégie de différenciation cardiaque	44
2- Utilité des corps embryoides (EB, pour <i>embryoid bodies</i> en anglais)	44
3- Rôle de l'acide ascorbique (AA)	46
B. <u>Résultats</u>	48
C. <u>Conclusion</u>	50
1- Intérêt et limites de ce travail	50
2- Problèmes rencontrés	50
3- Changement de stratégie et conséquences	51
IV. <u>Développement d'un protocole de différenciation des iPS en cardiomyocytes et poursuite de l'analyse des cardiomyocytes de patients</u>	53
A. <u>Pré-requis</u>	53
1- Développement embryonnaire du cœur	53
2- Bioénergétique des cardiomyocytes	54
3- Aspect technique : méthodes de sélection/enrichissement des cardiomyocytes	55
B. <u>Résultats</u>	58
1- Mise au point d'un protocole de différenciation cardiaque	58
a) <i>Démarche</i>	58
b) <i>Protocole final</i>	59
c) <i>Méthode de sélection/enrichissement utilisée</i>	60
2- Caractérisation des cardiomyocytes obtenus	61
a) <i>Phénotype AF : comportement de l'expansion (GAA)_n</i>	61
b) <i>Phénotype AF : études de cardiomyocytes AF âgés de 4 mois</i>	62
c) <i>Phénotype AF : impact d'un métabolisme mitochondrial forcé</i>	63
d) <i>Maturation et type de cardiomyocytes</i>	63
C. <u>Conclusion</u>	64
PARTIE 3 : DISCUSSION	65
<hr/>	
I. <u>Différenciation des iPS en cardiomyocytes</u>	65
A. <u>Efficacité des protocoles de différenciation</u>	65
1- Généralités	65
2- Protocole N°1 : différenciation indirecte via les EB	66
3- Protocole N°2 : différenciation directe	67

4- Transférabilité du protocole de différenciation N°2 à d'autres lignées iPS	67
B. <u>Améliorations et perspectives</u>	67
1- Coût de la différenciation et modifications possibles	67
2- Affranchissement des iPS	69
a) <i>La conversion directe (transdifférenciation)</i>	69
b) <i>Production et culture de progéniteurs cardiaques</i>	69
3- Dérivation de nouvelles lignées iPS	70
II. <u>Phénotype des cardiomyocytes AF</u>	71
A. <u>Timing d'apparition du phénotype</u>	71
1- Maturation générale des cardiomyocytes	71
2- Maturation par l'utilisation forcée des mitochondries	72
B. <u>Caractérisation du phénotype AF</u>	74
1- Instabilité de l'expansion (GAA) _n	74
2- Physiopathologie	75
a) <i>Les protéines Fe-S</i>	75
b) <i>Atteinte mitochondriale : dégénérescence ou dégradation ?</i>	77
C. <u>Confrontation de nos données avec celles de Lee et al., 2013</u>	78
III. <u>Cardiomyocytes obtenus par différenciation des iPS, un bon modèle de l'AF ?</u>	79
BIBLIOGRAPHIE	82
<hr/>	
ANNEXES	
<hr/>	
- ANNEXE 1 : Références bibliographiques du tableau 2	
- ANNEXE 2 : Liste et références des consommables utilisés	
- ANNEXE 3 : Composition des milieux de culture utilisés	
- ANNEXE 4 : Détail du calcul des coûts des protocoles de différenciation N°1 et N°2	

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

- FIGURE 1** Structure du gène *FXN*
- FIGURE 2** Mécanismes de répression de la transcription du gène *FXN* par l'expansion $(GAA)_n$
- FIGURE 3** Atteintes neurologiques des patients AF
- FIGURE 4** Schématisation des voies nerveuses atteintes dans l'ataxie de Friedreich
- FIGURE 5** Atteinte cardiaque des patients AF
- FIGURE 6** Energétique du cœur des patients AF
- FIGURE 7** Atteinte pancréatique des patients AF
- FIGURE 8** Physiopathologie de l'ataxie de Friedreich d'après les données issues des patients
- FIGURE 9** Conservation et structure de la frataxine
- FIGURE 10** Maturation de la frataxine
- FIGURE 11** Structure des centres Fe-S les plus courants
- FIGURE 12** Principe de la biosynthèse des protéines Fe-S
- FIGURE 13** Culture des cellules ES/iPS
- FIGURE 14** Modèle de Waddington « The epigenetic landscape »

RESULTATS

- FIGURE 15** Approche visant à utiliser les iPS pour modéliser l'ataxie de Friedreich
- FIGURE 16** Protocole de différenciation cardiaque
- FIGURE 17** Parallèle entre le développement embryonnaire précoce et celui des EB *in vitro*
- FIGURE 18** Rôles de l'acide ascorbique
- FIGURE 19** Devenir d'EB formés à partir d'iPS sur Matrigel™
- FIGURE 20** Stade précoce du développement embryonnaire cardiaque
- FIGURE 21** Métabolisme énergétique du cœur
- FIGURE 22** Bioénergétique des cardiomyocytes dérivés d'iPS
- FIGURE 23** Démarche de mise au point d'un protocole de différenciation cardiaque
- FIGURE 24** Protocole N°2 version finale
- FIGURE 25** Effet du pré-découpage des lignées iPS
- FIGURE 26** Processus de sélection/enrichissement des cardiomyocytes
- FIGURE 27** Comportement de l'expansion $(GAA)_n$ dans les iPS, les progéniteurs neuronaux et les cardiomyocytes
- FIGURE 28** Anomalies ultrastructurales révélées par microscopie électronique dans des cardiomyocytes âgés de 4 mois (milieu avec glucose)
- FIGURE 29** Effet de la déplétion en glucose sur la morphologie des cardiac bodies
- FIGURE 30** Analyse en microscopie électronique de cardiomyocytes âgés de 2 mois, ayant passé un mois en milieu déplété en glucose
- FIGURE 31** Diversité et stade de développement des cardiomyocytes âgés de deux mois

DISCUSSION

- FIGURE 32** Améliorations possibles du protocole de différenciation cardiaque N°2

- FIGURE 33** Etude du contenu en protéines Fe-S dans les cardiomyocytes dérivés d'iPS
- FIGURE 34** Système Venus de détection des centres Fe-S
- FIGURE 35** Autophagie et mitophagie
- FIGURE 36** Résultats et informations complémentaires en relation avec les travaux de Lee *et al.*, 2013

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

- TABLEAU 1** Tableau clinique de l'ataxie de Friedreich
- TABLEAU 2** Détails des mutations identifiées chez les patients AF hétérozygotes composites (hors $(GAA)_n$)
- TABLEAU 3** Modifications majeures de la chromatine relevées chez les patients AF et leurs conséquences
- TABLEAU 4** Exemples de protéines Fe-S eucaryotes reliés à la fonction de leur(s) centre(s) Fe-S
- TABLEAU 5** Référencement de publications rapportant la modélisation de pathologies cardiaques par les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients
- TABLEAU 6** Référencement de publications rapportant la modélisation de la composante cardiaque de pathologies multisystémiques par les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients

RESULTATS

- TABLEAU 7** Caractéristiques des patients (FD)/contrôles (CT) donneurs de fibroblastes et conditions de reprogrammation
- TABLEAU 8** Travaux sur les iPS de patients AF publiés par d'autres équipes
- TABLEAU 9** Démarche entreprise lors de ma thèse
- TABLEAU 10** Comparaison des stratégies de différenciation des ES/iPS humaines en cardiomyocytes
- TABLEAU 11** Récapitulatif de la caractérisation des iPS et des cardiomyocytes AF
- TABLEAU 12** Comparaison des méthodes de culture de nos iPS

DISCUSSION

- TABLEAU 13** Efficacité de différenciation cardiaque des différents clones iPS selon le protocole utilisé
- TABLEAU 14** Estimation du coût de revient des protocoles de différenciation cardiaque utilisés
- TABLEAU 15** Evaluation du degré de maturation des cardiomyocytes

ABREVIATIONS

3D	3-dimensions
AA	Acide Ascorbique
Aa	Acide aminé
ABCG2	<i>ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2</i>
ACO	Aconitase
ActA	<i>Activin A</i>
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AF	Ataxie de Friedreich
AFP	<i>alpha-fetoprotein</i>
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase</i>
ALS	<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
AMPK	<i>5' AMP-activated protein kinase</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
ARN(m)	Acide RiboNucléique (messenger)
AraC	<i>Cytosine-1-β-D-arabinofuranoside</i>
ARVD/C	<i>Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia / Cardiomyopathy</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
AzC	<i>L-2-Azetidine Carboxylic acid</i>
bFGF, FGF2	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP(4)	<i>Bone Morphogenic Protein (4)</i>
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
CB	<i>Cardiac Bodies</i>
cGATA6	<i>chicken GATA binding protein 6</i>
CIA	<i>Cytosolic ISC Assembly</i>
CICR	<i>Calcium-Induced Calcium Release</i>
CIS	<i>cis-4-hydroxy-D-proline</i>
CM	CardioMyocytes
Col1a1	<i>Collagen type I alpha 1 gene</i>
Col4a1	<i>Collagen type IV alpha 1 gene</i>
CT	Contrôle
cTnT, TNNT2	<i>cardiac Troponin T</i>
Cr	Créatine
CyaY	Orthologue bactérien de la frataxine
DCM	<i>Dilated CardioMyopathy</i>
DKK1	<i>Dickkopf-1 homolog</i>
DNMT3B	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta</i>
DPI	Diagnostic Pré-Implatatoire
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
EB	<i>Embryoid Bodies</i>
ECG	ElectroCardioGraphie
EFACTS	<i>European Friedreich's Ataxia Consortium for Translational Studies</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EHS	Engelbreth-Holm-Scharm
END-2	<i>mouse visceral ENDoderm-like cells</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal Regulated Kinase 1/2</i>
ES	<i>Embryonic Stem cells</i>
ETS2	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>

FADH ₂	<i>Flavine Adénine Dinucléotide</i>
FARR	<i>Friedreich's Ataxia with Retained Reflexes</i>
Fe-S	<i>Fer-Soufre</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FIV	<i>Fécondation in vitro</i>
FLT1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
FoxA2	<i>Hepatocyte nuclear factor-3 beta (HNF-3B)</i>
FXN	Gène codant pour la frataxine humaine
FXN	Frataxine protéine
GAA	Alpha-Glucosidase Acide
GAA	Triplet Guanine-Adénine-Adénine
GAPDH	<i>GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase</i>
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GPAT	<i>Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate AmidoTransferase</i>
GRX2	<i>Glutaredoxine 2</i>
GSK3	<i>Glycogen Synthase Kinase 3</i>
hCD2	<i>hétérochromatine-sensitive human CD2</i>
HCM	<i>Hypertrophic CardioMyopathy</i>
HDAC	<i>Histones DaACetylases</i>
HDM	<i>Histones DeMethylases</i>
HMTases	Histones MéthylTransferases
HP1	<i>Heterochromatine Protein 1</i>
IBMX	<i>3-isobutyl-1-methylxanthine</i>
IGBMC	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
iPS	<i>induced Pluripotent Stem cells</i>
IRE	<i>Iron Responsive Element</i>
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRP1	<i>IRE-binding protein 1</i>
ISC	<i>Iron Sulfur Clusters</i>
IWP	<i>Inhibitor of Wnt Production</i>
IWR	<i>Inhibitor of Wnt Response</i>
JAK/STAT	<i>Janus kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Ji1	<i>Jak Inhibitor 1</i>
kb	kilobase
KCNH2	<i>potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2</i>
KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
kDa	kilo Dalton
Klf4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
KO	<i>KnockOut</i>
KSR	<i>Knockout Serum Replacement</i>
(v)LOFA	<i>(very) Late Onset Friedreich's Ataxia</i>
LQT1/2	<i>Long QT syndrome type 1/2</i>
MCK	<i>Muscle Creatine Kinase</i>
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MEF2c	<i>Myocyte Enhancer Factor 2c</i>
MEK	<i>Mitogen-activated Extracellular signal-regulated protein Kinase</i>
MESP1	<i>Mesoderm Posterior homolog 1</i>
MLC2a	<i>Myosin Light chain 2 atrial isoform</i>
MLC2v	<i>Myosin Light chain 2 ventricular isoform</i>

MPP	<i>Mitochondrial Processing Peptidase</i>
MYH6, α -MHC	<i>Myosin, Heavy Chain 6, cardiac muscle, alpha</i>
MYH7, β -MHC	<i>Myosin, Heavy Chain 7, cardiac muscle, beta</i>
NAD(P)H	<i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)</i>
NE	<i>Non évalué</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NOX4	<i>NADPH Oxydase 4</i>
Oct4, POU5F1	<i>POU Class 5 Homeobox 1</i>
OXPPOS	<i>Oxidative Phosphorylation</i>
P4H	<i>Prolyl-4-Hydroxylase</i>
Pax-6	<i>Paired box gene 6</i>
pb	<i>paires de bases</i>
PCr	<i>PhosphoCréatine</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR α	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor-α</i>
PEV	<i>Position Effect Variegation</i>
Pi	<i>Phosphate inorganique</i>
PINK1	<i>PTEN induced putative kinase 1</i>
PKP2	<i>Plakophilin-2</i>
PPAR α/γ	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>
PTD	<i>Protein transduction domain</i>
PTP	<i>Permeability Transition Pore</i>
RER	<i>Réticulum Endoplasmique Rugueux</i>
REX1, ZFP42	<i>Zinc Finger Protein 42</i>
RMN	<i>Résonance Magnétique Nucléaire</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
RYR2	<i>Ryanodine Receptor 2</i>
SCA2	<i>Spinocerebellar Ataxia 2</i>
SCFR, c-Kit	<i>Stem Cell Factor Receptor</i>
SIRPA	<i>Signal-Regulatory Protein Alpha</i>
SOD1, CuSOD	<i>SuperOxyde Dismutase 1</i>
SOD2, MnSOD	<i>SuperOxyde Dismutase 2</i>
Sox2	<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2</i>
T3	<i>Triiodothyronine</i>
TAT	<i>HIV1-TransActivating Protein (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg)</i>
TBX5	<i>T-box 5</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TMRM	<i>TetraMethylRhodamine Methyl ester perchlorate</i>
UBE3A	<i>Ubiquitin Protein Ligase EA3</i>
Yfh1	<i>Orthologue de la frataxine chez la levure</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
Wnt	<i>Wingless type</i>
VEGFR2, KDR, Flk1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2</i>

PREAMBULE

Alors qu'elle ne devait être qu'une formalité, la mise au point de la différenciation des cellules pluripotentes induites (iPS) en cardiomyocytes m'a finalement autant occupée que leur caractérisation, si ce n'est plus. C'est pour cette raison qu'une grande partie de ma thèse expose des aspects techniques relatifs au développement de protocoles de différenciation cardiaque.

Mon INTRODUCTION comporte trois parties : la première est une présentation de l'ataxie de Friedreich, la seconde est une revue sur les modèles animaux et cellulaires de l'ataxie de Friedreich à laquelle j'ai participé, et enfin la troisième explique ce que sont les cellules pluripotentes induites, comment elles sont obtenues et quelles sont leurs applications.

La partie RESULTATS décrit dans un premier temps le contexte scientifique dans lequel j'ai réalisé ma thèse ainsi que la démarche que j'ai adoptée pour mener à bien mon projet. Deux autres parties sont dédiées à mes résultats à proprement parler. J'ai pris la liberté d'exposer quelques prérequis à chaque fois, de façon à justifier certains de mes choix ou à expliquer les problématiques qui ont guidé mon travail. Les résultats obtenus lors de la première partie de ma thèse ont fait l'objet d'une section dans un article plus global sur les iPS de patients Friedreich et leurs dérivés neuronaux et cardiaques (Hick et al., 2013). Les résultats obtenus par la suite, n'ayant pas pu faire l'objet d'une publication, sont exposés sous forme de paragraphes thématiques.

Dans ma DISCUSSION, je reviens sur différents aspects techniques liés à la culture des cellules iPS, à leur différenciation en cardiomyocytes et à la maturation de ces derniers, ainsi que sur la caractérisation de leur phénotype. Je me suis aussi permise de rédiger un petit commentaire sur une publication récente proposant une approche intéressante de la physiopathologie des cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients Friedreich (Lee et al., 2013). Enfin, j'ai questionné la validité de la modélisation de la cardiomyopathie de l'ataxie de Friedreich par les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients, au regard des données dont nous disposons aujourd'hui.

Introduction

Hiérarchisation	Fréquence	Descriptif
Critères primaires	Essentiels	<ul style="list-style-type: none"> - Héritéité autosomique récessive - Début avant 25 ans - Ataxie progressive des membres et du tronc - Abolition des réflexes ostéotendineux des membres inférieurs (genou, talon d'Achille)
Critères secondaires	>90% des cas, apparaissent dans les 5-10 après le début de la maladie	<ul style="list-style-type: none"> - Dysarthrie - Signes pyramidaux aux membres inférieurs : <ul style="list-style-type: none"> - Signe de Babinski - Faiblesse musculaire - Perte de la sensibilité profonde dans les membres inférieurs, et notamment : <ul style="list-style-type: none"> - De la proprioception - De la sensibilité vibratoire
Critères additionnels	Non essentiels pour le diagnostique, présents dans >2/3 des cas	<ul style="list-style-type: none"> - Scoliose* - Cardiomyopathie* (ECG anormal)
Autres signes	Dans moins de 50% des cas	<ul style="list-style-type: none"> - Problèmes oculomoteurs - Atrophie du nerf optique - Hypoacousie - Pieds creux* - Diabète - Troubles de la déglutition

TABLEAU 1 : Tableau clinique de l'ataxie de Friedreich (d'après (Harding, 1981))

* : symptômes pouvant précéder l'apparition de l'ataxie

I. L'ataxie de Friedreich

A. Epidémiologie

L'ataxie de Friedreich est l'ataxie récessive la plus fréquente puisqu'elle correspond à environ 40% des cas d'ataxies héréditaires (Anheim et al., 2010). Elle affecte indifféremment les hommes et les femmes. Des tests génétiques ont permis d'estimer la fréquence de porteurs sains à environ 1 sur 85 en Europe de l'Ouest, permettant de prédire une incidence autour de 1 sur 30000 et une prévalence de 1 sur 50000 dans la population caucasienne (Cossée et al., 1997). La différence entre la prévalence et l'incidence s'explique par la phase pré-symptomatique de la maladie et l'espérance de vie réduite des cas les plus sévères. Le croisement des données issues des études épidémiologiques menées depuis les années 1970 et des différentes associations européennes de patients a révélé une disparité entre l'Europe de l'Ouest/Sud-Ouest (1 sur 20000) et l'Europe de l'Est/Nord (1 sur 250000) (Vankan, 2013). L'identification du même haplotype porteur de la mutation chez des patients d'Europe, d'Afrique du Nord, du Moyen-Orient et d'Inde, suggère qu'un effet fondateur serait à l'origine de la maladie (Cossée et al., 1997; Labuda et al., 2000). Cette théorie est renforcée par la rareté de l'ataxie de Friedreich dans les populations africaines sub-sahariennes et sa quasi absence des populations d'Asie de l'Est (chinoises, japonaises et Sud-Est asiatiques) (Hirayama et al., 1994; Labuda et al., 2000).

B. Tableau clinique

1- Symptômes et évolution de la maladie

Les critères de diagnostic de l'ataxie de Friedreich ont été affinés grâce à l'étude de 115 patients issus de 90 familles faite par le Dr Anita Harding au début des années 1980 (**tableau 1**) (Harding, 1981). Ce tableau clinique a été validé par la suite sur d'autres cohortes de patients, préalablement confirmés par diagnostic génétique (Delatycki et al., 1999a; Dürr et al., 1996; Ribai et al., 2007a).

a) *Premiers symptômes*

Les premiers symptômes de l'AF apparaissent classiquement à la puberté, et de façon générale avant l'âge de 25 ans, par le développement d'une ataxie progressive et permanente des membres et du tronc (Harding, 1981). Celle-ci se manifeste par une démarche ébrieuse associée à des pertes d'équilibre fréquentes, ainsi que par une maladresse générale. En plus des troubles de la marche, les patients éprouvent des difficultés à réaliser des gestes du quotidien qui requièrent précision et dextérité comme l'écriture, l'habillement et le maniement de couverts pour se nourrir. Cette ataxie est qualifiée de mixte, car elle est d'origine cérébelleuse et sensitive (*voir intro. point I-D-*

1). Des symptômes non neurologiques, tels que la scoliose, les pieds creux ou la cardiomyopathie peuvent, dans certains cas, précéder les symptômes neurologiques de plusieurs années (Dürr et al., 1996; Harding, 1981; Harding and Hewer, 1983). La grande fréquence et la précocité de la scoliose dans l'AF suggèrent qu'elle ne serait pas idiopathique, mais étroitement liée à l'atteinte neurologique (Matthieu Anheim, communication personnelle).

b) *Progression de la maladie*

Le tableau clinique de l'ataxie de Friedreich se complète dans les 5 à 10 ans suivant l'apparition des premiers symptômes, avec notamment le développement d'une dysarthrie (trouble de l'articulation de la parole), l'abolition des réflexes ostéotendineux, la présence de signes pyramidaux (signe de Babinski et faiblesse musculaire) et la perte de la sensibilité profonde au niveau des membres inférieurs (**tableau 1**) (Harding, 1981). La plupart des patients perdent totalement leur activité locomotrice dans les 10-15 ans qui suivent le début de la maladie, entraînant leur confinement en fauteuil roulant (Harding, 1981; De Michele et al., 1996). D'autres signes neurologiques, plus rares et plus tardifs, peuvent apparaître lors de la progression de la maladie, comme des anomalies du mouvement des yeux (ondes carrées, nystagmus, troubles de la poursuite), une diminution de la vision (atteinte du nerf optique), des problèmes auditifs (atteinte du nerf auditif) et des troubles de la déglutition (**tableau 1**) (Harding, 1981).

La cardiomyopathie hypertrophique est une complication non neurologique majeure associée à l'ataxie de Friedreich qui concerne environ 80% des patients (*voir intro. point I-D-2*) (Dürr et al., 1996; Hewer, 1968; Koeppe, 2011; Tsou et al., 2011). Elle peut rester asymptomatique pendant de nombreuses années tout en continuant sa progression, car l'atteinte neurologique limite l'activité physique et donc les efforts cardiaques qui pourraient la révéler. Les manifestations cliniques de la cardiomyopathie sont principalement un essoufflement et des palpitations (Dutka et al., 1999; Harding and Hewer, 1983). Les complications cardiaques telles que l'arythmie et l'insuffisance cardiaque sont responsables du décès prématuré de nombreux patients (Dürr et al., 1996; Hewer, 1968; Tsou et al., 2011).

Les patients AF ont davantage de risques de développer une intolérance au glucose, voire un diabète. La proportion de patients concernés varie de 10 à 30% selon les études (*voir intro. point I-D-3*) (Delatycki et al., 1999a; Dürr et al., 1996; Harding, 1981; Hewer, 1968; De Michele et al., 1996). Cette variabilité est souvent imputée aux types de tests de dépistage utilisés, et à l'évolution des critères de diagnostic du diabète. Le diabète se déclare généralement tard dans l'évolution de la maladie (en moyenne 15 ans après les premiers signes) et souvent de façon brutale (acidocétose) (Harding, 1981; Hewer, 1968; De Michele et al., 1996; Snyder et al., 2012).

Les capacités cognitives des patients AF ont été peu étudiées, notamment car l'atteinte neurologique complique leur évaluation et qu'elles semblaient globalement préservées. Des études récentes et plus approfondies ont révélé que malgré un quotient intellectuel normal, plusieurs aspects cognitifs étaient affectés après une dizaine d'années d'évolution de la maladie (Mantovan et al., 2006; Nieto et al., 2012). En effet, les patients ont un raisonnement plutôt concret mais éprouveraient des

difficultés à formuler des concepts ou encore à manipuler mentalement des objets en trois dimensions (3D) (Klopper et al., 2011; Mantovan et al., 2006; Nieto et al., 2012). Par ailleurs, ils auraient aussi des problèmes de mémoire de travail (aussi appelée mémoire à court terme) et des troubles de l'attention (Klopper et al., 2011; Mantovan et al., 2006).

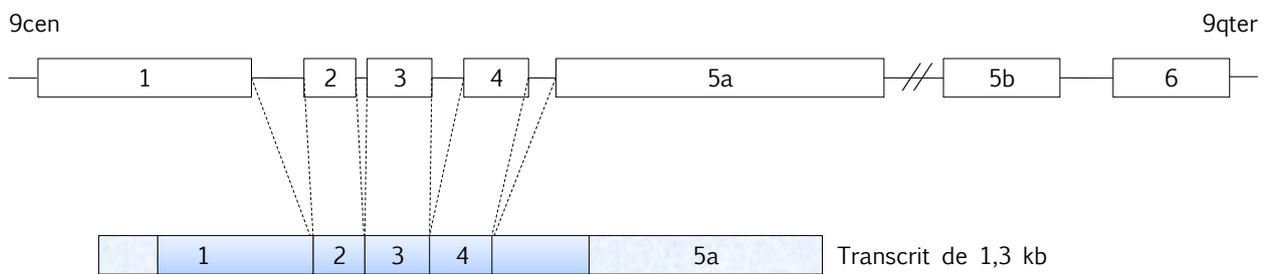
c) Pronostic

L'âge de décès est très variable. La valeur médiane de l'âge de décès des patients ayant développé une cardiomyopathie a été établie à 26 ans, contre 41 ans pour ceux qui n'en ont pas (Dürr et al., 1996; Hewer, 1968; Tsou et al., 2011). La cause majeure de décès est un dysfonctionnement cardiaque avéré ou suspecté (62,3%), suivie de causes non cardiaques (infection respiratoire, cachexie et fausse route par exemple) (27,9%) et de causes inconnues (9,8%) (Koeppen, 2011; Tsou et al., 2011). L'apparition précoce des symptômes et le développement d'une cardiomyopathie sont deux facteurs associés à un pronostic défavorable pour le patient (Ribaï et al., 2007a; Tsou et al., 2011).

Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement ni moyen prophylactique pour l'ataxie de Friedreich. Les dernières avancées dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie ont permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour lesquelles des traitements sont actuellement à l'étude (Gottesfeld et al., 2013). Un autre espoir est aujourd'hui offert par la thérapie génique pour le traitement de la cardiomyopathie, mais doit encore faire ses preuves chez l'homme (Perdomini et al., 2014 in press). A défaut d'un traitement disponible, la prise en charge des problèmes neurologiques et cardiaques, du diabète et des déformations squelettiques permet de prolonger l'espérance de vie des patients et d'améliorer leurs conditions de vie.

3- Variabilité clinique

L'étude de grandes cohortes de patients a permis de mettre en évidence qu'environ 25% d'entre eux étaient des cas atypiques, présentant des symptômes qui dévient des critères de diagnostic classiques. La variabilité clinique observée porte sur des critères tels que : l'âge de début, la sévérité de la maladie, la conservation des réflexes ostéo-tendineux et la présence de spasticité (hypertonie musculaire) (Dürr et al., 1996). Le diagnostic génétique a permis de confirmer que ces formes atypiques étaient bien des variantes de l'AF classique, car dues à la mutation du même gène (Filla et al., 1996; McCabe et al., 2000; Montermini et al., 1997a; Schöls et al., 1997). Suivant les cas, on parle de LOFA (*Late Onset Friedreich's Ataxia*) voire de vLOFA (*very Late Onset Friedreich's Ataxia*) (De Michele et al., 1994), de FARR (*Friedreich's Ataxia with Retained Reflexes*) (Coppola et al., 1999) et de patients d'origine Acadienne (Barbeau et al., 1984).



Légende :

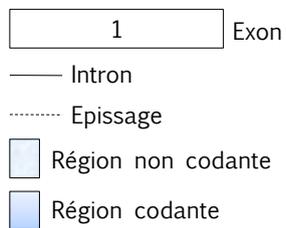


FIGURE 1 : Structure du gène FXN

Les sept exons qui composent le gène *FXN* s'étendent sur 85kb. Sa transcription se matérialise par un ARNm majoritaire de 1,3 kb correspondant aux exons 1 à 5a. Les échelles ne sont pas respectées.

Cent : centromère, *qter* : extrémité du bras long, traits en pointillés : épissage.

C. Origine génétique

1- Mutations dans le gène codant pour la frataxine

a) *Identification du gène*

Le gène impliqué dans l'ataxie de Friedreich a été localisé par clonage positionnel et hybridation *in situ* sur la partie proximale du bras long du chromosome 9, en 9q13-q21 (Chamberlain et al., 1988; Fujita et al., 1989; Hanauer et al., 1990). Le gène a été identifié ainsi que certaines mutations responsables de la maladie (dont la mutation majoritaire), en 1996 (Campuzano et al., 1996) : d'abord nommé X25, du nom du clone dont il a été isolé, ce gène est aujourd'hui officiellement appelé *FXN* dans la nomenclature HUGO en référence à la protéine qu'il code : la frataxine (abrégée FXN).

Le gène *FXN* comporte 7 exons s'étendant sur 85kb et est transcrit en un ARNm majoritaire de 1,3 kb correspondant aux exons 1 à 5a (**figure 1**) (Campuzano et al., 1996). D'autres transcrits du gène *FXN* ont été évoqués, mais leur existence et leur(s) éventuelle(s) fonction(s) sont aujourd'hui considérées comme anecdotiques. Le promoteur minimal du gène *FXN* se situe sur un fragment de 1255 pb en amont du cadre ouvert de lecture : il ne contient pas de TATA box, mais est riche en éléments répétés importants pour son activité (Greene et al., 2005). La régulation de l'expression du gène a peu été étudiée et reste à ce jour mal connue.

b) *Les mutations à l'origine de l'AF et leurs conséquences*

Plusieurs types de mutations du gène *FXN* ont été identifiées chez les patients AF (Campuzano et al., 1996). La mutation omniprésente est une expansion de trinucleotides (GAA)_n. De façon plus rare, les patients peuvent être porteurs de mutations ponctuelles ou présenter des délétions/insertions de tailles variables. Ce sont toutes des mutations perte de fonction.

L'expansion de trinucleotides (GAA)

La plupart des patients (96%) sont homozygotes pour une expansion (GAA)_n située dans le premier intron du gène *FXN*, sans autres mutations dans la séquence codante du gène. Dans le cas des maladies à expansions, l'homozygotie correspond à la présence d'expansions sur les deux allèles du gène atteint, mais le nombre de répétitions sur chaque allèle est généralement différent. Dans la population générale, les allèles normaux comportent moins d'une trentaine de répétitions GAA (Cossée et al., 1997; Justice et al., 2001; Montermini et al., 1997b). Des expansions de 66 à 1700 répétitions ont été trouvées chez des patients AF, mais la moyenne se situe plutôt entre 600 et 900 GAA (Dürr et al., 1996; Epplen et al., 1997). Les allèles de tailles intermédiaires sont appelés pré-mutations du fait de leur propension à l'expansion au niveau germinale (Epplen et al., 1997; Montermini et al., 1997b). L'effet de l'expansion (GAA)_n est expliqué au *point I-C-2* ci-après.

D'une façon générale, les allèles avec un grand nombre de répétitions GAA sont soumis à une instabilité germinale responsable de la transmission fréquente d'allèles de tailles différentes à la

Loc.	Mutation	Type	Effet	Phénotype	Référence
Ex1	c.1 A>T	FS	p.M1L	T	(Cossée et al., 1999)
	c.2 T>C	FS	p.M1T	T	(Cossée et al., 1999)
	c.2 delT	DCL	p.M1S	A, S↑	(Zhu et al., 2002)
	c.3 G>T	FS	p.M1I	T	(Zühlke et al., 1998) (Cossée et al., 1999)
	c.3 G>A	FS	p.M1I	T	(Potter et al., 2000)
	c.11-12delTC	DCL	p.L4RfsTer88	A, S↑	(Spacey et al., 2004)
	c.100delG	DCL	p.A34PfsTer42	T	(Gellera et al., 2007)
	c.104delC	DCL	p.P35HfsTer41	T	(Gellera et al., 2007)
	c.118delC	DCL	p.R40VfsTer26	T	(De Castro et al., 2000)
	c.157delC	DCL	p.R53AfsTer23	T	(Cossée et al., 1999) (Gellera et al., 2007)
Int1	c.165+1 G>A	SDE	Epissage aberrant	A, S↓	(Lamba et al., 2009)
	c.165+5 G>C	SDE	Epissage aberrant, p.0	A, S↓	(McCormack et al., 2000)
Ex2	c.202_205delGTCAinsTTG	DCL	p.V68LfsTer8	T	(Pook, 2000)
Ex3	c.296_297insT	DCL	p.E100RfsTer12	A, S↓, LO	(De Castro et al., 2000)
	c.317 T>G	NS	p.L106Ter	T	(Campuzano et al., 1996)
	c.317 T>C	FS	p.L106S	A, S↓	(Bartolo et al., 1998)
	c.317delT	NS	p.L106Ter	T	(Pook, 2000)
	c.340_352del13	DCL	p.A114TfsTer15	T	(Pook, 2000)
	c.354 C>G	NS	p.Y118Ter	T	(Gellera et al., 2007)
	c.364 G>T	FS	p.D122Y	A, S↓	(Cossée et al., 1999)
Ex3/ Int3	c.381_384delTGGG+c.384+1_+9delGTACCTCTT	FS + SDE	Epissage aberrant	T	(Gellera et al., 2007)
Int3	c.384+1 G>A	SDE	Epissage aberrant	T	(Doudney et al., 1997)
	c.384-2 A>G	SAE	Epissage aberrant	T	(Campuzano et al., 1996) (De Castro et al., 2000)
Ex4	c.389 G>T	FS	p.G130V	A, S↓	(Bidichandani et al., 1997) (Cossée et al., 1999) (Forrest et al., 1998)
	c.438 C>G	FS	p.N146K	A, S↓	(Zühlke et al., 2004)
	c.443 A>G	FS	p.Q148R	T	(McDaniel et al., 2003)
	c.460 A>T	FS	p.I154F	T	(Campuzano et al., 1996) (Filla et al., 1996) (Cossée et al., 1999) (Gellera et al., 2007)
	c.463 T>C	FS	p.W155R	T	(Labuda et al., 1999)
	c.465 G>A	NS	p.W155Ter	T	(De Castro et al., 2000)
	c.467 T>C	FS	p.L156P	T	(Cossée et al., 1999)
Int4	c.482+2 T>G	SDE	Epissage aberrant	T	(Forrest et al., 1998)
	c.482+3 delA	SDE	Epissage aberrant	T	(Cossée et al., 1999)
Ex5a	c.493 C>T	FS	p.R165C	A, S↓	(Forrest et al., 1998)
	c.494 G>C	FS	p.R165P	A	(De Michele et al., 2000)
	c.517 T>G	FS	p.W173G	T	(Cossée et al., 1999) (Gellera et al., 2007)
	c.544 C>T	FS	p.L182F	A, S↓	(Forrest et al., 1998)
	c.545 T>A	FS	p.L182H	T	(Cossée et al., 1999)
	c.548 A>G	FD	p.H183R	T	(Cossée et al., 1999)
	c.557 T>G	FS	p.L186R	T	(Zühlke et al., 2004)
	c.593 T>G	FS	p.L198R	T	(Al-Mahdawi et al., 2000)
	g.120032_122808del	Del	Délétion exon5a	T	(Zühlke et al., 2004)
FA exDel	Non précisé	Del	Délétion exons 2 et 3	T, S↑	(Anheim et al., 2012)
	Non précisé	Del	Délétion exon 4	T, S↑	(Anheim et al., 2012)
	Non précisé	Del	Délétion exons 4 et 5	T, S↑	(Anheim et al., 2012)

TABLEAU 2 : Détails des mutations identifiées chez les patients AF hétérozygotes composites (hors (GAA)_n)

Chaque mutation est associée à son effet au niveau protéique et au tableau clinique associé. La nomenclature utilisée est celle de la « Human Genome Variation Society » (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) à l'exception des 3 lignes FAexDel.

A : atypique, DCL : décalage du cadre de lecture, Del : délétion, Ex : exon, FS : faux-sens, Int : intron, LO : tardif (late onset), Loc. : localisation, NS : non-sens, S↑/↓ : sévérité augmentée/diminuée, SAE : site accepteur d'épissage, SDE : site donneur d'épissage, T : typique.

génération suivante : l'allèle d'origine maternelle subirait indifféremment des expansions ou des contractions, alors que l'allèle paternel est généralement sujet à une diminution du nombre de répétitions (Campuzano et al., 1996; Monrós et al., 1997; Pianese et al., 1997). Les expansions (GAA)_n sont aussi associées à une instabilité somatique qui se traduit par une accumulation avec l'âge d'allèles de tailles différentes au sein des tissus (De Biase et al., 2007a, 2007b). L'importance et l'effet de ce phénomène varient aussi selon les tissus : il semblerait qu'au niveau des ganglions dorsaux rachidiens (DRG) et du cervelet, les allèles pathologiques soient plus enclins à subir une augmentation de leur nombre de répétitions, alors que la tendance inverse est observée dans les cellules sanguines (De Biase et al., 2007a). Ce mosaïcisme somatique pourrait être impliqué à la fois dans la spécificité tissulaire et dans la progression de la maladie.

La taille de la plus petite expansion (GAA)_n a pu être inversement corrélée à (1) l'âge d'apparition des symptômes et à (2) la vitesse de progression de la maladie, évaluée par le temps de latence entre l'apparition des symptômes et le confinement en fauteuil roulant (Dürr et al., 1996). Ces relations ne peuvent cependant pas expliquer toute la variabilité phénotypique observée chez les patients. D'autres facteurs sont à prendre en considération, tels que le mosaïcisme somatique, l'implication éventuelle de gènes modificateurs ou encore de l'épigénétique.

Les autres mutations du gène FXN

Outre l'expansion (GAA)_n, une quarantaine d'autres mutations ont été décrites chez les patients AF (**tableau 2**) : il s'agit de substitutions, d'insertions et de délétions d'un ou plusieurs nucléotides ayant pour effet d'entraîner un faux-sens, un non-sens, un décalage du cadre de lecture, une erreur d'épissage et plus rarement une délétion d'exons. Elles ont été identifiées chez un petit nombre de patients (4%), qualifiés d'hétérozygotes composites car ces mutations, présentes sur un allèle, sont toujours associées à une expansion (GAA)_n sur le second allèle (De Castro et al., 2000; Cossée et al., 1999). Aucun cas de patient homozygote pour des mutations ponctuelles n'a été rapporté pour l'instant, probablement car leur fréquence est très faible et/ou que le phénotype associé serait trop sévère pour être viable, à l'image de la létalité embryonnaire induite par l'absence de frataxine chez le modèle souris KO complet (Cossée et al., 2000). Les mutations non-sens, les grandes délétions ainsi que la plupart des mutations touchant le codon d'initiation et les sites introniques d'épissage sont prédites pour donner une protéine non fonctionnelle ou absente (Lynch et al., 2012). Les mutations faux-sens, quant à elles, affectent notamment la stabilité de la frataxine et/ou l'interaction de la celle-ci avec ses partenaires protéiques (Correia et al., 2008; Schmucker et al., 2011).

La majorité de ces mutations sont associées à un tableau clinique classique selon les critères de Harding (Harding, 1981) (**tableau 2**). Cependant, les mutations faux-sens p.L106S, p.D122Y, p.G130V, p.N146K, p.R165C et p.L182F sont caractérisées par une progression plus lente de la maladie et une atteinte moins sévère (Bartolo et al., 1998; Bidichandani et al., 1997; Cossée et al., 1999; Delatycki et al., 1999b; Forrest et al., 1998; Zühlke et al., 2004). A l'inverse, certaines mutations sont associées à une atteinte plus précoce, qui serait plutôt due à l'association avec une expansion (GAA)_n plus longue, qu'à la mutation elle-même (De Castro et al., 2000; Cossée et al., 1999). La plupart de ces mutations sont restreintes à une famille, à l'exception des mutations c.3G>T, p.G130V,

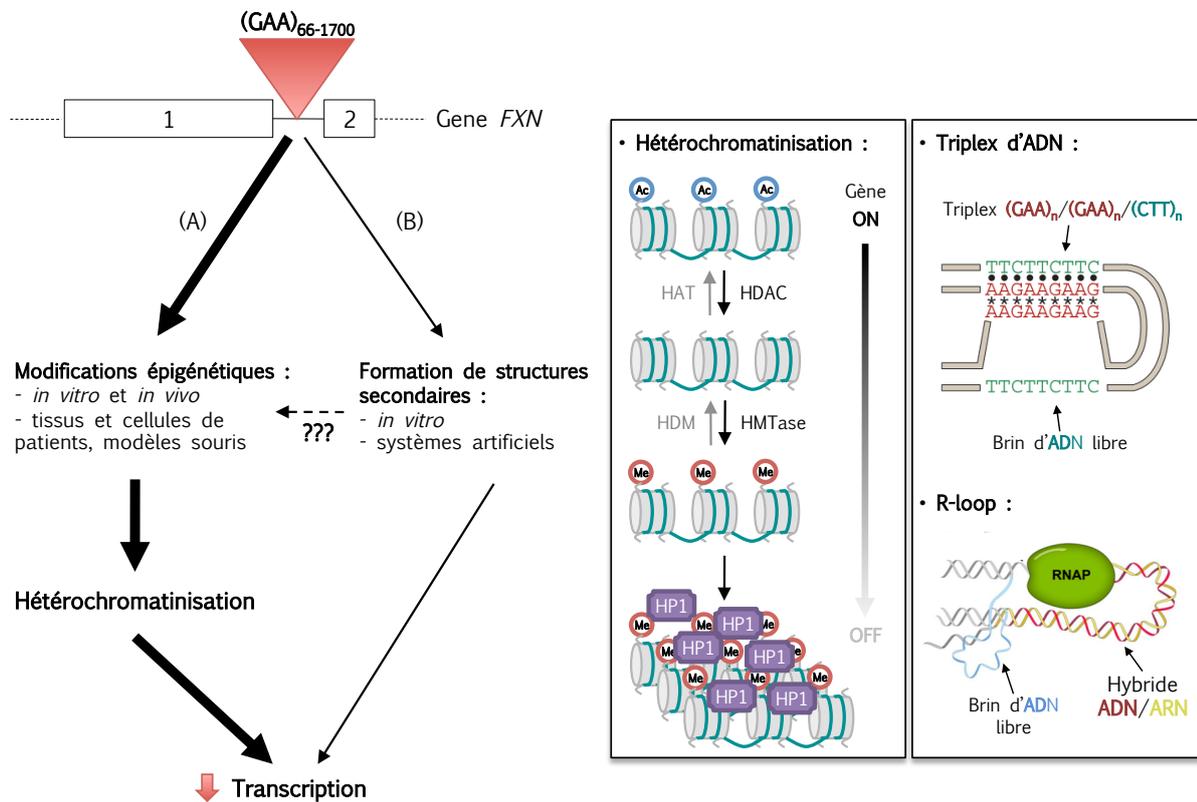


FIGURE 2 : Mécanismes de répression de la transcription du gène *FXN* par l'expansion $(GAA)_n$

(A) De nombreux travaux sont en faveur de l'implication de l'expansion $(GAA)_n$ dans des modifications épigénétiques, telles que la désacétylation et la méthylation des histones au niveau du gène *FXN*, conduisant à son hétérochromatinisation (illustration adaptée de (Festenstein, 2006)). (B) La formation de structures secondaires au niveau de l'expansion, du type triplex d'ADN (illustration issue de (Mirkin, 2007)) ou R-loop (illustration issue de (Kumari and Usdin, 2012)) a aussi été proposée. Ces deux mécanismes conduisent à une importante diminution de la transcription du gène *FXN* chez les patients AF. Il a été proposé que la structure formée par l'ADN au niveau de l'expansion $(GAA)_n$ puisse être le signal pour le recrutement de la machinerie cellulaire d'hétérochromatinisation (HDAC, HMTase, HP1).

Ac : Acétylation, HAT : Histone Acétylase, HDAC : Histone DeAcétylase, HDM : Histone DeMéthylation, HMTase : Histone Méthylation, HP1 : Heterochromatin Protein 1, Me : Méthylation, RNAP : ARN Polymérase. Points : liaisons Watson-Crick, Etoiles : liaisons Hoogsteen.

p.I154F, p.R165C et p.W173G identifiées dans plusieurs familles non apparentées, phénomène imputable à un effet fondateur ou à la présence de points chauds de mutation (Cossée et al., 1999; Delatycki et al., 1999b; Gellera et al., 2007; McCormack et al., 2000; Zühlke et al., 1998).

2- Extinction du gène *FXN* par l'expansion (GAA)_n

Les patients homozygotes pour l'expansion (GAA)_n présentent un taux résiduel de frataxine de l'ordre de 5-30%, alors que les individus hétérozygotes non atteints par la maladie en ont environ 50%, suggérant un effet seuil (Campuzano et al., 1997; Deutsch et al., 2010; Willis et al., 2008). Le niveau de frataxine dans les lymphocytes de patients corrèle négativement avec la taille des expansions (GAA)_n (Campuzano et al., 1997; Deutsch et al., 2010; Saccà et al., 2011; Willis et al., 2008). Bien que présente en quantité réduite, la protéine produite est structurellement normale et parfaitement fonctionnelle.

Le faible taux de frataxine chez les patients est dû à une réduction du taux d'ARNm mature, directement imputable à une diminution de la transcription du gène *FXN* (Bidichandani et al., 1998; Ohshima et al., 1998; Punga and Bühler, 2010). L'expansion (GAA)_n interfère avec la transcription de façon longueur-dépendante, ce qui est cohérent avec la corrélation phénotype/génotype observée entre le nombre de répétitions et l'âge d'apparition des symptômes d'une part, et la sévérité de la maladie d'autre part (Bidichandani et al., 1998; Dürr et al., 1996; Filla et al., 1996; Ohshima et al., 1998). Deux mécanismes majeurs et non exclusifs ont été proposés pour expliquer l'effet de l'expansion (GAA)_n sur la transcription du gène : l'hétérochromatinisation du locus et la formation de structures secondaires (**figure 2**).

a) Hétérochromatinisation du locus

La répression de la transcription par la présence d'hétérochromatine est actuellement le mécanisme le plus étayé (**figure 2**). La première preuve d'un effet de l'expansion (GAA)_n sur la structure de la chromatine a été établie *in vivo* chez la souris en montrant qu'une expansion de 200 répétitions GAA induisait l'extinction du gène rapporteur hCD2 (*hétérochromatine-sensitive human CD2*) par « Position Effect Variegation » (PEV) (Saveliev et al., 2003). Cette étude a suscité de l'intérêt pour la caractérisation des modifications épigénétiques au niveau du gène *FXN* qui soient spécifiques aux patients AF. En effet, l'état d'hétérochromatinisation d'un locus dépend non seulement du degré de méthylation des îlots CpG de l'ADN, mais aussi des modifications post-traductionnelles des histones et du recrutement de certaines protéines. Ainsi, l'hyperméthylation de sites CpG spécifiques de l'ADN en amont de l'expansion (GAA)_n (Al-Mahdawi et al., 2008; Evans-Galea et al., 2012; Greene et al., 2007) couplée à une diminution de l'acétylation et à une augmentation de la méthylation de certains résidus lysine des histones dans des lignées de lymphoblastes ou des tissus de patients (cerveau, cervelet et cœur) (Al-Mahdawi et al., 2008; Herman et al., 2006; Punga and Bühler, 2010) sont en faveur d'une répression transcriptionnelle induite par la présence d'hétérochromatine au niveau de l'expansion (GAA)_n (**tableau 3**). Le promoteur du gène *FXN* ne serait pas affecté par ces

Modifications de la chromatine	Localisation	Marque	Echantillons
↑ Méthylation de l'ADN	Amont (GAA) _n	Hétérochromatine	- Cerveau, cervelet et cœur de patients (Al-Mahdawi et al., 2008) - Lymphoblastes (Greene et al., 2007) - PBMC et cellules buccales (Evans-Galea et al., 2012)
↓ H3K9ac	Amont et aval du (GAA) _n	Hétérochromatine	- Lymphoblastes (Herman et al., 2006; Kim et al., 2011a)
↑ H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3	Amont et aval du (GAA) _n	Hétérochromatine	- Fibroblastes (De Biase et al., 2009) - Lymphoblastes (Herman et al., 2006; Kim et al., 2011a; Punga and Bühler, 2010)
↓ H3K4me3	Exon 1	Défaut dans l'initiation de la transcription	- Lymphoblastes (Kumari et al., 2011)
↓ H3K36me3, H3K79me2/me3, H3K4me3	Amont et aval du (GAA) _n	Défaut dans l'élongation de la transcription	- Lymphoblastes (Kim et al., 2011a; Punga and Bühler, 2010)

TABLEAU 3 : Modifications majeures de la chromatine relevées chez les patients AF et leurs conséquences

Chez les mammifères, l'hétérochromatine est associée à l'hypoacétylation de certaines histones (en particulier H3K9) et à l'hyperméthylation de certaines histones (H3K9me3, H3K27me3).

↑ : augmentation, ↓ : diminution, PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cells*.

modifications épigénétiques dans les lignées de lymphoblastes (Evans-Galea et al., 2012; Herman et al., 2006; Kim et al., 2011a), mais semble l'être dans les tissus de patients (cerveau, cervelet et cœur) (Al-Mahdawi et al., 2008). Bien que cette dernière étude ait été faite sur des échantillons post-mortem de seulement deux patients, celle-ci suggère une inactivation du gène plus importante dans ces tissus qui pourrait contribuer à la spécificité tissulaire de la maladie, mais cela reste encore à confirmer. L'hypoacétylation et la méthylation des histones au niveau de l'expansion $(GAA)_n$ impliquent le recrutement de protéines d'hétérochromatinisation de la famille des HDAC (histones déacétylases) et des HMTases (histones méthyltransférases) : leur action permet de générer des sites de liaison pour la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), impliquée dans la propagation de la condensation de la chromatine (Herman et al., 2006; Saveliev et al., 2003). Enfin, la caractérisation de certaines modifications des histones et de l'état de l'ARN polymérase II suggère que l'expansion $(GAA)_n$ entraverait l'initiation et l'élongation de la transcription (**tableau 3**) (Kim et al., 2011a; Kumari et al., 2011; Punga and Bühler, 2010).

b) Formation de structures secondaires

La formation de structures secondaires au sein de l'ADN et/ou par association avec l'ARN n'a été montrée, pour l'instant, que par des expériences *in vitro* sur des systèmes artificiels. Cette théorie postule que la présence de l'expansion $(GAA)_n$ entrainerait la formation d'une structure en triple hélice au sein d'un même brin d'ADN par l'association des brins $(GAA)_n/(GAA)_n/(CTT)_n$ ou $(CTT)_n/(GAA)_n/(CTT)_n$, appelée triplex d'ADN (**figure 2**) (Ohshima et al., 1998; Wells, 2008). De la même façon, au cours de la transcription du gène, le brin non transcrit $(GAA)_n$ pourrait se replier et former un triplex d'ADN $(GAA)_n/(GAA)_n/(CTT)_n$ alors que le brin transcrit $(CTT)_n$ s'hybriderait avec l'ARNm naissant, formant une R-loop (**figure 2**) (Grabczyk and Usdin, 2000a, 2000b). Dans ces deux cas, la transcription du gène serait aussi réduite par séquestration de l'ARN polymérase II et/ou blocage de sa progression (Grabczyk and Usdin, 2000a, 2000b; Sakamoto et al., 1999). Des études *in vivo* ou au moins *in vitro* sur des cellules de patients sont nécessaires pour confirmer le rôle de ce mécanisme dans la répression de l'expression du gène *FXN* chez les patients AF. La formation de R-loop au niveau de l'expansion $(GAA)_n$ de cellules de patients a été évoquée lors du congrès Ataxia UK en novembre 2012, mais ces travaux n'ont pas été publiés depuis (Natalia Gromak, communication personnelle).

A l'heure actuelle, le signal à l'origine des modifications épigénétiques et donc de l'hétérochromatinisation au niveau de l'expansion $(GAA)_n$ reste inconnu. L'hypothèse selon laquelle la formation des structures secondaires (triplex d'ADN, R-loop) pourrait initier ce processus a été proposée, mais reste encore à démontrer (**figure 2**).

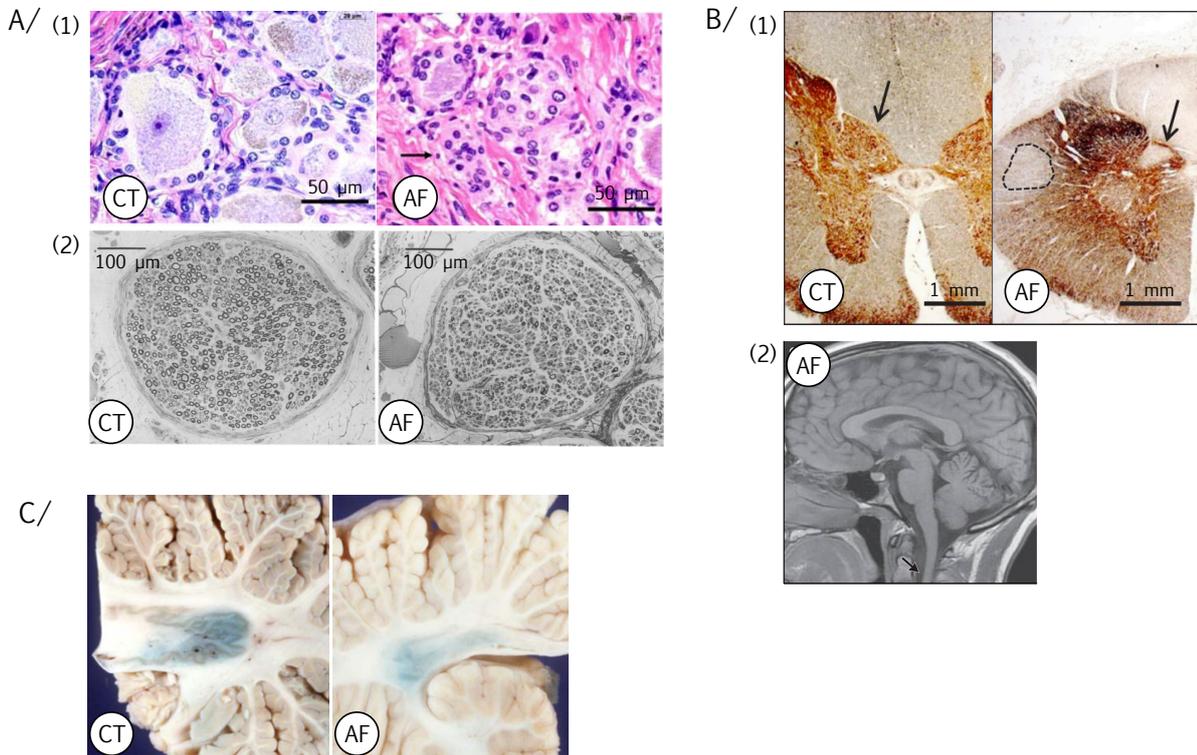


FIGURE 3 : Atteintes neurologiques des patients AF

A/ Atteinte des DRG et des nerfs périphériques sensitifs : (1) Coloration Hématoxyline/Eosine d'une coupe de DRG d'un individu contrôle (CT) et d'un patient (AF) montrant une absence de gros corps cellulaires chez les patients (issue de (Koeppen et al., 2009)), (2) Coupe du nerf sural d'un individu contrôle (CT) et d'un patient (AF), montrant une nette réduction de la quantité des larges fibres myélinisées chez les patients (issue de (Jitpimolmard et al., 1993)).

B/ Atteinte de la moelle épinière : (1) Marquage histologique de la myéline sur coupe de moelle épinière, montrant une décoloration de la colonne de Clarke (flèche) et du faisceau spinocérébelleux (contours pointillés) droits d'un patient (AF), comparé à un individu contrôle (CT) (issue de (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013)). (2) IRM du cerveau d'un patient (AF), 10 ans après le début de la maladie (issue de (Anheim et al., 2012)), montrant un amincissement médullaire cervical (flèche) et un cervelet d'apparence normale.

C/ Atteinte du cervelet : coupe de cervelet de patient (AF) et de contrôle (CT), montrant une atrophie du noyau dentelé chez le patient AF, caractérisée par l'absence du liseré de matière grise et la faible intensité du marquage bleu du fer (issue de (Koeppen et al., 2007)).

D. Anatomopathologie et physiopathologie

1- Atteintes neurologiques

Des analyses histologiques de biopsies et d'autopsies combinées à des études électrophysiologiques ont permis de montrer une atteinte combinée des systèmes nerveux périphérique et central chez les patients AF (voir revue (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013)).

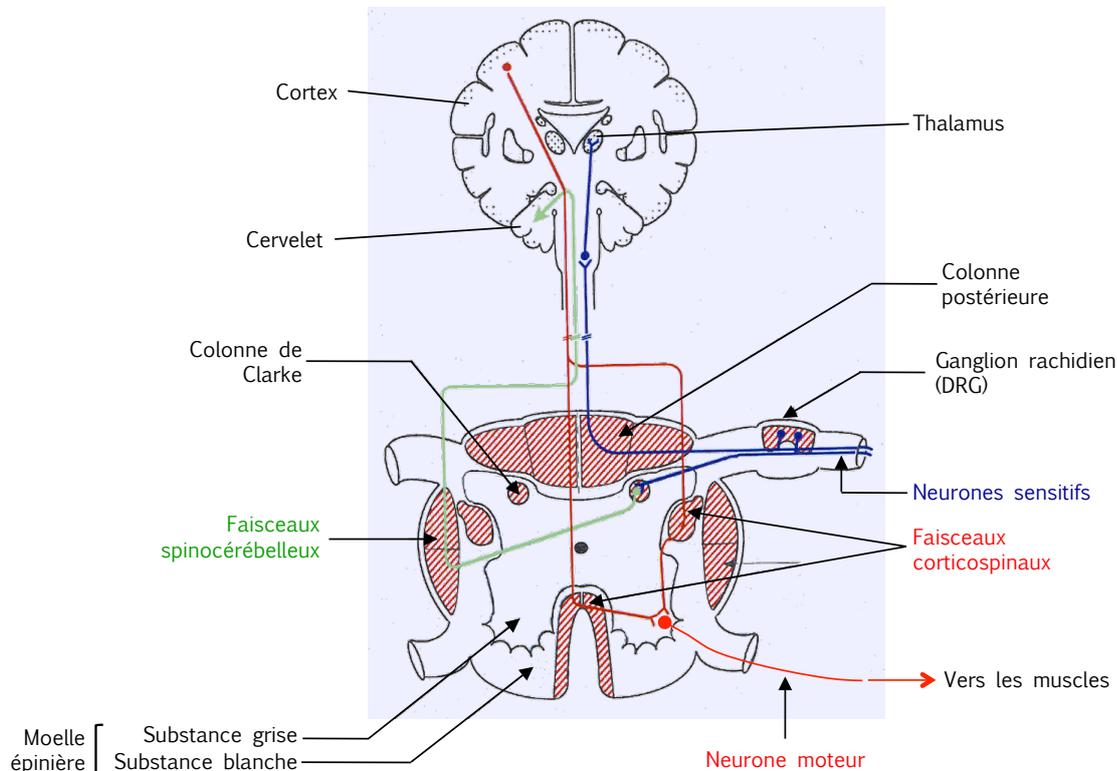
a) Atteinte périphérique

Les autopsies de patients ont révélé une réduction de la taille ainsi qu'une composition anormale de la racine dorsale de la moelle épinière et des ganglions dorsaux rachidiens (DRG) (Jitpimolmard et al., 1993; Koeppen et al., 2009). Ces structures comportent des neurones sensitifs dont le corps cellulaire est localisé dans les DRG et émet un axone dans la racine dorsale qui projette à la fois vers la périphérie (muscles, articulations, peau) et vers la moelle épinière. Ils permettent ainsi de transmettre les informations sensorielles émanant de la périphérie vers le système nerveux central. Dans le cas de l'AF, ce sont les neurones sensitifs proprioceptifs qui sont particulièrement touchés : il s'agit de neurones de gros diamètre, fortement myélinisés et à vitesse de conduction élevée qui recueillent des informations issues des muscles et des tendons afin d'évaluer la position et le mouvement des membres et du tronc dans l'espace. Au niveau des DRG, cette atteinte se caractérise par un déficit en gros corps cellulaires couplé à une prolifération de cellules annexes, identifiées comme étant des cellules satellites gliales ou des cellules de Schwann (**figure 3-A1**) (Jitpimolmard et al., 1993; Koeppen et al., 2009).

Les patients AF présentent aussi de façon constante une neuropathie sensitive périphérique généralement étudiée par biopsie du nerf sural, un nerf de la jambe purement sensitif dont l'excision a peu d'impacts. L'atteinte anatomique de ce nerf ressemble, de façon logique à celle observée au niveau des DRG, avec une réduction des fibres myélinisées de gros diamètre (**figure 3-A2**) (McLeod, 1971; Morral et al., 2010; Said et al., 1986). La caractérisation fonctionnelle de ce nerf a montré une importante réduction de l'amplitude des potentiels d'action et/ou de sa conduction (Harding, 1981; McLeod, 1971). Il est important de noter que les nerfs périphériques moteurs ne sont pas affectés dans la maladie (Zouari et al., 1998).

L'atteinte des DRG ainsi que la neuropathie sensitive périphérique sont à l'origine de la perte de la sensibilité profonde (proprioception) et de l'abolition des réflexes ostéotendineux observées chez les patients AF (Delatycki and Corben, 2012; Pandolfo, 2009). Elles sont très précoces dans la maladie (Harding, 1981; Zouari et al., 1998) et ne semblent pas vraiment évoluer avec le temps, suggérant qu'elles pourraient aussi bien résulter d'un défaut lors du développement que d'une dégénérescence rapide a posteriori due à une sensibilité accrue des gros neurones sensitifs et/ou des cellules de Schwann au déficit en frataxine (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013; Santoro et al., 1999; Zouari et al., 1998).

A/



B/

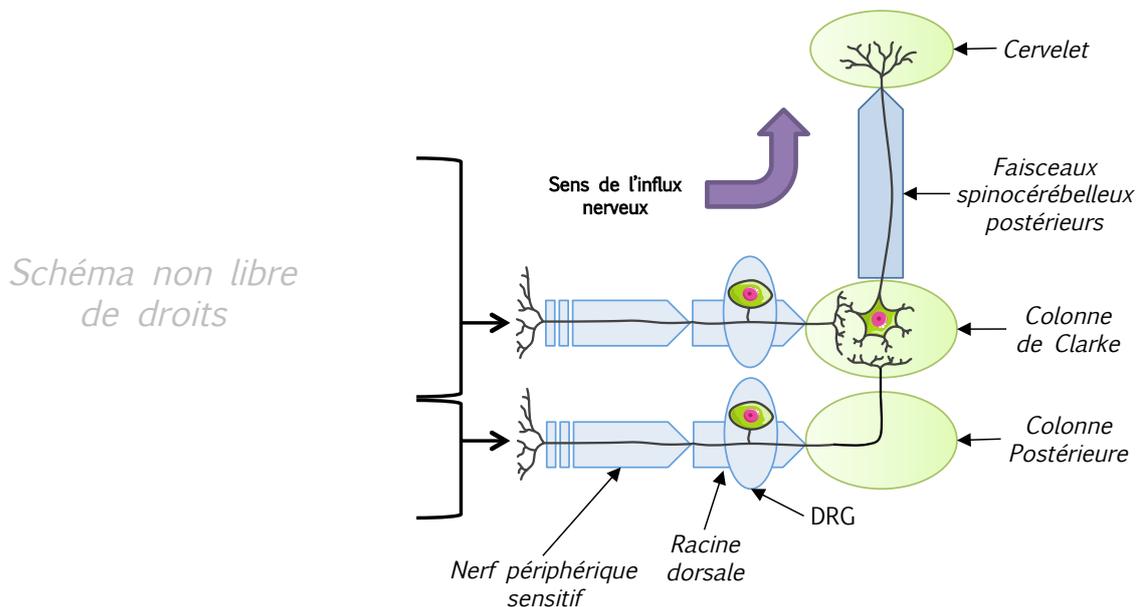


FIGURE 4 : Schématisation des voies nerveuses atteintes dans l'ataxie de Friedreich

A/ Schématisation des voies et des structures neurologiques atteintes dans l'AF. Les patients présentent une dégénérescence importante des colonnes postérieures, des colonnes de Clarke et des faisceaux spinocérébelleux de la moelle épinière. Les ganglions dorsaux rachidiens sont atrophiés à cause de la perte des gros neurones sensitifs. Les faisceaux corticospinaux, faisant partie de la voie pyramidale, sont aussi touchés, mais pas les neurones moteurs qui en partent. (Schéma modifié d'après Koutnikova H (1998), « Identification du gène de l'Ataxie de Friedreich et caractérisation de sa protéine, la frataxine ». Strasbourg, Université Louis Pasteur)

B/ Schématisation des chemins empruntés par les neurones sensitifs périphériques suivant leur niveau d'entrée dans la colonne vertébrale. Le noyau de Clarke étant absent au niveau sacral et lombaire inférieur, les fibres entrent dans les colonnes postérieures, remontent la moelle épinière et font synapse dans la colonne de Clarke supérieure. (Schéma de la colonne vertébrale issu de <http://legacy.jyi.org/articleimages/539/originals/img0.jpg>)

b) Atteinte de la moelle épinière

Réseau sensitif

Au niveau central, on observe une nette dégénérescence de la moitié arrière de la moelle épinière, avec notamment une atrophie des colonnes dorsales, des colonnes de Clarke et des faisceaux spinocérébelleux dorsaux (**figures 3-B1 et 4**) (Hewer, 1969; Jitpimolmard et al., 1993). Ces structures prennent en charge les informations proprioceptives recueillies par les gros neurones sensitifs et les véhiculent vers le cervelet (**figure 4**). L'atrophie de ces structures est particulièrement marquée au niveau lombaire. Un amincissement médullaire à la base du crâne est visible en IRM après une longue évolution de la maladie (**figure 3-B2**) (Anheim et al., 2012; Mascalchi et al., 1994). A l'heure actuelle, on ignore si ces structures de la moelle épinière s'atrophient d'elles-mêmes car les neurones qui les constituent sont sensibles au déficit en frataxine ou si leur dégénérescence est un phénomène rétrograde résultant de la perte des gros neurones sensitifs issus des DRG qui sont la source de leur information sensitive. La dégénérescence de ces structures participe à l'abolition de la sensibilité profonde et des réflexes ostéotendineux.

Réseau pyramidal

Bien que les neurones moteurs périphériques ne soient pas affectés, les patients AF présentent une atteinte de la voie pyramidale descendante, en particulier des cellules de Betz (cortex moteur) et des faisceaux corticospinaux (**figure 4-A**). Au niveau symptomatique, cela se manifeste par le signe de Babinski (extension du gros orteil suite à une stimulation de la plante des pieds, au lieu d'une flexion) et une faiblesse musculaire.

c) Atteinte du cervelet

Contrairement aux autres ataxies héréditaires, le cervelet est plutôt épargné dans l'ataxie de Friedreich. Il apparaît généralement normal à l'IRM, mais peut tout de même être atrophié tardivement dans la progression de maladie (Anheim et al., 2010, 2012). Malgré l'absence d'anomalie morphologique majeure, les études histologiques ont révélé une atteinte constante du noyau dentelé chez les patients AF, structure à l'origine des voies cérébelleuses efférentes (**figure 3-C**) (Jitpimolmard et al., 1993; Koeppen et al., 2007). Son atteinte est directement responsable de la dysarthrie observée chez les patients et participe à l'ataxie. Le cortex du cervelet est épargné. La perte des cellules de Purkinje est possible, mais tardive.

2- Cardiomyopathie

Plus de 2/3 des patients AF sont atteints d'une cardiomyopathie, dont la sévérité et la progression varient de l'un à l'autre. Les cardiomyopathies sont des maladies du muscle cardiaque, dont les causes peuvent être multiples. Les formes les plus fréquentes sont les cardiomyopathies hypertrophiques et les cardiomyopathies dilatées.

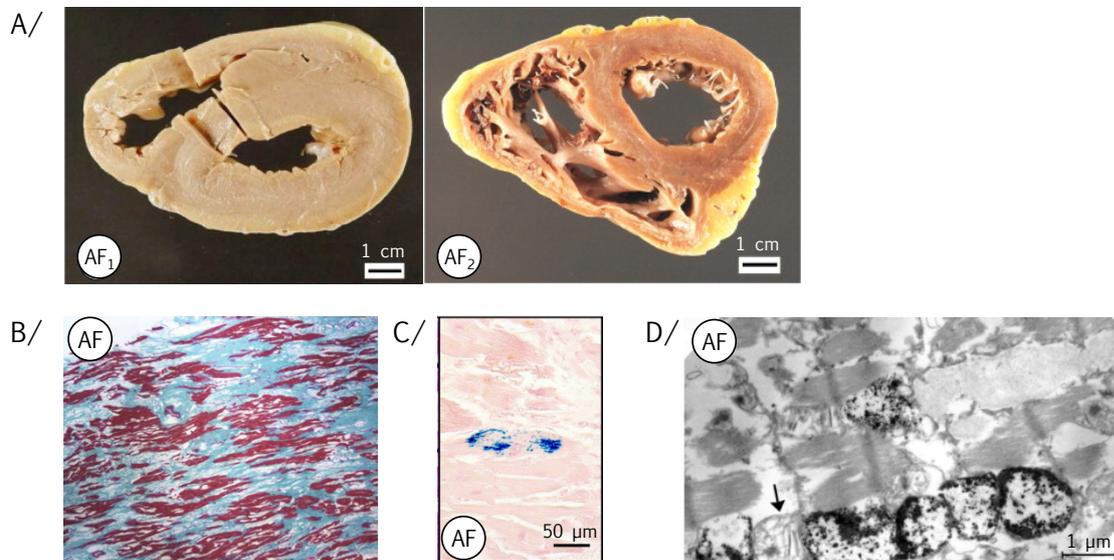


FIGURE 5 : Atteinte cardiaque des patients AF

A/ Coupes transversales de cœur de patients. Le patient AF₁ présente une hypertrophie concentrique avec une réduction du volume des deux ventricules. Le patient AF₂ présente une hypertrophie du ventricule gauche et du septum (*issues de (Koeppen, 2011)*).

B/ Coupe histologique de cœur de patient AF colorée au Trichrome de Masson mettant en évidence de la fibrose (en bleu) entre les fibres musculaires (en rouge) (*issue de (Payne and Wagner, 2012)*).

C/ Coupe histologique de cœur de patient colorée au bleu de Prusse (coloration de Perls) montrant des dépôts de fer dans certains cardiomyocytes (en bleu) (*issue de (Koeppen, 2011)*).

D/ Visualisation des dépôts de fer dans les cardiomyocytes par microscopie électronique. Les dépôts de fer sont opaques aux électrons et apparaissent comme des points noirs au sein de structures situées entre les faisceaux contractiles. Flèche = mitochondrie intacte (*issue de (Michael et al., 2006)*).

a) Fonctionnalité du cœur des patients AF

L'atteinte cardiaque des patients AF a fait l'objet de peu d'études comparé à l'atteinte neurologique. Ce n'est que depuis quelques années que l'on s'y intéresse réellement. Les caractéristiques fonctionnelles du cœur des patients ont été étudiées principalement par échographie, électrocardiographie (ECG), doppler et plus récemment en imagerie par résonance magnétique (IRM). Il a ainsi été établi que la fréquence cardiaque était plus élevée chez les patients AF que chez les individus contrôles (Bit-Avragim et al., 2001; Dedobbeleer et al., 2012; Unverferth et al., 1987). Lorsqu'elle est présente, la cardiomyopathie des patients se traduit généralement par une hypertrophie concentrique ou asymétrique du ventricule gauche et/ou du septum, qui selon son importance, peut s'accompagner d'une augmentation de la masse du ventricule gauche (**figure 5-A**) (Ribaï et al., 2007b; Schadt et al., 2012). La fonction systolique est maintenue chez la majorité des patients, comme en témoigne la fraction d'éjection normale (Dutka et al., 1999; Ribaï et al., 2007b). Jusqu'à 90% des patients étudiés présentent un électrocardiogramme anormal (Alboliras et al., 1986; Meyer et al., 2007; Regner et al., 2012; Schadt et al., 2012) : bien que l'onde QRS (dépolariation ventriculaire) soit normale chez la plupart des patients, ils présentent souvent une anomalie de l'onde T (repolarisation) qui peut être inversée ou aplatie (Dutka et al., 1999; Kipps et al., 2009; Meyer et al., 2007; Schadt et al., 2012). Le problème de repolarisation visible à l'ECG ainsi que la réduction du diamètre du ventricule gauche en fin de diastole sont le signe d'une atteinte de la fonction diastolique (Dutka et al., 1999; Harding, 1981; Meyer et al., 2007; Regner et al., 2012; Unverferth et al., 1987), caractéristique générale des hypertrophies cardiaques familiales (voir revue (Ommen, 2011)). Avec le temps, la cardiomyopathie hypertrophique peut évoluer vers une cardiomyopathie dilatée, qui se traduit notamment par un amincissement de la paroi ventriculaire, une diminution de la masse du ventricule gauche et de la fraction d'éjection, pouvant à terme conduire à l'insuffisance cardiaque et précipiter le décès des patients (Alboliras et al., 1986; Casazza and Morpurgo, 1996; Kipps et al., 2009; Rajagopalan et al., 2010).

Des études pré-symptomatiques ont permis de mettre en évidence des manifestations précoces en l'absence de signes d'hypertrophie et/ou de dysfonctionnement ventriculaire avérés. L'analyse IRM des patients AF a ainsi révélé une réduction de la perfusion de réserve du cœur (Raman et al., 2011). Cela signifie que la réponse circulatoire à une augmentation de la demande métabolique est moins efficace chez les patients comparé aux individus contrôles. De plus, les patients AF présentent une altération de la géométrie du ventricule gauche lors de sa contraction, qui se manifeste par une réduction de la déformation longitudinale et circonférentielle, et témoigne d'une contraction cardiaque moins efficace (Dedobbeleer et al., 2012; Mottram et al., 2011). Ces données récentes sont importantes pour le diagnostic précoce de la cardiomyopathie et sa prise en charge médicale qui devraient permettre de limiter le risque de décès lié à cette atteinte.

L'existence d'une corrélation entre la longueur de la plus petite expansion (GAA)_n et la sévérité de la cardiomyopathie a été envisagée à plusieurs reprises, mais reste encore aujourd'hui assez controversée : un lien a pu être établi par des études anciennes (Bit-Avragim et al., 2001; Dutka et al., 1999; Isnard et al., 1997), mais plus récemment a été réfuté (Kipps et al., 2009; Mateo et al.,

2004; Weidemann et al., 2012). La taille de l'échantillon de patients considéré, la nature prospective ou rétrospective de l'étude, ainsi que l'évolution du matériel de mesure, pourraient expliquer, du moins en partie, ce désaccord. Enfin, dans la mesure où la cardiomyopathie est évolutive, on peut se demander quel serait le stade de la maladie le plus judicieux à considérer pour étudier la véracité d'une telle corrélation. Dans cette idée, plusieurs groupes ont comparé l'évolution de la cardiomyopathie avec celle de l'atteinte neurologique. Dans la plupart des cas, aucun parallèle n'a pu être établi entre ces évolutions (Dutka et al., 1999; Meyer et al., 2007; Rajagopalan et al., 2010; Schadt et al., 2012; Weidemann et al., 2012).

b) Atteintes tissulaires et cellulaires

Plusieurs anomalies tissulaires et cellulaires ont été rapportées, avec notamment une fibrose diffuse, des dépôts de fer, une hypertrophie cellulaire et des foyers de nécrose (Alboliras et al., 1986; Hewer, 1969, 1968; Michael et al., 2006; Ramirez et al., 2012; Unverferth et al., 1987). En effet, les cœurs de patients présentent de façon constante de la fibrose localisée entre les cellules cardiaques, qui tend à remplacer les cellules musculaires avec le temps (**figure 5-B**) (Hewer, 1969; Jitpimolmard et al., 1993). Le développement de la fibrose impacte non seulement la morphologie (amincissement des parois), mais aussi le fonctionnement (performances contractiles réduites et dilatation) du ventricule gauche (Weidemann et al., 2013). Des dépôts de fer dans les cardiomyocytes sont détectables par histochimie et par microscopie électronique après contraste au bismuth sur des échantillons issus de biopsies ou d'autopsies (**figure 5-C,D**) (Lamarche et al., 1980; Michael et al., 2006; Ramirez et al., 2012). La distribution de ces dépôts est multifocale et concerne seulement 1 à 10% des fibres musculaires, n'entraînant pas d'augmentation de la charge globale en fer du cœur des patients AF contrairement à d'autres cardiomyopathies par surcharge en fer (Michael et al., 2006; Murphy and Oudit, 2010; Ramirez et al., 2012). Ces dépôts semblent précéder l'apparition de la fibrose (Michael et al., 2006). La localisation subcellulaire des dépôts de fer n'a pas encore été clairement établie, bien que leur aspect granulaire suggère une localisation mitochondriale (**figure 5-D**) (Michael et al., 2006; Ramirez et al., 2012). L'hypertrophie des cardiomyocytes serait associée à la présence de gros noyaux irréguliers mais cet aspect reste malheureusement peu documenté (Hewer, 1969; Jitpimolmard et al., 1993). La présence de foyers de nécrose avec des infiltrations de cellules immunitaires dans le tissu cardiaque a aussi été rapportée, mais semble être un événement plutôt rare (Hewer, 1969; Lamarche et al., 1980).

La cardiomyopathie des patients AF a surtout été étudiée du point de vue de la fonctionnalité et des modifications morphologiques globales du cœur. En revanche, les mécanismes cellulaires à l'origine de la cardiomyopathie restent peu documentés, notamment par manque de biopsies et d'échantillons post-mortem exploitables. Ainsi, le développement de modèles cellulaires cardiaques pourrait permettre d'approfondir nos connaissances sur l'étiologie de la cardiomyopathie des patients AF.

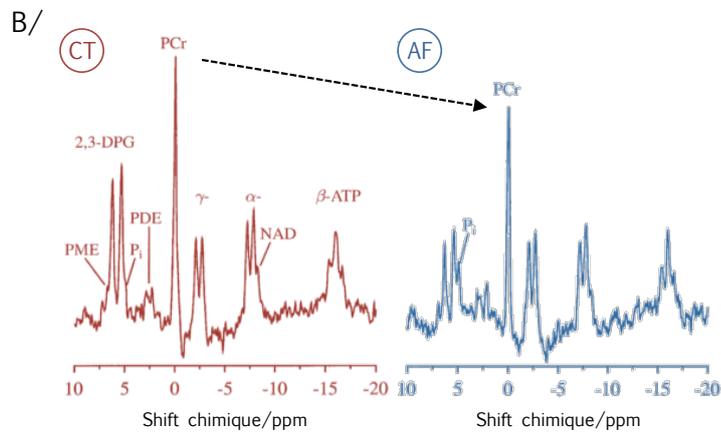
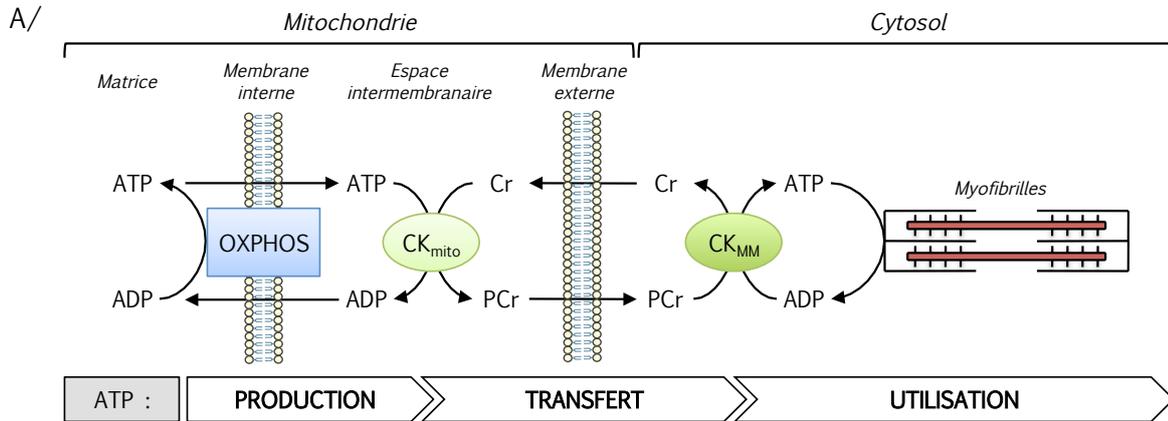


FIGURE 6 : Énergétique du cœur des patients AF

A/ Schématisation de la navette PCr/Cr, pour le transfert de phosphate à haute énergie des mitochondries aux myofibrilles et ainsi permettre la contraction musculaire.

B/ Spectre RMN du ^{31}P d'un individu contrôle (CT, en rouge) et d'un patient AF (AF, en bleu)(issu de (Bunse et al., 2003)), montrant une réduction du signal de la PCr et une augmentation du signal du phosphate inorganique (Pi) chez le patient AF.

ATP : Adénosine TriPhosphate, ADP : Adénosine DiPhosphate, CK_{MM} : Créatine kinase spécifique du muscle, CK_{mito} : Créatine kinase mitochondriale, Cr : Créatine, PCr : Phosphocréatine, OXPHOS : phosphorylation oxydative.

c) *Energétique du cœur des patients AF*

Parallèlement aux études fonctionnelles classiques, trois équipes se sont intéressées au statut énergétique du cœur des patients AF. L'état énergétique du cœur se mesure de façon non invasive par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du ^{31}P (SRM), qui permet d'évaluer le contenu en éléments phosphorés tels que l'Adénosine TriPhosphate (ATP), la PhosphoCréatine (PCr) et le Phosphate inorganique (Pi) (voir revue (Hudsmith and Neubauer, 2009)).

Le système Créatine/Phosphocréatine (Cr/PCr) est l'un des plus importants systèmes de régulation du transfert d'énergie dans les cellules musculaires. En effet, la phosphocréatine (PCr) constitue à la fois une réserve énergétique et une navette permettant de transférer des liaisons phosphates à haute énergie depuis le site de production de l'ATP que sont les mitochondries, à son site d'utilisation, les myofibrilles (**figure 6-A**). Lorsque la demande en ATP dépasse sa synthèse, le niveau de PCr chute de façon à maintenir un approvisionnement constant en ATP, ce qui se traduit par une diminution du ratio PCr/ATP (Hudsmith and Neubauer, 2009). Cela est possible car l'équilibre de la créatine kinase privilégie la synthèse d'ATP aux dépens de celle de la PCr (**figure 6-A**). Le ratio PCr/ATP peut aussi diminuer suite à une déplétion en créatine, mais ce phénomène est restreint à l'insuffisance cardiaque (Hudsmith and Neubauer, 2009).

Lodi *et al.* ont pu montrer que le ratio PCr/ATP était réduit de 40% chez les 18 patients AF étudiés, qu'ils aient ou non une hypertrophie du ventricule gauche (Lodi *et al.*, 2001). De la même façon, Bunse *et al.* ont confirmé chez 11 autres patients AF une réduction du ratio PCr/ATP et une augmentation du ratio Pi/PCr, avec ou sans hypertrophie du ventricule gauche (dans ce cas, les critères de définition de l'hypertrophie étaient plus stringents que pour la première étude) (**figure 6-B**) (Bunse *et al.*, 2003). Ils ont aussi pu établir une corrélation de ces ratios avec l'épaisseur de la paroi du septum, ce qui suggère un lien étroit entre le degré de défaillance énergétique et l'atteinte cardiaque associée à l'AF (Bunse *et al.*, 2003). En revanche, les patients LOFA (forme moins sévère de l'AF) n'ont pas de réduction significative du ratio PCr/ATP (Wolf *et al.*, 2008). Le faible ratio PCr/ATP mesurée chez les patients AF reflète donc un déficit énergétique certainement lié à un défaut de synthèse d'ATP, plutôt qu'à une augmentation de sa consommation.

3- Diabète

L'origine d'un diabète peut être double : (1) une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques et/ou (2) une résistance à l'insuline. Le diabète associé à l'ataxie de Friedreich résulterait de la combinaison de ces deux mécanismes (**figure 7-A**). En effet, la majorité des patients étudiés présentent une résistance à l'insuline, qu'ils soient diabétiques ou non (Cnop *et al.*, 2012; Fantus *et al.*, 1993; Finocchiaro *et al.*, 1988; Hebinck *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 1986). La résistance à l'insuline serait indirectement liée à l'atteinte neurologique, qui limite l'activité physique des patients, favorisant ainsi l'accumulation de gras abdominal (Cnop *et al.*, 2012) et la perte de masse musculaire. La résistance à l'insuline a aussi été observée chez les proches parents

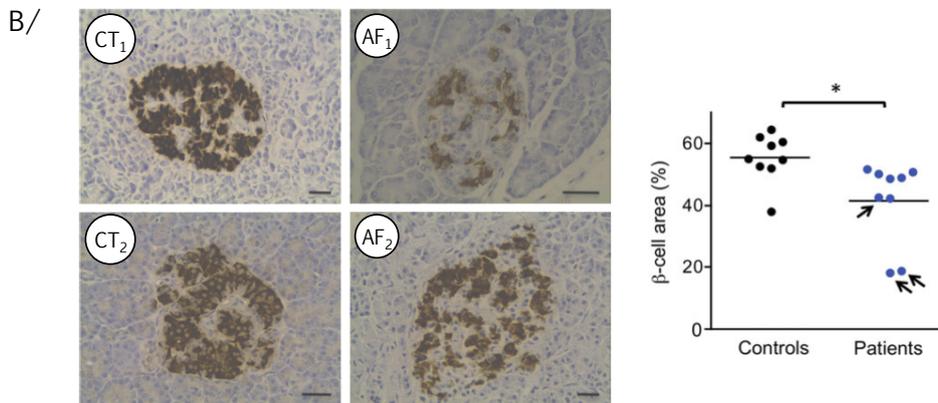
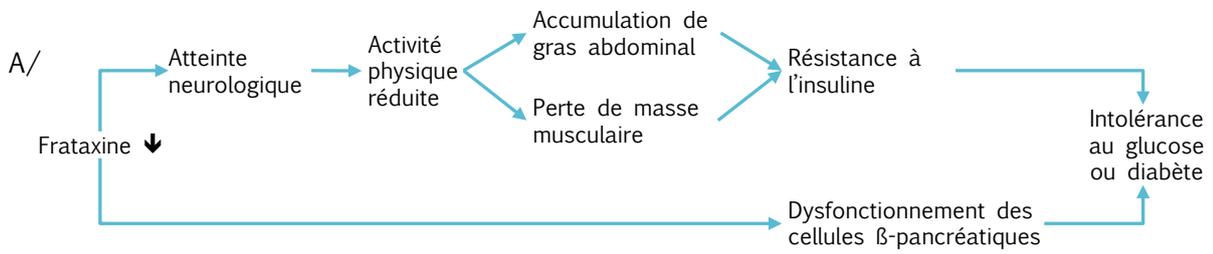


FIGURE 7 : Atteinte pancréatique des patients AF

A/ Etiologie du diabète/intolérance au glucose chez les patients AF.

B/ Atteinte des cellules β -pancréatiques (issue de (Cnop et al., 2012)) : A gauche, des clichés de coupes de pancréas de deux individus contrôles (CT₁ et CT₂) et de deux patients AF (AF₁ et AF₂) avec un marquage de l'insuline (marron) au niveau d'un îlot de Langerhans. Echelle : 40 μ m. A droite, un graphique montrant la proportion de cellules β -pancréatiques quantifiées post-mortem sur des pancréas de 9 contrôles et de 9 patients AF. Flèches : patients diagnostiqués diabétiques.

hétérozygotes des patients étudiés (Fantus et al., 1991; Hebinck et al., 2000), mais ces observations ont récemment été remises en cause (Cnop et al., 2012).

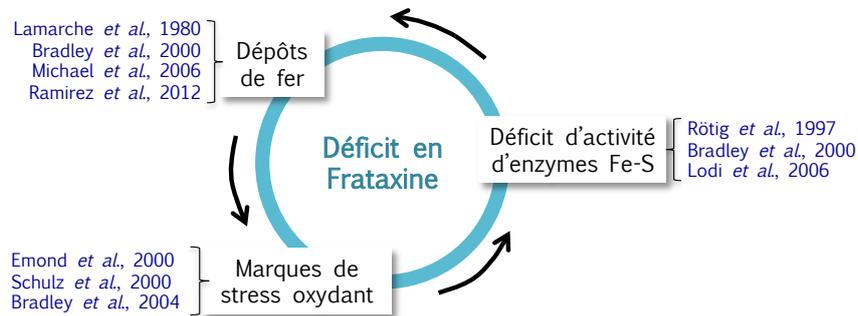
L'analyse histologique de coupes de pancréas de patients (diabétiques ou non) a révélé une réduction de la surface de cellules β , productrices d'insuline, au niveau des îlots de Langerhans, sans modification de la surface occupée par les cellules α productrices de glucagon (**Figure 7-B**) (Cnop et al., 2012; Schoenle et al., 1989). Contrairement au diabète de type I, la disparition des cellules β -pancréatiques observée chez les patients AF n'est pas due à un processus auto-immun (Schoenle et al., 1989). Afin d'élucider les mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement et plus tard dans la perte des cellules β -pancréatiques, Cnop et al. ont réalisé un knockdown de la frataxine par ARN interférent dans des cellules pancréatiques humaines et de rat (Cnop et al., 2012). Ils ont ainsi pu montrer que la production et la sécrétion basale d'insuline n'étaient pas affectées, contrairement à la sécrétion d'insuline induite par le glucose (impliquée dans la régulation de la glycémie) (Cnop et al., 2012). Les cellules β -pancréatiques déficientes en frataxine présentent une réduction du potentiel de membrane mitochondrial et du ratio ATP/ADP après traitement au glucose, suggérant une atteinte des mitochondries (Cnop et al., 2012). Or les mitochondries jouent un rôle essentiel dans le processus de régulation de la glycémie : en effet, le glucose sanguin, entré dans les cellules β -pancréatiques de façon dose-dépendante, est métabolisé via la glycolyse et le cycle de Krebs pour produire de l'ATP. L'ATP ainsi produit entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique (par inhibition d'un canal potassium), conduisant à l'influx de calcium puis à l'exocytose de l'insuline. Enfin, il a été montré sur des cellules β -pancréatiques en culture que le déficit en frataxine les rendait plus sensibles au stress métabolique et au stress du réticulum endoplasmique, entraînant une augmentation de l'apoptose (Cnop et al., 2012). Cela pourrait expliquer, au moins en partie, la disparition des cellules β -pancréatiques observée chez les patients.

L'intolérance au glucose et le diabète doivent être régulièrement évalués et suivis afin de limiter leur impact sur le quotidien et sur la vie des patients. Un diabète non pris en charge pourrait entraîner l'aggravation des symptômes neurologiques (neuropathie diabétique, perte de l'audition et de la vue) et/ou de la cardiomyopathie (Snyder et al., 2012).

4- Physiopathologie : observations faites chez les patients AF

Des études de biopsies, de prélèvements et d'échantillons post-mortem de patients ont permis d'établir le phénotype biochimique de l'AF (**figure 8-A**). Historiquement, cette caractérisation a débuté par l'observation de dépôts de fer dans les cellules cardiaques de patients (voir intro. point 1-D-2-b) (Lamarche et al., 1980). L'identification du gène muté dans la maladie et la localisation de son produit, la frataxine, dans les mitochondries, ont posé la question des répercussions sur ces organites. La mesure d'activité d'enzymes de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs a révélé un déficit spécifique des protéines à centres Fe-S, en particulier l'aconitase et les complexes I, II et III, dans des homogénats de cœur de patients (Bradley et al., 2000; Rötig et al., 1997). De plus, des études *in vivo* de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du phosphore (^{31}P) sur le cœur et le

A/



B/

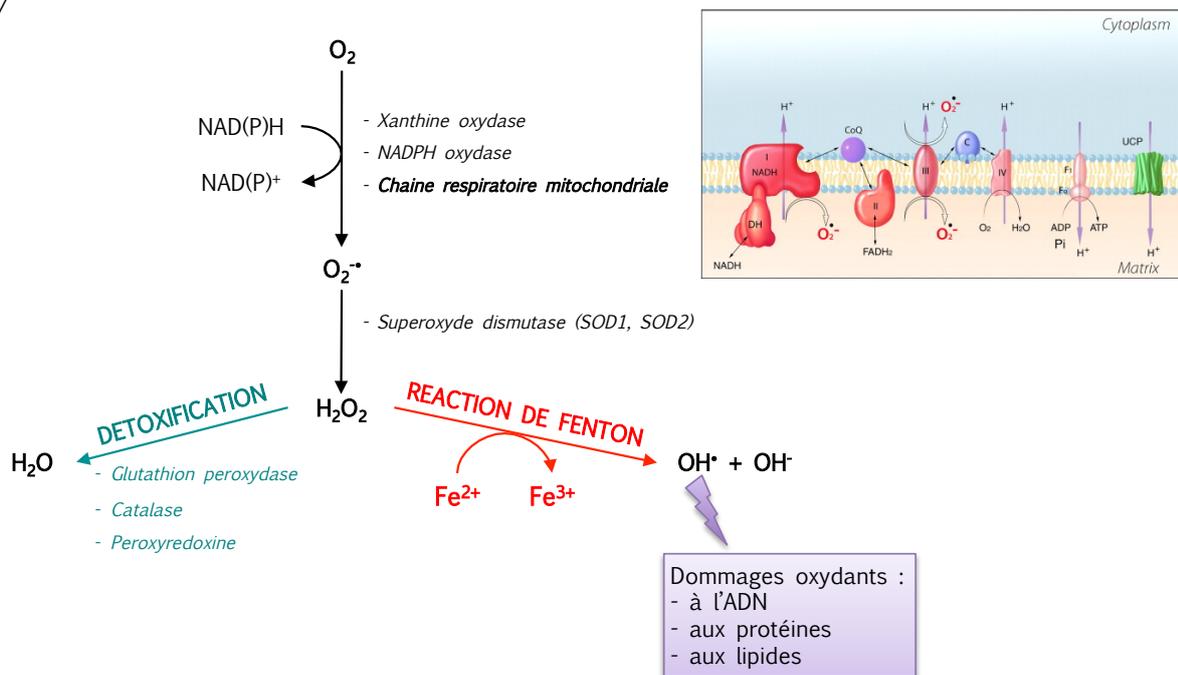


FIGURE 8 : Physiopathologie de l'ataxie de Friedreich d'après les données issues des patients

A/ Cercle vicieux reliant les trois anomalies biochimiques caractéristiques de l'AF : les dépôts de fer, le déficit d'activité des enzymes à centres Fe-S et les marques de stress oxydant. Les données issues des patients n'ont pas permis d'identifier celle qui était la conséquence directe du déficit en frataxine.

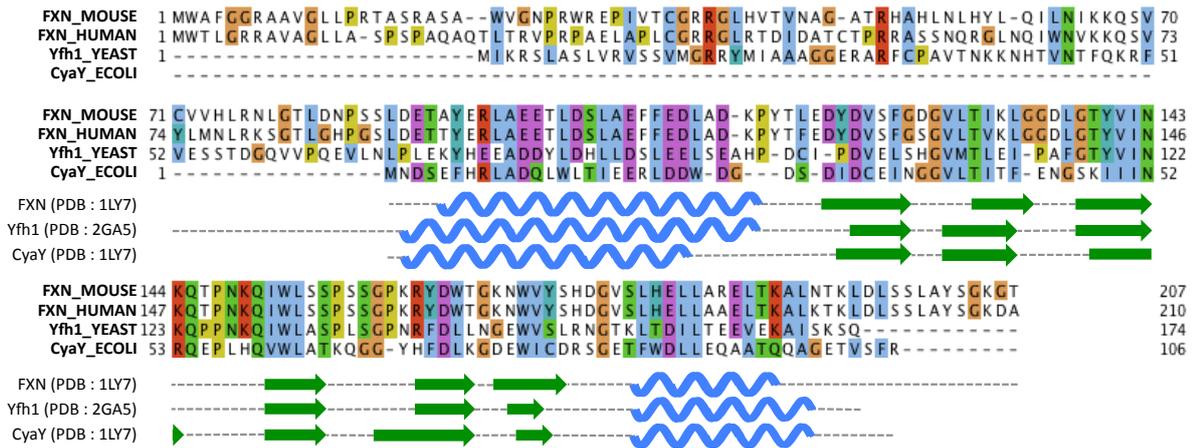
B/ Production et détoxification des espèces réactives de l'oxygène. La chaîne mitochondriale respiratoire est une grande source d'ions superoxydes, produits au niveau des complexes I et III (illustration issue de (Balaban *et al.*, 2005)). Les ions superoxydes sont détoxifiés par conversion successive en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) puis en eau. Si du fer Fe^{2+} est présent, le peroxyde d'hydrogène peut être converti via la réaction de Fenton en radicaux hydroxyles OH^{\bullet} , hautement réactifs.

muscle squelettique de patients AF ont suggéré une défaillance de leur métabolisme énergétique (ratio PCr/ATP réduit par rapport aux contrôles, voir *intro. point I-D-2-c*) (Bunse et al., 2003; Lodi et al., 1999, 2001). Le défaut de synthèse d'ATP observé ici reflète l'activité réduite des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale mesurée précédemment (Bradley et al., 2000; Rötig et al., 1997).

La mise en évidence de la perturbation de l'homéostasie du fer et de la défaillance de la chaîne respiratoire chez les patients a permis de postuler d'un possible rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de la maladie (**figure 8-A,B**). En effet, des ions superoxydes $O_2^{\bullet-}$ peuvent être générés au niveau de la chaîne respiratoire, puis convertis par les superoxydes dismutases cytosolique (SOD1, CuSOD) et mitochondriale (SOD2, MnSOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci est normalement détoxifié par conversion en eau par le système de défenses anti-oxydantes. En revanche, lorsque du fer libre (Fe^{2+}) est présent dans la cellule, celui-ci peut réagir avec l' H_2O_2 via la réaction de Fenton et produire des radicaux hydroxyles OH^{\bullet} hautement réactifs, susceptibles d'endommager l'ADN, les protéines et les lipides (**figure 8-A,B**). Des dommages cellulaires imputables au stress oxydant ont effectivement été observés chez les patients AF, avec notamment une augmentation du contenu en malondialdéhyde (MDA) dans le plasma et en 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2'dG) dans les urines, respectivement produits de la peroxydation des lipides et de l'oxydation de l'ADN (Bradley et al., 2004; Emond et al., 2000; Schulz et al., 2000). Ces données n'ont cependant pas pu être confirmées par des études ultérieures à cause d'une trop grande variabilité entre les patients (Arnold et al., 2006; Di Prospero et al., 2007).

L'hypothèse d'un cercle vicieux qui relierait les trois anomalies biochimiques de l'AF a été proposée (figure 8-A). Tout l'enjeu était d'identifier celle découlant directement du déficit en frataxine, permettant par la même occasion de se rapprocher de l'élucidation de sa fonction. C'est la caractérisation physiopathologique des modèles murins KO conditionnels développés au laboratoire qui a permis d'en établir la chronologie (Puccio et al., 2001) (voir la revue sur les modèles murins et cellulaires au point II (Perdomini et al., 2013)). En effet, dans ces modèles, le déficit d'activité des enzymes à centres Fe-S précède l'accumulation mitochondriale de fer. La portée de ces observations a été renforcée par différentes études in vitro chez la bactérie et la levure qui ont confirmé l'implication de la frataxine dans la biosynthèse des centres Fe-S (Duby et al., 2002; Gerber et al., 2003; Layer et al., 2006).

A/



B/

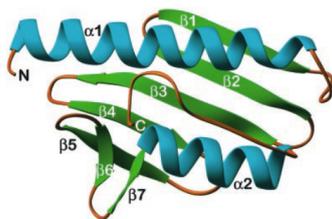


FIGURE 9 : Conservation et structure de la frataxine

A/ Alignement multiple des séquences de la frataxine souris, humaine, levure (Yfh1) et bactérienne (CyaY) avec en dessous, le positionnement des hélices α (en bleu) et des brins β (en vert). (Figure fournie par Florent COLIN).

PDB : Protein Data Bank.

B/ Structure de la frataxine humaine obtenue par cristallographie. (Issue de (Dhe-Paganon et al., 2000)).

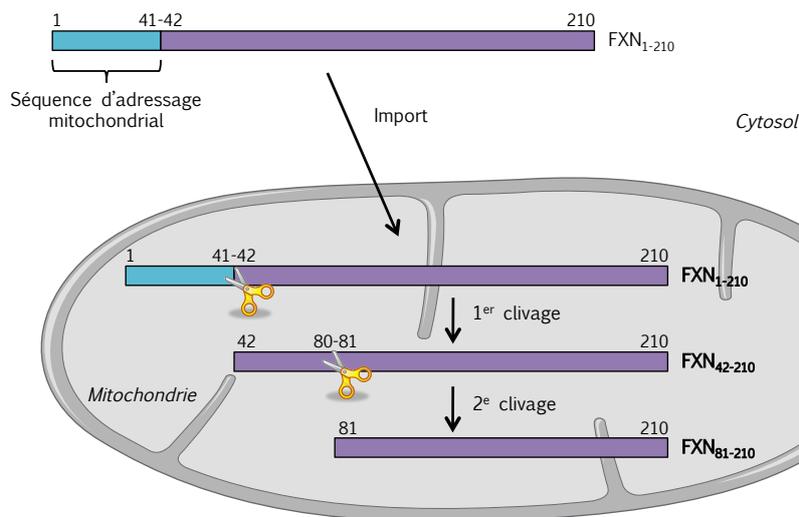


FIGURE 10 : Maturation de la frataxine

La frataxine est synthétisée dans le cytosol sous forme d'un précurseur de 210 acides aminés (FXN₁₋₂₁₀). Il est clivé à deux reprises par la MPP (ciseaux jaunes) lors de son entrée dans la mitochondrie, avec formation successive d'un intermédiaire (FXN₄₂₋₂₁₀) puis d'une forme mature et fonctionnelle (FXN₈₁₋₂₁₀).

MPP : Mitochondrial Processing Peptidase.

D. La frataxine

1- Maturation, localisation et structure

Chez les eucaryotes, la frataxine est une petite protéine ubiquitaire codée par le génome nucléaire et transportée du cytoplasme vers la mitochondrie (Campuzano et al., 1997; Koutnikova et al., 1997). Sa séquence est conservée des bactéries Gram négatives à l'homme (Figure 9-A). Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 210 acides aminés doté d'une séquence d'adressage mitochondrial dans sa partie N-terminale, correspondant à l'exon 1 et au début de l'exon 2 (Campuzano et al., 1997; Koutnikova et al., 1997). Lors de son entrée dans la mitochondrie, le précurseur ($t_{1/2} = 10$ min) est clivé à deux reprises par la *Mitochondrial Processing Peptidase* (MPP), aboutissant à la formation successive d'un intermédiaire (FXN₄₂₋₂₁₀, 19 kDa, $t_{1/2} = 2h10$), puis d'une forme mature et fonctionnelle (FXN₈₁₋₂₁₀, 17 kDa, $t_{1/2} = 50h$) (figure 10) (Li et al., 2008; Schmucker et al., 2008). En dehors de ces clivages, aucune autre modification post-traductionnelle n'a été rapportée pour l'instant.

La structure de la forme mature de la frataxine humaine (FXN₈₁₋₂₁₀) ainsi que celle de ses orthologues bactérien (CyaY) et levure (Yfh1) a été déterminée par RMN et/ou cristallographie (Dhe-Paganon et al., 2000; He et al., 2004; Nair et al., 2004) : c'est une protéine globulaire formée de 2 hélices α entourant 5 à 7 brins β antiparallèles selon l'orthologue (figure 9-B). La première hélice α comporte une dizaine de résidus chargés négativement exposés à la surface de la protéine et a de ce fait été pressentie comme site de fixation du fer (Dhe-Paganon et al., 2000). Le feuillet β , et plus particulièrement les résidus 127 à 182 correspondent à la région la plus conservée de la protéine (29% d'identité et 62,5% de similarité). La séquence de la dernière hélice α , est quant à elle, peu conservée.

2- Fonction de la frataxine : régulation de la biosynthèse des centres Fe-S

Les études *in vitro* sur les modèles levure, bactérien et mammifère ont permis de proposer différentes fonctions pour la frataxine : elle fut tour à tour proposée comme protéine de stockage de fer (à l'image des ferritines) (Karlberg et al., 2006), donneur de fer pour la machinerie de biosynthèse des centres Fe-S (Layer et al., 2006; Yoon and Cowan, 2003), la machinerie de biosynthèse de l'hème (Yoon and Cowan, 2004) ou pour la réparation des centres Fe-S (Bulteau et al., 2004). Enfin un rôle plus général de régulateur de la biosynthèse des centres Fe-S a aussi été montré (Tsai and Barondeau, 2010). C'est cette dernière fonction qui prévaut aujourd'hui.

a) Les centres Fe-S

Les centres Fe-S sont des cofacteurs inorganiques essentiels à la vie, constitués d'atomes de fer et de soufre, présents chez tous les organismes. Les formes de centres Fe-S les plus courantes et les plus simples sont les noyaux rhombiques [2Fe-2S] et cubiques [4Fe-4S] (figure 11), mais de nombreuses variantes existent (architectures complexes, incorporation d'autres métaux, etc.). Ces

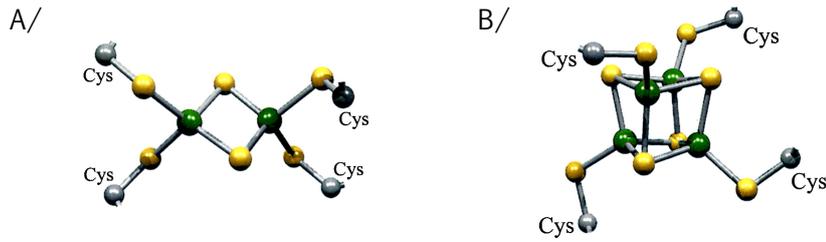


FIGURE 11 : Structure des centres Fe-S les plus courants (issues de (Frazzon and Dean, 2001))

A/ Cluster rhombique [2Fe-2S]. B/ Cluster cubique [4Fe-4S]. En jaune : les atomes de soufre, en vert : les atomes de fer, en gris : les atomes de carbone-β des résidus cystéines (cys).

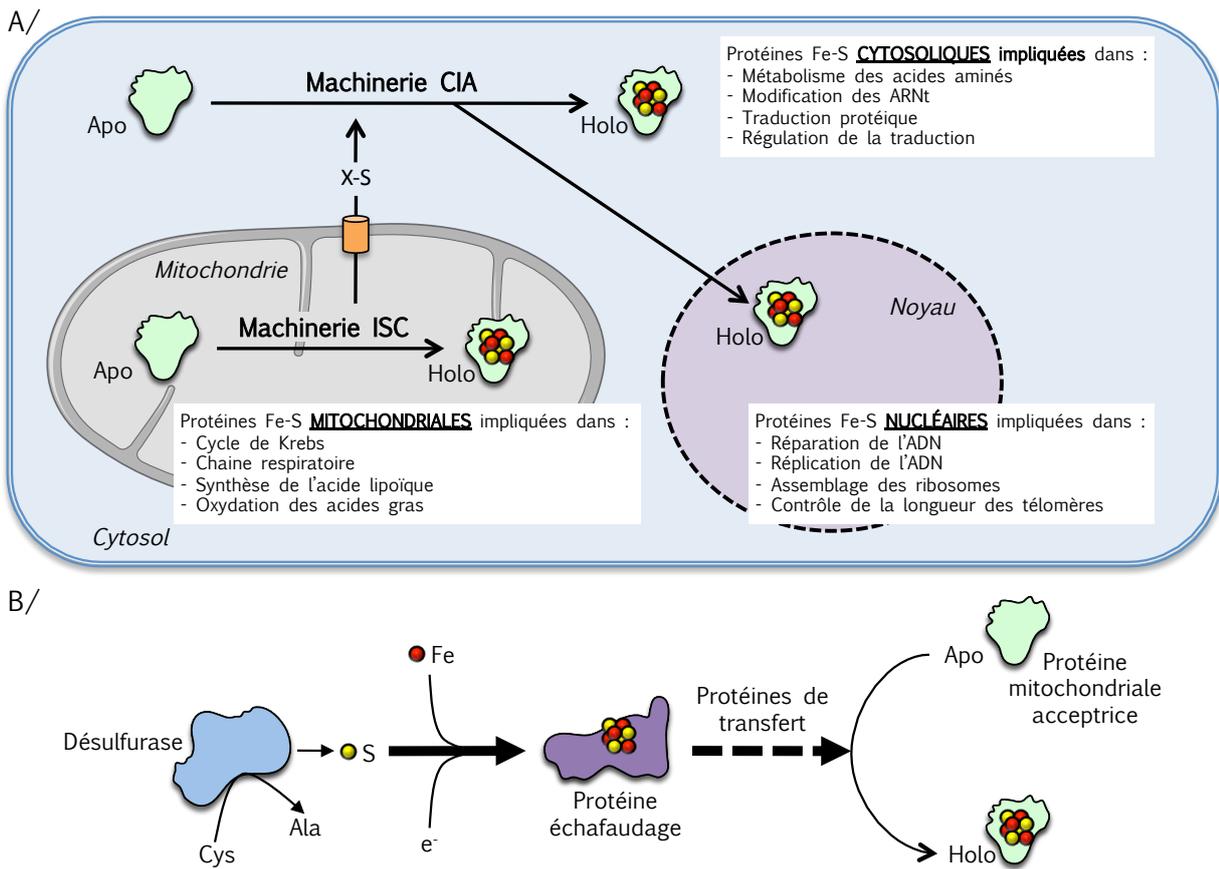


FIGURE 12 : Principe de la biosynthèse des protéines Fe-S

A/ Etapes de la biosynthèse des protéines Fe-S chez les eucaryotes : production des protéines Fe-S mitochondriales par la machinerie ISC et génération d'un composé X-S, exporté hors de la mitochondrie et pris en charge dans le cytosol par la machinerie CIA pour la production des protéines Fe-S cytosoliques et nucléaires. ISC : Iron Sulfur Clusters, CIA : Cytosolic Iron-sulfur protein Assembly, X-S : composé putatif contenant du soufre. (Figure reproduite d'après (Stehling and Lill, 2013))

B/ Grandes étapes de la machinerie ISC : les centres Fe-S sont assemblés sur une protéine échafaudage (en violet). Pour cela, il faut du soufre (obtenu par la désulfuration de cystéines), du fer et des électrons. Les centres Fe-S formés sont transportés par des protéines de transfert vers les protéines mitochondriales acceptrices (en vert clair). Cys : cystéine, Ala : alanine, S : soufre, Fe : fer : e⁻ : electron. (Figure reproduite d'après (Lill, 2009))

cofacteurs sont coordonnés au sein des protéines principalement par des résidus cystéines et histidines. Selon la protéine dans laquelle ils sont intégrés, ils peuvent être (1) des catalyseurs dans des réactions chimiques, (2) des transporteurs d'électrons, (3) des senseurs du fer ou encore (4) des stabilisateurs de structures protéiques (Lill and Mühlenhoff, 2008) (tableau 4).

Fonction des centres Fe-S	Exemples de protéines Fe-S
(1) Catalyse de réactions chimiques	- L'aconitase mitochondriale, catalysant l'isomérisation du citrate en isocitrate dans le cycle de Krebs. - La lipoyl synthase, impliquée dans la dernière étape de la biosynthèse de l'acide lipoïque.
(2) Transport d'électrons	- Les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale, transportent les électrons permettant de réduire l'oxygène en eau.
(3) Senseur du fer	- IRP1 (<i>Iron Regulatory Protein 1</i>), impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle du métabolisme du fer.
(4) Stabilité protéique	- La GPAT (<i>Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate AmidoTransferase</i>), une enzyme clé de la biosynthèse des purines

TABLEAU 4 : Quelques protéines Fe-S eucaryotes reliées à la fonction de leur(s) centre(s) Fe-S

b) *Biosynthèse des centres Fe-S et rôle de la frataxine*

Les mitochondries sont indispensables à la biosynthèse de l'ensemble des protéines Fe-S, qu'elles soient mitochondriales, cytosoliques ou nucléaires. Leur synthèse est assurée par deux machineries (figure 12-A). La machinerie d'assemblage ISC (*Iron Sulfur Clusters*) comprend la biosynthèse *de novo* des centres Fe-S et leur incorporation aux protéines Fe-S mitochondriales. Elle permettrait aussi de générer un élément X-S, de nature inconnue, exporté hors de la mitochondrie et pris en charge par la machinerie CIA (*Cytosolic ISC Assembly*) dont le rôle est d'assembler les protéines Fe-S cytosoliques et nucléaires (voir revues de référence (Lill and Mühlenhoff, 2008; Py and Barras, 2010)).

Schématiquement, la machinerie d'assemblage ISC nécessite un apport de soufre, de fer et d'électrons, ainsi que d'une protéine échafaudage sur laquelle est construit le centre Fe-S (figure 12-B). Ce dernier sera ensuite transféré à l'apoprotéine réceptrice grâce à différentes protéines chaperonnes. Simple dans son principe, la machinerie ISC implique pourtant plus d'une quinzaine de protéines. La frataxine est l'une d'elle et intervient lors de l'étape initiale, en interagissant avec le complexe ternaire NFS1/ISD11/ISCU (Schmucker et al., 2011; Tsai and Barondeau, 2010). Le couple NFS1/ISD11 est doté d'une activité cystéine désulfurase permettant d'extraire des atomes de soufre aux acides aminés L-cystéines et de les transférer à la protéine d'échafaudage ISCU. La frataxine, quant à elle, module l'activité de NFS1/ISD11 et l'apport de fer au complexe, sans toutefois avoir été reconnue comme donneur de fer (Colin et al., 2013). Les modalités d'arrivée des électrons restent à ce jour méconnues.

II. Les modèles animaux et cellulaires de l'ataxie de Friedreich

La conservation de la frataxine à travers l'évolution a permis de développer différents modèles de l'ataxie de Friedreich. On peut citer (1) le modèle levure (*Saccharomyces cerevisiae*), qui a surtout été utilisé pour décrypter la fonction de la frataxine (Duby et al., 2002; Karlberg et al., 2006), (2) les modèles drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Anderson et al., 2005) et nématode (*Caenorhabditis elegans*) (Vázquez-Manrique et al., 2006), générés par ARN interférents, mais dont l'utilisation reste assez anecdotique, et enfin (3) les modèles mammifères. Du fait de leur proximité avec l'homme, les modèles mammifères sont ceux qui ont le plus contribué à nos connaissances sur l'ataxie de Friedreich.

Je vous invite donc à lire la revue « Animal and cellular models of Friedreich ataxia » à laquelle j'ai participé (Perdomini et al., 2013). Dans cette revue nous avons répertorié les qualités du modèle idéal de l'AF, décrit leur apport dans la compréhension de (1) la physiopathologie de la maladie, (2) des mécanismes de répression du gène *FXN* par l'expansion (GAA)_n, (3) des mécanismes d'instabilité de l'expansion (GAA)_n, et enfin leur utilité pour le développement de thérapies. J'ai rédigé le paragraphe sur les cellules pluripotentes induites et leurs dérivés neuronaux et cardiaques, ainsi que celui sur le modèle cellulaire murin humanisé. J'ai aussi contribué à la rédaction de l'introduction et de la partie sur le modèle idéal de l'AF.

REVIEW

Animal and cellular models of Friedreich ataxia

Morgane Perdomini,^{*,†,‡,§,¶} Aurore Hick,^{*,†,‡,§,¶} Hélène Puccio^{*,†,‡,§,¶} and Mark A. Pook^{**}^{*}*Translational Medicine and Neurogenetics, IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch, France*[†]*Inserm, U596, Illkirch, France*[‡]*CNRS, UMR7104, Illkirch, France*[§]*Université de Strasbourg, Strasbourg, France*[¶]*Collège de France, Chaire de génétique humaine, Illkirch, France*^{**}*Biosciences, SHSSC, Brunel University, Uxbridge, UK***Abstract**

The development and use of animal and cellular models of Friedreich ataxia (FRDA) are essential requirements for the understanding of FRDA disease mechanisms and the investigation of potential FRDA therapeutic strategies. Although animal and cellular models of lower organisms have provided valuable information on certain aspects of FRDA disease and therapy, it is intuitive that the most useful models are those of mammals and mammalian cells, which are the closest in physiological terms to FRDA patients. To date, there have been considerable efforts put into the development of several

different FRDA mouse models and relevant FRDA mouse and human cell line systems. We summarize the principal mammalian FRDA models, discuss the pros and cons of each system, and describe the ways in which such models have been used to address two of the fundamental, as yet unanswered, questions regarding FRDA. Namely, what is the exact pathophysiology of FRDA and what is the detailed genetic and epigenetic basis of FRDA?

Keywords: frataxin, Friedreich ataxia, GAA repeat expansion, induced pluripotent stem cells, mismatch repair, mouse model. *J. Neurochem.* (2013) **126** (Suppl. 1), 65–79.

Friedreich ataxia (FRDA) is the most common autosomal recessive ataxia in the Caucasian population with a prevalence of approximately 1 in 50 000 and onset usually before 25 years of age (Cossee *et al.* 1997). The neurological symptoms, such as spinocerebellar and sensory ataxia with loss of deep tendon reflexes, dysarthria, and pyramidal signs (Pandolfo 2009), are a consequence of the degeneration of large sensory neurons of dorsal root ganglia (DRG) and spinocerebellar tracts, as well as lesions in the dentate nucleus of the cerebellum (Koeppen 2011). Other primary defects are hypertrophic cardiomyopathy and increased incidence in diabetes (Pandolfo 2009). Life expectancy of these patients is shortened to an average of 40–50 years, mostly because of cardiac complications (Tsou *et al.* 2011). Most patients (96%) are homozygous for a GAA triplet expansion within the first intron of the gene coding for frataxin (FXN). While normal alleles contain up to 40 GAA repeats, FRDA patients exhibit larger expansions, ranging from 70 to 1700 GAA repeats, most commonly 600–900 (Campuzano *et al.* 1996). The expansion leads to a partial

transcriptional silencing, either through the formation of a triple helix interfering with transcriptional elongation (Wells 2008) or epigenetic changes leading to heterochromatin formation thereby impairing gene transcription (Saveliev *et al.* 2003; Gottesfeld 2007). This results in a strongly reduced frataxin protein expression in all tissues. Indeed, FRDA patients show significantly lower amounts of frataxin protein compared to controls, with 21.1% in buccal cells and 32.2% in whole blood (Deutsch *et al.* 2010). There is an

Received December 19, 2012; revised manuscript received February 1, 2013; accepted February 4, 2013.

Address correspondence and reprint requests to Hélène Puccio, Translational Medicine and Neurogenetics, IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch France. E-mail: hpuccio@igbmc.fr or Mark Pook, Biosciences, SHSSC, Brunel University, Uxbridge, UK. E-mail: Mark.Pook@brunel.ac.uk

Abbreviations used: CNS, central nervous system; KO, knockout; PGC-1  , PPAR gamma co-activator 1  ; PNS, peripheral nervous system; PPAR  , peroxisome proliferator activated receptor gamma; WT, wild type; YAC, yeast artificial chromosome.

inverse correlation between the length of the smaller of the two alleles and the disease severity (Filla *et al.* 1996). A small but significant number of FRDA patients (3%) are compound heterozygous for the (GAA)_n expansion on one allele and a loss of function mutation on the other allele, including missense, nonsense, splice site mutations, and rarely, deletions involving a small or large portion of the gene (Cossee *et al.* 1999; Gellera *et al.* 2007). No patient carrying a double point mutation with normal GAA repeat length has ever been reported, suggesting that a minimal level of normal frataxin expression is required. This is supported by work in multicellular eukaryotes, demonstrating that frataxin is essential for embryonic development, as complete frataxin deletion leads to early embryonic lethality in plants and mice (Cossee *et al.* 2000; Busi *et al.* 2006; Puccio 2009) and to L2/L3 larval stage arrest in *C. elegans* (Ventura *et al.* 2006). Frataxin is a ubiquitous mitochondrial protein, whose exact function is still controversial, but both *in vitro* and *in vivo* studies suggest that the main function of frataxin is its involvement in Fe/S cluster (ISC) biosynthesis (Martelli *et al.* 2007; Tsai and Barondeau 2010; Schmucker *et al.* 2011). ISC are critical redox active prosthetic cofactors that are present in proteins involved in numerous essential cellular processes (reviewed in Lill 2009).

After the identification of the disease-causing mutation and its gene product, much effort has been made to elucidate both the pathophysiology and the genetic basis of the disease. Studies performed on biological material from FRDA patients revealed: (i) the presence of iron deposits in cardiomyocytes (Lamarche *et al.* 1980), (ii) decreased ISC-containing enzyme activities in heart homogenates (aconitase, respiratory chain complex I, II, and III) (Rotig *et al.* 1997), and (iii) presence of markers of oxidative damage in urine and blood (Emond *et al.* 2000; Schulz *et al.* 2000; Bradley *et al.* 2004). These three biochemical features are tightly interconnected, and have been alternately proposed in the literature to be the primary event in the disease, leading to the hypothesis that frataxin deficiency results in a vicious circle of cellular defects (Bayot *et al.* 2011). In correlation with the clinical signs, the cellular defects associated with frataxin deficiency are reported only in specific cells of certain tissues (e.g., sensory neurons, cardiomyocytes). As the affected cells are known to have a high mitochondrial content and high metabolic rate, these post-mitotic cells could be more sensitive to frataxin deficiency. Furthermore, this tissue specificity partially correlates with the distribution of the *FXN* transcript in the organism: its expression is strong in DRG and heart, mild in cerebellum, pancreas, liver, and skeletal muscle, and low in other tissues, such as cortex (Koutnikova *et al.* 1997). However, differential *FXN* expression levels cannot be the only explanation. It is thought that part of the tissue-specificity as well as the progressive nature of the disease might be a direct consequence of the genetic basis of the disease. Indeed, analysis of mutation load in

patients and their families has revealed that GAA repeat expansions are highly dynamic, exhibiting both intergenerational and somatic instability (Monros *et al.* 1997; De Biase *et al.* 2007b). The latter is both tissue specific and age related, and has therefore been hypothesized to be important for the disease progression (Clark *et al.* 2007). While the molecular mechanisms underlying GAA repeat instability remain unknown, major progress has been made in understanding the mechanism of GAA repeat expansion-induced *FXN* gene silencing using artificial constructs in transfected human cells, together with FRDA patient fibroblasts, lymphoblasts, autopsy tissues, and FRDA models (reviewed in Kumari and Usdin 2012). This review will focus on the different mouse models and the more recently developed mammalian cellular models that have contributed to a better understanding of the disease and to the development of therapeutic approaches.

What is a good model for FRDA?

Relevant models are essential to understand disease processes and to develop therapeutic approaches. So, what would be a good model for FRDA? The genetic aspect of FRDA indicates the need to focus on the *FXN* locus to derive the most appropriate models. The fact that frataxin is highly conserved from gram-negative bacteria to humans enables researchers to develop models using different organisms. For example, mouse frataxin has 73% identity with human frataxin (Koutnikova *et al.* 1997), strengthening the relevance of mouse model approaches. However, no other organisms apart from humans and primates are known to contain a GAA repeat within the specific genomic context of the frataxin gene intron 1 sequence. Indeed, the GAA repeat is localized within a primate-specific Alu sequence (Montemini *et al.* 1997a). This issue has to be taken into account when considering non-human models.

No model can be expected to reproduce all the symptoms that occur in patients and the cellular mechanisms involved. However, a good FRDA model should have a strongly reduced level of frataxin, ideally as a result of transcriptional silencing mediated by a GAA expansion within the genomic context of the frataxin locus. While cell models rarely recapitulate tissue-specific disease features, an ideal mouse model should recapitulate the tissue specificity observed in patients. A good mouse model should also show a progression of clinical signs, namely the spinocerebellar sensory ataxia and the cardiomyopathy observed in FRDA patients. Finally, the clinical signs should be associated with biochemical and cellular features of the disease. In addition, as the genetic basis might play an essential role in FRDA, it is of particular interest to develop models to analyze the mechanisms of GAA repeat instability. To date, no single model meets all of these criteria. However, the combination of data from all available cell and animal models allows us to

draw definitive conclusions on FRDA pathophysiology and to assess the relevance of novel therapeutic strategies.

Investigating the pathophysiology of FRDA using models

Full frataxin deletion models

To generate relevant models to study the pathophysiology of FRDA, extensive efforts have been made. It was first shown that complete deletion of frataxin in mice is not viable, resulting in lethality at embryonic day 6.5 (Cossee *et al.* 2000). Similarly, mouse fibroblasts cannot be sustained in culture after frataxin deletion because of the loss of cell division that leads to cell death within one week (Calmels *et al.* 2009a). This lethal phenotype either in cells or in the whole organism can be rescued by exogenous expression of human or murine frataxin (Pook *et al.* 2001; Calmels *et al.* 2009a). These results are in agreement with the absence of FRDA patients identified with a complete loss of frataxin. Although at the time of generation of these models, the function of frataxin was unknown, the data suggested that frataxin is not only important for early development but also for cell survival and renewal. The subsequent discovery of the essential role of frataxin in ISC biosynthesis, and the recent identification of cytosolic and nuclear ISC proteins with indispensable function for cell viability, including ABCE1 involved in translation, or DNA helicases, polymerases, and primases involved in replication and repair (reviewed in Rouault 2012) provide a rational explanation for the lethality associated with complete frataxin deficiency during embryogenesis and cell division.

To study the consequences of frataxin depletion after early embryonic stages and in a tissue-specific manner, several conditional knockout mouse models corresponding to tissues affected in FRDA patients (e.g., nervous system, heart and pancreas) were generated using the robust Cre-*loxP* system (Fig. 1). Together, these models reproduce most of the characteristic features of the disease, including hypertrophic cardiomyopathy, progressive spinocerebellar, and sensory ataxia, and some aspects of the diabetes. The cardiac-specific model, expressing Cre recombinase under the muscle creatine kinase (MCK) promoter, reproduces the chronological development of the cardiomyopathy observed in patients (Puccio *et al.* 2001). The strength of this model is its high reproducibility at the clinical, histopathological and molecular levels. Echocardiography results allow an accurate evaluation of the phenotype progression (Table 1). MCK mice develop a cardiac hypertrophy starting five weeks after birth, associated with geometric remodeling and cardiac failure, reminiscent to what happens in FRDA patients (Seznec *et al.* 2004). No muscle impairment is observed at the time of death of the MCK mutants. In addition, the MCK mutants reproduce the biochemical features observed in FRDA patients, with defects in ISC-enzyme activities (e.g.,

aconitase, succinate dehydrogenase) occurring early, prior to cardiac dysfunction and iron accumulation (Puccio *et al.* 2001). Mitochondrial iron accumulation is observed from 7 weeks of life, and is tightly associated with dysregulation of proteins involved in iron uptake (transferrin receptor 1), iron storage (ferritins H and L), and iron release (ferroportin 1), probably as a consequence of activation of IRP1, one of the main cellular regulators of iron metabolism, directly because of ISC deficit (Seznec *et al.* 2005; Huang *et al.* 2009). Interestingly, no detectable oxidative damage was observed in the MCK mutants, suggesting that oxidative stress might not be involved in the early onset of the disease. Contrary to the findings in FRDA patients, the respiratory chain defects in MCK mutant mice might be too severe because of complete frataxin loss, thereby abolishing the production of reactive oxygen species. The chronological sequence revealed in the MCK mouse model, highlighting the primary role of ISC deficit in the disease, enabled clarification of the vicious circle hypothesis.

The neuron specific enolase (NSE) promoter (Frugier *et al.* 2000) was used to generate a mouse model with the Cre recombinase expressed only in neurons. Surprisingly, in the NSE-Cre transgenic line, the promoter is leaky and deletion of *Fxn* occurs not only in neurons but also in heart and liver, leading to combined FRDA-like neurological and cardiac phenotypes (Puccio *et al.* 2001). The NSE mutants exhibit a specific progressive ataxia with loss of proprioception. They also develop a cardiomyopathy similar to MCK mutants, with a dilated defective left ventricle (Payne *et al.* 2011). At the histological level, iron accumulation and fibrosis are observed. Although recapitulating both the neurological and cardiac hallmarks observed in FRDA patients, the NSE mutant mouse model shows two main limitations. First, the phenotype of the model is very severe, with mice dying around 25 days after birth, thereby not reproducing the progressive nature of the disease. In particular, this premature death prevents the study of cells specifically affected in FRDA. Second, the mutants show features non-representative of the human disease, such as spongiform lesions in the cortex. Recently, Wagner and colleagues reported that a defective mitochondrial respiratory chain is followed by hyperacetylation of cardiac proteins for both MCK and NSE mice because of the inhibition of SIRT3 (Wagner *et al.* 2012). As SIRT3 is involved in regulation of oxidative metabolism, its inhibition might play a role in the cardiomyopathy observed in FRDA patients, as well as in the increased sensitivity to oxidative stress reported in FRDA cells.

The severity of the NSE mouse model, in particular in the cortex, is probably linked to early frataxin depletion, which occurs prior to neuronal maturity, as the nervous system in mouse continues to develop after birth. To circumvent this issue, together with the lack of specificity of the NSE-Cre transgene, an inducible conditional mouse model was

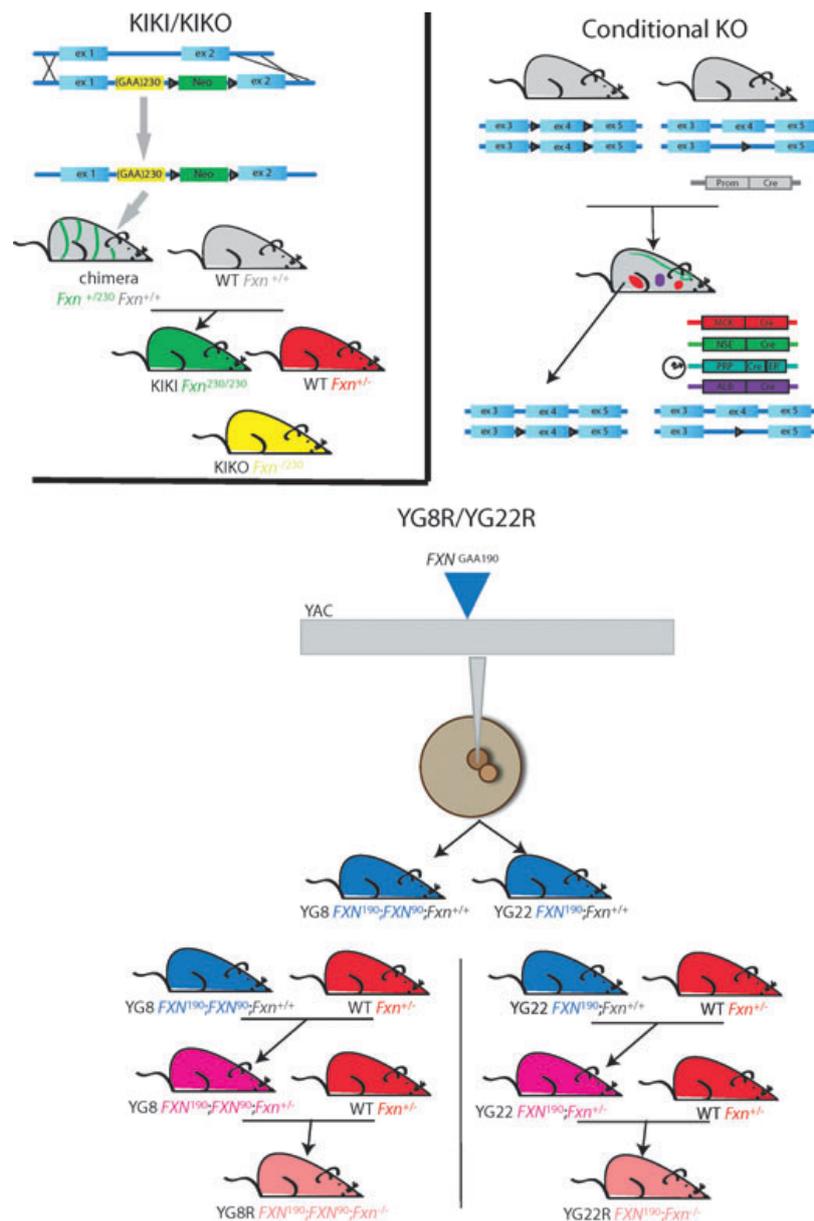


Fig. 1 Schematic diagram of FRDA mouse model genetic modifications and breeding strategies. Top left: KIKI and KIKO mice were generated by the insertion of a (GAA)₂₃₀ sequence into the endogenous mouse *Fxn* intron 1 sequence, followed by interbreeding (to obtain KIKI mice) or breeding with *Fxn*^{-/-} mice (to obtain KIKO mice). Top right: Four different tissue-specific conditional *Fxn* knockout mice have been generated by MCK, NSE, prion protein, or albumin promoter

promoter-driven Cre-*loxP* excision of *Fxn* exon 4 (tamoxifen-inducible in the case of prion protein-Cre/ER^T). Bottom: YG8R and YG22R mice have been generated by the initial generation of GAA repeat expansion-containing human *FXN* yeast artificial chromosome transgenic mice (YG8 and YG22), followed by breeding with *Fxn*^{-/-} mice to generate YG8R and YG22R mice that contain a single human *FXN* transgene in a *Fxn*^{-/-} background.

generated with the Cre recombinase under the control of the mouse prion protein (PRP) promoter. The inducible approach allows spatial and temporal control of *Fxn* deletion, mediated by Cre recombinase translocation to the nucleus upon tamoxifen injection. In the PRP model, *Fxn* deletion is

restricted to DRGs, spinal cord and cerebellum (Simon *et al.* 2004). This model reproduces most of the neurodegenerative aspects of FRDA. After tamoxifen injection at four weeks of age, mice develop a progressive mixed cerebellar and sensory ataxia associated with loss of proprioception and

Table 1 Investigations of FRDA mouse model functional phenotypes

Functional test	MCK	NSE	PRP	KIKO/KIKI	YG8R/YG22R
Cerebellar and sensory ataxia					
Rotarod	–	–	Y	N	Y
Footprint	–	–	Y	–	–
Sensory defect					
Electromyogram	–	Y	Y	–	–
Cardiac function					
Echocardiography	Y	Y	–	–	–
Motor defect					
Locomotor activity	–	–	–	–	Y
Grip strength test	–	–	N	–	Y

Y = test performed and impairment detected, N = test performed but no impairment detected.

absence of motor defects (Table 1). Histologically, the first event, occurring 10 weeks post-injection, is a degeneration of large sensory neurons in DRGs, with the presence of vacuoles, signs of autophagy and lipofuscin accumulation. Chromatolysis in sensory neurons of the posterior horn of the spinal cord is then observed, followed later by degeneration of motor neurons in the anterior horn (40 weeks post-injection). These features are reminiscent of the changes observed in FRDA patients (Koeppen 2011). The observations made in the PRP mutants suggest that increased autophagy might be a key process in the neurodegeneration. In parallel to the loss of the sensory neurons, degeneration of the granule cells of the cerebellum is observed. While non-specific to FRDA, this feature contributes also to the cerebellar ataxia observed in the PRP mutants and reveals the sensitivity of these particular cells to frataxin loss.

Diabetes mellitus and glucose intolerance are identified in 10% and 20% of FRDA patients, respectively, but to date few studies have been performed to address the mechanism underlying this phenotype. Conditional models lacking frataxin primarily in the pancreatic β cells were generated using an Ins2-Cre transgene (Ristow *et al.* 2003). These mice develop impaired glucose tolerance followed by slowly progressive diabetes probably as a consequence of decreased β cell mass, because of increased apoptosis and a reduced proliferation rate. However, more investigations need to be done in FRDA patients and mouse models to unravel the specific pathways which link frataxin deficiency and impairment of glucose homeostasis.

Other mouse models with selective *Fxn* deletions have also been generated to answer specific fundamental questions. For example, the liver is not known to be affected in FRDA patients. However, because of its key role in iron homeostasis, there is great interest in studying the effect of frataxin deletion in this organ. A liver-specific conditional *Fxn* knockout mouse model was generated using the Cre recombinase under the control of the albumin promoter

(ALB). Frataxin deletion resulted in the formation of lobules in the liver, which were initially identified as tumors, thereby defining frataxin as a tumor suppressor (Thierbach *et al.* 2005). However, recent data from clinical investigations have shown that the risk of cancer is not higher in FRDA patients compared to the general population (Martelli *et al.* 2012). Moreover, the generation of new liver-specific (ALB) Cre conditional *Fxn* knockout mice has shown that the lobules that develop in the liver of ALB Cre mice appear to be the consequence of liver regeneration rather than tumor progression (Martelli *et al.* 2012). Interestingly, this ALB Cre mouse model reproduces the same chronological sequence of cellular defects following frataxin deletion as those observed in the MCK mouse model. These studies highlight the importance of carefully interpreting the phenotypes of mouse models and point to the fact that studying a combination of different models can be more informative than studying a single model.

All together, these different *Fxn* deletion mouse models reproduce most of the symptoms associated with FRDA, and have allowed better understanding of the pathophysiology of the disease. Moreover, they are relevant for therapeutic tests, as they have been used for testing antioxidants, iron chelators, and protein therapy. However, certain limitations of these models have to be taken into account. Indeed, because of the total deletion of frataxin in the studied organs, the observed phenotypes are probably more severe than those of the disease itself, as observed in the NSE model. Likewise, no detectable oxidative stress is observed, preventing the unraveling of the contribution of oxidative stress in the disease process. Moreover, frataxin deletion in the *Fxn* knockout mouse models occurs at a specific time in development, whereas FRDA is characterized by partial frataxin deficiency in all cells throughout life. Finally, data from the different conditional knockout mouse models indicates that most cell types are sensitive to complete frataxin loss. As a consequence, these models cannot be used to study the tissue specific aspects of the disease. Therefore, in parallel to the conditional *Fxn* knockout models, mice with residual frataxin levels are essential to further investigate the pathophysiological mechanisms involved in FRDA.

Models with residual frataxin expression

KIKI, KIKO, YG8R, and YG22R GAA repeat expansion-based mouse models

The generation of GAA repeat expansion-based mouse models is appealing. Indeed, the presence of a pathological GAA expansion in mouse is expected to lead to a residual amount of frataxin in all tissues, as observed in patients. However, because of the specific genomic context and the length of the repeats, it is not easy to generate mice with large GAA repeat expansions. For this purpose, two strategies have thus far been used.

First, a model has been generated using a knock-in approach by introducing a (GAA)₂₃₀ repeat expansion into the first intron of the mouse *Fxn* locus, with the homozygous knock-in mice designated as KIKI mice (Miranda *et al.* 2002). The KIKI mice were then crossed with frataxin knockout mice to obtain compound heterozygous mice, designated as KIKO mice (Fig. 1). The KIKI and KIKO mice have 66–83% and 25–36% residual frataxin protein expression compared to wild type, respectively. The KIKO mice show no iron deposits and only mild signs of fibrosis (collagen) in the heart and no coordination defects assessed by rotarod (Table 1). This absence of cardiac and neurological phenotypes argues for a pathologic threshold of frataxin expression below 25% and probably for a role of the genomic context in the disease. Although no signs of neurodegeneration were observed in the PNS and CNS of KIKO mice, microarray analyses showed more changes in gene expression profiles in spinal cord compared with brainstem and cerebellum. This could parallel the primary degeneration of DRG and spinal cord in patients. Overall, most of the deregulated genes belonged to the mitochondrial component (Coppola *et al.* 2006). In heart and skeletal muscle microarray analysis (Coppola *et al.* 2009), expression changes suggested mostly structural changes compatible with shift in fiber-type for skeletal muscle and signs of cardiomyopathy for heart. Surprisingly, no structural changes are observed histologically, suggesting that the deregulation of these genes is too mild to affect cells. In addition, the PPAR γ pathway was affected (i.e., PGC-1 α was down-regulated) in liver and muscle samples. However, controversial data regarding dysregulated PGC-1 α expression in patient fibroblasts (Marmolino *et al.* 2010; Garcia-Gimenez *et al.* 2011) have recently been reported, showing that further studies are needed to understand the link between frataxin deficiency and metabolic control.

A second GAA repeat expansion-based mouse model has been obtained by initially crossing transgenic mice that contain the entire *FXN* gene within a human yeast artificial chromosome (YAC) clone onto a mouse *Fxn* null background, showing that transgenic human frataxin can substitute for endogenous mouse frataxin (Pook *et al.* 2001). Then, similar YAC *FXN* transgenic mice were generated, but this time with a GAA repeat expansion appropriately inserted into the *FXN* locus, producing the YG8 line with two GAA sequences of 90 and 190 repeats and the YG22 line with one sequence of 190 repeats (Al-Mahdawi *et al.* 2004). Both *FXN* transgenic mice were then crossed with heterozygous frataxin knockout mice to obtain the YG8R and YG22R (*R* = 'rescue') FRDA mouse models (Fig. 1) that contain GAA repeat expansions and express only human frataxin (Al-Mahdawi *et al.* 2006). A decrease in transgenic human frataxin mRNA was observed in all tissues, with the greatest decrease in cerebellum of YG22R and YG8R (62% and 57%, respectively) and skeletal muscle

of YG8R (57%), although there are some inherent difficulties in accurately assessing the levels of human frataxin expression in a mouse. Both models showed a mild progressive phenotype, with slight coordination impairment assessed by rotarod, together with locomotor defects shown by open field measurement (Table 1). Similar to PRP mutants, giant vacuoles were observed in large sensory neurons of DRGs as well as chromatolysis and lipofuscin accumulation. Despite late sparse iron deposits and lipofuscin accumulation, no overt cardiac phenotype was observed in YG22R. However, a decrease in heart aconitase activity was measured in 6-month-old YG8R mice compared with wild type mice. Contrary to the conditional knockout mouse models, slight signs of oxidative stress were reported in YG8R and YG22R tissues. The differences observed between YG8R and YG22R lines might be because of different integration sites of the YAC.

In conclusion, the different results obtained with the various mouse models highlight two main points when considering the pathophysiology of FRDA disease. On the one hand, only the conditional knockout models recapitulate important features of the human disease but they lack the genetic context. On the other hand, the GAA repeat expansion-based knock-in and transgenic models carry a GAA repeat expansion, which is the primary pathological mutation for humans, but they only show a very mild phenotype. It is not surprising that the threshold of GAA repeats to develop FRDA symptoms can differ from human to mouse. As a consequence, efforts to generate mouse models with longer GAA repeats, either through novel constructs or through various genetic crosses and selecting for GAA expansion, are ongoing. Moreover, new techniques such as inducible shRNA expression systems allowing the temporal control of gene silencing at a specific locus *in vivo* should help generate new models (reviewed in Dow and Lowe 2012). As this technique does not produce complete gene loss, it could be used to generate mice with frataxin deficiency in all tissues. Although not perfect, this type of model would be a useful compromise between the conditional knockout and GAA repeat-based mouse models.

FRDA patient-derived cells: fibroblasts, lymphoblasts, iPSCs, and iPSC-derived cells

Cells derived from FRDA patients constitute the most relevant frataxin-deficient cell model as they carry the complete frataxin locus together with GAA repeat expansions and regulatory sequences. Some cell types, such as primary fibroblasts and lymphocytes, are easily accessible, but these cells do not spontaneously exhibit the complex biochemical phenotype associated with FRDA, despite having reduced levels of frataxin (Rotig *et al.* 1997; Sturm *et al.* 2005). However, viability of these cells is affected under stress conditions (e.g., treatment with hydrogen peroxide or buthionine sulfoximine), suggesting defects in

cellular defense against oxidative stress (Wong *et al.* 1999; Jauslin *et al.* 2002, 2003). These cells may be useful for biomarker research and to study therapeutic candidates able to prevent cellular damage related to oxidative stress or to modulate frataxin levels (Wong *et al.* 1999; Jauslin *et al.* 2003, 2007). The most interesting cells to study remain neurons and cardiomyocytes, which are particularly affected in FRDA, but not accessible from patients. The poor availability of such cell types can be circumvented using the technique developed by Yamanaka and Thomson where primary fibroblasts are reprogrammed into embryonic-like cells, known as induced pluripotent stem cells (iPSCs), that are theoretically able to be differentiated into all cell types of the human body (Takahashi and Yamanaka 2006; Yu *et al.* 2007). This approach is of particular interest for FRDA, as the high instability of the GAA repeat expansion hampers the derivation of both mouse and cell models with long (GAA)_n repeats (Sharma *et al.* 2002; Al-Mahdawi *et al.* 2004). With this in mind, FRDA patient skin fibroblasts have been reprogrammed into iPSCs using two sets of transcription factors, Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc or Oct4/Sox2/Lin28/Nanog (Ku *et al.* 2010; Liu *et al.* 2011; Hick *et al.* 2012). Characterization of these iPSCs has demonstrated retention of the pathological GAA repeat expansions and decreased levels of *FXN* mRNA and frataxin protein compared to controls. Similar to other FRDA patient-derived cell models, the iPSCs do not exhibit any deficit in ISC-enzyme activities nor apoprotein levels, suggesting that despite a reduced level of frataxin, the amount of ISC produced by the iPSCs is sufficient to fulfill their needs (Hick *et al.* 2012). Much effort has been made in the past few years to differentiate FRDA iPSCs into neurons and cardiomyocytes (Liu *et al.* 2011; Hick *et al.* 2012). Functional data on mixed populations of neurons has indicated that FRDA neurons present a maturation delay and lower mitochondrial membrane potential (Hick *et al.* 2012). Unlike neurons, cardiomyocytes exhibit progressive mitochondrial degeneration, with frequent dark mitochondria and proliferation of normal mitochondria revealed by electron microscopy analyses (Hick *et al.* 2012). Although neurons and cardiomyocytes derived from FRDA iPSCs present different levels of disruption of mitochondrial homeostasis, these data parallel the mitochondrial damage found in FRDA patients and mouse models (Puccio *et al.* 2001). To further investigate the pathophysiology of neural and cardiac derivatives of FRDA iPSCs, two major drawbacks must first be overcome: the poor efficacy and the lack of specificity of the differentiation protocols. Indeed, the yield of differentiation into cardiomyocytes is less than 1%, probably because of the use of ascorbic acid, a weak cardiogenic factor (Takahashi *et al.* 2003; Wang *et al.* 2010). The efficacy of differentiation toward the cardiac lineage may be improved by using recent promising protocols based on the sequential treatment of iPSCs with

specific growth factors that are dedicated to mimic heart development (Yang *et al.* 2008; Kattman *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011b; Carpenter *et al.* 2012; Lian *et al.* 2012). On the other hand, the slight mitochondrial phenotype of FRDA iPSC-derived neurons may result from the heterogeneity of the cell population, with the majority of central neurons known to be less sensitive to reduced levels of frataxin than sensory neurons. Liu and colleagues recently reported the derivation of peripheral neurons from FRDA iPSCs, but this study did not provide insight into a possible FRDA phenotype (Liu *et al.* 2011). Pathways driving the developmental differentiation of embryonic stem cells into sensory neurons raise more and more interest, and may soon allow the differentiation of FRDA iPSCs into sensory neurons (Shi *et al.* 2007; Lee *et al.* 2010; Cimadamore *et al.* 2011; Denham *et al.* 2012). Apart from investigation of the FRDA-like pathological phenotype, the other interesting area of study using iPSCs and their derivatives is the question of somatic instability of the GAA repeat expansions. This aspect will be discussed in the next section of this review.

Antisense, ribozyme, siRNA, and shRNA-based cell lines

Since the most relevant cell types are not easily accessible from FRDA patients, other cell lines, such as HeLa, oligodendrogloma, T-Rex-293, and carcinoma cells, have been used to induce frataxin reduction by taking advantage of RNAi technology or ribozyme targeting. Although a defect in aconitase activity was observed in most of the models, other results are not consistent from one cell line to the other (Santos *et al.* 2001; Stehling *et al.* 2004; Lu and Cortopassi 2007; Napoli *et al.* 2007; Zanella *et al.* 2008; Calmels *et al.* 2009b). The use of several shRNAs sequences with diverse stability leading to different frataxin deficits might account for the inconsistent results from one study to another. A main limitation in these approaches is the fact that the cell types that are used are very different from those affected in FRDA patients, and most are maintained in culture as dividing cells, whereas the defective cells (cardiomyocytes, neurons) are post-mitotic. Furthermore, some of the models generated lose the original phenotype over sequential passages (Calmels *et al.* 2009b), suggesting a cellular adaptation to frataxin deficit. Although of interest as a first attempt, these models are not particularly well suited for FRDA investigations.

Humanized cell models with point mutations

Since FRDA patient fibroblasts and lymphocytes are not primary affected cell types and since RNAi-based models show partial and inconstant phenotypes, humanized murine cell models based on micromutations identified in patients were developed in an attempt to generate robust models (Calmels *et al.* 2009a). Immortalized mouse fibroblasts were stably transfected with a transgene expressing either normal

human frataxin or human frataxin carrying pathogenic missense mutations, followed by deletion of the endogenous frataxin (Calmels *et al.* 2009a). Among the point mutations found in compound heterozygous patients, two were chosen because of their frequency and their severity. G130V is the most common missense mutation and it causes incomplete loss of function with decreased protein maturation and stability (Correia *et al.* 2008), which leads to an atypical clinical presentation with early onset but slow progression of disease (Delatycki *et al.* 1999). In contrast, I154F carriers display a classical phenotype, indistinguishable from that of homozygous patients for the GAA repeat expansion (Campuzano *et al.* 1996). The I154F mutation is responsible for maturation impairment, aggregation susceptibility, and disturbed function (Correia *et al.* 2008). All of the transgenes, whether normal or pathogenic, were able to rescue the lethality induced by endogenous frataxin deletion. Although not related to a decreased amount of frataxin, the humanized model was the first cell model to reproduce a FRDA-like biochemical phenotype with the degree of severity dependent on the mutation, similar to patients. In addition to altered morphology, mutant cells display ISC-enzyme activity defects, degenerating mitochondria with iron deposits and accumulation, and increased sensitivity to oxidative stress. Thus, this model may be used for drug screening, considering any of its biochemical phenotypes as a potential readout. However, as with the knockdown approach, this model tends to drift a little over time in culture and its phenotype needs to be regularly checked, again suggesting a possible cellular adaptation to frataxin deficiency (Aurore Hick and Hélène Puccio, unpublished data).

In conclusion, it is striking that the neurodegenerative component of FRDA disease is under-investigated. Although the PRP model has given an indication of the chronology of events occurring in the CNS and PNS, little remains known at the cellular level. On the one hand, neuronal tissues are not accessible during patient life and the quality of post-mortem tissues is not good enough to give reliable answers. On the other hand, it is still difficult to study the specific degeneration of large sensory neurons in neurological mouse models (PRP, NSE, YG8R, YG22R) because of the mixed DRG cell populations. As described, efforts are currently focusing on the development of cellular models for sensory neurons. Moreover, recent investigations have shown that the defect in the dentate nucleus of the cerebellum is a critical component of FRDA pathology (Koeppen *et al.* 2007), emphasizing the necessity to evaluate the consequences of frataxin deletion in this specific tissue. In addition, further investigations of neuronal models could help to identify new FRDA biomarkers that are still missing to date. This is crucial for both FRDA patient prognosis and evaluating therapeutic strategies.

Deciphering the genetic and epigenetic basis of FRDA in models

FRDA mouse models and cell models have played, and continue to play, important roles in addressing two key questions in FRDA research, namely: (i) what is the exact mechanism by which the GAA repeat expansion leads to *FXN* gene silencing and reduced levels of frataxin expression? and (ii) what causes the dynamic nature of the GAA repeat expansions and how does this affect the inheritance and subsequent progression of FRDA disease? Understanding the mechanisms of GAA repeat expansion-mediated *FXN* gene silencing and GAA repeat instability are important because such mechanisms could be targeted by novel therapies. Thus, one would expect that decreasing the GAA repeat size and/or increasing the level of frataxin may halt, or at least slow down, FRDA disease progression. With this in mind, we will now consider the recent progress using mammalian model systems for both areas of investigation.

FXN gene silencing

Although the exact mechanisms by which the GAA repeat expansion leads to decreased frataxin expression are unknown, two non-exclusive hypotheses have been proposed and investigated. First, evidence from *in vitro* and cell transfection studies has suggested that GAA repeat expansions may adopt abnormal DNA or DNA/RNA hybrid (R-loop) structures that interfere with *FXN* gene transcription (Bidichandani *et al.* 1998; Ohshima *et al.* 1998; Sakamoto *et al.* 2001; Grabczyk *et al.* 2007). Second, there is evidence from position effect variegation effects in transgenic mice that GAA repeat expansions produce a heterochromatin-mediated gene silencing effect (Saveliev *et al.* 2003). Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, histone acetylation, and histone methylation, are known to affect gene expression by chromatin remodeling and these epigenetic changes are likely to underpin any GAA repeat-induced heterochromatin-mediated gene silencing effects. In support of this hypothesis, studies have revealed increased DNA methylation of CpG sites immediately upstream of the GAA repeat expansions in FRDA patient lymphoblastoid cell lines, FRDA patient tissues and YG8 and YG22 *FXN* transgenic mice (Greene *et al.* 2007; Al-Mahdawi *et al.* 2008). Furthermore, studies of FRDA patient peripheral blood leukocytes and buccal cells have revealed a direct correlation between GAA repeat size and DNA methylation, together with an inverse correlation between GAA repeat size and frataxin expression (Castaldo *et al.* 2008; Evans-Galea *et al.* 2012). A number of other studies using FRDA lymphoblastoid cell lines, primary lymphocytes or fibroblasts, FRDA patient tissues, YG8 and YG22 *FXN* transgenic mice, and KIKI mice have identified specific post-translational histone modifications, including deacetylation of histone H3 and H4 lysine residues and increased or decreased methylation of H3

lysine residues at either the 5'UTR or the GAA repeat expansion-flanking regions of the *FXN* gene (Herman *et al.* 2006; Al-Mahdawi *et al.* 2008; Rai *et al.* 2008; De Biase *et al.* 2009; Punga and Buhler 2010; Kim *et al.* 2011; Kumari *et al.* 2011). In addition to histone modifications, FRDA-related variations in other *cis* or *trans* factors acting at the *FXN* locus have been identified, including occupancy of CCCTC-binding factor (CTCF), heterochromatin protein 1 (HP1) and RNA polymerase II, and expression of *FXN*-antisense transcript-1 (*FAST-1*) (De Biase *et al.* 2009). Taken together, the evidence from these studies indicates a molecular mechanism that involves GAA repeat expansion-induced inhibition of *FXN* transcription initiation and elongation (De Biase *et al.* 2009; Punga and Buhler 2010; Kumari *et al.* 2011). Furthermore, in light of the histone deacetylation effects identified in FRDA models, novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors have been developed as a potential FRDA therapy and these compounds have already been used to induce increased *FXN* expression in FRDA lymphoblastoid cells and primary lymphocytes, KIKI mice and YG8R mice (Herman *et al.* 2006; Rai *et al.* 2008, 2010; Sandi *et al.* 2011).

GAA repeat instability

The GAA repeat sequence is unstable when transmitted from parent to child and non-pathogenic parental premutations can be transmitted to offspring as expanded pathogenic GAA repeats (Montermini *et al.* 1997a). Further expansion or contraction of the pathological GAA repeat can be detected equally during maternal transmission, but there is a preference toward contraction during paternal transmission (Monros *et al.* 1997; Pianese *et al.* 1997; De Michele *et al.* 1998; Delatycki *et al.* 1998). A direct correlation has been identified between the size of the smaller of the two GAA repeats and the severity of FRDA disease phenotype (Campuzano *et al.* 1996; Durr *et al.* 1996; Filla *et al.* 1996; Monros *et al.* 1997). However, not all of the phenotypic variation can be explained by GAA repeat size alone. Therefore, other factors such as somatic mosaicism of the GAA repeat expansion, genetic modifiers, and epigenetic effects need to be taken into consideration.

Somatic instability of the GAA repeat was first demonstrated in CNS autopsy tissues from FRDA patients, with the largest GAA repeat expansions being detected in the cerebellar cortex, indicating a degree of tissue specificity (Montermini *et al.* 1997b). Somatic instability of the GAA repeat has also been demonstrated to a lesser extent in lymphoblastoid cell lines and peripheral blood leukocytes from FRDA patients. Alleles with < 500 triplets showed a slight expansion bias and an instability threshold of 44 repeats, and conversely a significant contraction bias was detected in alleles with > 500 triplets, including complete contraction to normal size (Bidichandani *et al.* 1999; Sharma *et al.* 2002). The finding that somatic GAA repeat instability

is an age-related effect was first identified in the YG8 and YG22 transgenic mice, where progressive expansion of GAA repeats was detected predominantly in the DRG, cerebellum, and spinal cord tissues (Al-Mahdawi *et al.* 2004; Clark *et al.* 2007). Thus, it was hypothesized that progressive somatic instability in a subset of tissues may play an important role in disease progression (Clark *et al.* 2007). This was followed by the corresponding identification of CNS tissue-specific, age-related, somatic GAA repeat instability in FRDA patient tissues (De Biase *et al.* 2007a,b). The YG8 and YG22 mice were also reported to exhibit intergenerational instability of the GAA repeat, reminiscent of the initial findings in FRDA families (Al-Mahdawi *et al.* 2004). In contrast, the KIKI and KIKO mice showed no overt intergenerational or somatic GAA repeat instability (Miranda *et al.* 2002), suggesting the likely importance of genomic context with regards to mechanisms of GAA repeat instability.

Investigating GAA repeat instability mechanisms in FRDA mouse and cell models

The molecular mechanisms underlying GAA repeat expansion dynamics are currently unknown. However, GAA repeat expansion-containing FRDA mouse models are proving to be useful tools to study GAA repeat instability, in the same way that CTG/CAG repeat-containing mouse models have been essential to study CTG/CAG repeat dynamics for Huntington disease (HD) and Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) (reviewed in Lopez Castel *et al.* 2010). Thus, the mismatch repair (MMR) proteins, Msh2 and Msh3, have been shown to promote both intergenerational and somatic CTG/CAG repeat expansions in HD and DM1 mouse models, perhaps because of unusual Msh2-3 complex stabilization of insertion/deletion loops or else by an alternative role for Msh2 which does not involve canonical MMR functioning. Other MMR proteins, Msh6 and Pms2, have also been shown to have less prominent effects on CTG/CAG repeat instability. To investigate the potential effects of the MMR system on *FXN* GAA repeat expansion dynamics, YG8 and YG22 *FXN* transgenic mice were crossed with Msh2, Msh3, Msh6, or Pms2 knockout mice. Subsequent analysis of intergenerational GAA repeat transmissions showed that, in contrast to its effect on CAG/CTG repeats, the MMR system protects against intergenerational GAA repeat instability and does not promote GAA repeat expansions. In particular, Msh2 and Msh3 were shown to protect against intergenerational GAA repeat contractions, while Pms2 was shown to protect against intergenerational GAA repeat expansions (Table 2) (Ezzatizadeh *et al.* 2012). In contrast, somatic GAA repeat instability studies of YG8 and YG22 *FXN* transgenic mice show that, with the absence of Msh2 or Msh6 proteins, there is a dramatic reduction of the tissue-specific, progressive GAA repeat expansion that is usually observed in the DRG and cerebellum (Table 2). Therefore, just like the CAG/CTG repeat expansions, MMR proteins would appear to promote

Table 2 MMR effects on GAA repeat instability in FRDA mouse and cell models

Model system	Modification	Effects	References
YG8/YG22 transgenic mice	<i>Msh2</i> KO	Increased intergenerational GAA repeat contraction Decreased somatic GAA repeat expansion	Ezzatizadeh <i>et al.</i> 2012; Bourn <i>et al.</i> 2012;
YG8/YG22 transgenic mice	<i>Msh3</i> KO	Increased intergenerational GAA repeat contraction Decreased somatic GAA repeat expansion	Ezzatizadeh <i>et al.</i> 2012; MAP. Unpublished data
YG8/YG22 transgenic mice	<i>Msh6</i> KO	Increased intergenerational GAA repeat expansion and contraction Decreased somatic GAA repeat expansion	Ezzatizadeh <i>et al.</i> 2012; Bourn <i>et al.</i> 2012;
YG8/YG22 transgenic mice	<i>Pms2</i> KO	Increased intergenerational GAA repeat expansion Increased somatic GAA repeat expansion	Ezzatizadeh <i>et al.</i> 2012; Bourn <i>et al.</i> 2012;
FRDA fibroblasts (one cell line)	Reprogramming to generate iPSCs	Increased GAA repeat expansion during propagation and increased MSH2, MSH3 and MSH6 protein expression	Ku <i>et al.</i> 2010; Du <i>et al.</i> 2012;
FRDA fibroblasts (three cell lines)	Reprogramming to generate iPSCs	Increased GAA repeat expansion and contraction during propagation and increased MSH2 and MSH6 mRNA and protein expression	Hick <i>et al.</i> 2012;
FRDA iPSCs (one cell line)	Reprogramming to generate neurospheres	Stability of GAA repeats during propagation and decreased MSH2, MSH3 and MSH6 protein expression	Du <i>et al.</i> 2012;
FRDA iPSCs (three cell lines)	Reprogramming to generate neurospheres	Retained, but reduced, levels of GAA repeat instability during propagation and increased MSH2, MSH3 and MSH6 mRNA and protein expression	Hick <i>et al.</i> 2012;
FRDA iPSCs	shRNA knockdown of <i>MSH2</i>	Decreased GAA repeat expansion during propagation	Ku <i>et al.</i> 2010; Du <i>et al.</i> 2012;
FRDA iPSCs	shRNA knockdown of <i>MSH3</i>	Decreased GAA repeat expansion during propagation	Du <i>et al.</i> 2012;
FRDA fibroblasts	Ectopic expression of MSH2	Increased GAA repeat expansion	Halabi <i>et al.</i> 2012;
FRDA fibroblasts	Ectopic expression of MSH3	Increased GAA repeat expansion	Halabi <i>et al.</i> 2012

somatic GAA repeat expansions. However, absence of *Pms2* results in hyperexpansion of the GAA repeats within the DRG and cerebellum, and only in such CNS tissues, suggesting that *Pms2* may be acting in a non-canonical MMR pathway to suppress large GAA repeat expansions specifically in neuronal tissues (Bourn *et al.* 2012). Further evidence for involvement of the MMR system in GAA repeat instability comes from studies in which ectopic expression of MSH2 and MSH3 in FRDA fibroblast cells, which normally have stable GAA repeats, resulted in induction of GAA repeat expansion instability (Table 2) (Halabi *et al.* 2012).

This has led to the suggestion that MSH3 may serve as a potential inhibitory therapeutic target to slow GAA repeat expansion in vulnerable tissues and thereby to ultimately slow FRDA disease progression.

Investigating GAA repeat instability mechanisms in FRDA iPSCs

Instability of the GAA repeats upon propagation in cell culture is restricted to iPSCs and is neither seen in donor fibroblasts nor in iPSC-derived neural stem cells (neurospheres) (Ku *et al.* 2010; Du *et al.* 2012). However, this

apparent stabilization in neural precursors does not preclude potential instability in terminally differentiated neurons, especially sensory or cerebellar neurons, which are prone to high instability in patients. Du and colleagues have shown that the FRDA iPSC line 3816 (from GM03816 fibroblasts, NIGMS Coriell Cell Repository) exhibits regular expansion of both GAA repeat alleles in culture, with a higher rate of expansion of the longer allele compared to the shorter one (Du *et al.* 2012). These data are consistent with the behavior of the expanded allele of iPSCs derived from asymptomatic carrier parents of a FRDA patient, which is also prone to expansion while the normal allele remains stable (Ku *et al.* 2010). Interestingly, all of the FRDA iPSC lines that have been generated in the Puccio lab also exhibit GAA repeat instability, but they display not only expansions but also contractions upon propagation (Hick *et al.* 2012). However, no clear explanation has yet emerged to account for this discrepancy among iPSC lines from different groups. The GAA repeat instability in iPSCs appears to be specific for the *FXN* locus, because no instability was detected in two other GAA repeat-containing loci (e.g., 2q36 and 4q31) (Ku *et al.* 2010). However, these loci contain short GAA repeats, 16 and 30 repeats, respectively, similar to normal *FXN* alleles, which do not display any instability. Therefore, the specificity of the GAA repeat instability may be because of the size of the repeats, rather than to the locus itself. In addition, differences in repeat lengths observed between donor fibroblasts and corresponding iPSCs raised the question of instability upon reprogramming. It is difficult to assess whether this difference is because of reprogramming or to instability of the GAA within iPSC colonies during growth prior to the first passage.

As previously described, MMR enzymes have been implicated in trinucleotide instability within HD and DM1 mouse models (reviewed in Lopez Castel *et al.* 2010) and more recently within FRDA mouse and modified cell models (Bourn *et al.* 2012; Ezzatizadeh *et al.* 2012; Halabi *et al.* 2012). It has also recently been shown that MSH2, MSH3, and MSH6 are more highly expressed in FRDA iPSCs, which exhibit GAA instability during propagation, compared to donor fibroblasts, which show GAA repeat stability (Table 2) (Du *et al.* 2012; Hick *et al.* 2012). Furthermore, shRNA knockdown of either MSH2 or MSH6 in FRDA iPSCs leads to a reduced rate of GAA repeat expansions (Ku *et al.* 2010; Du *et al.* 2012), which is in agreement with the reduction in somatic GAA repeat expansions observed in *FXN* transgenic mice that are deleted for *Msh2* or *Msh6* (Bourn *et al.* 2012). The situation with FRDA iPSC-derived neurospheres is less clear. Study of the single FRDA iPSC line 3816 showed stability of GAA repeats in derivative neurospheres, together with MSH2, MSH3, and MSH6 protein expression levels that were lower than the levels in iPSCs, but higher than the levels in the original fibroblasts (Du *et al.* 2012). However, the subsequent study of three

independent FRDA cell lines showed consistent retention of GAA repeat instability in neurospheres, although at reduced levels, together with further increased levels of MSH2, MSH3 and MSH6 mRNA and protein expression (Table 2) (Hick *et al.* 2012).

Development of therapeutic approaches using models

Good FRDA models can also be used to evaluate new therapies. Different pharmacological approaches have been tested on mouse models for FRDA to treat the downstream events of frataxin deficit, such as oxidative stress (idebenone), mitochondrial iron accumulation (deferiprone), and more recently to increase the level of frataxin. Others chapters of this review issue are dedicated to the description of these approaches. HDAC inhibitors appeared as appealing candidates to prevent deacetylation of histones, and thus open the chromatin to increase frataxin gene transcription. A first screening of commercially available HDAC inhibitors was performed on FRDA patient and control lymphoblastoid cells, allowing the identification and the optimization of a promising compound able to increase both frataxin mRNA and protein levels in patient cells (Herman *et al.* 2006). After additional developments, several derivatives were tested on KIKI mice in short-term studies, confirming their ability to temporarily reverse frataxin gene silencing (Rai *et al.* 2008, 2010). This effect was supported by a five-month study on the mildly affected YG8R mice (Sandi *et al.* 2011). Whether those promising HDAC inhibitors have an effect on somatic instability has not yet been determined. Apart from the MMR machinery, transcription has also been proposed as a contributor to GAA expansion instability (Ditch *et al.* 2009), and therefore caution should be taken to ensure that HDACi do not induce increased GAA repeat expansions. More recently, protein replacement has been investigated for FRDA using the transactivator of transcription protein transduction to deliver human frataxin protein to mitochondria. The injection of NSE conditional knockout mice with transactivator of transcription-FXN resulted in increased lifespan and improvement of cardiac functions as well as increased of aconitase activity (Vyas *et al.* 2012). Another therapeutic approach, which is currently under-explored, is gene therapy, which aims to partially or totally restore the levels of frataxin in the affected cells. Indeed, in contrast to the current therapeutic approaches, only a single therapeutic intervention would be needed to correct the cardiac and neurological phenotype. Stereotaxic injection of HSV1 amplicon vector containing the frataxin gene allowed a functional recovery in a mouse model with frataxin deletion in neurons (Lim *et al.* 2007). This constitutes the proof-of-principle that frataxin gene delivery could have a beneficial therapeutic effect. However, stereotaxic injections are not adapted to target the sensory neurons of DRG. Interestingly,

adeno-associated virus (AAV)-based gene therapy approaches have shown promise in multiple preclinical therapeutic studies, as well as in a growing number of clinical trials. In particular, rAAV9 and rAAVrh10 vectors have a good tropism for cardiomyocytes, the PNS and the CNS, which are the main systems affected in FRDA (Zhang *et al.* 2011a). In conclusion, it is expected that all such therapeutic approaches will greatly benefit from the continued development of effective FRDA cell and mouse models.

Acknowledgements

This study was supported by the Friedreich's Ataxia Research Alliance (USA) (to HP), the Association Française pour l'Ataxie de Friedreich (to HP), and the European Community under the European Research Council [206634/ISCATAXIA] (to HP) and the 7th Framework Program [242193/EFACTS] (to HP and to MAP).

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

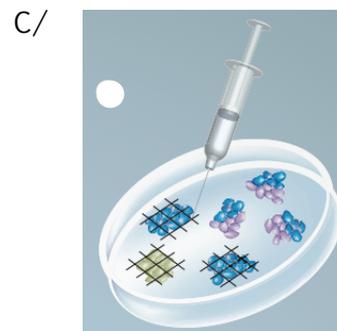
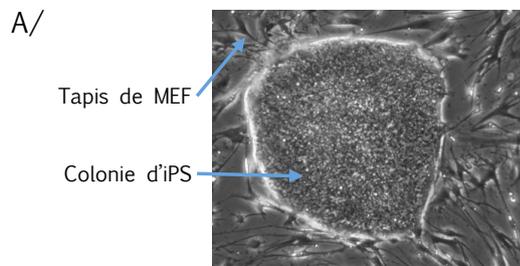
References

- Al-Mahdawi S., Mouro Pinto R., Ruddle P., Carroll C., Webster Z. and Pook M. (2004) GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics* **84**, 301–310.
- Al-Mahdawi S., Mouro Pinto R., Varshney D. *et al.* (2006) GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* **88**, 580–590.
- Al-Mahdawi S., Mouro Pinto R., Ismail O., Varshney D., Lymperi S., Sandi C., Trabzuni D. and Pook M. (2008) The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 735–746.
- Bayot A., Santos R., Camadro J. M. and Rustin P. (2011) Friedreich's ataxia: the vicious circle hypothesis revisited. *BMC Med.* **9**, 112.
- Bidichandani S. I., Ashizawa T. and Patel P. I. (1998) The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 111–121.
- Bidichandani S. I., Purandare S. M., Taylor E. E., Gumin G., Machkhas H., Harati Y., Gibbs R. A., Ashizawa T. and Patel P. I. (1999) Somatic sequence variation at the Friedreich ataxia locus includes complete contraction of the expanded GAA triplet repeat, significant length variation in serially passaged lymphoblasts and enhanced mutagenesis in the flanking sequence. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 2425–2436.
- Bourn R. L., De Biase I., Pinto R. M., Sandi C., Al-Mahdawi S., Pook M. A. and Bidichandani S. I. (2012) Pms2 Suppresses Large Expansions of the (GAA.TTC)(n) Sequence in Neuronal Tissues. *PLoS ONE* **7**, e47085.
- Bradley J. L., Homayoun S., Hart P. E., Schapira A. H. and Cooper J. M. (2004) Role of oxidative damage in Friedreich's ataxia. *Neurochem. Res.* **29**, 561–567.
- Busi M. V., Maliandi M. V., Valdez H., Clemente M., Zabaleta E. J., Araya A. and Gomez-Casati D. F. (2006) Deficiency of Arabidopsis thaliana frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. *Plant J.* **48**, 873–882.
- Calmels N., Schmucker S., Wattenhofer-Donze M., Martelli A., Vaucamps N., Reutenauer L., Messaddeq N., Bouton C., Koenig M. and Puccio H. (2009a) The first cellular models based on frataxin missense mutations that reproduce spontaneously the defects associated with Friedreich ataxia. *PLoS ONE* **4**, e6379.
- Calmels N., Seznec H., Villa P., Reutenauer L., Hibert M., Haiech J., Rustin P., Koenig M. and Puccio H. (2009b) Limitations in a frataxin knockdown cell model for Friedreich ataxia in a high-throughput drug screen. *BMC Neurol.* **9**, 46.
- Campuzano V., Montermini L., Molto M. D. *et al.* (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423–1427.
- Carpenter L., Carr C., Yang C. T., Stuckey D. J., Clarke K. and Watt S. M. (2012) Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells generates cardiac cells that provide protection following myocardial infarction in the rat. *Stem Cells Dev.* **21**, 977–986.
- Castaldo I., Pinelli M., Monticelli A. *et al.* (2008) DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J. Med. Genet.* **45**, 808–812.
- Cimadamore F., Fishwick K., Giusto E., Gnedeva K., Cattarossi G., Miller A., Pluchino S., Brill L. M., Bronner-Fraser M. and Terskikh A. V. (2011) Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis. *Cell Stem Cell* **8**, 538–551.
- Clark R. M., De Biase I., Malykhina A. P., Al-Mahdawi S., Pook M. and Bidichandani S. I. (2007) The GAA triplet-repeat is unstable in the context of the human FXN locus and displays age-dependent expansions in cerebellum and DRG in a transgenic mouse model. *Hum. Genet.* **120**, 633–640.
- Coppola G., Choi S. H., Santos M. M., Miranda C. J., Tentler D., Wexler E. M., Pandolfo M. and Geschwind D. H. (2006) Gene expression profiling in frataxin deficient mice: microarray evidence for significant expression changes without detectable neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **22**, 302–311.
- Coppola G., Marmolino D., Lu D., Wang Q., Cnop M., Rai M., Acquaviva F., Coccozza S., Pandolfo M. and Geschwind D. H. (2009) Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPARgamma pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2452–2461.
- Correia A. R., Pastore C., Adinolfi S., Pastore A. and Gomes C. M. (2008) Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *FEBS J.* **275**, 3680–3690.
- Cossee M., Schmitt M., Campuzano V., Reutenauer L., Moutou C., Mandel J. L. and Koenig M. (1997) Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 7452–7457.
- Cossee M., Durr A., Schmitt M. *et al.* (1999) Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.* **45**, 200–206.
- Cossee M., Puccio H., Gansmuller A., Koutnikova H., Dierich A., LeMeur M., Fischbeck K., Dolle P. and Koenig M. (2000) Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1219–1226.
- De Biase I., Rasmussen A., Endres D., Al-Mahdawi S., Monticelli A., Coccozza S., Pook M. and Bidichandani S. I. (2007a) Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich's ataxia patients. *Ann. Neurol.* **61**, 55–60.
- De Biase I., Rasmussen A., Monticelli A., Al-Mahdawi S., Pook M., Coccozza S. and Bidichandani S. I. (2007b) Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics* **90**, 1–5.

- De Biase I., Chutake Y. K., Rindler P. M. and Bidichandani S. I. (2009) Epigenetic silencing in Friedreich ataxia is associated with depletion of CTCF (CCCTC-binding factor) and antisense transcription. *PLoS ONE* **4**, e7914.
- De Michele G., Cavalcanti F., Crisculo C., Pianese L., Monticelli A., Filla A. and Coccozza S. (1998) Parental gender, age at birth and expansion length influence GAA repeat intergenerational instability in the X25 gene: pedigree studies and analysis of sperm from patients with Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1901–1906.
- Delatycki M. B., Paris D., Gardner R. J., Forshaw K., Nicholson G. A., Nassif N., Williamson R. and Forrest S. M. (1998) Sperm DNA analysis in a Friedreich ataxia premutation carrier suggests both meiotic and mitotic expansion in the FRDA gene. *J. Med. Genet.* **35**, 713–716.
- Delatycki M. B., Knight M., Koenig M., Cossee M., Williamson R. and Forrest S. M. (1999) G130V, a common FRDA point mutation, appears to have arisen from a common founder. *Hum. Genet.* **105**, 343–346.
- Denham M., Parish C. L., Leaw B., Wright J., Reid C. A., Petrou S., Dottori M. and Thompson L. H. (2012) Neurons derived from human embryonic stem cells extend long-distance axonal projections through growth along host white matter tracts after intra-cerebral transplantation. *Front. Cell. Neurosci.* **6**, 11.
- Deutsch E. C., Santani A. B., Perlman S. L., Farmer J. M., Stolle C. A., Marusch M. F. and Lynch D. R. (2010) A rapid, noninvasive immunoassay for frataxin: utility in assessment of Friedreich ataxia. *Mol. Genet. Metab.* **101**, 238–245.
- Ditch S., Sammarco M. C., Banerjee A. and Grabczyk E. (2009) Progressive GAA.TTC repeat expansion in human cell lines. *PLoS Genet.* **5**, e1000704.
- Dow L. E. and Lowe S. W. (2012) Life in the fast lane: mammalian disease models in the genomics era. *Cell* **148**, 1099–1109.
- Du J., Campau E., Soragni E., Ku S., Puckett J. W., Dervan P. B. and Gottesfeld J. M. (2012) Role of mismatch repair enzymes in GAA.TTC triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 29861–29872.
- Durr A., Cossee M., Agid Y., Campuzano V., Mignard C., Penet C., Mandel J. L., Brice A. and Koenig M. (1996) Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1169–1175.
- Emond M., Lepage G., Vanasse M. and Pandolfo M. (2000) Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* **55**, 1752–1753.
- Evans-Galea M. V., Carrods N., Rowley S. M. et al. (2012) FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* **71**, 487–497.
- Ezzatizadeh V., Pinto R. M., Sandi C., Sandi M., Al-Mahdawi S., Te Riele H. and Pook M. A. (2012) The mismatch repair system protects against intergenerational GAA repeat instability in a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol. Dis.* **46**, 165–171.
- Filla A., De Michele G., Cavalcanti F., Pianese L., Monticelli A., Campanella G. and Coccozza S. (1996) The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **59**:554–560.
- Frugier T., Tiziano F. D., Cifuentes-Diaz C., Miniou P., Roblot N., Dierich A., Le Meur M. and Melki J. (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 849–858.
- Garcia-Gimenez J. L., Gimeno A., Gonzalez-Cabo P., Dasi F., Bolinches-Amoros A., Molla B., Palau F. and Pallardo F. V. (2011) Differential expression of PGC-1alpha and metabolic sensors suggest age-dependent induction of mitochondrial biogenesis in Friedreich ataxia fibroblasts. *PLoS ONE* **6**, e20666.
- Gellera C., Castellotti B., Mariotti C., Mineri R., Seveso V., Didonato S. and Taroni F. (2007) Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics* **8**, 289–299.
- Gottesfeld J. M. (2007) Small molecules affecting transcription in Friedreich ataxia. *Pharmacol. Ther.* **116**, 236–248.
- Grabczyk E., Mancuso M. and Sammarco M. C. (2007) A persistent RNA:DNA hybrid formed by transcription of the Friedreich ataxia triplet repeat in live bacteria, and by T7 RNAP *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5351–5359.
- Greene E., Mahishi L., Entezam A., Kumari D. and Usdin K. (2007) Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res.* **35**, 3383–3390.
- Halabi A., Ditch S., Wang J. and Grabczyk E. (2012) DNA mismatch repair complex MutSbeta promotes GAA.TTC repeat expansion in human cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 29958–29967.
- Herman D., Janssen K., Burnett R., Soragni E., Perlman S. L. and Gottesfeld J. M. (2006) Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 551–558.
- Hick A., Wattenhofer-Donze M., Chintawar S. et al. (2012) Induced pluripotent stem cell derived neurons and cardiomyocytes as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* **6**, Advanced Online Article. doi:10.1242/dmm.010900.
- Huang M. L., Becker E. M., Whitnall M., Suryo Rahmanto Y., Ponka P. and Richardson D. R. (2009) Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 16381–16386.
- Jauslin M. L., Wirth T., Meier T. and Schoumacher F. (2002) A cellular model for Friedreich Ataxia reveals small-molecule glutathione peroxidase mimetics as novel treatment strategy. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3055–3063.
- Jauslin M. L., Meier T., Smith R. A. and Murphy M. P. (2003) Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J.* **17**, 1972–1974.
- Jauslin M. L., Vertuani S., Durini E., Buzzoni L., Ciliberti N., Verdecchia S., Palozza P., Meier T. and Manfredini S. (2007) Protective effects of Fe-Aox29, a novel antioxidant derived from a molecular combination of Idebenone and vitamin E, in immortalized fibroblasts and fibroblasts from patients with Friedreich Ataxia. *Mol. Cell. Biochem.* **302**, 79–85.
- Kattman S. J., Witty A. D., Gagliardi M., Dubois N. C., Niapour M., Hotta A., Ellis J. and Keller G. (2011) Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* **8**, 228–240.
- Kim E., Napierala M. and Dent S. Y. (2011) Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8366–8377.
- Koepfen A. H. (2011) Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* **303**, 1–12.
- Koepfen A. H., Michael S. C., Knutson M. D., Haile D. J., Qian J., Levi S., Santambrogio P., Garrick M. D. and Lamarche J. B. (2007) The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: the role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol.* **114**, 163–173.
- Koutnikova H., Campuzano V., Foury F., Dolle P., Cazzalini O. and Koenig M. (1997) Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* **16**, 345–351.
- Ku S., Soragni E., Campau E., Thomas E. A., Altun G., Laurent L. C., Loring J. F., Napierala M. and Gottesfeld J. M. (2010) Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAATTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell* **7**, 631–637.
- Kumari D. and Usdin K. (2012) Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clin. Epigenetics* **4**, 2.

- Kumari D., Biacsi R. E. and Usdin K. (2011) Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in Friedreich ataxia cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 4209–4215.
- Lamarche J. B., Cote M. and Lemieux B. (1980) The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia: morphological observations in 3 cases. *Can. J. Neurol. Sci.* **7**, 389–396.
- Lee G., Chambers S. M., Tomishima M. J. and Studer L. (2010) Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **5**, 688–701.
- Lian X., Hsiao C., Wilson G., Zhu K., Hazeltine L. B., Azarin S. M., Raval K. K., Zhang J., Kamp T. J. and Palecek S. P. (2012) Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, E1848–E1857.
- Lill R. (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838.
- Lim F., Palomo G. M., Mauritz C., Gimenez-Cassina A., Illana B., Wandosell F. and Diaz-Nido J. (2007) Functional recovery in a Friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an HSV-1 amplicon vector. *Mol. Ther.* **15**, 1072–1078.
- Liu J., Verma P. J., Evans-Galea M. V. *et al.* (2011) Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev.* **7**, 703–713.
- Lopez Castel A., Cleary J. D. and Pearson C. E. (2010) Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 165–170.
- Lu C. and Cortopassi G. (2007) Frataxin knockdown causes loss of cytoplasmic iron-sulfur cluster functions, redox alterations and induction of heme transcripts. *Arch. Biochem. Biophys.* **457**, 111–122.
- Marmolino D., Manto M., Acquaviva F., Vergara P., Ravella A., Monticelli A. and Pandolfo M. (2010) PGC-1 α down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia. *PLoS ONE* **5**, e10025.
- Martelli A., Wattenhofer-Donze M., Schmucker S., Bouvet S., Reutenauer L. and Puccio H. (2007) Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2651–2658.
- Martelli A., Friedman L. S., Reutenauer L., Messaddeq N., Perlman S. L., Lynch D. R., Fedosov K., Schulz J. B., Pandolfo M. and Puccio H. (2012) Clinical data and characterization of the liver conditional mouse model exclude neoplasia as a non-neurological manifestation associated with Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* **5**, 860–869.
- Miranda C. J., Santos M. M., Ohshima K. *et al.* (2002) Frataxin knockout mouse. *FEBS Lett.* **512**, 291–297.
- Monros E., Molto M. D., Martinez F., Canizares J., Blanca J., Vilchez J. J., Prieto F., de Frutos R. and Palau F. (1997) Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 101–110.
- Montermini L., Andermann E., Labuda M. *et al.* (1997a) The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1261–1266.
- Montermini L., Kish S. J., Jiralerspong S., Lamarche J. B. and Pandolfo M. (1997b) Somatic mosaicism for Friedreich's ataxia GAA triplet repeat expansions in the central nervous system. *Neurology* **49**, 606–610.
- Napoli E., Morin D., Bernhardt R., Buckpitt A. and Cortopassi G. (2007) Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendroglia cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 773–780.
- Ohshima K., Montermini L., Wells R. D. and Pandolfo M. (1998) Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**, 14588–14595.
- Pandolfo M. (2009) Friedreich ataxia: the clinical picture. *J. Neurol.* **256** (Suppl 1), 3–8.
- Payne R. M., Pride P. M. and Babbey C. M. (2011) Cardiomyopathy of Friedreich's ataxia: use of mouse models to understand human disease and guide therapeutic development. *Pediatr. Cardiol.* **32**, 366–378.
- Pianese L., Cavalcanti F., De Michele G., Filla A., Campanella G., Calabrese O., Castaldo I., Monticelli A. and Coccozza S. (1997) The effect of parental gender on the GAA dynamic mutation in the FRDA gene. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 460–463.
- Pook M. A., Al-Mahdawi S., Carroll C. J. *et al.* (2001) Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics* **3**, 185–193.
- Puccio H. (2009) Multicellular models of Friedreich ataxia. *J. Neurol.* **256**(Suppl 1), 18–24.
- Puccio H., Simon D., Cossee M., Criqui-Filipe P., Tiziano F., Melki J., Hindelang C., Matyas R., Rustin P. and Koenig M. (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **27**, 181–186.
- Punga T. and Buhler M. (2010) Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO. Mol. Med.* **2**, 120–129.
- Rai M., Soragni E., Janssen K., Burnett R., Herman D., Coppola G., Geschwind D. H., Gottesfeld J. M. and Pandolfo M. (2008) HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. *PLoS ONE* **3**, e1958.
- Rai M., Soragni E., Chou C. J., Barnes G., Jones S., Rusche J. R., Gottesfeld J. M. and Pandolfo M. (2010) Two new pimelic diphenylamide HDAC inhibitors induce sustained frataxin upregulation in cells from Friedreich's ataxia patients and in a mouse model. *PLoS ONE* **5**, e8825.
- Ristow M., Mulder H., Pomplun D. *et al.* (2003) Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J. Clin. Invest.* **112**, 527–534.
- Rotig A., de Lonlay P., Chretien D., Foury F., Koenig M., Sidi D., Munnich A. and Rustin P. (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**, 215–217.
- Rouault T. A. (2012) Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* **5**, 155–164.
- Sakamoto N., Ohshima K., Montermini L., Pandolfo M. and Wells R. D. (2001) Sticky DNA, a self-associated complex formed at long GAA*TTC repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription. *J. Biol. Chem.* **276**, 27171–27177.
- Sandi C., Pinto R. M., Al-Mahdawi S., Ezzatizadeh V., Barnes G., Jones S., Rusche J. R., Gottesfeld J. M. and Pook M. A. (2011) Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol. Dis.* **42**, 496–505.
- Santos M. M., Ohshima K. and Pandolfo M. (2001) Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1935–1944.
- Saveliev A., Everett C., Sharpe T., Webster Z. and Festenstein R. (2003) DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* **422**, 909–913.
- Schmucker S., Martelli A., Colin F., Page A., Wattenhofer-Donze M., Reutenauer L. and Puccio H. (2011) Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS ONE* **6**, e16199.
- Schulz J. B., Dehmer T., Schols L. *et al.* (2000) Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* **55**, 1719–1721.

- Seznec H., Simon D., Monassier L., Criqui-Filipe P., Gansmuller A., Rustin P., Koenig M. and Puccio H. (2004) Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1017–1024.
- Seznec H., Simon D., Bouton C. *et al.* (2005) Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 463–474.
- Sharma R., Bhatti S., Gomez M., Clark R. M., Murray C., Ashizawa T. and Bidichandani S. I. (2002) The GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia shows a high level of somatic instability *in vivo*, with a significant predilection for large contractions. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2175–2187.
- Shi F., Corrales C. E., Liberman M. C. and Edge A. S. (2007) BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 3016–3023.
- Simon D., Seznec H., Gansmuller A., Carelle N., Weber P., Metzger D., Rustin P., Koenig M. and Puccio H. (2004) Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* **24**, 1987–1995.
- Stehling O., Elsasser H. P., Bruckel B., Muhlenhoff U. and Lill R. (2004) Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 3007–3015.
- Sturm B., Bistrich U., Schranzhofer M., Sarsero J. P., Rauen U., Scheiber-Mojdehkar B., de Groot H., Ioannou P. and Petrat F. (2005) Friedreich's ataxia, no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts: a decrease in antioxidative capacity? *J. Biol. Chem.* **280**, 6701–6708.
- Takahashi K. and Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676.
- Takahashi T., Lord B., Schulze P. C., Fryer R. M., Sarang S. S., Gullans S. R. and Lee R. T. (2003) Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* **107**, 1912–1916.
- Thierbach R., Schulz T. J., Isken F. *et al.* (2005) Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3857–3864.
- Tsai C. L. and Barondeau D. P. (2010) Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**, 9132–9139.
- Tsou A. Y., Paulsen E. K., Lagedrost S. J., Perlman S. L., Mathews K. D., Wilmot G. R., Ravina B., Koeppen A. H. and Lynch D. R. (2011) Mortality in Friedreich ataxia. *J. Neurol. Sci.* **307**, 46–49.
- Ventura N., Rea S. L. and Testi R. (2006) Long-lived *C. elegans* mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases. *Exp. Gerontol.* **41**, 974–991.
- Vyas P. M., Tomamichel W. J., Pride P. M., Babbey C. M., Wang Q., Mercier J., Martin E. M. and Payne R. M. (2012) A TAT-frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1230–1247.
- Wagner G. R., Pride P. M., Babbey C. M. and Payne R. M. (2012) Friedreich's ataxia reveals a mechanism for coordinate regulation of oxidative metabolism via feedback inhibition of the SIRT3 deacetylase. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2688–2697.
- Wang Y., Chen G., Song T., Mao G. and Bai H. (2010) Enhancement of cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells. *Sci. China Life Sci.* **53**, 581–589.
- Wells R. D. (2008) DNA triplexes and Friedreich ataxia. *FASEB J.* **22**, 1625–1634.
- Wong A., Yang J., Cavadini P., Gellera C., Lonnerdal B., Taroni F. and Cortopassi G. (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 425–430.
- Yang L., Soonpaa M. H., Adler E. D. *et al.* (2008) Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* **453**, 524–528.
- Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K. *et al.* (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920.
- Zanella I., Derosas M., Corrado M., Cocco E., Cavadini P., Biasotto G., Poli M., Verardi R. and Arosio P. (2008) The effects of frataxin silencing in HeLa cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 90–98.
- Zhang H., Yang B., Mu X. *et al.* (2011a) Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Mol. Ther.* **19**, 1440–1448.
- Zhang Q., Jiang J., Han P. *et al.* (2011b) Direct differentiation of atrial and ventricular myocytes from human embryonic stem cells by alternating retinoid signals. *Cell Res.* **21**, 579–587.



B/

*Photos non libres
de droits*

FIGURE 13 : Culture des cellules ES/iPS

A/ Culture sur MEF dans du milieu HES (voir annexe 3 pour la composition).

B/ Culture sur matrice protéique (Matrigel™) dans du milieu mTESR™ : (1) jolies colonies (bonne couleur et bords nets) prêtes à être coupées, (2) Différenciation spontanée et colonie dépassée. (photographies issues du manuel technique du mTESR™, http://www.stemcell.com/~media/Technical%20Resources/B/C/A/2/B/29106MAN_3_0_0.pdf)

C/ Schéma illustrant le coupage des colonies d'ES/iPS avec une seringue (issue de (Lefort et al., 2009)).

III. Les cellules pluripotentes induites « iPS » et leurs cellules dérivées

A. Définition

1- Caractéristiques

Les cellules pluripotentes induites (iPS, pour *induced Pluripotent Stem cells*) sont des cellules partageant de nombreuses propriétés avec les cellules souches embryonnaires (ES, pour *Embryonic Stem cells*), mais ayant une origine différente. Alors que les cellules ES dérivent des cellules de la masse interne issue d'embryons au stade blastocyste, les iPS sont obtenues par reprogrammation de cellules somatiques via l'expression forcée de facteurs embryonnaires de pluripotence exogènes (*voir intro. point III-B-1-a*) (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

Comme les cellules ES, les iPS sont des petites cellules plutôt rondes possédant un gros nucléole et caractérisées par un ratio noyau/cytoplasme élevé (Odorico et al., 2001). Elles prolifèrent sous forme de colonies compactes, délimitées par des bords nets. Elles sont dotées de deux propriétés indissociables à l'origine de leur grand intérêt : l'autorenouvellement et la pluripotence. Ces cellules sont ainsi capables de se multiplier indéfiniment, puis de se différencier à loisir en tous les types cellulaires de l'organisme adulte. Ces atouts sont cependant très fragiles et leur pérennisation requiert des conditions de culture particulières et un entretien minutieux.

2- Culture

Les ES/iPS humaines sont généralement cultivées sur un tapis de cellules nourricières inactivées (MEF, pour *Mouse Embryonic Fibroblasts*) ou sur une matrice protéique (**Figure 13-A,B**), en association avec un milieu contenant du bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), élément indispensable au maintien de l'état pluripotent de ces cellules (Levenstein et al., 2006; Xu et al., 2005). Elles requièrent aussi une attention quotidienne, consistant à observer l'aspect et la croissance des colonies afin de détecter d'éventuels signes de différenciation spontanée (**Figure 13-B**), mais aussi à renouveler le milieu de culture pour éviter toute pénurie de bFGF. Le passage des cellules s'effectue généralement par coupage manuel des colonies en damier (**Figure 13-C**) ou par dissociation enzymatique douce afin de transférer les cellules en petits amas dans la boîte de culture fille.

B. Obtention d'iPS

1- La reprogrammation

a) Principe

Avant d'expliquer ce qu'est la reprogrammation, intéressons-nous à son contraire : la différenciation. Il s'agit d'un processus naturel permettant à une cellule pluripotente du jeune embryon d'acquérir une identité propre associée à des fonctions spécialisées. Rappelons que toutes les cellules somatiques de l'organisme possèdent le même patrimoine génétique, mais n'en expriment qu'une

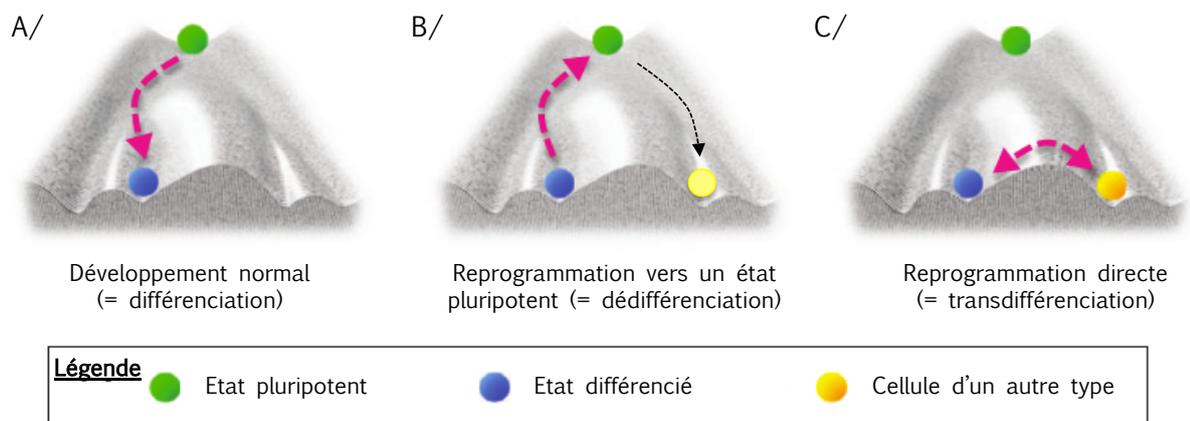


FIGURE 14 : Modèle de Waddington « The Epigenetic Landscape » (modifié d'après (Takahashi, 2012))

A/ Développement normal d'une cellule (= différenciation). « En dévalant la colline », la cellule pluripotente (vert) se dirige progressivement vers sa destinée, le but ultime étant un état totalement différencié (bleu).

B/ Reprogrammation et retour à un état pluripotent (= dédifférenciation). A partir de là, les cellules peuvent se redifférencier vers un autre type de cellule somatique (flèche noire, disque jaune).

C/ Reprogrammation directe vers un autre type cellulaire (= transdifférenciation). Passage d'un type cellulaire (bleu) à l'autre (jaune) sans avoir à remonter au sommet de la colline, c'est-à-dire sans avoir à passer par un état pluripotent.

partie. L'acquisition de leur identité au cours de la différenciation se fait par trois types de modifications épigénétiques (voir les revues (Han and Yoon, 2012; Li et al., 2012)) : la modification des histones, la méthylation de l'ADN et le remodelage de la chromatine. De part leur aspect dynamique, les modifications des histones constituent le premier niveau de régulation de l'expression génique. Suivant leur nature, elles permettent d'activer ou de réprimer l'expression des gènes. La méthylation de l'ADN est, quant à elle, un code statique qui permet de stabiliser les répressions préalablement établies, pérennisant ainsi l'inactivation des gènes inutiles pour un type cellulaire donné. Enfin, le dernier niveau de régulation est le remodelage de la chromatine, permettant de passer d'un état globalement peu compacte dans les cellules indifférenciées de l'embryon (euchromatine) à la condensation sous forme d'hétérochromatine de certaines zones chromosomiques pour former des régions totalement inactives.

Le modèle de Waddington permet d'expliquer de façon métaphorique ce qui se passe lors de la différenciation (**figure 14**) : il décrit le « paysage épigénétique » comme étant une surface inclinée constituée par une série de vallées ramifiées et de cols représentant respectivement, des états stables et les barrières entre ces états. La cellule pluripotente se trouve au sommet et dévale progressivement la pente de la différenciation. A chaque embranchement entre deux vallées, la cellule doit choisir quelle voie emprunter pour se rapprocher un peu plus de son état final. Sa progression est influencée par différents signaux et accompagnée d'un verrouillage progressif des modifications épigénétiques établies au fur et à mesure, empêchant tout retour en arrière.

La reprogrammation correspond à un retour à l'état pluripotent, impliquant de « remonter la pente » en détruisant les différentes barrières épigénétiques établies lors de la différenciation (**Figure 13**) : pour ce faire, il s'agit notamment de reconfigurer les profils de méthylation de l'ADN. Ainsi, la déméthylation des promoteurs des gènes de pluripotence Oct4, Nanog et Sox2, et donc leur réactivation, constitue une étape clé de la reprogrammation. Depuis 2006 et les travaux du laboratoire de S. Yamanaka, on sait qu'il suffit de surexprimer transitoirement un cocktail de facteurs de transcription exogènes, tel que Oct4/Sox2/Klf4/cMyc, pour induire la réexpression des facteurs de pluripotence endogènes et ainsi permettre la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). C'est pour cette raison que l'on parle de cellules pluripotentes induites (iPS, pour *induced Pluripotent Stem cells*).

Bien que classiquement obtenues par reprogrammation de fibroblastes de peau, des iPS ont aussi pu être générés à partir d'autres types de cellules somatiques humaines, telles que des cellules sanguines CD34⁺ (Loh et al., 2009), des lymphocytes B (Hanna et al., 2008), des kératinocytes (Aasen et al., 2008), des cellules β -pancréatiques (Bar-Nur et al., 2011) ou encore des cellules souches adipeuses (Sun et al., 2009), montrant ainsi la puissance et l'aspect universel du processus de reprogrammation.

Le set de facteurs de transcription proposé par S. Yamanaka (Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc) est à l'heure actuelle le plus fréquemment utilisé pour la dérivation d'iPS (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Son efficacité réside notamment dans l'utilisation des proto-oncogènes c-Myc et Klf4 qui altèreraient la structure de la chromatine, permettant ainsi à Oct4 et Sox2 d'accéder plus facilement à leurs cibles (Araki et al., 2011; Takahashi and Yamanaka, 2006). Notre laboratoire avait

pris le parti d'utiliser plutôt la combinaison de facteurs de transcription proposée par JA. Thomson : Oct4/Sox2/Lin28/Nanog (Yu et al., 2007). Ce choix avait été motivé par les travaux de Sumi *et al.* qui montraient que la surexpression de c-Myc dans des cellules ES humaines accélérât leur différenciation ou induisait leur apoptose selon les conditions (Sumi et al., 2007). Ainsi une extinction incomplète ou une réactivation fortuite du transgène c-Myc pourraient compromettre la stabilité et le maintien des futures lignées iPS. Plus tard, les travaux de Martinez-Fernandez *et al.* ont suggéré que l'utilisation de c-Myc pour la reprogrammation était préjudiciable à une différenciation cardiaque des iPS (Martinez-Fernandez et al., 2010). Ces travaux ont cependant été maintes fois remis en cause par les nombreuses différenciations cardiaques réussies à partir d'iPS générés avec le cocktail Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc (Carvajal-Vergara et al., 2010; Kim et al., 2013; Lahti et al., 2012a). Bien qu'il ne nous concerne pas directement, le dernier argument à l'encontre de l'utilisation des proto-oncogènes c-Myc et Klf4 est leur effet tumorigène chez la souris (Okita et al., 2007). Cet aspect est en effet particulièrement gênant si les iPS ou leurs dérivés sont destinés à des applications cliniques.

b) Méthodes de reprogrammation

La plupart des lignées iPS actuelles ont été produites par transduction avec des rétrovirus ou des lentivirus. C'est aussi le cas des lignées de notre laboratoire, qui ont été obtenues par transduction lentivirale. L'inconvénient de ces deux méthodes virales est l'intégration des transgènes dans le génome de la cellule hôte. En effet, l'aspect « intégratif » est particulièrement problématique si les iPS sont destinées à la thérapie cellulaire, et dans une moindre mesure pour toutes les autres applications, car il est impossible d'exclure une intégration malchanceuse des transgènes qui pourrait être à l'origine de mutations et éventuellement d'anomalies phénotypiques artéfactuelles.

Depuis quelques années, les efforts se sont focalisés sur le développement de techniques de reprogrammation dites « propres » car non intégratives (voir les revues (Lai et al., 2011; Quattrocchi et al., 2013)). Ont ainsi été proposés, l'utilisation d'adénovirus (Zhou and Freed, 2009), du virus Sendai (Fusaki et al., 2009), des transposons piggyBac (Woltjen et al., 2009), d'ARNm (Warren et al., 2010), de microARN (Miyoshi et al., 2011), de protéines recombinantes (Kim et al., 2009) et d'épisomes (Okita et al., 2011). Des méthodes hybrides ont aussi vu le jour avec par exemple l'utilisation de « petites molécules » couplées à des facteurs de pluripotence. Ainsi, le traitement des cellules somatiques à l'acide valproïque, un inhibiteur d'histones désacétylases (HDAC), juste après la transduction virale permet de n'utiliser que les facteurs de transcription Oct4 et Sox2 pour la reprogrammation (Huangfu et al., 2008). A l'heure actuelle, on assiste à l'émergence de la reprogrammation par les épisomes et au maintien de l'utilisation des rétrovirus, deux techniques simples et dotées d'une bonne reproductibilité (Yamanaka, 2012).

2- Sélection et validation des iPS après reprogrammation

La première sélection des cellules iPS repose sur des critères purement morphologiques : l'apparence des colonies formées et leur vitesse de croissance. Les cellules ainsi repérées sont ensuite amplifiées et soumises à une série de tests de validation visant principalement à démontrer l'état de pluripotence des cellules (voir revue (Maherali and Hochedlinger, 2008)). (1) Il s'agit d'abord de vérifier que cet état est géré de façon autonome par les cellules en montrant que les transgènes utilisés pour la reprogrammation ont été inactivés. (2) L'expression de marqueurs de pluripotence endogènes comme les facteurs de transcription embryonnaires Oct4, Sox2, Nanog et les protéines de surface Tra1-81, Tra1-60, SSEA-4 est communément recherchée par immunofluorescence et/ou RT-qPCR. (3) La déméthylation des promoteurs des endogènes Oct4 et/ou Nanog est la preuve d'une conversion épigénétique de la cellule somatique différenciée à la cellule pluripotente et donc le signe d'une reprogrammation réussie.

Des tests fonctionnels viennent compléter cette caractérisation (voir revue (Sheridan et al., 2012)). Ils visent à montrer la capacité de différenciation des iPS. Pour les cellules humaines, ils sont au nombre de deux : la formation de corps embryoïdes *in vitro* et de tératomes *in vivo*. (1) Les corps embryoïdes sont des structures sphériques obtenues par l'agrégation de cellules pluripotentes en suspension, qui vont spontanément se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires (voir résultats point III-A-2 pour plus de détails). La réussite de la différenciation est généralement vérifiée en quantifiant l'expression d'une batterie de gènes caractéristiques de chaque feuillet, tels que AFP, FOXA2 et GATA4 pour l'endoderme, Brachyury, FLT1 et RUNX1 pour le mésoderme et GFAP, Nestin, et Pax-6 pour l'ectoderme. (2) Les tératomes sont des tumeurs solides bénignes, obtenues par injection sous-cutanée de cellules pluripotentes (ES ou iPS) à des souris immunodéficientes. Les tératomes sont récupérés environ trois semaines après l'injection et sont soumis à une analyse histologique qui recherche la présence de cellules différenciées issues des trois feuillets embryonnaires. La formation de tératomes a longtemps été considérée comme le test de pluripotence le plus stringent, mais est de plus en plus remise en cause (voir revues de (Buta et al., 2013; Dolgin, 2010)). D'abord pour des raisons économiques et éthiques, liées à l'utilisation d'un grand nombre de souris. Du point de vue scientifique, il a été montré que certaines lignées iPS qui n'avaient pas formé de tératomes étaient capables de se différencier dans le tissu d'intérêt, mais aussi que des lignées iPS partiellement reprogrammées pouvaient quand même produire des tératomes. Ces données questionnent fortement l'intérêt de ce test et encouragent la recherche d'alternatives. Ainsi, Chan et al. ont montré que le niveau d'expression des marqueurs REX1, DNMT3B et ABCG2 reflétait le degré de reprogrammation et la capacité de formation de tératomes par les cellules, proposant ainsi un nouvel outil de caractérisation de la pluripotence, à la fois simple et efficace (Chan et al., 2009).

Enfin, la caractérisation de la pluripotence des iPS formées est souvent complétée par la détection d'une activité phosphatase alcaline (O'Connor et al., 2008) ainsi que par l'étude du transcriptome des iPS pour montrer leur proximité avec les cellules ES et leur éloignement des cellules somatiques de départ.

Tous les tests présentés ci-dessus visent à identifier les lignées iPS dont la reprogrammation a été totale. Outre la pluripotence, il convient de vérifier régulièrement la diploïdie des cellules en établissant leur caryotype. En effet, un caryotype anormal ou un défaut de pluripotence pourraient être à l'origine de phénotypes artéfactuels, sans rapport avec le génotype de la cellule.

C. Proximité des cellules iPS avec les cellules ES

Toutes les études s'accordent à dire que les cellules ES et iPS sont très proches. Mais la question est : jusqu'à quel point ? La comparaison de leur transcriptome, de leur profil épigénétique ou encore de leur capacité à se différencier a révélé des différences dont l'interprétation varie selon les cas. En effet, les travaux principalement basés sur la confrontation des profils d'expression génique postulent l'existence d'une signature spécifique aux lignées iPS indépendante de leur origine et de la méthode de reprogrammation utilisée (Chin et al., 2009; Ghosh et al., 2010; Marchetto et al., 2009). Les différences observées entre les cellules ES et iPS seraient atténuées par un long maintien en culture (Chin et al., 2009, 2010). Des études plus complètes, couplant plusieurs angles de comparaison, concluent quant à elles, à l'absence de réelles différences entre les iPS et les ES (Bock et al., 2011; Guenther et al., 2010). Ces conclusions contradictoires sont souvent expliquées par le nombre de lignées confrontées dans les comparaisons et le choix des méthodes d'analyse de données. La confrontation des résultats des études transcriptomiques publiées par différents laboratoires a montré qu'au delà des minimales différences identifiées entre les cellules ES et les iPS, il y aurait plutôt une signature propre à chaque laboratoire, qui serait probablement liée aux conditions de culture choisies (support, composition du milieu de culture, méthode de passage, etc.) (Guenther et al., 2010; Newman and Cooper, 2010).

Bien que les études globales d'un grand nombre de lignées n'aient pas révélé de signature commune aux iPS, l'étude au cas par cas semble toutefois indiquer la conservation d'une forme de mémoire de la cellule donneuse. Celle-ci se caractérise par la persistance de l'expression de gènes en relation avec la fonction de la cellule de départ, mais aussi par la sous-expression de gènes spécifiques aux cellules ES (Bar-Nur et al., 2011; Ghosh et al., 2010; Kim et al., 2011b; Lister et al., 2011; Ohi et al., 2011). Ces anomalies seraient principalement liées à un effacement incomplet des méthylations spécifiques du tissu d'origine et à l'apparition *de novo* de méthylations aberrantes au cours de la reprogrammation (Kim et al., 2011b; Lister et al., 2011). Cette mémoire épigénétique a pour conséquence de restreindre l'étendue des différenciations possibles, tout en favorisant un retour vers le type cellulaire d'origine (Kim et al., 2011b).

La problématique sous-jacente aux études de proximité iPS/ES est l'évaluation de leur capacité à se différencier. En effet, si des lignées iPS s'avéraient être moins pluripotentes que les cellules ES, cela pourrait compromettre leur utilisation pour des applications données. La question de l'efficacité de différenciation des iPS et des ES a été notamment posée dans le cadre de différenciations ciblées en motoneurones (Boulting et al., 2011; Hu et al., 2010) et en hémangioblastes (Feng et al., 2010). Là encore, les conclusions s'opposent : selon Hu et al., les lignées iPS testées sont capables de se différencier en motoneurones fonctionnels suivant le même

timing que les cellules ES, mais avec une efficacité moindre et davantage de variabilité (Hu et al., 2010), alors que les travaux de Boulting *et al.* concluent à l'absence de différences entre la majorité des lignées iPS et ES considérées (Boulting et al., 2011). Bien que l'étude menée par Feng *et al.* rejoigne les conclusions de Hu *et al.* concernant l'efficacité de différenciation réduite des iPS, elle souligne cependant les défauts fonctionnels des hémangioblastes générés, qui sont davantage sujets à l'apoptose et moins enclins à générer des cellules hématopoïétiques (Feng et al., 2010). Il a cependant été montré que l'application de protocoles de différenciation plus complets pouvait permettre de mener à bien la différenciation de certaines lignées iPS réfractaires, suggérant que ces lignées perçoivent et/ou répondent moins bien aux signaux basiques de différenciation (Boulting et al., 2011; Hu et al., 2010). L'analyse de l'expression de 500 gènes caractéristiques des trois feuillet embryonnaires sur des cellules somatiques obtenues par différenciation spontanée, a révélé que les différentes lignées d'ES et d'iPS étudiées avaient toutes des propensions différentes à la différenciation (Bock et al., 2011). Il est toutefois important de noter qu'il existe aussi des différences non négligeables entre les lignées de cellules ES elles-mêmes, notamment en terme de différenciation (voir revue (Allegrucci and Young, 2007)) : par exemple, la lignée HUES3 serait plus appropriée pour une différenciation en cardiomyocytes, alors que la lignée HUES8 serait à privilégier pour la formation d'endoderme, en particulier de cellules pancréatiques (Bock et al., 2011; Osafune et al., 2008).

En conclusion, malgré le fait que les iPS ne soient pas des copies conformes des cellules ES, elles constituent tout de même un bon outil de travail. Il serait toutefois judicieux d'effectuer certaines vérifications préalables à l'utilisation de nouvelles lignées iPS, notamment en terme de capacité de différenciation vers le tissu souhaité (Bock et al., 2011).

Bien que la mémoire conservée des cellules d'origine semble être un frein à la différenciation, il serait possible d'en faire un atout. Pour cela, il faudrait privilégier la reprogrammation de cellules issues du même feuillet embryonnaire que les cellules voulues : par exemple, utiliser des cellules de l'ectoderme comme les follicules pileux dans le but d'obtenir des neurones (Petit et al., 2012). Mieux encore, lorsque cela est possible, utiliser au départ le même type cellulaire que celui voulu : cela a d'ores et déjà été réalisé avec succès avec des cellules β -pancréatiques humaines (Bar-Nur et al., 2011) et des cellules cardiaques néonatales de souris (Rizzi et al., 2012).

D. Applications des iPS et de leurs dérivés dans la modélisation de maladies

1- Généralités

La possibilité de générer un large panel de cellules différenciées fonctionnelles à partir des cellules ES/iPS offre de multiples opportunités : d'abord en (1) recherche fondamentale, pour l'étude du développement embryonnaire précoce, la modélisation de maladies ou encore la recherche de biomarqueurs, mais aussi en (2) recherche appliquée, pour le criblage à haut débit de candidats médicaments, la mise au point de tests de toxicologie et le développement de la thérapie cellulaire.

Maladie, Références	Mode de transmission, Gène muté	Tableau clinique	Phénotype des cardiomyocytes issus des iPS (voire des iPS)
CANALOPATHIES			
Syndrome congénital du QT long de type 1 (=LQT1) (Egashira et al., 2012; Moretti et al., 2010)	- Autosomique dominant - Gène <i>KCNQ1</i> (canal K ⁺ , courant I _{Ks})	- Repolarisation ventriculaire prolongée : augmentation de la durée de l'onde QT à l'ECG - Risque d'arythmie (tachycardie) pouvant conduire au décès du patient	- Repolarisation ralentie - Localisation aberrante des récepteurs KCNQ1 (problème de trafic) - Diminution du courant I _{Ks} - Post-dépolarisation précoce induite par les agonistes β-adrénergiques
Syndrome congénital du QT long de type 2 (=LQT2) (Itzhaki et al., 2011; Lahti et al., 2012; Matsa et al., 2011)	- Autosomique dominant - Gène <i>KCNH2</i> (canal K ⁺ , courant I _{Kr})		- Repolarisation cardiaque prolongée (augmentation de la durée du potentiel d'action) - Réduction du courant I _{Kr} - Arythmie induite par les agonistes β-adrénergiques
Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique (CPVT) (Fatima et al., 2011; Itzhaki et al., 2012; Jung et al., 2012; Kujala et al., 2012)	- Autosomique dominant - Gène <i>RYR2</i> (Canal Ca ²⁺ impliqué dans le phénomène de CICR (<i>Calcium-Induced Calcium Release</i>))	- Importants troubles du rythme à l'effort ou en cas d'émotions fortes chez des sujets jeunes (mise en jeu du système sympathique) - Peut causer syncope et mort subite - Il n'y a pas d'anomalies à l'ECG de repos	- Catécholamines induisent une signalisation calcique anormale et de l'arythmie - Séquestration du Ca ²⁺ par le réticulum endoplasmique est moins efficace - Post-dépolarisation retard en conditions normales et en réponse à l'adrénaline
CARDIOMYOPATHIES			
Cardiomyopathie dilatée (DCM) (Sun et al., 2012)	- Autosomique dominant - Gène <i>TNNT2</i> (troponine T cardiaque, protéine sarcomérique)	- Dilatation ventriculaire - Dysfonctionnement systolique - Insuffisance cardiaque	- Désorganisation des sarcomères - Distribution anormale de l'α-actinine - Altération de la régulation calcique - Réduction de la contractilité
Cardiomyopathie dilatée (DCM) (Siu et al., 2012)	- Autosomique dominant - Gène <i>LMNA</i> (lamine A/C, filament intermédiaire)	- Fibrillation atriale - Atteinte du système de conduction - A l'ECG : réduction amplitude onde P et intervalle PR prolongé (QRS normale)	- Altération de l'architecture nucléaire - Stimulation électrique entraîne la sénescence nucléaire et l'apoptose
Cardiomyopathie hypertrophique (HCM) (Lan et al., 2013)	- Autosomique dominant - Gène <i>MYH7</i> (chaîne lourde de la myosine, protéine sarcomérique)	- Epaissement du ventricule gauche - Complications : insuffisance cardiaque, arythmie et mort subite	- Hypertrophie des cardiomyocytes - Multinucléation - Augmentation du contenu en myofibrilles - Désorganisation des sarcomères - Arythmie et post-dépolarisation retard - Altération de la régulation calcique, aggravée par les agonistes β-adrénergiques
Dysplasie ventriculaire droite arythmogène (ARVD) (Kim et al., 2013; Ma et al., 2013)	- Autosomique récessif - Gène <i>PKP2</i> (Plakophiline-2, protéine des desmosomes)	- Débute à l'âge adulte (âge médian : 26 ans) - Apoptose des cardiomyocytes du ventricule droit avec remplacement par de la fibrose et des lipides - Arythmie ventriculaire	- Diminution de l'expression de la PKP2 et de la plakoglobine - Translocation anormale de la plakoglobine dans le noyau - Diminution de l'activité β-caténine - Avec l'activation de PPAR-α et PPAR-γ : augmentation de la lipogenèse et de l'apoptose des cardiomyocytes - Perturbation du métabolisme du Ca ²⁺ - Anomalies de la strie Z

TABLEAU 5 : Référencement de publications rapportant la modélisation de pathologies cardiaques par les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients

Par la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement à leur utilisation dans le cadre du développement de modèles cellulaires de pathologies, puisque ce fut l'objet de mon travail de thèse.

Il existe deux façons d'obtenir des cellules ES humaines pour la modélisation de maladies : on peut soit les générer en modifiant génétiquement des lignées de cellules ES existantes, soit les dériver à partir d'embryons porteurs d'une mutation identifiée dans le cadre de fécondations *in vitro* (FIV) avec diagnostic pré-implantatoire (DPI). Ces sources sont respectivement limitées par la faible efficacité de transfection des cellules ES et par le nombre restreint de maladies génétiques concernées par le DPI. A l'heure actuelle, seule une douzaine de lignées ES ont pu être ainsi produites ou dérivées, mais moins de la moitié d'entre-elles ont été caractérisées (voir la revue de [Maury et al., 2012](#)). Ces limites et les considérations éthiques évidentes que soulève l'utilisation des cellules ES humaines font qu'elles restent peu utilisées pour la modélisation de maladies.

La modélisation de maladies par les iPS est actuellement l'application la plus répandue de ces cellules car elles offrent énormément de possibilités. En effet, des cellules iPS peuvent théoriquement être dérivées pour n'importe quelle maladie, avec l'avantage de connaître le tableau clinique du patient. Les iPS sont rarement une fin en soi, car la plupart des maladies ne sont observables que sur des cellules différenciées, et non à l'état pluripotent. Ainsi, les enjeux de la modélisation de maladies par les iPS sont : (1) la reprogrammation de cellules somatiques porteuses d'une mutation pathologique en iPS, (2) la différenciation des iPS dans le type cellulaire d'intérêt grâce à un protocole spécifique, efficace et reproductible et (3) l'apparition d'un phénotype mesurable dans un laps de temps raisonnable. La preuve de concept pour la reprogrammation de cellules somatiques de patients atteints de diverses maladies génétiques a été établie dès 2008, en montrant notamment que le patrimoine génétique du donneur était conservé et que les cellules produites étaient bien pluripotentes ([Park et al., 2008](#)). Depuis, des lignées iPS ont été générées et différenciées en types cellulaires d'intérêt pour de nombreuses maladies génétiques, principalement des maladies monogéniques, mais aussi quelques maladies polygéniques. La maladie de Parkinson est celle qui semble susciter le plus d'intérêt avec la caractérisation de dérivés neuronaux d'iPS à partir de cas d'origine génétique mais aussi sporadiques ([Devine et al., 2011](#); [Nguyen et al., 2011](#); [Sánchez-Danés et al., 2012](#); [Seibler et al., 2011](#)). D'autres pathologies ont fait l'objet de ce type d'étude, comme la schizophrénie ([Robicsek et al., 2013](#)), le syndrome de Down ([Briggs et al., 2012](#); [Mou et al., 2012](#)), la sclérose latérale amyotrophique (ALS) ([Egawa et al., 2012](#)), le syndrome de Rett ([Marchetto et al., 2010](#)), l'amyotrophie spinale ([Ebert et al., 2009](#)), la maladie de Gaucher ([Panicker et al., 2012](#)), la progéria ([Zhang et al., 2011a](#)), la chorée de Huntington ([Juopperi et al., 2012](#); [The HD iPSC Consortium, 2012](#)), l'ataxie télangiectasie ([Nayler et al., 2012](#)) et l'ataxie spinocérébelleuse de type 2 (SCA2) ([Xia et al., 2012](#)). Des pathologies cardiaques ont aussi pu être modélisées grâce aux iPS, et font l'objet du point suivant.

2- Cas des pathologies cardiaques

Plusieurs sortes de pathologies cardiaques d'origine génétique ont déjà fait l'objet d'une modélisation fidèle grâce aux iPS (voir la revue [Moretti et al., 2013](#)). Les maladies congénitales dues

Maladie, Références	Mode de transmission, Gène muté	Tableau clinique	Phénotype des cardiomyocytes issus des iPS
MALADIES MULTISYSTEMIQUES			
Syndrome LEOPARD (Carvajal-Vergara et al., 2010)	- Autosomique dominant - Gène <i>PTPN11</i> (tyrosine phosphatase)	- Anomalies cutanées (taches de rousseur) - Dysmorphie faciale - Cardiomyopathie hypertrophique (80% des patients)	- Hypertrophie des cardiomyocytes - Augmentation de l'assemblage des sarcomères - Voie Ras/MAPK suractivée
Syndrome de Timothy (Yazawa et al., 2011)	- Autosomique dominant - Très rare (<20 cas) - Gène <i>CACNA1C</i> (canal Ca ²⁺ de type L)	- Augmentation de la durée de l'onde QT à l'ECG - Syndactylie des doigts et des orteils - Dysmorphie faciale - Autisme	- Arythmie - Augmentation de la durée du potentiel d'action ventriculaire - Inactivation du canal Ca _v 1.2 altérée → conséquences : influx de Ca ²⁺ irréguliers et élévation prolongée du niveau de Ca ²⁺
Forme infantile de la maladie de Pompe (Huang et al., 2011)	- Autosomique récessif - Gène <i>GAA</i> (alpha glucosidase acide, impliquée dans la dégradation du glycogène)	- Touche le nourrisson (<6 mois) - Myopathie - Cardiomyopathie - Problèmes respiratoires	- Les iPS de patients ont un phénotype : activité GAA diminuée, surcharge en glycogène, problème de structure et dysfonctionnement des mitochondries, croissance réduite) - Ce phénotype est amplifié dans les cardiomyocytes avec en plus une diminution de la survie

TABLEAU 6 : Référencement de publications rapportant la modélisation de la composante cardiaque de pathologies multisystémiques par les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients

au dysfonctionnement de canaux ioniques arrivent en tête : parmi elles, se trouvent les syndromes du QT long de types 1 et 2 (LQT1/2) (Egashira et al., 2012; Itzhaki et al., 2011; Lahti et al., 2012b; Matsa et al., 2011; Moretti et al., 2010) et la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique (CPVT) (Fatima et al., 2011; Itzhaki et al., 2012; Jung et al., 2012; Kujala et al., 2012). Des cardiomyopathies liées à des défauts de contractilité du myocarde, comme des cardiomyopathies dilatées (Siu et al., 2012; Sun et al., 2012), une cardiomyopathie hypertrophique (Lan et al., 2013) ou encore la dysplasie ventriculaire droite arythmogène (ARVD) (Kim et al., 2013; Ma et al., 2013) ont aussi été modélisées. De façon intéressante, la composante cardiaque de quelques maladies génétiques multisystémiques a aussi pu être étudiée grâce aux iPS. C'est le cas du syndrome LEOPARD (Carvajal-Vergara et al., 2010), du syndrome de Timothy (Yazawa et al., 2011), ainsi que de la forme infantile de la maladie de Pompe (Huang et al., 2011).

Les résultats de la caractérisation des cardiomyocytes pour ces maladies sont confinés dans les **tableaux 5 et 6** : leur confrontation avec le tableau clinique des patients montre une reproduction fidèle des différentes pathologies cardiaques *in vitro*. L'apparition du phénotype des cardiomyocytes était spontanée pour l'ensemble des maladies congénitales, mais a dû être provoquée dans le cas de l'ARVD, une pathologie qui se déclare chez le jeune adulte. Pour cela les cardiomyocytes ont été cultivés dans un milieu dit « adipogénique » permettant d'activer le processus d'oxydation des acides gras et ainsi de forcer leur maturation métabolique (Kim et al., 2013; Ma et al., 2013).

Ces résultats sont encourageants pour la modélisation de la cardiomyopathie associée à l'ataxie de Friedreich, mais soulèvent la question du degré de maturité que les cardiomyocytes auront à atteindre pour reproduire le phénotype observé chez les patients.

3- Limites à l'utilisation des iPS pour la modélisation de maladies

a) Choix des contrôles

L'un des points faibles des études de modélisation de maladies par les iPS est le nombre de lignées utilisées pour chaque génotype. Il n'est pas rare de voir des publications fondées sur la comparaison de lignées issues d'un patient et d'un contrôle, bien que la norme soit plutôt de deux donneurs pour chaque génotype, mais rarement plus. Ceci s'explique d'une part par la faible disponibilité des cellules somatiques de patients notamment dans le cas de maladies rares, mais aussi et surtout parce que la génération et l'entretien quotidien des lignées iPS représente une lourde charge de travail.

Dans ces conditions, le choix du/des « bon(s) » contrôle(s) est indispensable. Généralement, les contrôles choisis sont des individus sans liens de parenté avec les patients, mais du même genre, d'un âge proche et de la même ethnie. Or la différence génétique existant naturellement entre deux individus non apparentés pourrait conduire à des résultats erronés, surtout si le phénotype associé à la pathologie étudiée est plutôt léger et restreint. Pour limiter ce risque, il faudrait multiplier les contrôles indépendants. Une autre possibilité consiste à dériver des iPS à partir de membres de la

famille du patient, mais non atteints par la maladie. Dans le cadre des maladies monogéniques, il serait aussi envisageable d'effectuer une correction génétique ciblée des iPS du patient, qui pourraient alors servir de contrôle. Certaines études utilisent parfois une lignée de cellules ES comme contrôle. Outre le problème de la différence du fond génétique, l'absence de parfaite conformité entre les cellules ES et les iPS pourrait aussi poser problème (voir ci-après).

b) Comparaison de cellules ES et iPS pour une même maladie

Le syndrome de l'X fragile est l'une des pathologies pour laquelle des cellules ES sont disponibles (voir la revue de (Maury et al., 2012)). Il s'agit de la forme la plus fréquente de retard mental héréditaire. Elle est due à une expansion de triplets (CGG)_n dans la région 5' non traduite du gène *FRM1*. Eiges et al. ont pu montrer que le gène *FRM1* muté était exprimé dans les cellules ES, mais plus après différenciation (Eiges et al., 2007). Après reprogrammation de cellules somatiques, il s'est avéré que le gène *FRM1* n'avait pas été réactivé dans les iPS : la méthylation de l'ADN et certaines modifications des histones indiquaient que le locus était toujours réprimé (Urbach et al., 2010). De façon intéressante, ils ont pu montrer que la persistance de la méthylation était spécifique au gène *FRM1* muté, puisque le promoteur du gène *Oct4* avait, quant à lui, été parfaitement déméthylé au cours de la reprogrammation (Urbach et al., 2010).

Pour les farouches défenseurs des cellules ES, ces résultats tendent à décrédibiliser les iPS pour la modélisation de ce type de pathologie. L'absence de déméthylation du gène *FRM1* serait effectivement problématique si les iPS avaient été générées dans le but d'étudier les mécanismes de répression du locus lors de la différenciation. Par contre, si l'objectif était plutôt de différencier les iPS en neurones et d'en caractériser la physiopathologie, ce n'est pas gênant puisque le locus aurait de toute façon été réprimé lors de la différenciation.

c) Effet de la reprogrammation sur les « maladies épigénétiques »

Dans la mesure où la reprogrammation consiste en une « remise à zéro » de l'épigénome des cellules, on peut se demander quelles seraient les conséquences pour la génération d'iPS de maladies impliquant des mécanismes de régulation épigénétique. C'est le cas notamment des syndromes de Prader-Wili et d'Angelman dus à la mutation de gènes soumis à une empreinte génomique parentale. En effet, le syndrome de Prader-Wili est dû à l'absence d'expression des gènes de la région q13-q11 du chromosome 15 paternel (grandes délétions), la région correspondante du chromosome maternel étant naturellement réprimée par méthylation de l'ADN. A l'inverse, le syndrome d'Angelman est dû à l'absence d'expression de la copie maternelle du gène *UBE3A*, lui aussi localisé sur le chromosome 15, alors que l'allèle paternel est normalement inactivé. L'empreinte génomique parentale du gène *UBE3A* ne concerne que certaines zones du cerveau, puisque dans la majorité des tissus les deux copies du gène sont exprimées. Cela explique que les symptômes de cette maladie soient exclusivement neurologiques (notamment retard mental, épilepsie et ataxie). Dans ces deux cas, la pathologie est donc due à la perte d'expression de l'allèle parental actif. Si la reprogrammation

venait à « effacer » les méthylations de l'ADN sur l'allèle inactif, cela aurait donc pour effet de l'activer, ce qui permettrait de compenser la perte de fonction de l'allèle normalement actif. La modélisation de la maladie par les iPS serait alors impossible. Or, les études de Chamberlain *et al.* et Yang *et al.* ont montré que la reprogrammation n'effaçait pas l'emprunte génomique parentale de ces deux loci du chromosome 15 (Chamberlain *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). Ils y semblent réfractaires, à l'image de la mutation du gène *FRM1* à l'origine de la maladie de l'X-Fragile (*voir ci-dessus*).

La même question pourrait se poser pour l'ataxie de Friedreich, dont l'inactivation du gène FXN est soumise à des modifications épigénétiques induites par la présence de l'expansion (GAA)_n. Cependant, les données pour ces trois pathologies laissent supposer que la répression de l'expression du gène ne serait pas non plus affectée par la reprogrammation.

d) Difficultés lors de la reprogrammation

Plusieurs équipes ont rencontré des difficultés lors de la reprogrammation de cellules somatiques de patients en iPS. Les pathologies concernées par ces problèmes sont : l'ataxie télangiectasie (Nayler *et al.*, 2012) et l'anémie de Fanconi (Raya *et al.*, 2009), toutes deux caractérisées par une instabilité chromosomique, ainsi que la maladie de Pompe qui est une myopathie métabolique (Huang *et al.*, 2011). Ces trois études montrent que l'instabilité génétique et des problèmes métaboliques importants sont des freins à la reprogrammation de cellules somatiques de patients en iPS. Le problème peut, dans certains cas, être contourné par la modification génétique (permanente ou transitoire) des cellules donneuses.

L'ataxie télangiectasie est une maladie autosomique récessive due à la mutation du gène codant pour la protéine ATM impliquée dans la réparation de l'ADN. Bien qu'ils aient pris soin d'utiliser des fibroblastes de patients avec un petit passage (<5) en espérant ainsi limiter l'impact de l'instabilité chromosomique, l'efficacité de reprogrammation était extrêmement faible : en effet, ils ont eu 20 fois moins de colonies iPS à partir des fibroblastes de la patiente que du contrôle. L'efficacité était aussi réduite pour les fibroblastes du parent hétérozygote, mais dans une moindre mesure (6.5x) (Nayler *et al.*, 2012).

L'anémie de Fanconi est une maladie rare, autosomique ou liée à l'X, due à la mutation de l'un des 13 gènes identifiés jusqu'à présent. L'instabilité génétique avérée des cellules et leur prédisposition à l'apoptose ont conduit Raya *et al.* à tester en parallèle la reprogrammation sur des fibroblastes de patients avec un gène muté ou génétiquement corrigés. Ils ont ainsi pu montrer que trois lignées n'étaient pas du tout reprogrammables et que deux autres l'étaient, mais seulement après correction. Enfin, une troisième lignée a toutefois pu être reprogrammée avec et sans modification génétique, mais la lignée non corrigée a été perdue au troisième passage car elle ne proliférait plus (Raya *et al.*, 2009).

La maladie de Pompe est une maladie autosomique récessive due à la mutation du gène codant pour l'alpha glucosidase acide (GAA), une enzyme lysosomale responsable de la dégradation

du glycogène. Huang *et al.* ont été incapables de reprogrammer 17 lignées de fibroblastes issues de quatre patients sans restaurer transitoirement l'expression de la GAA (Huang *et al.*, 2011). La raison pour laquelle l'accumulation de glycogène dans les lysosomes et le cytoplasme serait rédhibitoire pour la reprogrammation demeure un mystère.

Résultats

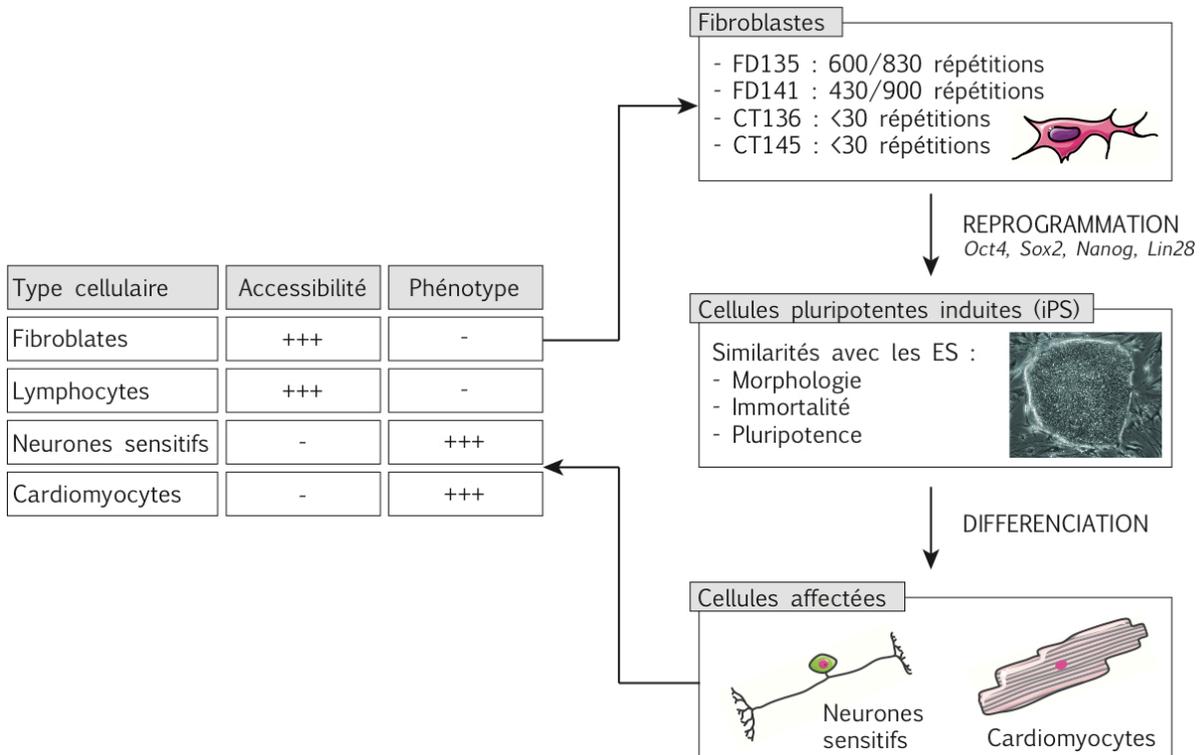


FIGURE 15 : Approche visant à utiliser les iPS pour modéliser l'ataxie de Friedreich

L'approche du projet iPS développé au laboratoire consistait à reprogrammer des cellules somatiques de patients AF (fibroblastes cutanés), non atteints dans la maladie mais facilement accessibles par biopsie, en iPS. Le caractère pluripotent des iPS est sensé permettre de générer par différenciation des cellules affectées dans la maladie, comme des neurones sensitifs et des cardiomyocytes. L'avantage étant que ces cellules différenciées sont génétiquement identiques aux cellules de patients de départ, et devraient ainsi permettre d'approfondir notre étude de la physiopathologie de la maladie.

I. Intérêt des iPS pour modéliser l'ataxie de Friedreich

Les modèles cellulaires de l'ataxie de Friedreich les plus fidèles seraient constitués par des cellules humaines spécifiquement atteintes dans la maladie et portant de longues expansions $(GAA)_n$ dans le gène de la frataxine, voire éventuellement l'une des mutations ponctuelles retrouvées chez les patients. L'intérêt de tels modèles serait double : permettre de décrypter les mécanismes moléculaires précoces impliqués dans la pathogenèse de l'AF et d'effectuer des criblages pharmacologiques sans a priori vis-à-vis des cibles potentielles des composés testés (gène *FXN*, ARNm, protéine, conséquences biochimiques du déficit en frataxine). Seules des cellules primaires de patients provenant de biopsies des tissus atteints satisfont l'ensemble de ces critères. Cependant, il est difficilement envisageable de prélever sur les patients des neurones sensitifs des DRG, alors que ceux-ci leur font déjà défaut. La réalisation de biopsies de cœur lors d'interventions chirurgicales programmées est toutefois possible, mais les applications de ces cellules sont limitées par la quantité accessible, leur courte survie en culture et l'impossibilité de les amplifier.

Une solution alternative consisterait à générer *in vitro* des cellules neuronales et cardiaques à partir de cellules souches embryonnaires humaines (ES). Or, il n'existe pour l'instant pas de lignées de cellules ES de l'ataxie de Friedreich. En effet, les demandes de diagnostic préimplantatoire (DPI) dans le cadre d'une fécondation *in vitro* (FIV) sont quasiment nulles, car les fratries sont généralement déjà formées lorsque la maladie se déclare au sein d'une famille. Manipuler génétiquement des cellules ES normales est possible, mais l'intégration de la mutation à l'état homozygote dans le gène *FXN* reste techniquement difficile du fait de sa taille et de son caractère répétitif. Bien que l'utilisation de cellules ES pour l'application proposée ici rentrerait dans le cadre de la loi de bioéthique n°2011-814 du 7 juillet 2011, révisée en juillet 2013, l'utilisation de cellules ES en recherche suscite toujours des questions éthiques qui justifient le recours à des solutions alternatives lorsqu'elles existent.

Ces barrières techniques et éthiques peuvent être contournées par la reprogrammation de cellules somatiques de patients, porteuses de la mutation mais non affectées dans la maladie, en cellules pluripotentes induites (iPS) grâce à la surexpression transitoire de facteurs embryonnaires de pluripotence exogènes (*cf intro. point III-B-1-a*) (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). A l'image des cellules ES, les iPS possèdent plusieurs avantages : (1) elles peuvent se renouveler indéfiniment et donc être amplifiées suivant les besoins, (2) leur caractère pluripotent leur permet de se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme, et enfin (3) elles sont génétiquement identiques aux cellules somatiques de départ. Ces atouts sont particulièrement intéressants dans le cas de l'ataxie de Friedreich, où les cellules pluripotentes induites pourraient ainsi permettre de générer des neurones sensitifs et des cardiomyocytes avec de longues expansions $(GAA)_n$, sans que le nombre de répétitions et l'instabilité qui lui est associée ne soient, en principe, un obstacle.

N° d'anonymat des individus	CT136	CT145	FD135	FD141
Taille du (GAA) _n	Contrôle	Contrôle	600/800	400/900
Age	25 ans	55 ans	25 ans	42 ans
Sexe	Femme	Homme	Femme	Femme
Passages (P) des fibroblastes	P10	P4	P11	P6
Durée de la reprogrammation	28-36 jours	34-38 jours	43-60 jours	31-34 jours
Nombre de clones iPS obtenus	8	6	5	18
Numéros des clones iPS validés et utilisés en routine	25, 34	2	30, 33	49, 51, 62

TABLEAU 7 : Caractéristiques des patients (FD)/contrôles (CT) donneurs de fibroblastes et conditions de reprogrammation

Les fibroblastes primaires issus de deux individus contrôles et de deux patientes AF ont été reprogrammés avec succès en iPS par notre laboratoire avant mon arrivée. Ce tableau présente les caractéristiques des individus donneurs (taille des répétitions (GAA), âge, sexe), les conditions de reprogrammation (passage des fibroblastes, durée, nombre de clones obtenus), ainsi que les numéros de clones validés que nous utilisons en routine pour nos expériences.

Date	Référence	Contenu de la publication
Nov. 2010	(Ku et al., 2010) Laboratoires de J. Gottesfeld et M. Napierala, USA	- Obtention et validation d'iPS de patients AF - Etude du comportement de l'expansion (GAA) _n dans les iPS de patients et première approche du mécanisme d'instabilité
Sept. 2011 (en ligne fin déc. 2010)	(Liu et al., 2011) Laboratoires de M. Dottori et A. Pebay, Australie	- Obtention et validation d'iPS de patients AF - Preuve de concept de la capacité des iPS à se différencier en neurones périphériques (sensitifs) et cardiomyocytes
Août 2012	(Du et al., 2012a) Laboratoire de J. Gottesfeld, USA	- Etude du mécanisme d'instabilité de l'expansion (GAA) _n dans les iPS et les précurseurs neuronaux.
Août 2013	(Eigentler et al., 2013) Laboratoire de S. Boesch, Autriche	- Obtention et validation d'iPS de patients AF - Etude de la capacité des iPS de patients AF à se différencier en neurones périphériques (aspect développemental).
Décembre 2013	(Lee et al., 2013) Laboratoire de C-W. Siu, Chine	- Obtention et validation d'iPS d'une patiente AF - Différenciation des iPS en cardiomyocytes - Etude des anomalies spontanées des cardiomyocytes AF et de l'effet de la dérégulation du métabolisme du fer dans ces cellules

TABLEAU 8 : Travaux sur les iPS de patients AF publiés par d'autres équipes

Cinq papiers ont été publiés sur les iPS de patients AF et/ou les cellules différenciées à partir de celles-ci par d'autres équipes travaillant sur l'AF. Ce tableau récapitule les axes d'études développés par ces publications.

II. Contexte et objectifs de mon travail de thèse

A. Point de départ

Le projet iPS du laboratoire a été initié en 2007 par une post-doctorante, Marie Wattenhoffer-Donzé, avec le soutien technique de l'équipe du Dr Stéphanie Viville (IGBMC). A cette époque, la technologie des iPS était très novatrice (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007), ce qui explique que les débuts du projet iPS aient été quelque peu difficiles et tâtonnants. Des lignées iPS ont été dérivées à partir de fibroblastes primaires de deux individus contrôles (CT136 et CT145) et de deux patientes AF homozygotes pour l'expansion (GAA)_n (FD135 et FD141, avec respectivement 600/800 et 400/900 répétitions (GAA)_n) (**tableau 7**). Les données cliniques dont nous disposons indiquent que la patiente FD135 est plus sévèrement atteinte que la patiente FD141, cette dernière ne présentant pas de cardiomyopathie. Plusieurs clones ont été obtenus pour chaque individu, mais seuls certains d'entre eux ont été validés et sont depuis utilisés en routine par notre laboratoire (**tableau 7**).

Dans le cadre du consortium européen EFACTS (*European Friedreich's Ataxia Consortium for Translational Studies*), notre laboratoire a établi une collaboration avec l'équipe de Massimo Pandolfo (*Hôpital Erasme et Université libre de Bruxelles, Belgique*) pour la caractérisation des iPS et leur différenciation. Lors de mon arrivée sur le projet en septembre 2010, les iPS avaient déjà été globalement caractérisées et nos deux équipes travaillaient en parallèle sur leur différenciation en neurones. L'aspect cardiaque du projet n'avait, quant à lui, pas encore été abordé.

B. Travaux sur les iPS de patients AF des autres équipes du domaine

Lorsque j'ai rejoint le projet iPS de notre laboratoire en septembre 2010, quatre autres groupes travaillaient à la modélisation de l'ataxie de Friedreich par les iPS dérivées de patients : les équipes de Joel Gottesfeld (*The Scripps Research Institute, USA*), de Marek Napierala (*University of Texas, USA*), de Mirella Dottori (*University of Melbourne, Australia*) et d'Alice Pebay (*Center for Eye Research Australia and University of Melbourne, Australia*). Les premiers travaux émanant de ces équipes de recherche ont d'ailleurs été publiés au cours du premier trimestre de ma thèse (**tableau 8**) (Ku et al., 2010; Liu et al., 2011). Le dénominateur commun à ces papiers était la reprogrammation avec succès de fibroblastes de patients AF en iPS déficientes en frataxine. Alors que Ku et al. s'intéressaient plutôt au comportement de l'expansion (GAA)_n dans les iPS de patients (Ku et al., 2010), Liu et al. ont montré qu'il était possible de différencier les iPS de patients à la fois en neurones et cardiomyocytes (Liu et al., 2011). Bien qu'assez superficiels, ces deux papiers ont eu le mérite de nous encourager à poursuivre nos efforts dans la différenciation de nos lignées iPS en cellules neuronales et cardiaques, et à nous focaliser sur leur caractérisation physiopathologique. Cet aspect, pourtant indispensable à la preuve de concept de l'utilisation des iPS et de leurs cellules dérivées pour la modélisation de l'AF, avait été largement négligé par ces deux études. Seule une analyse transcriptomique montrait une modification de l'expression de gènes impliqués dans la fonction mitochondriale, la réparation de l'ADN et la réponse aux dommages à l'ADN dans les iPS de patients (Ku et al., 2010).

Depuis ces premiers travaux, le laboratoire de Joel Gottesfeld a étoffé son étude de l'instabilité de l'expansion $(GAA)_n$ dans les iPS de patients AF ainsi que dans leurs dérivés neuronaux, en confirmant l'implication de la machinerie de réparation de l'ADN dans ce processus (Du et al., 2012a). En revanche, aucune avancée des travaux des groupes de Mirella Dottori et d'Alice Pebay sur les aspects neuronaux et cardiaques liés à l'AF ne nous est parvenue depuis leur premier papier. Nous savons depuis quelques temps que trois nouvelles équipes se sont lancées dans la modélisation de l'AF par les iPS et leurs dérivés : l'équipe de Mathilde Girard (*iStem*, France), celle de Sylvia Boesch (*Innsbruck Medical University*, Austria) et celle de Chung-Wah Siu (*University of Hong Kong*, Chine). Le groupe de Sylvia Boesch a publié une étude montrant que les iPS de patients AF avaient la même capacité à se différencier en neurones périphériques sensitifs que les iPS d'individus contrôles, mais que l'augmentation de l'expression de la frataxine observée dans les neurones périphériques précoces dérivés des iPS contrôles n'avait pas lieu dans les iPS AF, suggérant un défaut lors du développement des neurones sensitifs chez les patients AF (Eigentler et al., 2013). Très récemment, le laboratoire de Chung-Wah Siu a, quant à lui, proposé une étude sur l'effet de la dérégulation du métabolisme du fer dans les cardiomyocytes de patients AF (Lee et al., 2013). Je reviendrai sur cette publication plus longuement dans ma discussion (*voir discussion point II-C*).

Nos travaux issus de la collaboration avec l'équipe de Massimo Pandolfo ont donné lieu à une publication regroupant la reprogrammation de fibroblastes en iPS, leur différenciation en neurones et en cardiomyocytes ainsi qu'une première étude du phénotype de ces cellules différenciées (Hick et al., 2013). L'aspect cardiaque de ce travail dont je me suis occupé sera davantage détaillé ci-après, au point II-D pour l'organisation de mon travail et aux points III et IV pour l'aspect scientifique.

C. Problématique et questions posées

La problématique générale du projet iPS développé au laboratoire consiste à déterminer si les iPS de patients et/ou les cellules différenciées, types neurones et cardiomyocytes, constituent réellement un bon modèle cellulaire de l'ataxie de Friedreich. La définition d'un « bon » modèle cellulaire prend en compte non seulement la reproduction fidèle de la physiopathologie de la maladie dans un laps de temps raisonnable, mais aussi des aspects plus techniques comme la facilité de gestion des cellules en culture ainsi que la simplicité, l'efficacité et la reproductibilité des protocoles de différenciation à mettre en œuvre pour obtenir ces cellules, tout cela avec un coût de revient réduit. L'enjeu de ce projet étant notamment d'en apprendre davantage sur la physiopathologie précoce de la maladie et de déterminer si à terme, il serait possible et judicieux d'utiliser ces modèles cellulaires dans des criblages pharmacologiques.

Comme mentionné précédemment, mon travail de thèse s'est focalisé sur l'aspect cardiaque du projet iPS. Trois questions ont guidé mon travail : (1) Comment différencier nos lignées iPS en cellules cardiaques de façon efficace et reproductible ? (2) Les cellules différenciées conservent-elles les caractéristiques moléculaires de l'ataxie de Friedreich (en particulier, l'expansion $(GAA)_n$ et le taux

1^{ERE} PARTIE : septembre 2010 à décembre 2011

Etapes	Enjeux	Problèmes rencontrés
Obtention de cardiomyocytes	- Trouver un protocole compatible avec nos iPS	Clones réfractaires et efficacité différente suivant le clone
	- Produire une quantité suffisante de CM pour débiter des analyses	
Culture des cardiomyocytes produits	- Maintenir les CM en culture suffisamment longtemps pour voir l'apparition d'un phénotype	Prolifération des cellules mitotiques (type fibroblastes) aux dépens des CM qui sont post-mitotiques
Caractérisation des cardiomyocytes	Etudier la fonctionnalité et les caractéristiques structurales et moléculaires des CM	<ul style="list-style-type: none"> - La quantité de CM produits est très limitante - Pas de CM de la patiente FD135 (car tendance à la différenciation spontanée, échec du protocole de différenciation)
	Vérifier le maintien des caractéristiques moléculaires de l'AF (expansion (GAA) _n et déficit en frataxine)	
	Chercher les manifestations d'un phénotype typique de l'AF	



TRANSITION : novembre 2011-janvier 2012

Etapes	Enjeux	Problèmes rencontrés
Publication des résultats obtenus	- Etre les premiers à se positionner sur l'aspect « étude physiopathologique des neurones et cardiomyocytes dérivant des iPS de patients AF »	/
Changement des conditions de culture de nos iPS	<ul style="list-style-type: none"> - Stabiliser l'état des iPS en culture (réduire l'impact des lots) - Améliorer la reproductibilité des protocoles de différenciation 	- Les iPS cultivées sur Matrigel™ ne répondent plus au protocole de différenciation cardiaque utilisé jusqu'à présent



2^E PARTIE : janvier 2012 à juillet 2013

Etapes	Enjeux	Problèmes rencontrés
Obtention de cardiomyocytes	Développer un nouveau protocole permettant :	<ul style="list-style-type: none"> - La culture des iPS sur Matrigel™ a accentué les différences de « caractère » entre les clones - L'efficacité de différenciation reste dépendante du clone iPS de départ et de son état de pluripotence
	<ul style="list-style-type: none"> - D'augmenter significativement le rendement de production des CM - D'obtenir des CM à partir de toutes nos lignées iPS utilisées en routine - De réduire la durée nécessaire à l'obtention des cardiomyocytes 	
Culture des cardiomyocytes produits	- Sélectionner/enrichir les CM pour limiter la prolifération des cellules non cardiaques contaminantes	<ul style="list-style-type: none"> - Arriver à dissocier les CM - Trouver une méthode de sélection adaptée
	Accélérer la maturation des CM en culture (phénotype plus précoce ?)	Considération émergente dans le domaine, mais reste peu connue
Caractérisation des cardiomyocytes	Etudier les phénotypes biochimiques et mitochondriaux des CM.	<ul style="list-style-type: none"> - La quantité de CM produits n'est pas toujours suffisante - Désynchronisation de la culture des iPS et donc des CM qui en résultent
	Etudier le comportement de l'expansion (GAA) _n dans les CM en culture	- Sensibilité de la PCR

TABLEAU 9 : Démarche entreprise lors de ma thèse

iPS : cellules pluripotentes induites, CM : cardiomyocytes, AF : Ataxie de Friedreich.

réduit en frataxine) ? (3) Ces cellules présentent-elles des anomalies déjà identifiées dans les tissus de patients AF (telles qu'une atteinte mitochondriale ou un déficit d'activité des enzymes Fe-S) ?

D. Mon cheminement

Mon travail de thèse peut se décomposer en trois parties étroitement liées : (1) la mise au point de protocoles de différenciation cardiaque, (2) la production « massive » des cardiomyocytes et enfin (3) leur caractérisation.

Pour obtenir des cardiomyocytes je me suis basée sur des protocoles publiés dans la littérature, car nous ne disposions pas d'une expertise dans ce domaine au sein du laboratoire, ni dans l'institut, ni parmi nos collaborateurs. Le premier protocole que j'ai utilisé m'a permis d'obtenir des cellules cardiaques en quantité suffisante pour réaliser une première série de caractérisations moléculaires et cellulaires qui ont fait l'objet d'une partie dans le papier que nous avons publié (**tableau 9, 1^{ère} partie**) (Hick et al., 2013). A ma grande surprise, ce protocole s'est révélé être incompatible avec les nouvelles conditions de culture des iPS que nous avons adoptées à mi-parcours de ma thèse (**tableau 9, transition**). Cet imprévu m'a contrainte à mettre au point un nouveau protocole et donc à répéter l'ensemble du processus (**tableau 9, 2^e partie**). Par chance, la connaissance des iPS et les méthodes de différenciation s'étaient beaucoup développées depuis le début de ma thèse et j'ai pu rebondir assez rapidement. Je dispose aujourd'hui d'un protocole de différenciation cardiaque avec un bien meilleur rendement qui m'a permis de poursuivre la caractérisation des cardiomyocytes de patients AF (*voir résultats point IV*).

Les enjeux de mon travail ainsi que les problèmes que j'ai pu rencontrer à chaque étape sont répertoriés dans le **tableau 9** et seront approfondis tout au long des chapitres résultats et discussion.

Stratégies	Délai	Efficacité	Coût	Améliorations
(1) Formation d'EB	3 semaines	Faible (<1%)	Faible	- Traitement avec des facteurs cardiogéniques (Wang et al., 2010)
(2) Co-culture avec des cellules de souris END-2	12 jours	Moyenne (10-20%)	Moyen	- Suppression du sérum (Passier et al., 2005) et de l'insuline (Freund et al., 2008) du milieu de culture - Traitement avec un inhibiteur de la p38-MAPK (Graichen et al., 2008)
(3) Culture sur une matrice extracellulaire et traitement par des facteurs cardiogéniques	12 jours	Bonne (30-50%)	Elevé	- Balisage plus précis du processus différenciation (Yang et al., 2008) - Orientation vers un sous-type de cardiomyocytes (ex : ventriculaires) (Zhang et al., 2011)

TABLEAU 10 : Comparaison des stratégies de différenciation des ES/iPS humaines en cardiomyocytes
 EB : Embryoid Bodies, END-2 : mouse visceral ENDoderm-like cells, MAPK : Mitogen-Associated Protein Kinase.

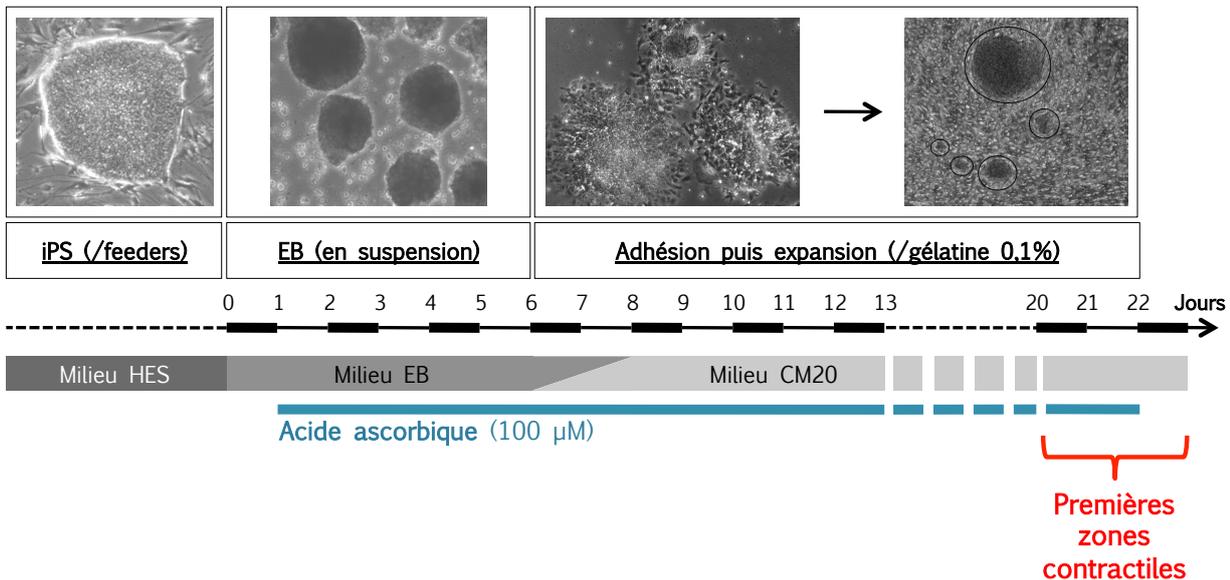


FIGURE 16 : Protocole de différenciation cardiaque (adapté de (Wang et al., 2010))

Des colonies d'iPS âgées de 7 jours sont récupérées, légèrement dissociées, puis placées en suspension pour former des EB. Le traitement à l'acide ascorbique (100 µM) débute le lendemain de la mise en suspension, et est maintenu jusqu'à la découverte des premières zones contractiles. Après 6 jours en suspension, les EB sont transférés dans des boîtes de culture recouvertes de gélatine (0,1%), ce qui leur permet d'adhérer et de poursuivre leur différenciation. Les zones contractiles (entourées) apparaissent autour du 21^e jour de différenciation. La composition des milieux utilisés est indiquée dans l'annexe 3.

CM : CardioMyocytes, EB : Embryoid Bodies, HES : Human Embryonic Stem cells, iPS : Induced Pluripotent Stem cells

III. [Manuscrit : « Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia »](#) (Hick et al., 2013)

A. Démarche expérimentale

Du fait de la proximité avérée des cellules ES et des iPS (voir intro. point III-C), j'ai considéré que les données issues des travaux réalisés sur les cellules ES étaient transposables aux iPS.

1- Choix d'une stratégie de différenciation cardiaque

De nombreux protocoles pour la différenciation des cellules ES/iPS en cardiomyocytes étaient déjà disponibles dans la littérature lorsque j'ai débuté ma thèse en 2010 (voir la revue de (Vidarsson et al., 2010)). Les trois stratégies de différenciation les plus populaires consistaient en (1) une différenciation spontanée via la formation de corps embryoïdes (EB, pour « embryoid bodies » en anglais) (Kehat et al., 2001), (2) une co-culture des cellules ES avec des cellules endodermiques de souris (cellules END-2) (Mummery et al., 2003) et enfin, (3) un traitement avec différents facteurs de croissance aux propriétés cardiogéniques (Laflamme et al., 2007) (**tableau 10**).

Pour obtenir les cardiomyocytes à partir de nos iPS, j'ai opté dans un premier temps pour une différenciation indirecte, via la formation d'EB. Cette méthode était alors la plus fréquemment utilisée dans le domaine, malgré une reproductibilité assez aléatoire et un rendement plutôt faible (Kehat et al., 2001; Zhang et al., 2009). Pour accroître ce dernier, j'ai combiné la formation des EB à un traitement à l'acide ascorbique, à l'image du protocole de Wang et al. (**figure 16**) (Wang et al., 2010). L'avantage de cette stratégie est sa simplicité.

2- Utilité des corps embryoïdes (EB, pour *embryoid bodies* en anglais)

Les corps embryoïdes (EB) sont des structures plus ou moins sphériques obtenues par agrégation de cellules pluripotentes et qui miment *in vitro* le développement embryonnaire précoce, en particulier les stades correspondant à l'implantation du blastocyste dans l'utérus et à la gastrulation (formation des trois feuilletts embryonnaires). Ces aspects ont été largement étudiés sur des EB formés à partir de cellules ES de souris et ont ensuite été confirmés chez l'homme (**figure 17-B**) (voir la revue de (Weitzer, 2006)).

Au départ, les cellules ES proviennent de la mise en culture des cellules de la masse interne du blastocyste. Par analogie, on peut considérer que les iPS sont proches de ce stade du développement embryonnaire. La méthode classique pour générer des EB *in vitro* consiste à dissocier partiellement des colonies d'ES/iPS humaines en combinant un traitement enzymatique à une action mécanique, puis à placer les fragments en suspension dans un milieu avec sérum, mais sans bFGF. En l'espace de quelques heures, les cellules s'organisent en structures compactes aux limites bien définies que sont les EB. La morphologie des EB évolue au cours du temps, passant du stade d'EB qualifié de simples, car compactes et uniformes, au stade d'EB cystiques, possédant des cavités

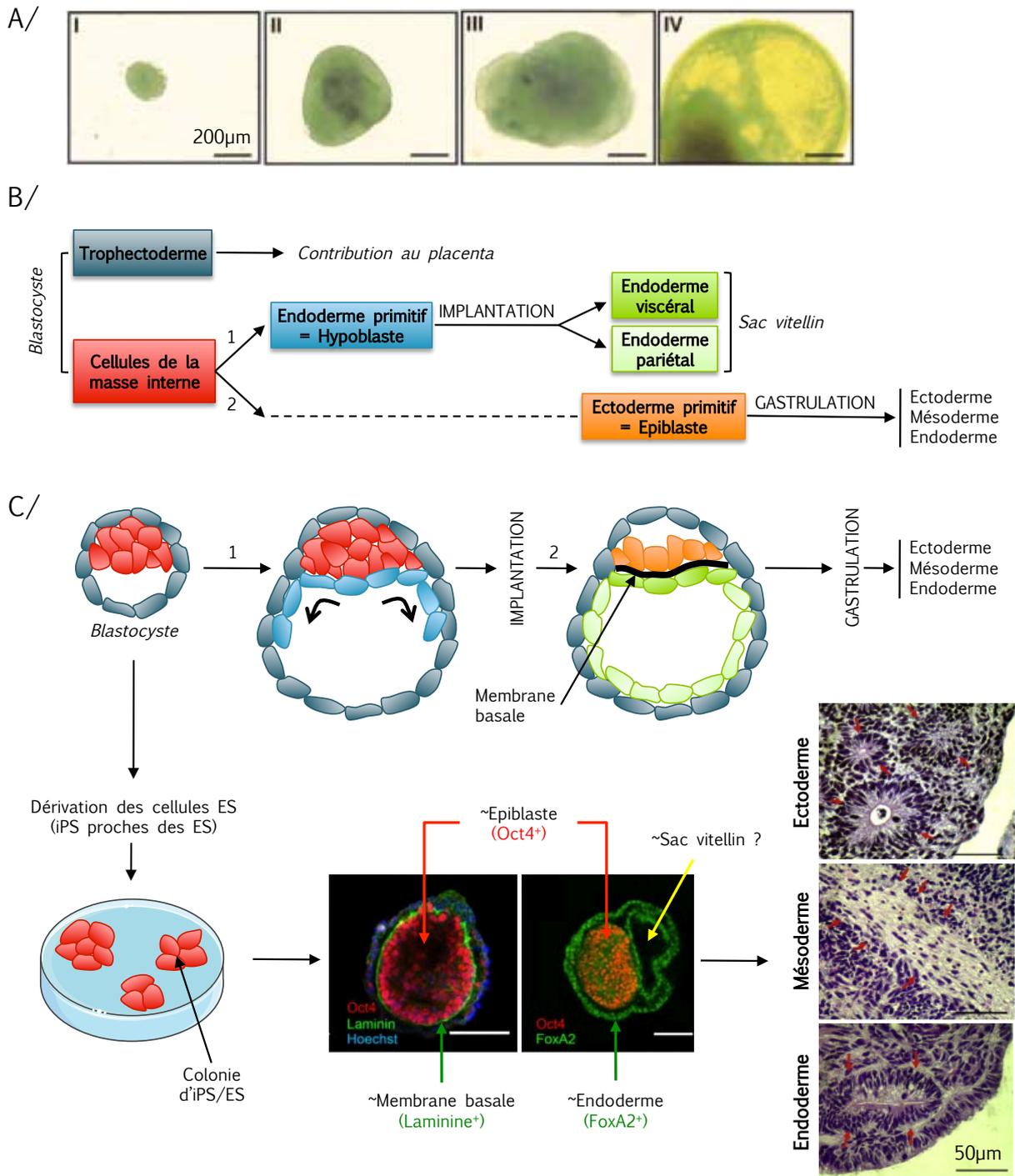


FIGURE 17 : Parallèle entre le développement embryonnaire précoce et celui des EB *in vitro*

A/ Evolution des EB au cours du temps : I – EB à 3 jours, morphologie compacte ; II et III – EB à 7 et 10 jours respectivement, présentant des formations de cavités en périphérie, IV – EB à 14 jours, dit « cystique » du fait de l’accumulation de liquide dans les cavités (photos issues de (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000)).

B/ Etapes du développement embryonnaire du stade blastocyste à la gastrulation. Ce schéma détaille le code couleur utilisé en C/.

C/ Parallèle entre le développement embryonnaire et la différenciation des cellules ES/iPS *in vitro* via la formation d’EB Immunofluorescences sur les EB sont issues de (Ungrin *et al.*, 2008) et colorations histologiques montrant des structures des 3 feuillets embryonnaires : rosettes (ectoderme), tissu conjonctif (mésoderme) et épithélium intestinal (endoderme) proviennent de (Abraham *et al.*, 2010)).

remplies de liquides, et évoquant la formation du sac vitellin lors du développement embryonnaire (**figure 17-A**) (Itskovitz-Eldor et al., 2000). L'analyse spatio-temporelle de l'expression de marqueurs du développement embryonnaire dans les EB a permis de mieux caractériser les événements qui s'y déroulent. Ainsi, on retrouve dans des EB de 3 à 7 jours une organisation équivalente au stade implantatoire : une couche périphérique de cellules endodermiques (caractérisées par les marqueurs FoxA2 et la E-cadhérine) sécrète une membrane basale, principalement composée de laminine et de collagène IV, au contact de cellules pluripotentes (exprimant Oct4) qui pourraient être l'équivalent de l'épiblaste de l'embryon (**figure 17-B,C**) (Conley et al., 2004; Sachlos and Auguste, 2008; Ungrin et al., 2008). Le processus de gastrulation, correspondant à la formation des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) par mouvement et différenciation de cellules de l'épiblaste, n'a pas encore pu être mis en évidence en tant que tel dans les EB. En revanche, l'expression de marqueurs spécifiques (α -foetoprotéine (endoderme), ζ -globine (mésoderme) et neurofilament 68Kd (ectoderme)) associée à la présence de structures différenciées dérivant de chacun de ces feuillets (épithélium intestinal (endoderme), tissu conjonctif fibreux (mésoderme) et rosettes neurales (ectoderme)), suggèrent fortement que les EB passent par un stade comparable à la gastrulation (**figure 17-C**) (Abraham et al., 2010; ten Berge et al., 2008; Itskovitz-Eldor et al., 2000). Les cellules différenciées du même type sont généralement regroupées en amas, suggérant qu'elles proviennent de la division clonale d'un même progéniteur ou qu'elles sont originaires de cellules pluripotentes adjacentes qui auraient reçues les mêmes signaux et se seraient donc différenciées de la même façon (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Des travaux plus récents sur les tératomes (Blum and Benvenisty, 2007) et les EB (Ungrin et al., 2008) sont en faveur de la seconde hypothèse et renforcent l'idée d'un contrôle spatio-temporel de la différenciation au sein des EB, à l'image de l'embryon. Il est cependant difficile de dater précisément les modifications qui se produisent au sein des EB, car les publications se focalisent généralement sur une étape et ne considèrent pas l'ensemble du processus. Enfin, on ne peut pas exclure que la lignée de cellules ES/iPS et la méthode de formation des EB utilisées aient une influence sur le déroulement de ces étapes.

Sachant que dans l'embryon, la cardiogenèse au niveau du mésoderme est régulée par la coordination de signaux inductifs émanant de l'endoderme voisin et de signaux inhibiteurs provenant de la crête neurale (ectoderme), les EB apparaissent donc être un outil intéressant pour produire des cardiomyocytes *in vitro*. Malgré cela, le rendement des protocoles de différenciation cardiaque utilisant seulement le stade EB est très faible (**tableau 10**). Tout l'enjeu était alors de biaiser le système de façon à favoriser la production de cardiomyocytes au sein des EB aux dépens des autres types cellulaires. Pour cela, j'ai testé plusieurs protocoles de différenciation par EB promettant une augmentation du rendement par l'ajout de certains composés dans le milieu de culture, comme la 5-aza-2'-desoxycytidine (agent déméthylant) (Wang et al., 2010; Xu et al., 2002), l'acide ascorbique (vitamine C) (Wang et al., 2010) ou encore la combinaison des facteurs BMP4/IWR-1 (Ren et al., 2011). Seul le traitement des EB à l'acide ascorbique m'a permis d'obtenir des cardiomyocytes à partir des iPS. L'effet cardiogénique de l'acide ascorbique sera explicité ci-après (*voir résultats point III-A-3*).

L'un des challenges majeurs des protocoles de différenciation par la formation d'EB est leur reproductibilité. En effet, la méthode classique de production des EB citée ci-dessus est fortement dépendante de l'expérimentateur et génère des EB de taille variable (100-400 µm de diamètre) avec des rendements qui le sont tout autant. Or la taille des EB influence non seulement la diffusion des facteurs du milieu et de l'oxygène au sein des EB, mais aussi le ratio « cellules pluripotentes/couche d'endoderme périphérique » et donc potentiellement le profil de différenciation des cellules au sein des EB. Ainsi, les EB de 200 à 300 µm de diamètre seraient les plus propices à la différenciation cardiaque (Bauwens et al., 2008; Mohr et al., 2006). Le calibrage de la taille des EB peut se faire en contrôlant la taille des colonies d'ES/iPS de départ (Bauwens et al., 2008; Mohr et al., 2006) ou directement le nombre de cellules constituant chaque EB (Burrige et al., 2007). Ces approches ne sont malheureusement pas à la portée de tous, car elles requièrent la maîtrise de technologies utilisant des biomatériaux et/ou l'achat de consommables particulièrement onéreux.

La reproduction de certains aspects du développement embryonnaire précoce et leur simplicité d'obtention expliquaient, l'utilisation privilégiée des EB pour différencier les cellules ES/iPS lorsque j'ai débuté ma thèse. Cette technique n'est quasiment plus utilisée aujourd'hui dans le domaine à cause de son faible rendement et de son manque de reproductibilité.

3- Rôles de l'acide ascorbique (AA)

L'acide ascorbique (C₆H₈O₆) (AA) est une vitamine hydrosoluble aux multiples propriétés, dont la plus connue est probablement son activité anti-oxydante. L'AA est aussi un cofacteur clé d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du collagène, des corticostéroïdes, de la carnitine, des catécholamines (dopamine, norépinephrine et épinéphrine) et dans l'hydroxylation aromatique (voir revues (Arrigoni and De Tullio, 2002; Du et al., 2012b)).

Son pouvoir cardiogénique a été identifié en 2003 suite au criblage de 880 molécules pour leur capacité à induire la différenciation cardiaque de cellules ES de souris (Takahashi et al., 2003). D'autres anti-oxydants ont été testés (N-acétylcystéine, Tiron, vitamine E, vitamine B1), mais aucun d'entre eux n'a pu induire de cardiogenèse, suggérant que le pouvoir cardiogénique de l'AA n'est pas lié à ses propriétés anti-oxydantes (Cao et al., 2011; Sato et al., 2006; Takahashi et al., 2003). L'AA est souvent utilisé dans les protocoles de différenciation des cellules ES en cardiomyocytes, sans que son intérêt ne soit expliqué (Burrige et al., 2011; Kattman et al., 2011; Wang et al., 2010; Yang et al., 2008). Seules quelques rares études se sont réellement penchées sur le mécanisme par lequel l'AA favorisait la différenciation cardiaque, en utilisant principalement des ES de souris comme modèle d'étude. Deux théories non exclusives ont ainsi pu être proposées : (1) un effet de l'AA sur la synthèse du collagène (Cao et al., 2011; Sato et al., 2006) et (2) un effet pro-oxydant (Bartsch et al., 2011; Crespo et al., 2010). Quel que soit le rôle de l'acide ascorbique défendu par ces travaux, il ressort à chaque fois que sa fenêtre d'efficacité se situe au début du processus de différenciation (Bartsch et al., 2011; Cao et al., 2011; Sato et al., 2006) et plus particulièrement au stade des progéniteurs cardiaques (Cao et al., 2011)

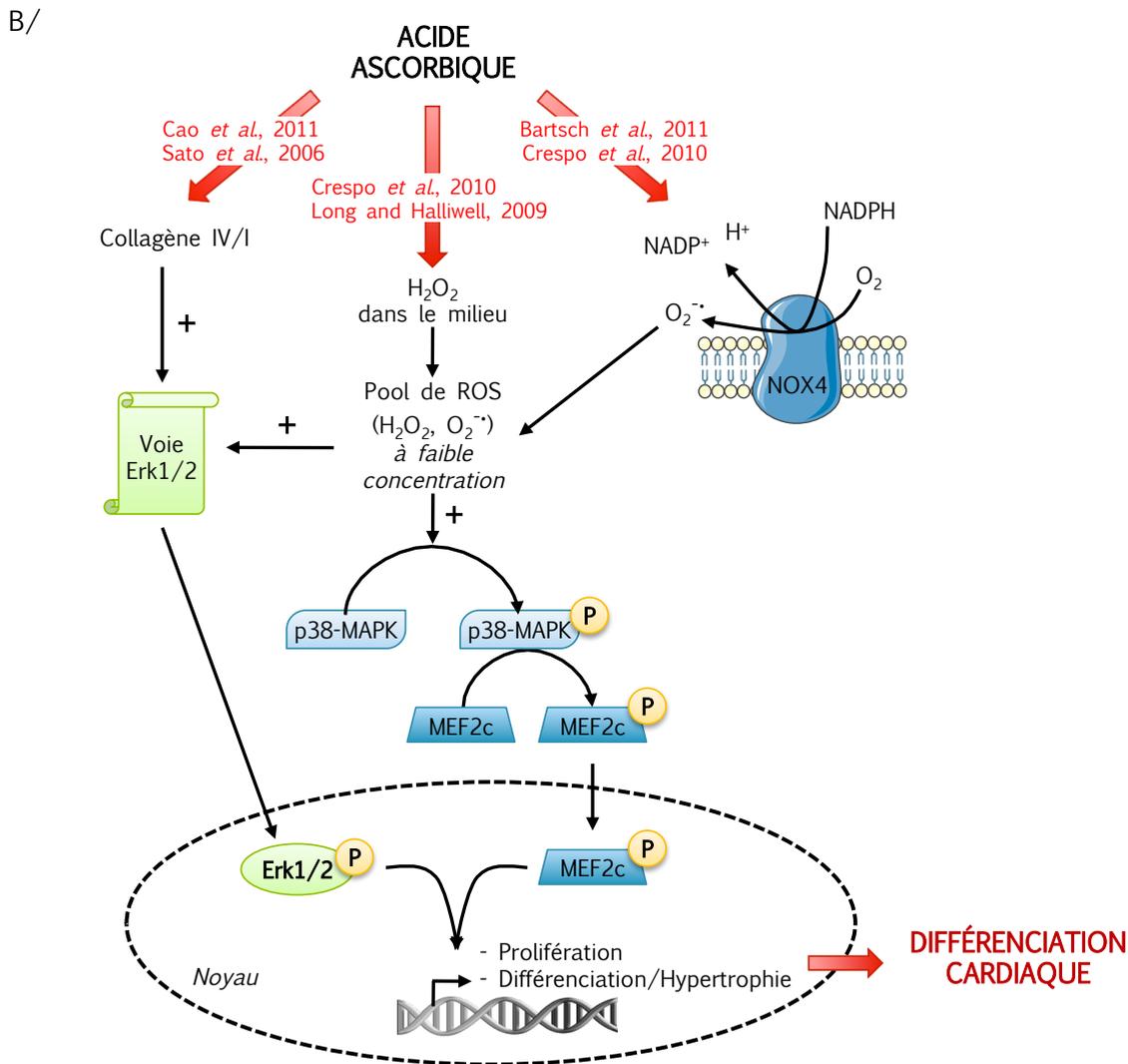
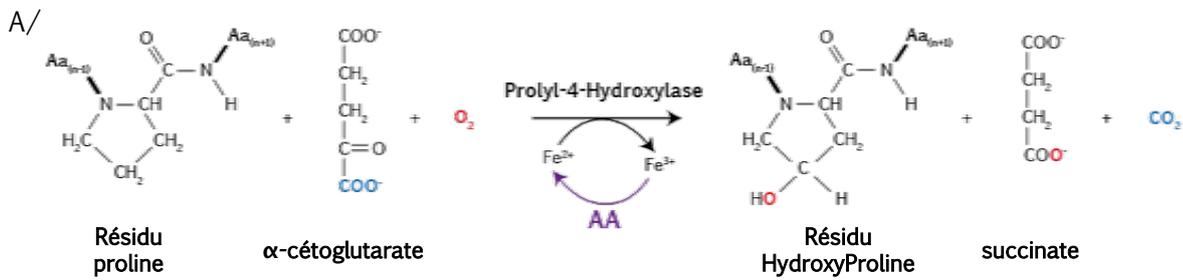


FIGURE 18 : Rôles de l'acide ascorbique

A/ Modification des résidus Proline du procollagène catalysée par la Prolyl-4-hydroxylase et utilité de l'AA pour la réduction du Fe^{3+} et la réactivation de l'enzyme.

B/ Mécanisme de l'effet cardiogénique de l'AA, proposé par (Bartsch *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2011; Crespo *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2006) et complété d'après (Li *et al.*, 2006; Sauer and Wartenberg, 2005). L'AA active la synthèse de collagène (régulation transcriptionnelle), entraînant l'activation de la voie ERK1/2. En parallèle, l'AA peut générer des ROS, soit par réaction avec des composants du milieu, soit par activation de la NADPH oxydase 4. Les ROS ainsi produits inhiberaient certaines phosphatases, impliquant une augmentation de la phosphorylation d'un certain nombre de leurs substrats, tels que les membres de la voie ERK1/2 ou encore la p38-MAPK. La p38-MAPK phosphoryle à son tour le facteur de transcription MEF2c. ERK1/2 et MEF2c ainsi activés par phosphorylation sont transloqués dans le noyau où ils activent la transcription de gènes conduisant à la prolifération des progéniteurs cardiaques, puis à leur différenciation/hypertrophie.

AA : Acide Ascorbique, Aa : Acide aminé, ERK1/2 : Extracellular signal Regulated Kinase $\frac{1}{2}$, MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase, MEF2c : Myocyte Enhancer Factor 2c, NOX4 : NADPH Oxydase 4, P : groupement phosphate, ROS : Reactive Oxygen Species.

Acide ascorbique, synthèse de collagène et différenciation

Le collagène est un composant essentiel de la matrice extracellulaire (MEC), dont la biosynthèse est un processus complexe qui débute au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), fait étape par le Golgi et se termine dans l'espace extracellulaire. Les modifications co- et post-traductionnelles des chaînes de procollagène, en particulier l'hydroxylation du carbone 4 des résidus Proline par la Prolyl-4-Hydroxylase (P4H, EC1.14.11.2), sont indispensables à l'acquisition de la conformation fibrillaire du collagène, à sa stabilité et à sa sécrétion. La P4H utilise l'oxygène, l' α -cétoglutarate et du fer(II) pour hydroxyler les résidus Proline (**figure 18-A**) (Corres and Raines, 2010). L'acide ascorbique, quant à lui, sert à maintenir le fer à l'état réduit (Fe^{2+}), garantissant ainsi le bon fonctionnement de la P4H (Du et al., 2012b; England and Seifert, 1986).

La MEC de chaque organe se distingue par sa composition. La MEC cardiaque se caractérise notamment par la présence de collagène de types I, III et IV. Alors que le collagène de types I et III est principalement synthétisé par les fibroblastes cardiaques, le collagène de type IV est produit à la fois par les cardiomyocytes et par les fibroblastes cardiaques (Eghbali et al., 1989). Cao et al. ont montré que le traitement à l'AA d'EB formés à partir d'ES de souris entraînait une augmentation de l'expression des gènes *Col1a1* et *Col4a1*, codant respectivement pour le collagène de types I et IV (Cao et al., 2011). La même observation a été faite récemment sur des fibroblastes humains en culture (Kishimoto et al., 2013). Les travaux publiés jusqu'à présent ne permettent pas de savoir sur quel(s) type(s) cellulaire(s) au sein des EB s'exerce réellement la stimulation de la synthèse du collagène par l'acide ascorbique. Il semblerait que l'important soit surtout la présence de collagène au contact des cellules en différenciation. En effet, l'utilisation d'analogues de la proline (L-2-Azétidine Carboxylic acid ou AzC, cis-4-hydroxy-D-proline ou CIS), qui une fois intégrés dans les chaînes naissantes de collagène, empêchent leur maturation et donc leur sécrétion, inhibent la différenciation cardiaque de cellules ES de souris, en présence, comme en absence d'AA (Cao et al., 2011; Sato et al., 2006). Le collagène extracellulaire aurait pour effet d'activer spécifiquement la voie de signalisation MEK-ERK1/2 dans les progéniteurs cardiaques, entraînant leur prolifération et donc l'augmentation de la quantité finale de cardiomyocytes (Cao et al., 2011).

Considérant le rôle majeur de l'AA en tant que cofacteur de la P4H, on aurait pu s'attendre à ce que l'effet cardiogénique de l'AA soit une conséquence directe de son rôle de cofacteur dans la maturation du collagène. Bien qu'aucune étude n'ait posé la question d'un quelconque effet dose de l'acide ascorbique sur l'activité de la P4H, on ne peut écarter la possibilité que l'acide ascorbique augmente non seulement l'expression des gènes codant pour le collagène, mais facilite aussi la maturation du collagène et donc sa sécrétion. Il faut cependant noter qu'un tel effet sur la maturation du collagène a d'ores et déjà été écarté pour les fibroblastes (Murad et al., 1981).

Acide ascorbique, ROS et différenciation

Lors des étapes du développement embryonnaire précédant l'implantation utérine, le blastocyste évolue dans un environnement hypoxique. Les cellules ES, qui dérivent de ce stade, ont gardé un métabolisme majoritairement anaérobie, se caractérisant notamment par des mitochondries peu nombreuses et de morphologie immature (rondes, matrice claire, peu de crêtes)

(Cho et al., 2006; Oh et al., 2005). La poursuite du développement par la différenciation progressive des cellules nécessite un switch énergétique avec la mise en place d'un métabolisme aérobie, afin de répondre à l'augmentation des besoins en ATP des cellules. Cette transition est rendue possible par le développement du placenta et la mise en place de la circulation sanguine, véhiculant notamment l'oxygène jusqu'à l'embryon. Outre une synthèse massive d'ATP, l'activation de la respiration mitochondriale s'accompagne de la production annexe de ROS. Il s'agit ici de faibles variations de la concentration des ROS qui servent de messagers intracellulaires sans pour autant endommager les cellules.

Ces ROS sont particulièrement importants pour la cardiogenèse, puisque le traitement précoce des cellules ES en différenciation avec des anti-oxydants réduit nettement la formation des zones contractiles au sein des EB (Buggisch et al., 2007; Crespo et al., 2010; Li et al., 2006). A l'inverse, l'exposition des EB à du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , nM) favorise la différenciation cardiaque (Buggisch et al., 2007; Li et al., 2006). De façon intéressante, l'ajout d'AA dans du milieu de culture entraîne la production de H_2O_2 , et cela indépendamment de la présence de cellules : l'ion ascorbate réagirait avec un ou des composants du milieu, probablement des métaux catalytiques du type Fe^{3+} pour former de l' H_2O_2 (Crespo et al., 2010; Long and Halliwell, 2009). Outre la production d' H_2O_2 directement dans le milieu, l'AA entraînerait aussi une augmentation de l'expression de NOX4, une NADPH oxydase qui produit des ROS intracellulaires à partir de l'oxygène (Bartsch et al., 2011), ce qui pourrait amplifier le système.

Le schéma B de la figure 18 résume les effets identifiés de l'AA sur la cardiogenèse et précise les voies de signalisation impliquées. L'efficacité de l'AA dans la différenciation cardiaque pourrait s'expliquer par un effet pléiotrope, illustrant que les deux hypothèses proposées quant à son mode d'action sont convergentes et complémentaires.

B. Résultats

L'ensemble des travaux réalisés sur les iPS AF et leurs dérivés neuronaux et cardiaques jusqu'à fin 2011 ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Disease Models & Mechanisms » (DMM) en janvier 2013 : **Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia** (Hick et al., 2013).

L'article est organisé en 4 parties :

- (1) La dérivation et la caractérisation des iPS : travaux réalisés par Marie Wattenhoffer-Donzé et Nadège Vaucamps, avec l'appui de l'équipe de Stéphane Viville (IGBMC).
- (2) La différenciation des iPS en neurones et leur caractérisation : travaux effectués par Satyan Chintawar (équipe de Massimo Pandolfo, Université libre de Bruxelles, Belgique).
- (3) La différenciation des iPS en cardiomyocytes et leur caractérisation : fruit des travaux que j'ai menés au cours de ma première année de thèse.
- (4) L'étude de l'instabilité de l'expansion GAA dans les iPS et au cours de la différenciation : travaux principalement réalisés par Marie Wattenhoffer-Donzé, avec l'expertise de l'équipe de

Christopher Pearson (Université de Toronto, Canada). J'y ai contribué pour ce qui concerne la taille du GAA dans les EB.

Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia

Aurore Hick^{1,2,3,4,5,*}, Marie Wattenhofer-Donzé^{1,2,3,4,5,*}, Satyan Chintawar^{6,*}, Philippe Tropel^{2,3,4,7,†}, Jodie P. Simard⁸, Nadège Vaucamps^{1,2,3,4,5}, David Gall⁹, Laurie Lambot⁹, Cécile André^{2,3,4,7}, Laurence Reutenauer^{1,2,3,4,5}, Myriam Raj⁶, Marius Teletin^{2,3,4,7}, Nadia Messaddeq^{1,2,3,4,5}, Serge N. Schiffmann⁹, Stéphane Viville^{2,3,4,7}, Christopher E. Pearson^{8,10}, Massimo Pandolfo^{6,11,§} and Hélène Puccio^{1,2,3,4,5,§}

SUMMARY

Friedreich's ataxia (FRDA) is a recessive neurodegenerative disorder commonly associated with hypertrophic cardiomyopathy. FRDA is due to expanded GAA repeats within the first intron of the gene encoding frataxin, a conserved mitochondrial protein involved in iron-sulphur cluster biosynthesis. This mutation leads to partial gene silencing and substantial reduction of the frataxin level. To overcome limitations of current cellular models of FRDA, we derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) from two FRDA patients and successfully differentiated them into neurons and cardiomyocytes, two affected cell types in FRDA. All FRDA iPSC lines displayed expanded GAA alleles prone to high instability and decreased levels of frataxin, but no biochemical phenotype was observed. Interestingly, both FRDA iPSC-derived neurons and cardiomyocytes exhibited signs of impaired mitochondrial function, with decreased mitochondrial membrane potential and progressive mitochondrial degeneration, respectively. Our data show for the first time that FRDA iPSCs and their neuronal and cardiac derivatives represent promising models for the study of mitochondrial damage and GAA expansion instability in FRDA.

INTRODUCTION

Friedreich's ataxia (FRDA), the most prevalent hereditary ataxia in Caucasians, is a multisystem autosomal recessive disorder with neurological and cardiac involvement dominating the clinical picture (Pandolfo, 2009). Atrophy of sensory and cerebellar pathways causes ataxia, dysarthria, fixation instability, deep sensory loss and loss of tendon reflexes (Pandolfo, 2009). Cardiac

dysfunction leading to congestive heart failure and arrhythmias is the cause of death in 59% of FRDA patients (Tsou et al., 2011). About 10% of FRDA patients develop diabetes, but insulin resistance and β -cell dysfunction are very common (Cnop et al., 2012).

FRDA is caused by reduced expression of the mitochondrial protein, frataxin (Campuzano et al., 1997). Most individuals with FRDA are homozygous for a GAA triplet repeat expansion within the first intron of the frataxin (*FXN*) gene (Campuzano et al., 1996), which leads to partial silencing of *FXN* transcription through epigenetic mechanisms (Saveliev et al., 2003). Normal chromosomes contain up to 40 GAA repeats, whereas disease-associated alleles contain 100–1000 GAA repeats (Campuzano et al., 1996). Patients have between 5 and 35% of the frataxin levels in healthy individuals, whereas asymptomatic heterozygous subjects have >50% (Campuzano et al., 1997; Deutsch et al., 2010). The GAA repeat expansions are dynamic and exhibit both intergenerational and somatic instability (De Biase et al., 2007; Monrós et al., 1997). Progressive somatic expansion in a subset of tissues could play an important role in disease progression (Clark et al., 2007). However, the molecular mechanisms underlying GAA repeat instability are currently unknown.

Although the function of frataxin is still under investigation, available evidence supports a role as an activator of iron-sulphur (Fe-S) cluster biogenesis in mitochondria (Schmucker et al., 2011; Tsai and Barondeau, 2010). Fe-S clusters are essential prosthetic groups for many proteins with a variety of functions and subcellular localisations (Lill, 2009; Ye and Rouault, 2010). Frataxin deficiency leads to impairment of Fe-S cluster-containing proteins, altered cellular iron metabolism, mitochondrial dysfunction and increased sensitivity to oxidative stress (Schmucker and Puccio, 2010), but

¹Translational Medicine and Neurogenetics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 67404 Illkirch, France

²INSERM, U596, 67404 Illkirch, France

³CNRS, UMR7104, 67404 Illkirch, France

⁴Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

⁵Collège de France, Chaire de génétique humaine, 67404 Illkirch, France

⁶Laboratoire de Neurologie Expérimentale, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, Belgium

⁷Development and Stem Cells, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 67404 Illkirch, France

⁸Program of Genetics and Genome Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, M5G 1L7, Canada

⁹Laboratoire de Neurophysiologie, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Brussels, Belgium

¹⁰Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON, M5G 1L7, Canada

¹¹Service de Neurologie, Hôpital Erasme, 1070 Brussels, Belgium

*These authors should be regarded as joint first authors

[†]Present address: Aix-Marseille Université, INSERM UMR 910, Faculté de Médecine Timone, 13385, Marseille, France

[§]Authors for correspondence (massimo.pandolfo@ulb.ac.be; hpuccio@igbmc.fr)

Received 19 September 2012; Accepted 6 November 2012

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly cited and all further distributions of the work or adaptation are subject to the same Creative Commons License terms.

TRANSLATIONAL IMPACT

Clinical issue

Friedreich's ataxia (FRDA), an autosomal recessive multisystem disorder characterised by neurodegeneration and cardiomyopathy, is caused by reduced levels of frataxin, an essential mitochondrial protein. Most individuals with FRDA are homozygous for an expanded GAA repeat in the first intron of the frataxin gene (*FXN*); this leads to repressed *FXN* expression through epigenetic mechanisms. Animal models of FRDA have enabled substantial progress in understanding pathogenesis, but none fully recapitulates the genetic and epigenetic characteristics of the human disease. Moreover, easily accessible cells from patients do not show any phenotype.

Results

The aim of this study was to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs) from individuals with FRDA and differentiate them into neuronal and cardiac lineages. The authors successfully derived iPSCs from two FRDA patients. Both sets of iPSCs displayed expanded GAA repeats that were prone to high instability and decreased levels of frataxin, but no biochemical phenotype. In addition, FRDA iPSCs did not differ from control iPSCs with respect to morphology and differentiation potential. The authors then differentiated these iPSCs into neurons and cardiomyocytes. FRDA iPSC-derived committed neural precursor cells and differentiated neurons did not differ morphologically from controls, even at the ultrastructural level. However, FRDA iPSC-derived neurons showed signs of mitochondrial defects and delayed electrophysiological maturation compared with control iPSC-derived neurons. FRDA iPSC-derived cardiomyocytes also exhibited signs of impaired mitochondrial homeostasis. Expanded GAA repeats, which were very unstable in iPSCs, became much more stable upon differentiation. Levels of mismatch repair factors MSH2 and MSH6, considered to be involved in repeat instability, were much higher in iPSCs than in fibroblasts used for reprogramming, both in FRDA and control subjects. However, expression of these factors also remained high during differentiation, suggesting that other factors also play a role in repeat instability.

Implications and future directions

Patient-derived iPSCs and their derived differentiated cells can be maintained in long-term culture and constitute a permanent source of differentiated cells. These cells are an important resource for research into FRDA pathogenesis and provide an excellent system for testing potential therapeutics, as they fully recapitulate the genetic aspects of the disease and express detectable, measurable phenotypes. The phenotypes characterised in this study for differentiated neurons and cardiomyocytes can be further dissected to identify underlying molecular mechanisms, which appear to involve altered mitochondrial homeostasis. Guiding differentiation toward specific neuronal types that are particularly vulnerable in FRDA (cerebellar deep nuclei and primary sensory neurons) will soon be possible as specific protocols are developed.

the relative contribution of these mechanisms to pathogenesis is not yet defined.

The genetic basis of FRDA challenges the development of models, yet required to understand the disease mechanisms and design drug screening assays. The currently available mouse models are either mildly symptomatic (Al-Mahdawi et al., 2006; Miranda et al., 2002) or tissue-specific knockouts (Puccio et al., 2001; Simon et al., 2004). Cellular models include easily obtained, but unaffected cells from FRDA patients, engineered cell lines with frataxin knockdown and cells derived from animal models (Martelli et al., 2012). These models have allowed important advances in understanding frataxin function and pathogenesis, and have been used to test drug effects (Martelli et al., 2012). However, none of them faithfully recapitulates the human disease, and no long-term

cultures of mutated vulnerable human cells, such as neurons and cardiomyocytes, are available. Reprogramming of somatic cells to generate pluripotent stem cells (induced pluripotent stem cells, iPSCs) provides a long-term source for deriving any cell type genetically identical to the original somatic cell. Accordingly, iPSCs have been used to obtain cultures of vulnerable cells in genetic diseases (Onder and Daley, 2012). Recently, two groups reported the successful generation of FRDA iPSCs (Ku et al., 2010; Liu et al., 2011). These iPSCs show epigenetic silencing of the *FXN* locus (Ku et al., 2010), low levels of frataxin expression (Ku et al., 2010; Liu et al., 2011) and GAA repeat instability, with only expansions (Ku et al., 2010) or both expansions and contractions (Liu et al., 2011). Furthermore, one group reports the involvement of mismatch repair (MMR) enzymes in the GAA repeat expansions (Du et al., 2012; Ku et al., 2010). However, none of these studies reported a phenotype resulting from frataxin deficiency in cells obtained from FRDA iPSCs. Here, we describe the generation and characterisation of FRDA iPSCs as well as neurons and cardiomyocytes derived from the FRDA iPSCs. We show that iPSC-derived neurons and cardiomyocytes from FRDA patients maintain GAA repeat expansions of pathological size and express low levels of frataxin compared with control cells, resulting in neuronal and cardiac mitochondrial abnormalities and delayed functional maturation of neurons. Furthermore, we found high levels of GAA instability, both expansions and contractions, in the FRDA iPSCs, which correlates with an upregulation of the MMR enzymes MSH2, MSH3 and MSH6 upon reprogramming. Our findings confirm the mitochondrial pathogenesis of FRDA and provide cellular phenotypes to test potential therapeutics.

RESULTS

Generation and characterisation of iPSC lines from FRDA patient fibroblasts

Dermal fibroblasts were obtained from two patients with FRDA and two age-matched unrelated healthy individuals after informed consent (see Materials and Methods). Fibroblasts from FRDA patients (FD135 and FD141) had expanded GAA repeats (800/600 and 900/400, respectively) whereas the control fibroblasts (CT136 and CT145) had normal GAA repeats (<20) (Fig. 1A). To obtain iPSCs, the fibroblasts were transduced with lentivirus expressing the reprogramming factors OCT4, SOX2, LIN28 and NANOG as described previously (Lapillonne et al., 2010). At 4–6 weeks after transduction, 5–15 independent iPSC colonies per cell line were manually picked on the basis of their human embryonic stem cell (hESC)-like morphology. The expanded GAA repeats length was determined on each clone prior to full characterisation. All iPSC clones derived from FRDA patients retained pathological GAA repeat expansions, ranging between 400 and 1000 triplets (Fig. 1A), with the exception of one clone, in which one allele contracted to 200 GAA triplets, a size still within the pathological range (FD135-4L clone 28; Fig. 1A).

All iPSC clones stained for the pluripotency markers TRA1-60, TRA1-81 and NANOG (Fig. 1B), most silenced the transduced *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* and *LIN28* genes and expressed the corresponding endogenous genes (supplementary material Fig. S1A,B). They also showed extensive DNA demethylation at the proximal promoter and the distal enhancer of the endogenous *OCT4* locus (supplementary material Fig. S1C), demonstrating

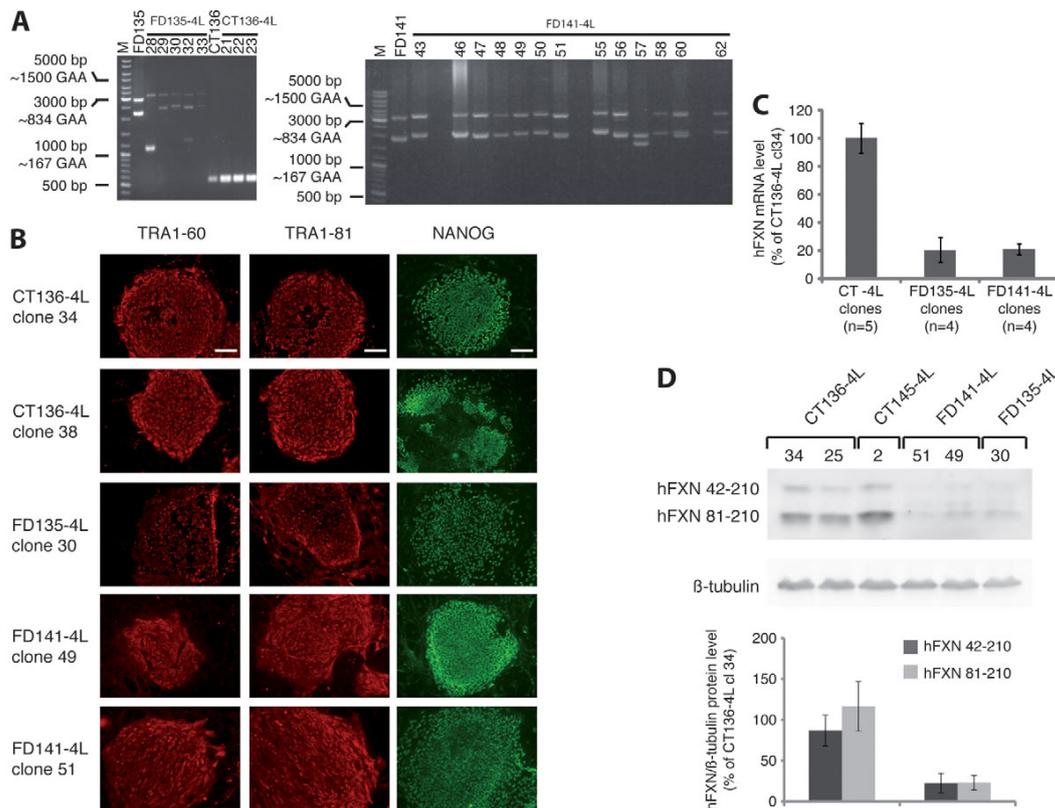


Fig. 1. Generation and characterisation of iPSC cell lines from control and FRDA fibroblasts. (A) PCR analysis of *FXN* GAA repeat length in fibroblast cell lines (FD135, CT136 and FD141) and iPSCs (FD135-4L, CT136-4L and FD141-4L clones). CT136 corresponds to an unaffected control; FD135 and FD141 correspond to two unrelated FRDA patients. Numbers represent different iPSC clones isolated for each cell lines. M, molecular weight marker. (B) Representative colonies of control and FRDA iPSCs stained positive for the pluripotency markers TRA1-60 (red), TRA1-81 (red) and NANOG (green). Scale bars: 200 μ m. (C) qRT-PCR analysis of frataxin expression relative to *GADPH* in control and FRDA iPSCs. The value of CT136-4L clone 34 was arbitrarily set to 100. (D) Western blot of whole cell extracts from control or FRDA iPSCs. The intermediate (hFXN 42-210) and mature (hFXN 81-210) forms of frataxin are detected. β -tubulin is used as a loading control. Protein levels were quantified after normalisation with β -tubulin and expressed as a percentage of control level (CT136-4L clone 34 was arbitrarily set to 100); $n=3$ in each group. Data are presented as mean \pm s.d.

faithful reprogramming. In addition, all iPSC clones maintained a normal karyotype. Two or three clones per line were selected for further characterisation (see supplementary material Table S1). Their pluripotency was confirmed *in vitro* by the formation of embryoid bodies (EBs) that expressed genes from all three embryonic layers (supplementary material Fig. S2). Furthermore, iPSCs were able to form teratomas in SCID mice that contained tissues derived from all three germ layers, including gut-like epithelium (endoderm), cartilage (mesoderm) and neural tissues (ectoderm) (supplementary material Fig. S3). Collectively, these results demonstrate that we successfully generated iPSCs from FRDA fibroblasts with pluripotent propensity.

We next determined whether the expanded GAA repeats in FRDA iPSCs still caused *FXN* gene silencing present in patient somatic cells (including the fibroblasts used for reprogramming). qRT-PCR analysis confirmed an \sim 80% decrease in *FXN* mRNA in all FRDA iPSC clones, as compared with control iPSCs (Fig. 1C). By western blot analysis, FRDA iPSCs had 23% residual frataxin compared with control iPSCs (Fig. 1D), as previously observed in various patient-

derived cell lines (Deutsch et al., 2010; Selak et al., 2011). Frataxin deficiency leads to impaired Fe-S cluster biosynthesis and reduced Fe-S cluster enzyme activity in affected tissues (Martelli et al., 2007; Puccio et al., 2001; Rötig et al., 1997). The activity of the Fe-S cluster containing succinate dehydrogenase (SDH) enzyme, the levels of Fe-S dependent proteins, which normally show diminished levels of apoprotein when cells are unable to generate Fe-S clusters (Guillon et al., 2009; Martelli et al., 2007; Navarro-Sastre et al., 2011), and the levels of protein-bound lipoic acid, a cofactor that is synthesised by the Fe-S-containing enzyme lipoic acid synthase (Navarro-Sastre et al., 2011), are not affected in FRDA-derived iPSCs (supplementary material Fig. S4). Together, these results demonstrate that, as for FRDA-derived fibroblasts, despite low levels of frataxin protein in FRDA-derived iPSCs, there is no evidence of Fe-S cluster biogenesis defects.

iPSC neural differentiation

In an attempt to generate faithful cell models that recapitulate the pathophysiological features of the disease, we derived human

neurons from normal and FRDA iPSCs following an established protocol (Dottori and Pera, 2008) with slight modifications (see Materials and Methods; Fig. 2A). Treatment of iPSCs for 14 days with the bone morphogenetic protein (BMP) antagonist Noggin led to the induction of neural precursors, which were immunopositive for the neuroectodermal markers Nestin and PAX6 (Fig. 2C). Neural precursors were mechanically isolated and cultured in suspension as neurospheres, which extinguished the expression of pluripotent factors *NANOG*, *LIN28* and *OCT4* while retaining the expression of *SOX2*, a transcription factor expressed in neuronal precursors (Fig. 2B). Within 3 days of culture in differentiation conditions, neurospheres started extending processes in all directions. Over 30 days, dense networks of neurons with extended radially projecting neurites positive for the early phase neural marker β -III-tubulin were formed (Fig. 2A). These cells commonly expressed MAP2 (microtubule-associated protein 2), a dendrite specific marker in mature neurons (Fig. 2D,E). Furthermore, synapsin puncta outlining the MAP2-positive neurites became visible by immunostaining (Fig. 2D), evidence of synaptic connections. A subpopulation of neurons expressed the vesicular glutamate transporter 1/2 (VGLut1/2) (Fig. 2E), in accordance with the notion that human neural precursors in the

absence of any specific cues mostly generate glutamatergic neurons (Mariani et al., 2012).

FRDA neurons demonstrate physiological and mitochondrial abnormalities

To address whether the FRDA iPSC-derived neurospheres and differentiated neurons exhibited any pathological features, we first assessed the GAA expansion and the levels of frataxin expression. Neurospheres and neurons obtained from FRDA iPSCs retained pathological GAA repeat expansions (Fig. 3B) and maintained low *FXN* mRNA expression levels, at 30-35% of controls (Fig. 3C), but showed no obvious difference in morphology, viability or differentiation potential compared with those derived from control iPSCs (Fig. 3A). However, at 34-39 days of differentiation, 30% less FRDA than control neurons exhibited spontaneous calcium transients (Fig. 2F; supplementary material Movie 1) (Fig. 3D). Patch clamp recordings from neurons participating in spontaneous calcium oscillations showed that 16/28 control cells from two clones displayed voltage-dependent sodium currents, 11 showed repetitive firing during step current injection with little or no accommodation, and five were spontaneously active (Fig. 3D). By contrast, only 6/30 recorded neurons from two FRDA clones displayed voltage-

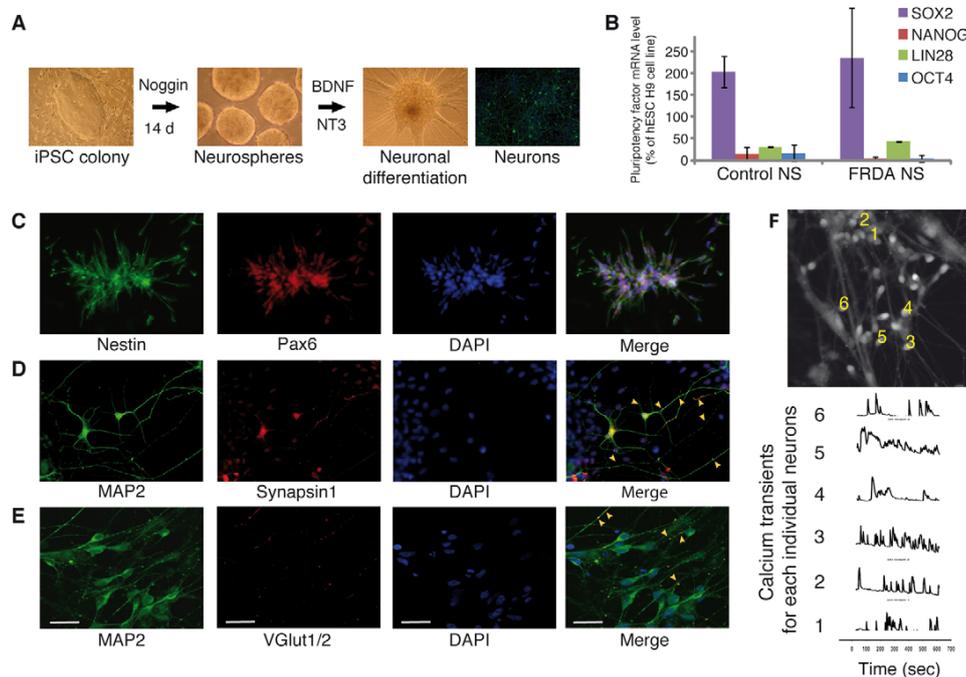


Fig. 2. Differentiation of FRDA iPSCs into neurons and their characterisation. (A) Schematic view of the neural differentiation protocol. Representative images show an iPSC colony treated with noggin for 14 days, cultured as neurospheres, and neurospheres undergoing neural differentiation in the presence of neurotrophic factors, BDNF and NT3 (bright fields) and neurons (immunostained for β -tubulin III; green). (B) qRT-PCR analysis of the expression levels of endogenous *SOX2*, *NANOG*, *LIN28* and *OCT4* relative to *GADPH* in control and FRDA neurospheres (NS) normalised to hESC H9. The data are presented as mean \pm s.d. (C) Representative iPSC-derived neurospheres (FD135-4L clone 30) stained positive for the neural stem cell markers Nestin (green) and Pax6 (red). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). The majority of cells coexpress both markers. (D,E) Representative iPSC-derived neurons at 45 days (FD135-4L clone 30) stained positive for MAP2 (green). (D) Positive labeling for synapsin1 (red) demonstrates synapse formation (see arrowheads in merge). (E) A subset of cells stain positive for the glutamate vesicular transporter VGLut1/2 (red, see arrowheads in merge). (F) Top: unprocessed fluorescence image of iPSC-derived neurons at 35 days (FD135-4L clone 30) loaded with the calcium indicator Oregon Green 488 BAPTA 1. Bottom: representative traces from numbered neurons (1-6) showing spontaneous calcium spikes. Scale bars: 20 μ m.

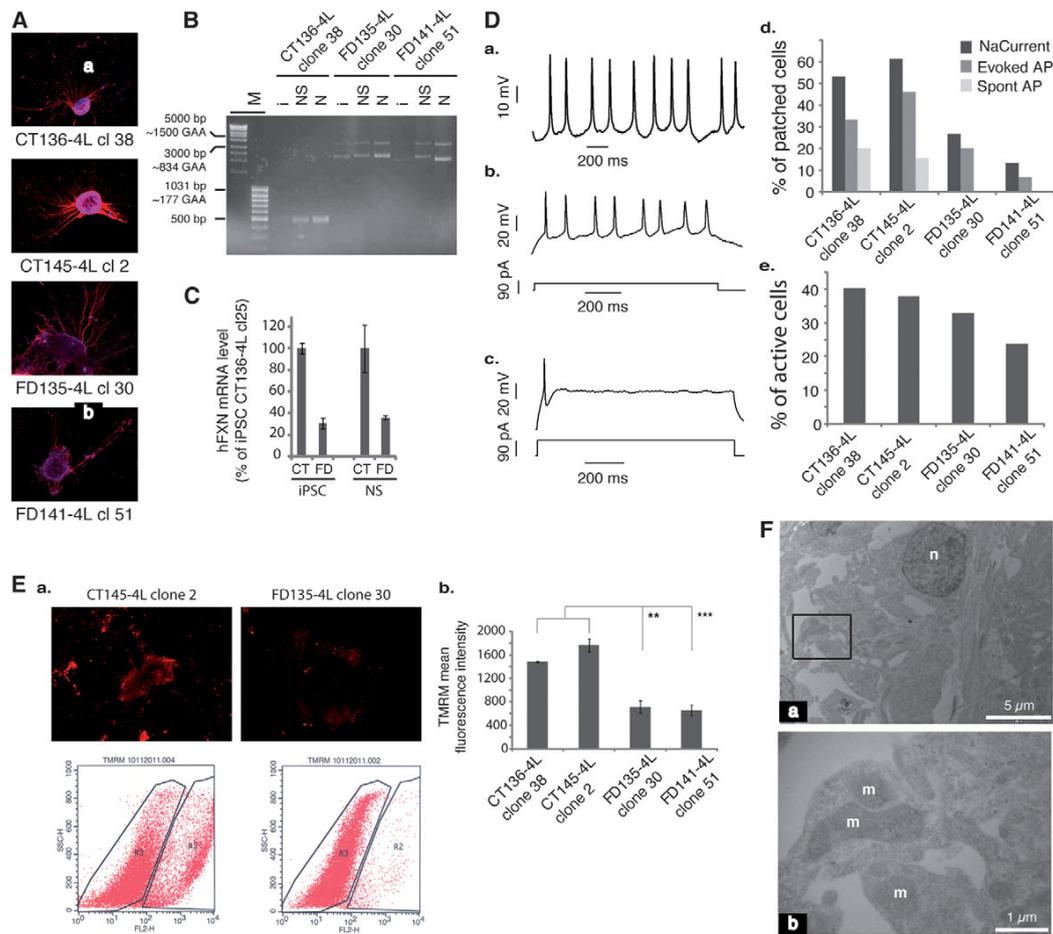


Fig. 3. FRDA neurons are functionally impaired and have reduced mitochondrial membrane potential. (A) Representative images of iPSC-derived 8-day-old differentiating neurospheres for both control and FRDA clones stained positive for β -tubulin III. (B) PCR analysis of *FXN* GAA repeat length in iPSCs, neurospheres (NS) and neurons (N) from representative control (CT136-4L clone 38) and FRDA (FD135-4L clone 30 and FD141-4L clone 51) lines. M, molecular weight marker. (C) qRT-PCR analysis of frataxin expression relative to *GADPH* in control (CT) and FRDA (FD) iPSCs and neurospheres (NS). The value of iPSC CT136-4L clone 25 was arbitrarily set to 100. The data are presented as mean \pm s.d. (D) Electrophysiological characteristics of iPSC-derived neurons. Representative traces obtained from current-clamp recordings in maturing iPSC-derived neurons at days 34-39 are shown: (Da) Control neuron (CT 136-4L clone 38) showing spontaneous repetitive action potentials, a recording never detected in any FRDA neurons. (Db) Control neuron (CT 136-4L clone 38) showing repetitive depolarisation-evoked action potentials. (Dc) FRDA neuron (FD141-4L clone 51) showing a single depolarisation-evoked action potential. (Dd) Quantification of iPSC-derived control and FRDA neurons expressing voltage-dependent sodium current, evoked and spontaneous action potentials determined by patch-clamp recording. (De) Quantification of iPSC-derived control and FRDA neurons participating in spontaneous calcium oscillations. (E) Loading of iPSC-derived neurons with the mitochondrial fluorescent dye TMRM. (Ea) Upper panels show representative fluorescent images of FRDA and control neuronal cultures loaded with TMRM. Lower panels show flow cytometry profile with TMRM fluorescence. (Eb) Quantification of mean fluorescence intensity in TMRM-positive cells in R2; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (F) Electron microscopy analysis of FRDA iPSCs neurons at 43 days shows no ultrastructural abnormality. Fb is a higher magnification image of the boxed area shown in Fa; n, nucleus; m, mitochondria.

dependent sodium currents, four produced only a single action potential during step current injection, and none spontaneously generated action potentials (Fig. 3D). These findings suggest that, contrary to neurons from control iPSCs, neurons from FRDA iPSCs have not yet developed full electrophysiological functionality at 34-39 days of differentiation. However, when allowed additional time for maturation, FRDA iPSC-derived neurons eventually developed similar electrophysiological properties as control neurons. Accordingly, at 54-63 days of differentiation, 5/8 patched FRDA

iPSC-derived neurons showed evoked action potentials and 3/8 had also spontaneous repetitive action potentials, similar to findings in control neurons (3/5 showing both evoked and spontaneous repetitive action potentials)

We next estimated mitochondrial integrity and functionality of neurons from FRDA and control iPSCs by assessing their ability to incorporate the mitochondrial membrane-permeable fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM), which is readily sequestered by active mitochondria. Flow cytometry analysis of cells

treated with TMRM revealed that FRDA neural cultures at 44-49 days of differentiation had a 40% lower fluorescence than control cultures (Fig. 3E), indicating reduced mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), which could result from defects in mitochondrial respiratory chain function. Interestingly, ultrastructural analysis of FRDA-derived neurons at the same stage of differentiation showed no defect, in particular mitochondria were well preserved with intact cristae (Fig. 3F).

Differentiation of iPSCs into cardiomyocytes

As the majority of FRDA patient present cardiac defects, we asked whether cardiomyocytes derived from FRDA iPSCs exhibit typical

pathophysiological features of the disease. To generate cardiomyocytes, we adapted a protocol to induce differentiation relying on embryoid body (EB) formation combined with a treatment with ascorbic acid, a factor known to promote cardiac differentiation (Takahashi et al., 2003; Wang et al., 2010) (Fig. 4A). The yield of this differentiation protocol varied according to the iPSC line.

Spontaneously beating areas of variable morphology, size and pulse rate emerged around day 20 of differentiation (Fig. 4A; supplementary material Movies 2, 3). Cardiomyocytes at different degrees of maturation coexisted in the same area. qRT-PCR analyses confirmed the expression of cardiac lineage markers, as the transcription factor *GATA4*; *ACTN2* encoding the myofibrillar

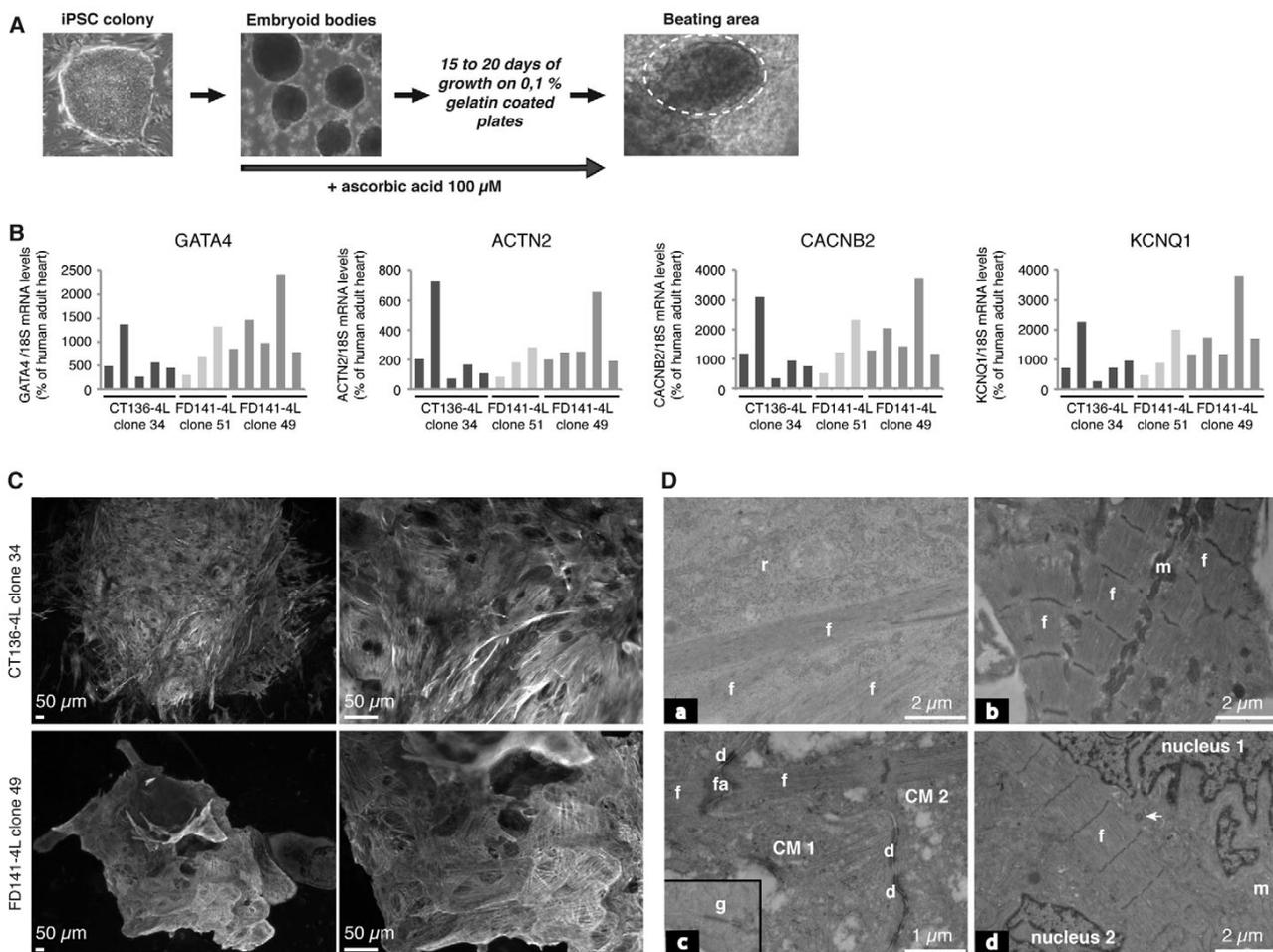


Fig. 4. Differentiation of iPSCs into cardiomyocytes and their characterisation. (A) Schematic view of the cardiomyocyte differentiation protocol with representative images showing an iPSC colony, EBs and a beating area (bright fields). (B) qRT-PCR analysis of cardiac marker expression relative to the 18S housekeeping gene in different pools of beating areas from control (CT136-4L clone 34) and patient (FD141-4L clones 49 and 51) iPSCs, normalised to human adult heart. (C) Representative iPSC-derived beating areas from control (CT136-4L clone 34) and FRDA (FD141-4L clone 49) lines immunostained with cardiac troponin T to reveal cardiomyocyte organisation. (D) Representative electron microscopy images of iPSC-derived cardiomyocytes showing different degrees of structural maturity and intercellular junctions. (Da) Immature cardiomyocyte with organised contractile fibres or myofibrils without clear defined Z-line and with accumulation of ribosomes. (Db) Mature cardiomyocyte with dense myofibrillar sarcomeres bounded by straight dense Z-lines. Note that mitochondria are elongated and aligned in between myofibrils. (Dc) The presence of intercalated disks formed by desmosomes and fascia adherens, and occasionally gap junction (inset) connect different cardiomyocytes (CM1 and CM2). (Dd) Rare binucleated cardiomyocytes were observed (arrow points to centriole). d, desmosome; f, myofibril; fa, fascia adherens; g, gap junction; m, mitochondria; r, ribosome.

protein actinin $\alpha 2$; *CACNB2* encoding calcium voltage-dependent channel, beta 2 subunit; and *KCNQ1* encoding the potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (Fig. 4B; supplementary material Fig. S5). These genes were highly expressed in beating areas compared with adult cardiac mRNAs, reflecting the different degree of maturity. Cardiac troponin T immunostaining showed that the beating areas had comparable structure to heart tissue, with tightly imbricated but not aligned cardiomyocytes (Fig. 4C). Ultrastructural analysis revealed that early cardiomyocytes (<20 days) contained fibres already organised in beams, but only with Z-line drafts (Fig. 4Da). These cells also presented an accumulation of ribosomes and rough endoplasmic reticulum, indicating an intense protein synthesis activity, probably dedicated to building a mature contractile apparatus. With maturation, dense myofibrillar beams formed, with well-organised sarcomeres bounded by straight Z lines (Fig. 4Db). The presence of intercalated disks composed of adherent junctions, gap junctions and desmosomes (Fig. 4Dc) was indicative of an efficient

contraction transmission within the beating areas. The majority of cardiomyocytes were mononucleated and a few were binucleated cardiomyocytes as normally observed in human heart (Fig. 4Dd).

FRDA cardiomyocytes recapitulate ultrastructural mitochondrial defects associated with FRDA

Cardiomyocytes derived from FRDA iPSCs retained the pathological GAA repeat expansions, but size heterogeneity was observed (Fig. 5A), possibly because samples from 12–22 beating areas were pooled to obtain sufficient material for genetic analyses. FRDA iPSC-derived cardiomyocytes maintained low levels (36–40%) of frataxin mRNA (Fig. 5A), but higher than in the original iPSCs (Fig. 1C; Fig. 5A), probably reflecting the contribution of beating areas with shorter GAA expansions.

We collected time-lapse images of 273 beating areas from several independent differentiation experiments to detect possible arrhythmias, as can occur in FRDA patients (Tsou et al., 2011). Surprisingly, we observed clonal differences, but no FRDA-related

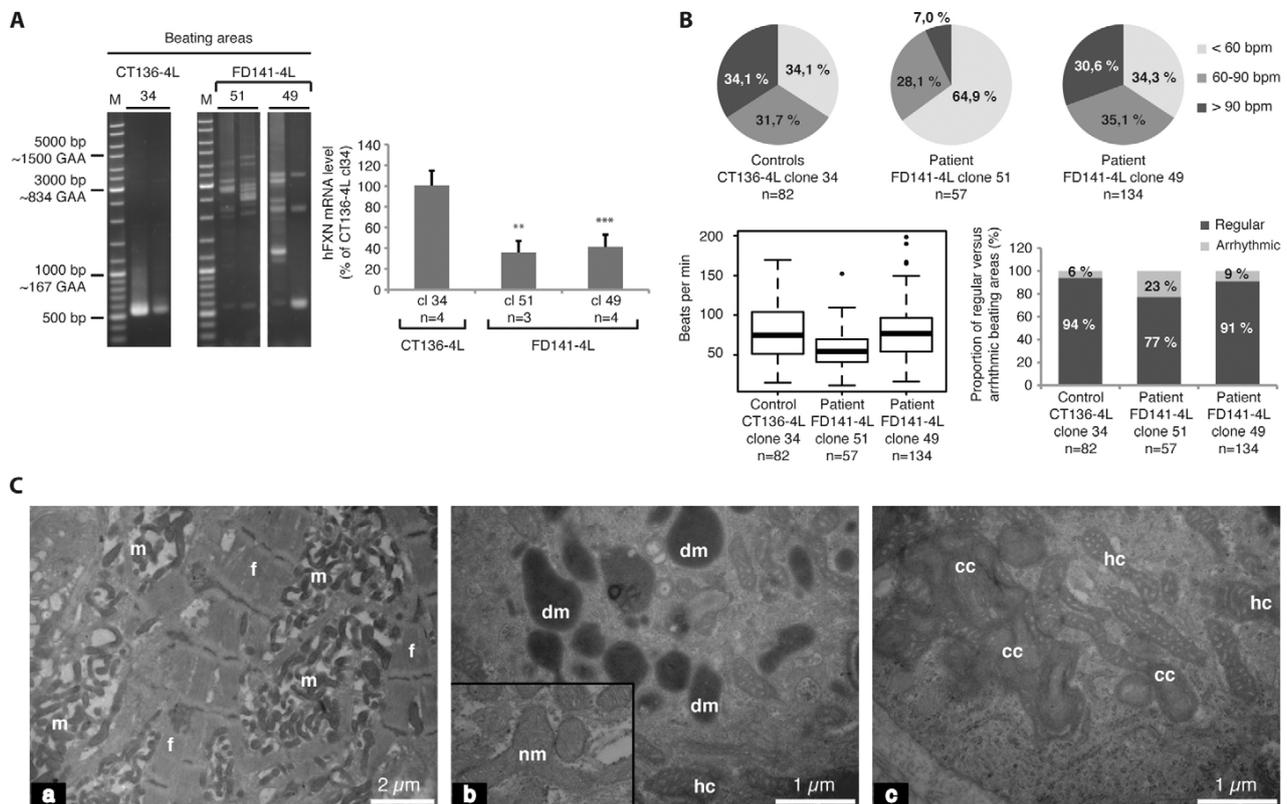


Fig. 5. FRDA cardiomyocytes present a mitochondrial phenotype. (A) PCR analysis of *FXN* GAA repeat length in representative pools of beating areas derived from control and FRDA iPSCs (left panel). qRT-PCR analysis of the expression levels of frataxin relative to *GADPH* in the pools of beating areas from control (CT136-4L clone 34) and FRDA (FD141-4L clones 49 and 51) iPSCs (right panel). The value of one pool of beating areas from the control was arbitrarily set to 100. The data are presented as mean \pm s.d. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (B) Analysis of the beating area contraction profiles by time-lapse imaging. Beating rate (beats per minutes; bpm) distribution (sectors and boxplot) and frequency of arrhythmic events (bars) are shown. The contraction rate distribution is categorised as slow (<60 bpm), intermediate (60–90 bpm) and fast (>90 bpm). (C) Ultrastructural changes in cardiomyocytes derived from FRDA iPSCs. No ultrastructural abnormality was observed in the organisation of the contractile fibre with clear defined sarcomeres. (Ca) Abnormal mitochondrial proliferation and/or accumulation. (Cb,c) Degenerating dark mitochondria with poorly defined cristae, mitochondria with hypertrophic cristae and onion-like mitochondria with coiled cristae. Inset: normal mitochondrion. cc, coiled cristae; dm, cristae; f, contractile fibre; hc, hypertrophic cristae; m, mitochondria; nm, normal mitochondrion.

GAA repeat instability in FRDA iPSCs

We observed GAA repeat instability upon reprogramming (Fig. 1A), consistent with previously reports of GAA instability in FRDA patient-derived iPSCs (Ku et al., 2010; Liu et al., 2011). Monitoring the expanded GAA repeats in FRDA iPSCs over several passages, we detected both expansions and contractions, whereas normal repeats in control iPSCs remained stable (Fig. 6A). By contrast, during neural differentiation of FRDA iPSCs, only minor differences in GAA repeat length were observed between the starting iPSCs, neurospheres and their neuronal progeny (Fig. 3B), as well as after passing of the neurospheres up to 65 days in culture (Fig. 6B). These data suggest that repeat instability substantially decreases when iPSCs commit to the neural lineage. This apparent stabilisation of the GAA tract would be consistent with the differentiation-induced stabilisation of CTG instability in myotonic dystrophy type 1 (DM1)-derived hESCs (Seriola et al., 2011). The heterogeneity in GAA repeat sizes in FRDA cardiomyocytes (Fig. 5A) could be a consequence of heterogeneity in the starting iPSC clones or of repeat instability during differentiation. However, GAA repeats were stable during the 6 days of EB differentiation prior to plating (Fig. 6C).

Mismatch repair (MMR) enzymes have previously been reported to be implicated in somatic trinucleotide repeat instability (reviewed by López Castel et al., 2010). In particular, increased levels of the MMR factors MSH2 and MSH3 have been proposed to cause enhanced GAA repeat instability (Ezzatizadeh et al., 2012; Ku et al., 2010). mRNA levels of MMR enzymes MSH2 and MSH6, but not MSH3, markedly increased in iPSCs and in neurospheres compared with the donor fibroblasts (Fig. 6D). No difference was observed between control and FRDA-derived cells, demonstrating that this mRNA upregulation is not related to the FRDA state. Because MMR transcript levels do not always reflect the corresponding protein levels (Chang et al., 2000), MSH2, MSH3 and MSH6 protein levels were assessed. By western blot analysis, the MSH2, MSH3 and MSH6 proteins were not detected in the donor fibroblasts, but abundant levels of MSH2 and MSH6 were detected in both iPSCs and neurospheres (Fig. 6E). MSH3 protein expression remained low in iPSCs and neurospheres, but was detectable compared with fibroblasts (supplementary material Fig. S8). Thus, MSH2, MSH3 and MSH6 proteins are expressed at higher levels in both the undifferentiated iPSCs and neuronal precursors compared with the parental fibroblast cells.

DISCUSSION

In the present study, we report the generation and characterisation of FRDA-derived iPSCs, and their differentiation into neurons and cardiomyocytes. Although the generation of peripheral sensory neurons and spontaneous beating cells using distinct protocols have previously been reported for FRDA-derived iPSC lines (Liu et al., 2011), this is the first report that provides a phenotypic characterisation of the neurons and cardiomyocytes derived from FRDA iPSCs. FRDA iPSCs retained expanded GAA repeats and expressed low levels of frataxin, but they showed no obvious phenotype with respect to control iPSCs. Furthermore, although inter-clonal variation was seen in differentiation efficiency, there was no overall difference in the efficiency or timing of neural and cardiac differentiation between FRDA and control iPSCs, suggesting that a reduced amount of frataxin does not affect the

initial commitment to neuronal or cardiac fate. However, we cannot exclude the possibility that differences might emerge if iPSC differentiation is directed towards specific neuronal fates, such as primary sensory neurons, known to be highly vulnerable in FRDA.

Despite their apparently normal differentiation and morphology, young (34–39 days of differentiation) FRDA iPSC-derived neurons showed poor excitability compared with control iPSC-derived neurons (Fig. 3). Older (54–63 days) FRDA iPSC-derived neurons showed essentially normal electrophysiology, suggesting that the differences observed at 34–39 days reflect delayed functional maturation rather than a general functional failure. It is tempting to correlate the delayed maturation with the reduced uptake of TMRM by FRDA iPSC-derived neurons, indicative of reduced mitochondrial membrane potential, which could result from a defect in respiratory chain function rather than proton leak. Such a defect in respiratory chain function could be a direct consequence of Fe-S enzyme deficiency or oxidative stress. However, we cannot exclude the possibility that the differences might be due to loss of sick, non-functional neurons. Importantly, these findings provide measurable parameters to evaluate the effect of potential therapeutics on neurons carrying the FRDA mutations.

Cardiomyocyte physiology did not significantly differ between control and FRDA iPSC-derived cells. Time-lapse analysis of spontaneously contracting beating areas revealed inter-clonal variation rather than a disease-specific phenotype. The beat rates measured in this study were similar to spontaneous rates previously reported (Yazawa et al., 2011). Interestingly, the majority of arrhythmia events occurred in slow beating clusters. As there was heterogeneity in GAA repeat size among the beating clusters, it would be interesting to determine whether the rhythmic abnormalities observed are linked to higher GAA triplet expansions. By contrast, the ultrastructural abnormalities of cardiomyocytes derived from all FRDA iPSCs faithfully recapitulated some features observed in FRDA patients and animal models of the disease (Michael et al., 2006; Seznec et al., 2005). In particular, FRDA iPSC-derived cardiomyocytes present progressive extensive mitochondrial proliferation and accumulate mitochondria with swollen or onion-like cristae and dark mitochondria, which are characteristic of respiration-compromised mitochondria, suggestive of a functional defect in cellular respiration. Conversely, sarcomere disorganisation and mitochondrial iron accumulation, observed both in FRDA patient autopsies and in late stages of the disease in conditional knockout mice (Michael et al., 2006; Seznec et al., 2005), were not apparent in FRDA iPSC-derived cardiomyocytes, suggesting that they recapitulate the very early molecular and cellular changes of FRDA cardiomyopathy.

Neuronal and cardiac dysfunctions develop over several years in FRDA patients or several months in FRDA mouse models; however, both neurons and cardiomyocytes derived from the FRDA iPSCs develop a phenotype suggestive of mitochondrial respiratory chain defect over a relatively short period of time in culture. We cannot exclude the possibility that culture-related stress conditions accelerate the development of FRDA related phenotype *in vitro*. It is well known that frataxin-deficient cells are vulnerable to stress conditions (Chantrel-Groussard et al., 2001; Jiralerspong et al., 2001; Wong et al., 1999). In any case, our results strongly support impairment of oxidative phosphorylation, which is likely

to be present as a result of impaired Fe-S cluster biogenesis and possibly oxidative stress, as the main player in FRDA pathogenesis, at least in its early stages. Importantly, our findings provide measurable parameters for evaluating the effect of potential therapeutics on neurons and cardiomyocytes carrying the FRDA mutations.

Similarly to previous reports (Ku et al., 2010; Liu et al., 2011), the expanded GAA repeat showed instability during the reprogramming process. In addition, upon propagation in culture, high instability was observed in all FRDA iPSC clones, yielding both expansions and contractions of the expanded GAA repeats, in contrast with only expansions observed upon passage in culture in previous reports (Du et al., 2012; Ku et al., 2010). This discrepancy correlates with the difference in the GAA repeat size in the reprogrammed fibroblasts. Indeed, in the present report, the sizes of the GAA repeats were 800/600 and 900/400, respectively, whereas the sizes of the repeats in iPSCs showing only repeat expansion with no contraction were 330/380 and 541/420, respectively (Du et al., 2012; Ku et al., 2010). Furthermore, we cannot exclude the possibility that different approaches used to derive iPSCs, such as retroviral transduction and the inclusion of *c-Myc* in the set of reprogramming factors, and the different culture conditions could play a role. However, although instability during culture passages was not addressed, it is notable that Liu et al., using a similar protocol including the *c-Myc* transgene in the set of reprogramming factors, observed both expansions and contractions upon reprogramming, with repeat sizes at 527/1058 and 751/1027, respectively (Liu et al., 2011). The repeat instability we observed therefore appears to be more similar to events arising in the somatic tissues of FRDA patients and distinct from the suggested instability in FRDA iPSCs resembling intergenerational expansion (Du et al., 2012; Ku et al., 2010).

Increased expression of the MMR factors is known to be involved in repeat instability (López Castel et al., 2010) and, more specifically, MSH2 and MSH3 have been proposed to promote GAA repeat instability (Du et al., 2012; Ezzatizadeh et al., 2012; Halabi et al., 2012; Ku et al., 2010). Accordingly, we found upregulation of MSH2 and MSH6, and possibly MSH3, in all iPSCs irrespective of their genotype, suggesting an overall activation of mismatch repair during reprogramming. Interestingly, GAA repeats became much more stable in EBs, neurospheres, neurons and possibly cardiomyocytes, even though neurospheres maintained comparable mRNA and protein levels of MSH2 and MSH6 as iPSCs. This suggests that, in addition to MMR, other factors are likely to be involved in GAA repeat instability. The high level of MSH2 and MSH6 in neurospheres contrasts with a very recent report demonstrating that MSH2, MSH3 and MSH6 are expressed at lower levels in neural stem cells than in iPSCs (Du et al., 2012). Although no obvious explanation can explain this discrepancy, we observed high levels of MSH2 and MSH6 in neurospheres derived from three distinct iPSC clones, whereas Du et al. reports results for a unique clone (Du et al., 2012). Limited sample availability precluded MMR expression analysis in neurons and cardiomyocytes; however, previous reports indicate that MMR genes are downregulated and proteins are degraded upon differentiation (Seriola et al., 2011).

In conclusion, we show that iPSCs from FRDA patients maintain expanded GAA repeats and low expression of frataxin, and that

iPSC-derived cardiomyocytes and neurons show pathological phenotypes that can be attributed to mitochondrial dysfunction. iPSCs represent a precious resource for studying the pathogenesis of FRDA and testing the effect of potential therapeutics. The major current limitation of this approach is the lack of robust protocols to obtain the most severely affected neuronal types in FRDA, such as large proprioceptive primary sensory neurons and deep cerebellar nuclei projection neurons, but it is reasonable to assume that these will be developed in the future.

MATERIALS AND METHODS

Human iPSC generation and characterisation

Human iPSCs were obtained as previously described (Lapillonne et al., 2010). For more clarity, to distinguish control and FRDA iPSC-derived cells; the original FD136 fibroblasts have been renamed as CT136 and the original iPSC clone FD136-25 as CT136-4L clone 25. Human iPSC characterisation was performed as previously described (Lapillonne et al., 2010). Supplementary material Table S1 gives a summary of the different analyses performed on each iPSC clone.

Molecular analysis

To determine GAA size, genomic DNA was extracted as previously described (Pandolfo, 2006). For the beating areas, DNA and RNA were extracted from the same sample using the RNA XS extraction kit (Macherey Nagels) and the Nucleospin RNA/DNA buffer set extension, according to the manufacturer's instructions. Beating area pellets were made of 12-22 beating areas, according to their age and size. PCR was performed on 10 ng of genomic DNA using the forward 5'-GGCTTGAACCTCCCACACGTGTT-3' and reverse 5'-AGGACCATCATGGCCACACTT-3' primers with the Expand Long Template PCR System Kit (Roche) in 50 µl reaction following the manufacturer's instructions. Then, 10 µl of the PCR sample was loaded on 1% agarose gel.

RNA was extracted with either TRI Reagent (MRC) or Nucleospin RNA XS (Macherey Nagel) following the manufacturer's recommendations and treated with Dnase I (Roche Biosciences). cDNA was generated using Superscript II kit (Invitrogen) and oligo-dT. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was achieved using Light Cycler 480 (Roche Biosciences) with the primers listed in supplementary material Table S2 and, unless indicated, using GAPDH as internal standard. Total RNA from human adult heart tissue (Clontech) was used to evaluate mRNA expression levels in iPSC-derived cardiomyocytes. Beating area pellets were made of 12-22 beating areas, according to their age and size.

Transgene-specific primers were drawn to address reprogramming factor expression (supplementary material Table S2). Each gene-specific forward primer was used in couple with the same reverse primer picked up in IRES sequence immediately in 3' of ORF. The double Δ Ct method was used to quantify transgene expression, with primary human dermal fibroblasts infected with same viruses at MOI 10, as a calibrator. Negative controls were H9 hESC and original fibroblast cells. To avoid monitoring the potential expression of the transgenes, expression of endogenous Oct4, Nanog, Sox2 and Lin 28 was performed using primers designed in the 3' untranslated region. HuES1 and H9 RNA were kindly provided by Olivier Pourqu   (IGBMC, Illkirch, France).

In vitro differentiation analysis

Differentiation markers were analysed using Taqman Low Density Arrays (Life Technologies) as previously described (Lapillonne et al., 2010).

DNA methylation profile

Genomic DNA purified from H9 human embryonic stem cells, human iPSC and original dermal fibroblasts were bisulphite-treated according to the kit manufacturer (Qiagen). Strand-specific PCR was then performed on POU5F1 promoter according to published protocols and primers (Freberg et al., 2007). After PCR product cloning, between 10 and 15 clones were sequenced to establish DNA methylation profiles.

Teratoma analysis

Human iPSCs clumps were recovered from dishes using collagenase IV and dispase treatment. After washing, every human iPSC line was subcutaneously injected in two SCID mice (750,000 iPSCs per mouse) and teratoma formation followed over 3 months. When tumours reached 1 cm wide, mice were sacrificed, the tumours fixed in 4% PFA and processed for histological analysis.

Neural induction and differentiation

For neural induction, iPSC colonies were treated with Noggin for 14 days as previously described (Dottori and Pera, 2008), then mechanically transferred and cultured in NBN media (neurobasal media A+B27+N2) in the presence of FGF-2 and EGF (both 20 ng/ml; Peprotech, UK), which allowed the formation of neurospheres. Neural precursors were maintained and propagated as neurospheres by the cutting method and by replacing 50% of the medium every 2 days. For neuronal differentiation, neurospheres were plated on laminin-coated glass coverslips in NBN media without proliferating factors. To promote neuronal differentiation, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) (both 100 ng/ml; Peprotech, UK) were added in differentiating media. Within 3 days, neurospheres displayed signs of differentiation as they started extending processes in all directions.

Calcium imaging

For calcium dye loading, each coverslip containing differentiating neurospheres was incubated at 37°C for 45 minutes in the presence of 3 μ M Oregon Green BAPTA 1 am (Life Technologies, Gent, Belgium). Imaging was carried out at room temperature using an upright Axioskop 2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a CCD camera (iXon+, Andor). Images were acquired using a 63x, 0.95 NA water-immersion objective (Zeiss, Oberkochen, Germany). To excite the fluorescence of the calcium dye, a light source composed of a LED array (OptoLED, Cairn) emitting at 488 nm was coupled to the microscope equipped with a dichroic mirror and a high-pass emission filter centred at 505 and 507 nm, respectively. Using the AndorIQ software, images were acquired every 2 seconds, with an exposure time of 50 milliseconds and with a resolution of 512x512 pixels (14 bits). The pseudo ratio ($\Delta F/F$) curves corresponding to the different cells were computed offline. The fluorescence change over time is defined as $\Delta F/F = (F - F_{\text{basal}}) / F_{\text{basal}}$, where F is the fluorescence at any time point, and F_{basal} is the baseline fluorescence averaged over three

consecutive images at the beginning of the recording. The results presented here were obtained from three different coverslips (generated from two or three different experiments) cultured for 34-39 days.

Electrophysiology

Whole-cell patch clamp recordings were performed on individual neurons identified by using infrared differential interference contrast microscopy (Axioskop 2FS, 63x 0.95w, Zeiss). Recording pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (Hilgenberg, Malsfeld, Germany) on a PiP5 pipette puller (HEKA, Lambrecht-Pfalz, Germany) and presented resistances of 5-8 MOhm when filled with the patch pipette solutions containing the following: 119 mM KMeSO₄, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 12 mM phosphocreatine, 2 mM Na₂ATP, 0.7 mM Na₂GTP, pH 7.2-7.3 adjusted with KOH, 280-300 mOsm/l. The extracellular solution contained: 126 mM NaCl, 1.6 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 18 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄ and 11 mM glucose, equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4). For the recordings, the glass coverslips were transferred into a recording chamber where they were continuously perfused (2-3 ml/min) with the extracellular solution at room temperature. All recordings were made with an Dual EPC10 amplifier and acquired using the software PatchMaster (HEKA). Signals were filtered at 4 kHz using the built-in filter of EPC10 and digitally sampled at 20 kHz. Data were analysed with Igor Pro software (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Passive cellular parameters were extracted in voltage clamp by analysing current relaxation induced by a 10-mV hyperpolarising step from a holding potential of -70 mV.

Measurement of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential changes ($\Delta\Psi_m$) were detected using the slow, lipophilic, cationic fluorescent redistribution dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM). Neurosphere-derived differentiated cells at 6 to 7 weeks old were dissociated by accutase and loaded with 25 nM TMRM (Life Technologies, Gent, Belgium) for 30 minutes at 37°C. In this experiment, TMRM was used in the 'redistribution mode' to assess $\Delta\Psi_m$, and therefore a reduction in mitochondria-localised TMRM fluorescence represents mitochondrial depolarisation (Abramov et al., 2010). The mean fluorescence intensity was quantified using flow cytometry. Optimal emission from TMRM lies in the FL2 emission region (573 nm) and mean fluorescence of all test samples was measured with the FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences) using the same voltage settings as determined for the negative control.

Cardiac differentiation

For cardiac differentiation, iPSC colonies were harvested after a 30 minutes of treatment with a mix of 1mg/ml collagenase IV (Invitrogen, France) and 2 mg/ml dispase (Invitrogen, France) at 37°C. EBs were formed by culturing small clumps of iPSC colonies in ultra-low attachment plates (Corning, France) for 6 days in DMEM-Ham F12 (1:1) supplemented with 20% KO-serum replacement (KSR), 1% non-essential amino acids, 1% penicillin-streptomycin, 1% glutamax and 0.1 mM 2-mercaptoethanol (all from Gibco, France). EBs were then plated onto 0.1% gelatin-coated plates in the same medium with a progressive replacement of KSR by foetal calf serum (PAA). Cardiac differentiation was

enhanced by adding 100 μM of ascorbic acid (Sigma, France) starting from day 1. First beating areas appeared around day 20 of differentiation.

Analysis of contraction rhythm in cardiomyocytes

Images were collected by time lapse every 68 or 26 milliseconds using Metamorph software and converted to multiframe TIFF images. Contraction profiles were built with ImageJ software by assessing the motion of light spots both in space and time. We calculated the ratio of the standard deviation to the mean of the intervals between 20 contractions, as described (Yazawa et al., 2011). The threshold for classifying a beating area as arrhythmic was a ratio at least two times higher than the average ratio of control cells.

Immunofluorescence

Full beating areas were rinsed with PBS and fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature. Cells were blocked and permeabilised at the same time with PBS (10% NGS, 0.1% BSA, 0.1% Triton X-100) for 2 hours at room temperature. They were then incubated overnight at 4°C with the anti-cTnT primary antibody (1:200; MS-295-P0 from Fisher Scientific) diluted in PBS, 10%NGS, 0.1%BSA, 0.1%Triton X-100. The Alexa Fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody (1:1000; Invitrogen) was incubated at room temperature for 1 hour. Immunofluorescence on neurospheres and neurons was performed as previously described (Chintawar et al., 2009). Briefly, to test their ability to express neural stem cell markers, neurospheres were plated on glass coverslips coated with matrigel (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), left overnight and then fixed with 4% paraformaldehyde. Triton X-100-permeabilised cultures were incubated with Nestin and SOX2 (Merck Millipore, Overijse, Belgium) antibodies overnight. For differentiating cultures, β -tubulin-III (Merck Millipore, Overijse, Belgium) and MAP2 (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) were used as neuronal markers. Synapsin1 and VGlut1/2 (Synaptic Systems, Goettingen, Germany) were used to reveal synapses and vesicular glutamate transporters, respectively. The appropriate secondary antibodies coupled to Cy3 and FITC fluorochromes revealed the signal. In all the cultures, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was used to counterstain cell nuclei. Slides were mounted using Fluorsave (Calbiochem, Germany). Cultures were visualised either by laser scanning confocal microscope (LSM 510 META) or by AxioImager Z1 microscope (Zeiss, Jena, Germany). Exported images from LSM and Axiovision software were processed with the ImageJ (NIH) program and exported as TIFF files.

Immunoblot

Whole-cell protein extract of human iPSCs were made from frozen pellets by a lysis performed in TGEK-50 buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 50 mM KCl) with 0.5% Triton X-100 and protease inhibitor (Complete-EDTA-free, Roche). From each sample, 25 μg of protein was electrophoresed in 14% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Primary antibodies (anti-frataxin, 1:250; 18A5DB1, Mitosciences; anti- β -tubulin, 1:40,000; IGBMC-made; anti-SDH (su30kDa), 1:1000; Invitrogen; anti-NDUFS3, 1:2000; Invitrogen; anti-lipoid acid, 1:5000; Calbiochem; and anti-GAPDH, 1:20,000; IGBMC-made)

were incubated overnight at 4°C. HRP-conjugated secondary antibody (goat anti-mouse or anti-rabbit, 1:5000; Jackson ImmunoResearch) was incubated for 1 hour at room temperature. Immunocomplexes were revealed by SuperSignal West Pico or Dura Chemiluminescent Substrate (37071, Pierce), according to the manufacturer's instructions.

For mismatch repair protein analysis, cells were resuspended in (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 10% glycerol) containing Protease Inhibitor Cocktail (Roche) and sonicated for 45 seconds. Protein concentration was determined using the Pierce BCA protein assay kit. Proteins (40 μg) were denatured for 5 minutes at 95°C in 4 \times loading buffer and resolved by electrophoresis on an 8% polyacrylamide SDS-PAGE gel. Membranes were blocked for 1 hour at room temperature in PBS-T containing 5% (m/v) dried milk. Primary MMR antibodies were incubated simultaneously overnight at 4°C in antibodies anti-MSH2 (1:2800; NA27, Calbiochem), anti-MSH6 (1:2000; 610918, BD Laboratories), anti-MSH3 (1:2000; 611930, BD Laboratories) and anti-Actin Ab-5 (1:20,000; 612656, BD Laboratories). The membranes were incubated for 1 hour in secondary antibody (sheep anti-mouse-HRP, 1:5000; 515-035-062, Jackson ImmunoResearch) at room temperature and visualised using ECL plus western blotting detection system (RPN2132, Amersham).

Enzyme activities

iPSCs were harvested with collagenase IV and dispase (Invitrogen) in PBS and the dry pellet immediately frozen at -80°C. The activity of the respiratory chain enzyme complex succinate dehydrogenase (SDH, complex II) and the citric acid cycle enzymes isocitrate dehydrogenase (IDH) were determined as previously described (Calmels et al., 2009).

Electron microscopy

Cells were fixed in 2.5% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2), rinsed in cacodylate buffer and postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 hour at 4°C. Cells were contrasted with uranyl acetate for 2 hours at 4°C, dehydrated, and embedded in Epon. Ultrathin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined with a Morgagni 268D electron microscope.

Statistics

Results are represented as mean \pm s.d. Comparisons between groups for mean fluorescence intensity were made using one way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test using the Prism Software (GraphPad Software). Histograms were generated using Sigmaplot 10.0. All histograms and images generated using ImageJ software (NIH) were imported in Adobe Illustrator and the final figure was exported in TIFF format. *P*-values less than 0.05 were considered significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marcel Boeglin, Josiane Hergueux, Laetitia Fuhrman and Jean-Luc Weickert from the IGBMC for technical help. We thank Eric Jeandier (CHU Mulhouse) for iPSCs caryotypes. We thank Karim Hnia, Alain Martelli and Karine Merienne for helpful discussion and reading through the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they do not have any competing or financial interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.H. designed and performed experiments for iPSC characterisation, differentiation and characterisation of cardiomyocytes from iPSCs. M.W.-D. designed and performed experiments for iPSC derivation and characterisation, neurospheres and neurons from iPSCs. S.C. designed and performed experiments for the differentiation and characterisation of neurospheres and neurons from iPSCs. P.T. designed strategy and performed experiments for iPSCs derivation. J.P.S. performed the mismatch repair western blot. N.V., D.G., L.L., C.A., L.R. and M.R. performed experiments. M.T. was responsible for the teratoma analysis. N.M. was responsible for electron microscopy studies. S.N.S. designed the electrophysiological studies. S.V. designed the iPSC derivation. C.E.P. designed the mismatch repair study. M.P. and H.P. conceived, designed and supervised the complete study. A.H., M.W.-D., S.C., M.P. and H.P. wrote the manuscript. All authors read and approved the content of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the US Friedreich's Ataxia Research Alliance (USA) (to H.P. and to M.P.), the Association Française pour l'Ataxie de Friedreich (to H.P.), the Association Française contre les Myopathies (to S.V.), the Ministère de l'Économie, de l'Industrie et de l'emploi (to S.V.), and the European Community under the European Research Council [grant number 206634/ISCATAXIA to H.P.] and the 7th Framework Program [grant number 242193/EFACTS to H.P. and to M.P.].

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material for this article is available at <http://dmm.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dmm.010900/-/DC1>

REFERENCES

- Abramov, A. Y., Smulders-Srinivasan, T. K., Kirby, D. M., Acin-Perez, R., Enriquez, J. A., Lightowers, R. N., Duchon, M. R. and Turnbull, D. M.** (2010). Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations. *Brain* **133**, 797-807.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M. B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J. M., King, R. et al.** (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* **88**, 580-590.
- Calmels, N., Schmucker, S., Wattenhofer-Donzé, M., Martelli, A., Vaucamps, N., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Bouton, C., Koenig, M. and Puccio, H.** (2009). The first cellular models based on frataxin missense mutations that reproduce spontaneously the defects associated with Friedreich ataxia. *PLoS ONE* **4**, e6379.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltó, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A. et al.** (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423-1427.
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trotter, Y., Kish, S. J., Fauchoux, B., Trouillas, P. et al.** (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1771-1780.
- Chang, D. K., Ricciardiello, L., Goel, A., Chang, C. L. and Boland, C. R.** (2000). Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J. Biol. Chem.* **275**, 18424-18431.
- Chantrel-Groussard, K., Geromel, V., Puccio, H., Koenig, M., Munnich, A., Rötig, A. and Rustin, P.** (2001). Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2061-2067.
- Chintawar, S., Hourez, R., Ravello, A., Gall, D., Orduz, D., Rai, M., Bishop, D. P., Geuna, S., Schiffmann, S. N. and Pandolfo, M.** (2009). Grafting neural precursor cells promotes functional recovery in an SCA1 mouse model. *J. Neurosci.* **29**, 13126-13135.
- Clark, R. M., De Biase, I., Malykhina, A. P., Al-Mahdawi, S., Pook, M. and Bidichandani, S. I.** (2007). The GAA triplet-repeat is unstable in the context of the human FXN locus and displays age-dependent expansions in cerebellum and DRG in a transgenic mouse model. *Hum. Genet.* **120**, 633-640.
- Cnop, M., Igoillo-Estevé, M., Rai, M., Begu, A., Serroukh, Y., Depondt, C., Musuaya, A., Marfour, I., Ladrrière, L., Moles Lopez, X. et al.** (2012). The central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in Friedreich's ataxia-associated diabetes. *Ann. Neurol.* [Epub ahead of print] doi: 10.1002/ana.23698.
- De Biase, I., Rasmussen, A., Monticelli, A., Al-Mahdawi, S., Pook, M., Cocozza, S. and Bidichandani, S. I.** (2007). Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics* **90**, 1-5.
- Deutsch, E. C., Santani, A. B., Perlman, S. L., Farmer, J. M., Stolle, C. A., Marusich, M. F. and Lynch, D. R.** (2010). A rapid, noninvasive immunoassay for frataxin: utility in assessment of Friedreich ataxia. *Mol. Genet. Metab.* **101**, 238-245.
- Dottori, M. and Pera, M. F.** (2008). Neural differentiation of human embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* **438**, 19-30.
- Du, J., Campau, E., Soragni, E., Ku, S., Puckett, J. W., Dervan, P. B. and Gottesfeld, J. M.** (2012). Role of mismatch repair enzymes in GAA-TTC triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 29861-29872.
- Ezzatizadeh, V., Pinto, R. M., Sandi, C., Sandi, M., Al-Mahdawi, S., Te Riele, H. and Pook, M. A.** (2012). The mismatch repair system protects against intergenerational GAA repeat instability in a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol. Dis.* **46**, 165-171.
- Freberg, C. T., Dahl, J. A., Timoskainen, S. and Collas, P.** (2007). Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1543-1553.
- Guillon, B., Bulteau, A. L., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Friguet, B., Puccio, H., Drapier, J. C. and Bouton, C.** (2009). Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins. *FEBS J.* **276**, 1036-1047.
- Halabi, A., Ditch, S., Wang, J. and Grabczyk, E.** (2012). DNA mismatch repair complex MutS β promotes GAA-TTC repeat expansion in human cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 29958-29967.
- Jiralerspong, S., Ge, B., Hudson, T. J. and Pandolfo, M.** (2001). Manganese superoxide dismutase induction by iron is impaired in Friedreich ataxia cells. *FEBS Lett.* **509**, 101-105.
- Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E. A., Altun, G., Laurent, L. C., Loring, J. F., Napierala, M. and Gottesfeld, J. M.** (2010). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell* **7**, 631-637.
- Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M. C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donzé, M., Puccio, H., Hebert, N. et al.** (2010). Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* **95**, 1651-1659.
- Lill, R.** (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831-838.
- Liu, J., Verma, P. J., Evans-Galea, M. V., Delatycki, M. B., Michalska, A., Leung, J., Crombie, D., Sarsero, J. P., Williamson, R., Dottori, M. et al.** (2011). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev.* **7**, 703-713.
- López Castel, A., Cleary, J. D. and Pearson, C. E.** (2010). Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 165-170.
- Mariani, J., Simonini, M. V., Palejev, D., Tomasini, L., Coppola, G., Szekeely, A. M., Horvath, T. L. and Vaccarino, F. M.** (2012). Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 12770-12775.
- Martelli, A., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L. and Puccio, H.** (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2651-2658.
- Martelli, A., Napierala, M. and Puccio, H.** (2012). Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis. Model. Mech.* **5**, 165-176.
- Michael, S., Petrocine, S. V., Qian, J., Lamarche, J. B., Knutson, M. D., Garrick, M. D. and Koepfen, A. H.** (2006). Iron and iron-responsive proteins in the cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Cerebellum* **5**, 257-267.
- Miranda, C. J., Santos, M. M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossée, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J. et al.** (2002). Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett.* **512**, 291-297.
- Monrós, E., Moltó, M. D., Martínez, F., Cañizares, J., Blanca, J., Vilchez, J. J., Prieto, F., de Frutos, R. and Palau, F.** (1997). Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 101-110.
- Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M. A., Arranz, J. A., Del Toro, M., Labayru, M. T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J. et al.** (2011). A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 656-667.
- Onder, T. T. and Daley, G. Q.** (2012). New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 500-508.
- Pandolfo, M.** (2006). Friedreich ataxia: Detection of GAA repeat expansions and frataxin point mutations. *Methods Mol. Med.* **126**, 197-216.
- Pandolfo, M.** (2009). Friedreich ataxia: the clinical picture. *J. Neurol.* **256** Suppl. 1, 3-8.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. and Koenig, M.** (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **27**, 181-186.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. and Rustin, P.** (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**, 215-217.

- Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z. and Festenstein, R. (2003). DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* **422**, 909-913.
- Schmucker, S. and Puccio, H. (2010). Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R103-R110.
- Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donzé, M., Reutenauer, L. and Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS ONE* **6**, e16199.
- Selak, M. A., Lyver, E., Micklow, E., Deutsch, E. C., Onder, O., Selamoglu, N., Yager, C., Knight, S., Carroll, M., Daldal, F. et al. (2011). Blood cells from Friedreich ataxia patients harbor frataxin deficiency without a loss of mitochondrial function. *Mitochondrion* **11**, 342-350.
- Seriola, A., Spits, C., Simard, J. P., Hilven, P., Haentjens, P., Pearson, C. E. and Sermon, K. (2011). Huntington's and myotonic dystrophy hESCs: down-regulated trinucleotide repeat instability and mismatch repair machinery expression upon differentiation. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 176-185.
- Seznez, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., Procaccio, V., Patel, M., Drapier, J. C., Koenig, M. et al. (2005). Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 463-474.
- Simon, D., Seznez, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M. and Puccio, H. (2004). Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* **24**, 1987-1995.
- Takahashi, T., Lord, B., Schulze, P. C., Fryer, R. M., Sarang, S. S., Gullans, S. R. and Lee, R. T. (2003). Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* **107**, 1912-1916.
- Tsai, C. L. and Barondeau, D. P. (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**, 9132-9139.
- Tsou, A. Y., Paulsen, E. K., Lagedrost, S. J., Perlman, S. L., Mathews, K. D., Wilmot, G. R., Ravina, B., Koeppen, A. H. and Lynch, D. R. (2011). Mortality in Friedreich ataxia. *J. Neurol. Sci.* **307**, 46-49.
- Wang, Y., Chen, G., Song, T., Mao, G. and Bai, H. (2010). Enhancement of cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells. *Science China. Life Sci.* **53**, 581-589.
- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. and Cortopassi, G. (1999). The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 425-430.
- Yazawa, M., Hsueh, B., Jia, X., Pasca, A. M., Bernstein, J. A., Hallmayer, J. and Dolmetsch, R. E. (2011). Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature* **471**, 230-234.
- Ye, H. and Rouault, T. A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry* **49**, 4945-4956.

Supplementary Information

Induced pluripotent stem cells derived neurons and cardiomyocytes as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia

Hick et al.

Table S1: Summary of different analysis performed on each iPSC clone

	CT136-4L			CT145-4L	FD135-4L		FD141-4L	
EXPERIMENTS	25	34	38	2	30	33	49	51
Neuronal phenotypic characterization								
Calcium imaging			x	x	x			x
Immunofluorescence β III-tubulin			x	x	x			x
Electrophysiology			x	x	x			x
Mitochondrial membrane potential			x	x	x			x
Electron microscopy			x	x	x			x
GAA repeats and FXN mRNA levels			x	x	x			x
Cardiac phenotypic characterization								
Cardiac markers mRNA levels		x					x	x
Immunofluorescence cTNT		x					x	x
GAA repeats and FXN mRNA levels		x					x	x
Electron microscopy		x		x			x	x
Rhythm analysis		x		x			x	x
(GAA)_n instability								
GAA follow-up in iPSCs		x			x	x		x
GAA follow-up in neurospheres			x	x	x			x
GAA follow-up in EBs		x			x		x	x
MSH proteins in iPSCs	x	x					x	x
MSH proteins in neurospheres			x	x	x			x

Table S2: List of primers used in qRT-PCR experiments

Application	Gene	Primer sequence
Normalization	GAPDH forward	TTGCCCTCAACGACCACTTT
	GAPDH reverse	TGGTGGTCCAGGGGTCTTAC
	β -actin forward	AGACCTGTACGCCAACACAGT
	β -actin reverse	CGCTCAGGAGGAGCAATGAT
	18S forward	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC
	18S reverse	CTTTCGCTCTGGTCCGTCTT
Transgene	POU5F1 forward	CCTCACTTCACTGCACTGTA
	SOX2 forward	TGCCCGGCACGGCCATTAACG
	NANOG forward	TGGAGGCTGCCTTGGAAGCTGCT
	LIN28 forward	TACCCTGCTCCCGGAGGCACAG
	IRES reverse	GGGGCGGAATTGGCCGCCCTA
ES markers	Oct4 forward	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTGG
	Oct4 reverse	ACTTCACCTTCCCTCCAACC
	Nanog forward	TTTGGGAAGCTGCTGGGGAAG
	Nanog reverse	GATGGGAGGAGGGGAGAGGA
	Sox2 forward	AGTCTCCAAGCGACGAAAAA
	Sox2 reverse	TTTCACGTTTGCAACTGTCC
	Lin 28 forward	AGTGGCCTGGATAGGGAAGT
	Lin 28 reverse	CTTGGCTCCATGAATCTGGT
Cardiac markers	GATA-4 forward	TGGCCTGTCATCTCACTACG
	GATA-4 reverse	GGGAGACGCATAGCCTTGT
	ACTN2-forward	CACCGTCACCTTCCAATCC
	ACTN2-reverse	CGCCAGGATGTATGGCTTA
	CACNB2-forward	GCCGTACATTAGCCACTTCAA
	CACNB2-reverse	TTGGGAAGCAGAACGGATAG
	KCNQ1-forward	ATTGGGAAGCCCTCACTGTT
	KCNQ1-reverse	AAGCATGTTCGGTGATGAGTG
	TBX5-forward	CGTTCTGCACTCACGTCTTT
	TBX5-reverse	TCTTGACATTCTGTGCAGCTC
	SerCa2-forward	ACAATGGCGCTCTCTGTTCT
	SerCa2-reverse	ACATGGACAGGCAGATGGA
Miscellaneous	Frataxin Forward	AGAGGAAACGCTGGACTCTT
	Frataxin reverse	ACGCTTAGGTCCACTGGATG
	MSH2 forward	GGAAAAGAAGATGCAGTCAACA
	MSH2 reverse	CAAACCTGTGCACTGGAATCC
	MSH3 forward	GAGTTATGGATTAAATGTGGC
	MSH3 reverse	GTCCACTTCTGCAGGTCTTG
	MSH6 forward	AGCAAGGCTTGCTAATCTCC
	MSH6 reverse	CTACAGTTGACCTTTCCTAG

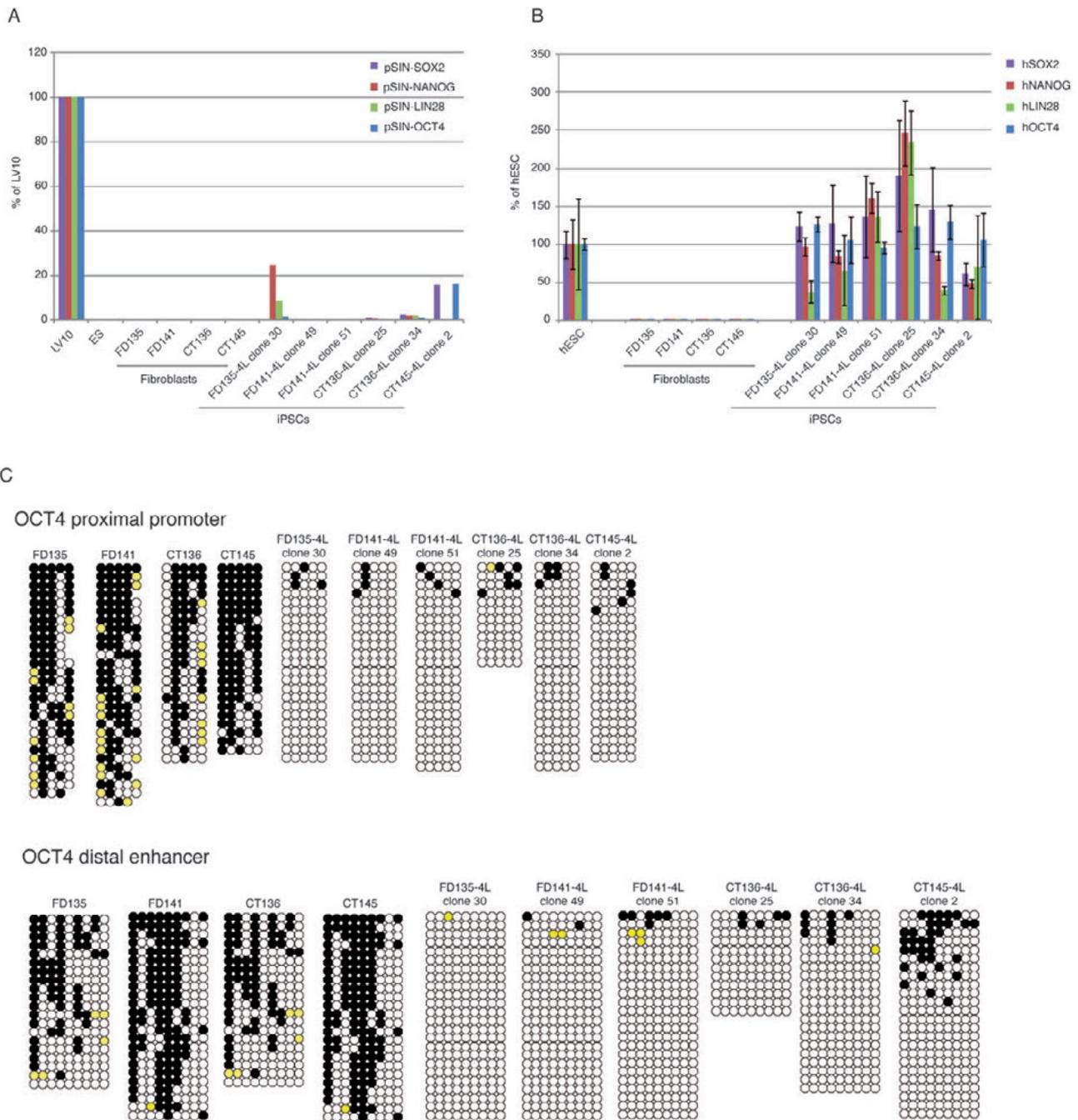


Figure S1: iPSC repress virus transgenes and *de novo* express endogenous genes in correlation with epigenetic remodelling.

(A) Quantitative RT-PCR analyses of the expression levels of viral SOX2, NANOG, LIN28 and OCT4 relative to GADPH. Data were normalized to LV10 sample. Human ES, original fibroblast cells and derived iPSC were tested. (B) Quantitative RT-PCR analyses of the expression levels of endogenous SOX2, NANOG, LIN28 and OCT4 relative to GADPH on hESC and on original fibroblast cells and derived iPSC normalized to hESC H9. The data are presented as mean \pm SD. (C) Methylation status analysis of Oct4 proximal promoter and distal enhancer by bisulfite sequencing. Each line corresponds to a independant sequence. Black dot, methylated C base; White dot, unmethylated C base; Yellow dot, not recovered base.

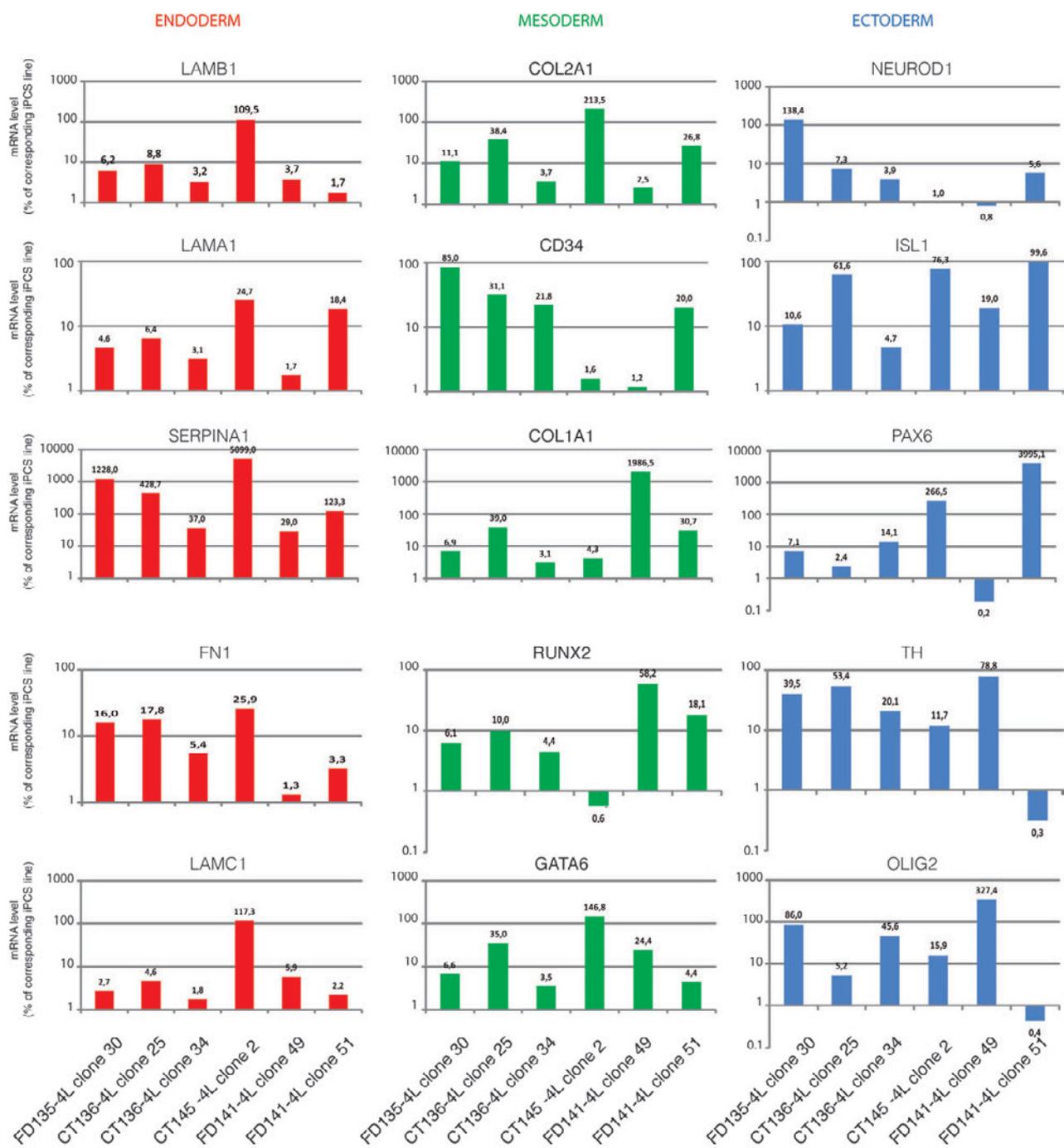


Figure S2: iPSC-derived embryoid bodies show active expression of differentiation markers from the three germ layers.

For each embryonic layer, 5 representative genes are shown. For a given gene and a given iPSC line, presented result is the activation ratio of transcription in embryoid bodies vs undifferentiated cells.

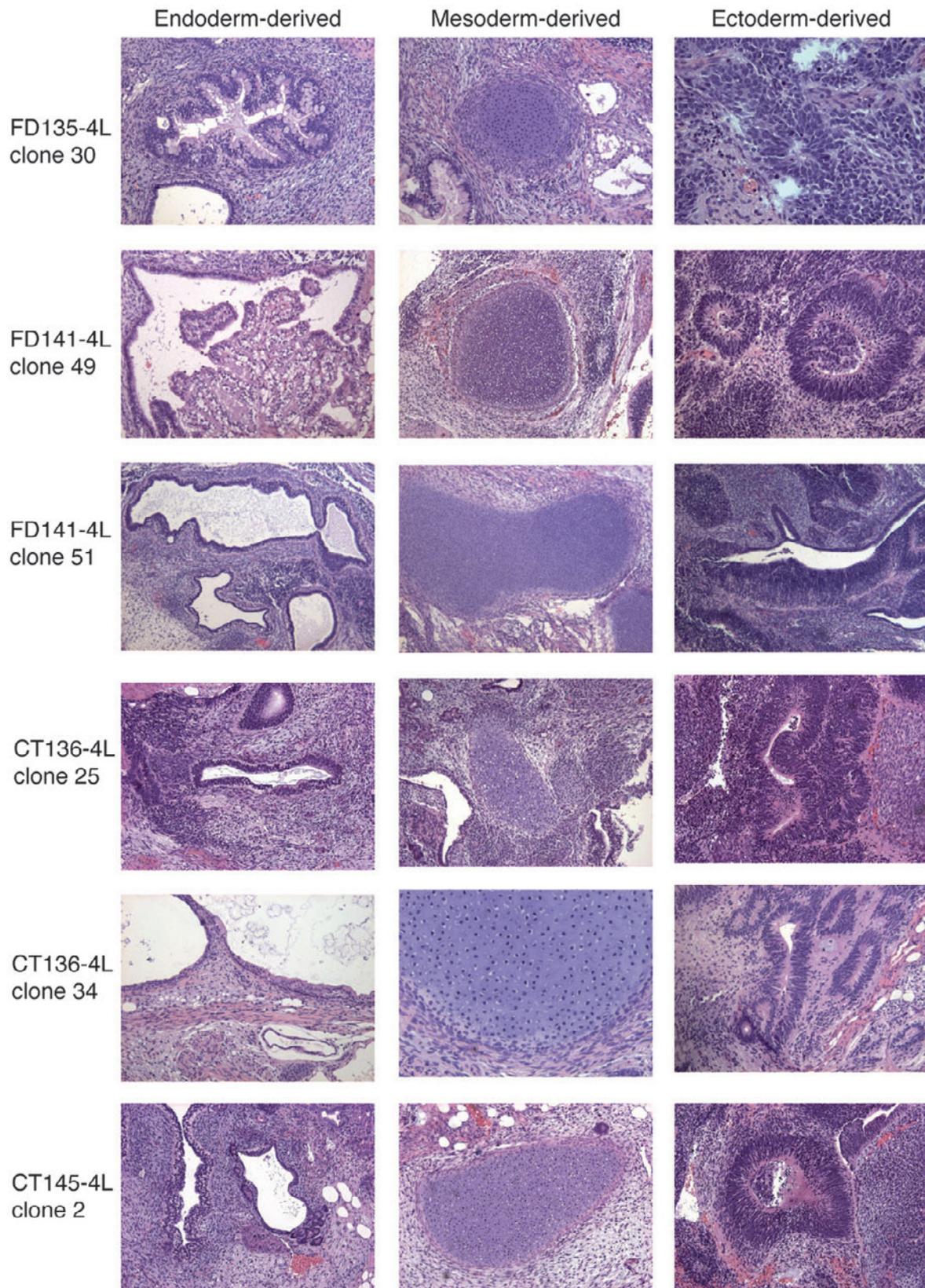


Figure S3: iPSC pluripotency *in vivo*

Representative HE stained sections from teratoma, all x10 magnification except: clone 30 ectoderm x20; all clones 51 x15; clone 34 mesoderm x20

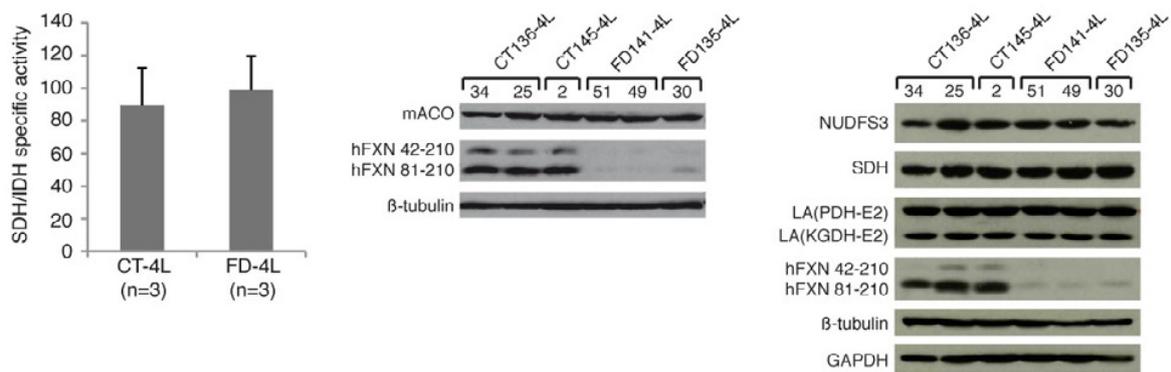


Figure S4: Absence of Fe-S cluster deficit in FRDA iPSCs

(A) SDH specific activities standardized to isocitrate dehydrogenase (IDH) specific activity. (B) Western blot of whole cell extracts from control or FRDA iPSCs. The mature aconitase (mACO), the intermediate (hFXN 42-210) and mature (hFXN 81-210) forms of frataxin are detected. β-tubulin is used as a loading control. (C) Western blot of whole cell extracts from control or FRDA iPSCs. NUDFS3, SDH, LA-(PDH-E2), LA-(KGDH-E2), the intermediate (hFXN 42-210) and mature (hFXN 81-210) forms of frataxin are detected. β-tubulin and GAPDH are used as a loading control.

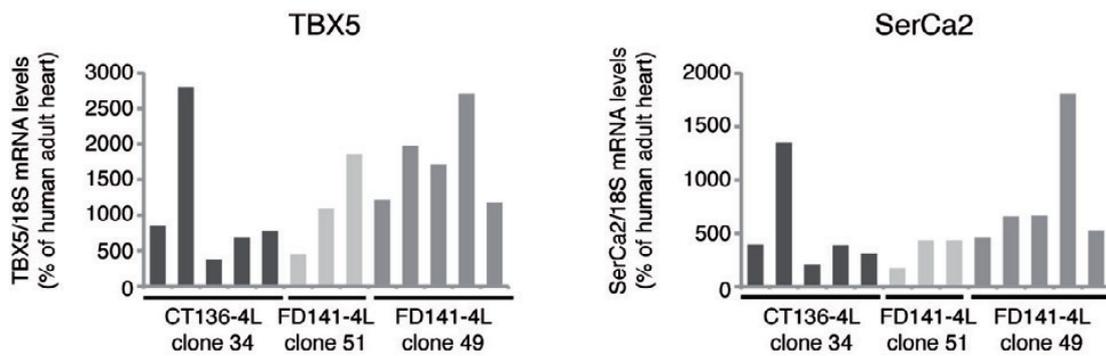


Figure S5: Cardiac markers expression in beating areas
 Quantitative RT-PCR analyses of cardiac markers expression relative to the 18S housekeeping gene in different pools of beating area from control (CT136-4L clone 34) and patient (FD141-4L clones 49 and 51) iPSCs, normalized to human adult heart. TBX5 transcription factors ; calcium-ATPase SerCa2

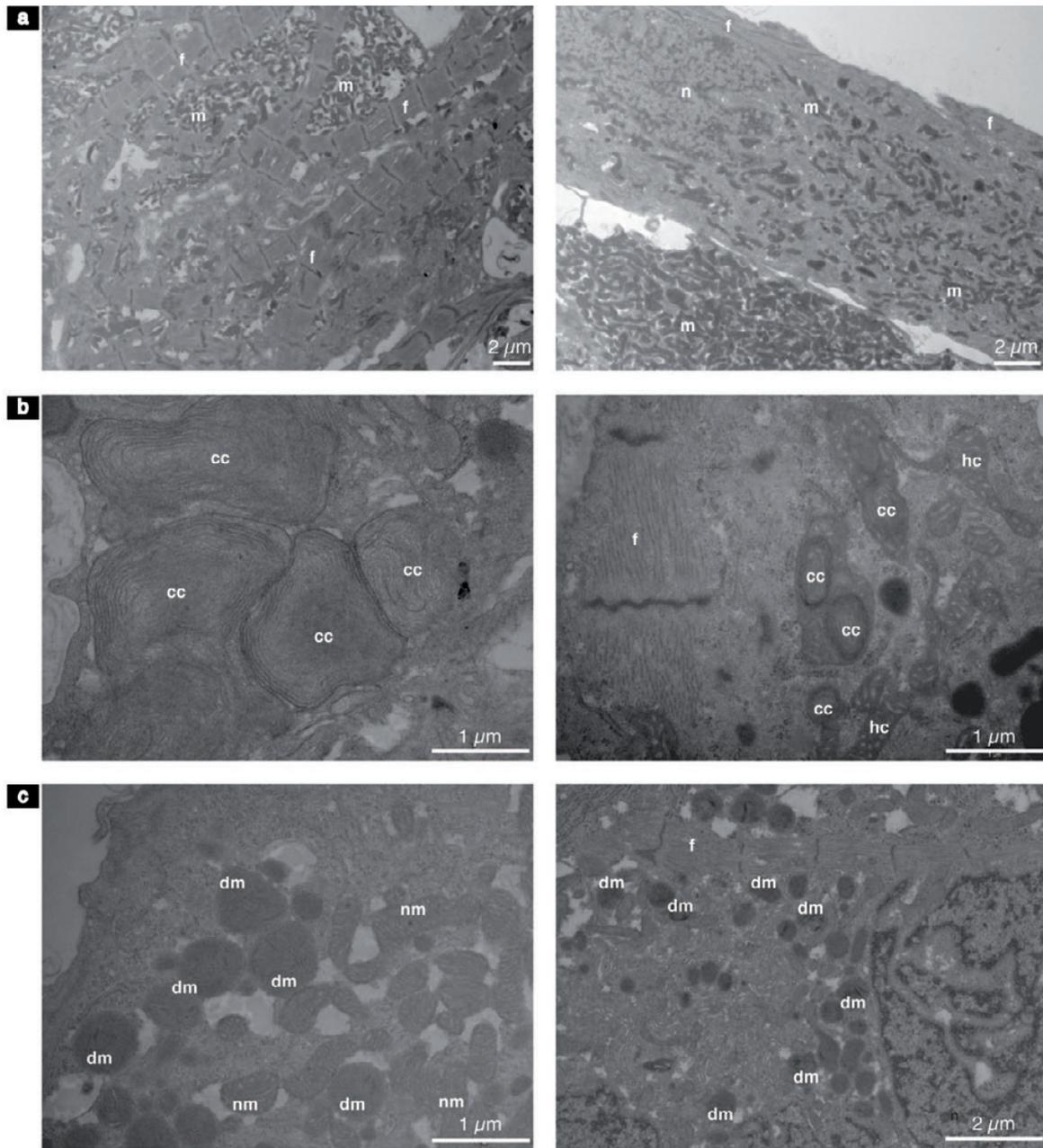


Figure S6 : Additional pictures of ultrastructural changes in cardiomyocytes derived from FRDA iPSCs

a. Abnormal proliferation and/or accumulation of mainly normal mitochondria. b. Onion-like mitochondrion with coiled cristae (cc) and mitochondrion with hypertrophic cristae (hc). c. Dark mitochondrion with poorly defined cristae (dm). Normal mitochondrion (nm), (f) contractile fiber, (n) nucleus.

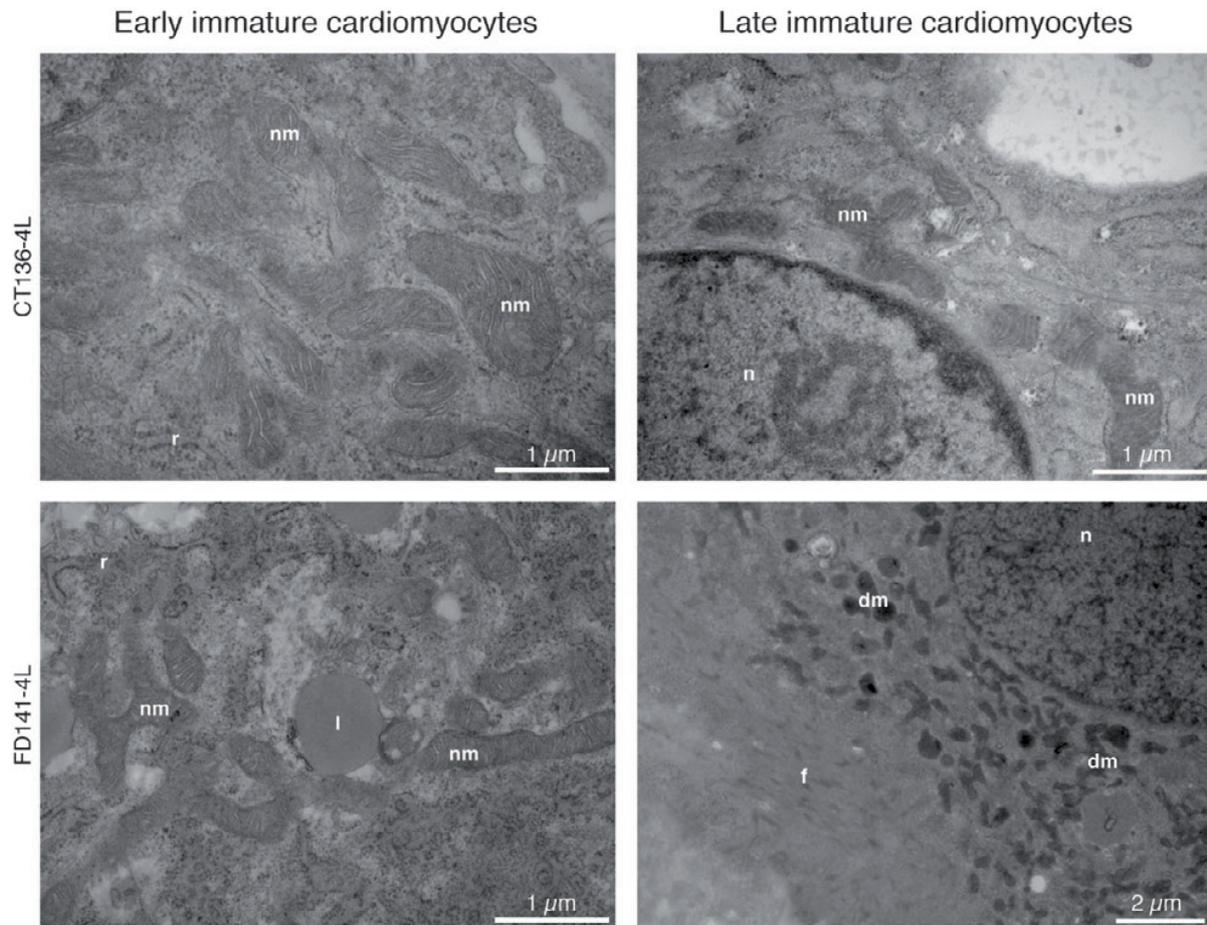
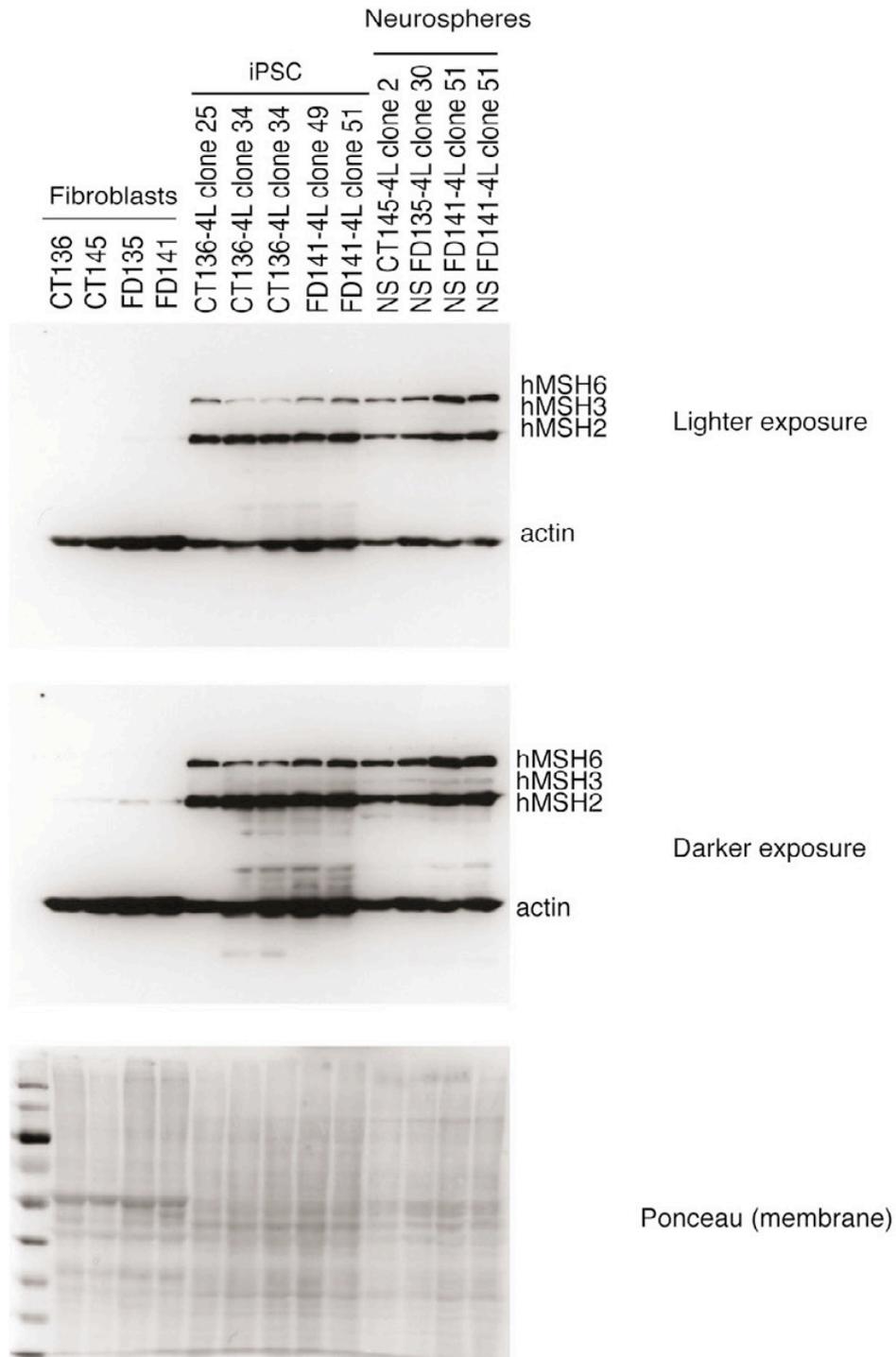


Figure S7 : Mitochondrial status in early versus late immature cardiomyocytes

Early immature cardiomyocytes (< 1 month) from both FRDA and controls display normal mitochondria, with well-defined cristae. At 2 months, both mature and immature cardiomyocytes coexist within the same beating areas. Late immature FRDA cardiomyocytes present similar mitochondrial defect as their neighboring mature cells, as shown by the dark mitochondria (dm). Normal mitochondrion, fibers (f), nucleus (n), lipids (l), reticulum (r).



Caractéristiques moléculaires et cellulaires	iPS AF	Cardiomyocytes AF
Expansion (GAA) _n	Oui	Oui
Réduction du taux de frataxine	Oui	Oui
Instabilité de l'expansion (GAA) _n	Oui	?
Déficit d'activité des protéines Fe-S	Non	?
Anomalies mitochondriales	?	Oui

TABLEAU 11 : Récapitulatif de la caractérisation des iPS et des cardiomyocytes AF

C. Conclusion

1- Intérêt et limites de ce travail

Cet article propose la première étude phénotypique « fonctionnelle » caractérisant des neurones et cardiomyocytes dérivant d'iPS de patients AF. Nous avons ainsi pu montrer que (1) les iPS ne présentaient pas le phénotype biochimique caractéristique de l'AF, à savoir le déficit d'activité des protéines Fe-S. Ce résultat était attendu, car la maladie se déclare bien après le développement embryonnaire, dans des tissus bien particuliers (système nerveux, cœur, pancréas). Il est cependant apparu que l'expansion $(GAA)_n$ était instable dans les iPS, mais pas dans les cellules différenciées, et que cette instabilité impliquait le système de réparation de l'ADN, comme précédemment montré par le laboratoire de J. Gottesfeld (Du et al., 2012a; Ku et al., 2010). (2) Bien que non sensitifs, les neurones produits présentaient un retard de maturation, compatible avec les données récentes du laboratoire de S. Boesch (Eigentler et al., 2013), ainsi qu'une diminution du potentiel de membrane mitochondriale, sans atteinte visible de l'ultrastructure des mitochondries. Enfin, (3) seuls les cardiomyocytes matures présentaient une atteinte mitochondriale, qui se traduisait principalement par une matrice mitochondriale sombre avec parfois des crêtes collapsées, une prolifération mitochondriale ou encore des mitochondries avec des crêtes hypertrophiques. Les résultats de la caractérisation moléculaire et cellulaire des iPS et des cardiomyocytes sont résumés dans le **tableau 11**.

Bien que prometteur, je trouve ce papier frustrant car la caractérisation des cardiomyocytes y est finalement assez légère, notamment à cause des petites quantités de matériel disponible et des lignées iPS réfractaires (CT145-4L et FD135-4L). En effet, la partie cardiaque est une étude comparative principalement basée sur les iPS d'un contrôle (CT136) et d'un patient (FD141), alors que la plupart des modélisations de maladie par les dérivés des iPS utilisent 2, voire 3, lignées pour chaque génotype. Le résultat mitigé de l'étude du rythme des zones contractiles illustre bien cette faiblesse du papier. Pour un même patient (FD141), les deux clones étudiés avaient des comportements différents : alors que le clone 49 avait un profil de contraction (vitesse et régularité) semblable à celui des contrôles, le clone 51 était plus lent et d'avantage sujet à des anomalies du rythme. Au final, seule l'atteinte mitochondriale des cardiomyocytes AF était vraiment convaincante et nous a poussé à approfondir cet aspect.

2- Problèmes rencontrés

Les iPS, et les cellules ES humaines en général, sont particulièrement sensibles et donc difficiles à maintenir en culture dans de bonnes conditions. La difficulté réside dans le maintien de leur état pluripotent, afin de pouvoir les amplifier pour les étudier ou les différencier dans un type cellulaire donné. Nos iPS ont été dérivées et cultivées pendant longtemps sur une monocouche de cellules nourricières (MEF, feeders) dans un milieu contenant notamment du KSR (*Knockout Serum Replacement*) et supplémenté quotidiennement en bFGF. Ce sont là trois éléments clés de la culture des iPS/ES, dont la qualité est extrêmement variable d'un lot à l'autre, ce qui impose la réalisation

	Mode de culture initial	Nouveau mode de culture
Support	Monocouche de feeders (MEF inactivés)	Matrigel™
Milieu de culture	- Milieu ES, composé de 80% KO-DMEM, 20% KSR, 1mM Gln, 1% P/S, 1% NEAA, 0,1mM β -Me. - Supplémenté de 10 ng/mL bFGF	mTESR1™
Point commun	- Renouvellement quotidien du milieu	
Avantages	- Lignées synchronisées, un passage hebdomadaire - Coût modéré	- Milieu complet, prêt à l'emploi - Qualité plus constante - Grande quantité de bFGF
Inconvénients	- Beaucoup de composants avec une qualité variable de lot à lot (MEF, KSR, bFGF) - Milieu à préparer soi-même	- Lignées désynchronisées, passage tous les 4 à 6 jours selon les clones - Morphologie différence suivant les clones - Absence d'antibiotiques - Coût élevé

TABLEAU 12 : Comparaison des méthodes de culture de nos iPS

β -Me : 2-Mercaptoethanol, bFGF : basic Fibroblast Growth Factor, Gln : Glutamine, KO-DMEM : Knockout-Dulbecco's Modified Eagle Medium, KSR : Knockout Serum Replacement, MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts, NEAA : Non Essential Amino Acids, P/S : Penicilline/Streptomycine.

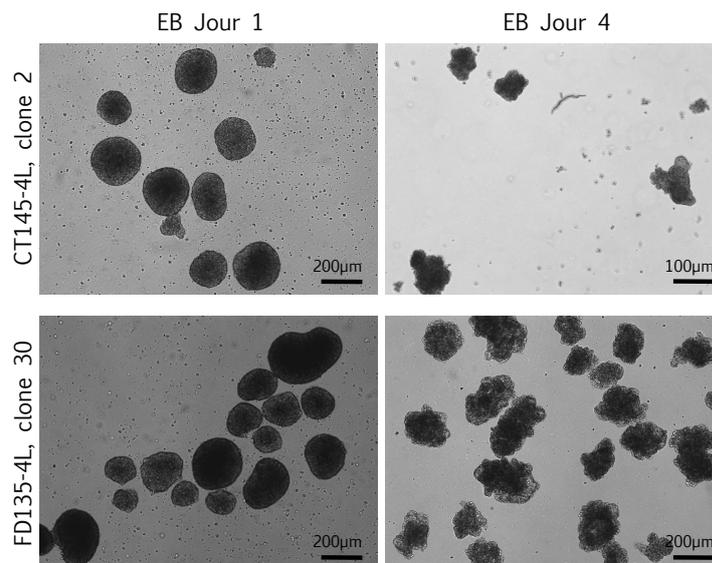


FIGURE 19 : Devenir d'EB formés à partir d'iPS sur Matrigel™

Le lendemain de la mise en suspension des fragments de colonies iPS, on obtient de jolis EB, aux contours réguliers et bien définis (photographies de gauche : EB jour 1). Trois jours plus tard, les EB se sont tous désintégrés, et forment des agrégats cellulaires irréguliers, incompatibles avec la poursuite du protocole de différenciation (photographies de droite : EB jour 4).

systématique de tests sur nos cellules avant d'entamer tout nouveau lot. Une mauvaise qualité d'un de ces composants se traduit par une morphologie des cellules anormale et une forte tendance à la différenciation spontanée.

Au cours de ma première année de thèse, j'ai eu la chance de connaître quelques périodes pendant lesquelles les lots de feeders/KSR/bFGF étaient plutôt bons et les iPS globalement réceptifs à mon protocole de différenciation cardiaque. J'ai ainsi réussi à différencier en cardiomyocytes les clones des lignées contrôles CT136 et CT145, et de la lignée patient FD141. Les quantités obtenues, bien que variables d'un clone à l'autre, étaient suffisantes pour une première caractérisation. Je n'ai cependant jamais pu obtenir de cardiomyocytes à partir des iPS (cultivés sur feeders) de la lignée patient FD135, qui ont toujours eu une très forte propension à se différencier spontanément, ce qui m'empêchait de les amplifier correctement pour produire les EB.

3- Changement de stratégie et conséquences

Face aux problèmes récurrents de culture que nous rencontrions avec nos lignées iPS, nous avons opté pour une méthode alternative où les feeders sont remplacés par une couche de Matrigel™ (BD Biosciences) et le milieu de culture classique des cellules ES par du milieu mTESR1™ (STEMCELL technologies) (**tableau 12**). Le Matrigel™ est une membrane basale obtenue à partir du sarcome de souris EHS (*Engelbreth-Holm-Scharm*) et principalement composée de laminine (60%), de collagène IV (30%), de protéoglycanes à héparane sulfate (8%), d'entactine (1%), ainsi que de facteurs de croissance (bFGF, EGF, IGF-1, PDGF, NGF et TGF-β1) (Kibbey, 1994). Le mTESR1™ est un milieu riche et complexe supplémenté en bFGF et en TGF-β, garantissant le maintien de la pluripotence des cellules ES/iPS (James et al., 2005; Ludwig et al., 2006; Schuldiner et al., 2000). Le bFGF y est 25 fois plus concentré que dans les conditions classiques (100ng/mL versus 4ng/mL) pour palier à la diminution de stabilité de celui-ci en absence de sérum (Ludwig et al., 2006). Le Matrigel™ et le mTESR1™ ont fait leurs preuves dans le maintien de cellules ES à long terme (Akopian et al., 2010) et sont supposés être plus fiables car de qualité contrôlée.

Conformément à nos attentes, le duo Matrigel™/mTESR1™ nous a permis de stabiliser l'état de nos lignées d'iPS en culture en diminuant la différenciation spontanée. En revanche, il a aussi été à l'origine de quelques désagréments : (1) la désynchronisation des lignées (passage tous les 4 à 6 jours selon le clone), (2) l'adoption de « caractères » propres à chaque clone (colonies grises/transparentes, petites/grosses, etc.) et enfin (3) la diminution importante du rendement de différenciation des iPS en cardiomyocytes avec le protocole des EB traités à l'acide ascorbique. L'échec du protocole de différenciation est dû à la difficulté à produire des EB à partir de lignées iPS établies sur Matrigel™. Il est possible de former des EB à partir d'iPS cultivés sur Matrigel™ en pré-traitant les colonies pendant 2 jours avec du milieu de différenciation et en ne dissociant pas les colonies après détachement : les EB sont plutôt jolis jusqu'à 3 jours de culture en suspension, puis se désintègrent spontanément les rendant inutilisables pour la suite du protocole (**figure 19**). Cette observation s'explique probablement par le fait que selon le support sur lequel sont cultivées les

ES/iPS (feeders ou Matrigel™), les cellules n'expriment pas les mêmes protéines de surface et n'ont donc pas les mêmes capacités à former des EB (Tompkins et al., 2012).

L'incompatibilité de la culture des iPS en Matrigel™/mTESR1™ avec mon protocole de différenciation cardiaque pourrait sembler réhibitoire, justifiant un retour à l'ancien système de culture sur feeders. Mais dans la mesure où ce protocole n'était pas tellement efficace (rendement faible, lignées réfractaires) et ne permettait pas d'approfondir nos analyses, j'ai décidé de tester des protocoles de différenciation prometteurs et compatibles avec une culture des iPS sur Matrigel™. Le résultat de ce travail fait l'objet du *point IV* ci-après.

A/

B/

Schéma non libre
de droitsSchéma non libre
de droits

C/

D/

Schéma non libre
de droitsSchéma non libre
de droits

E/

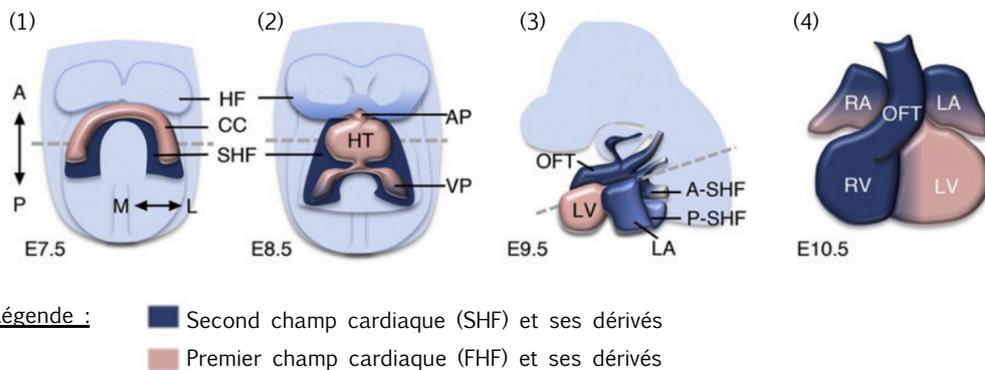


FIGURE 20 : Stade précoce du développement embryonnaire cardiaque

A/ Localisation des structures embryonnaires.

B/ Orientation de l'embryon par rapport au futur bébé.

C/ Invagination de cellules épiblastiques à travers la ligne primitive (transition épithélio-mésenchymateuse) et formation par vagues successives de l'endoderme puis du mésoderme. Cette étape correspond au début de la gastrulation.

D/ Migration des cellules du mésoderme cardiaque de façon symétrique vers l'aire cardiaque, située dans la partie antérieure de l'embryon (flèches rouges). Les flèches grises représentent la migration de cellules du mésoderme destinées à former d'autres organes.

(Les illustrations des points A, B, C, D sont issues du site www.studyblue.com)

E/ Poursuite du développement cardiaque (illustration issue de (Kelly, 2012)). Le timing indiqué correspond au développement cardiaque chez la souris. (1) Formation du croissant cardiaque (premier champ cardiaque) avec en position sous-jacente le second champ cardiaque (deuxième pool de progéniteurs cardiaques). (2) Fusion du croissant cardiaque dans sa partie médiane et formation du tube cardiaque linéaire, avec à ses extrémités les pôles artériel et veineux. (3) Courbure du tube cardiaque permettant l'organisation des futurs compartiments cardiaques. (4) Schéma indiquant les contributions de chaque champ cardiaque aux différents compartiments du cœur.

A : anterior, AP : arterial pole, CC : cardiac crescent, E : embryonic day, HF : Head fold, HT : heart tube, LA : left atrium, LV : left ventricle, OFT : outflow tract, P : posterior, RA : right atrium, RV : right ventricle, SHF : second heart field, VP : venous pole.

IV. Développement d'un protocole de différenciation des iPS en cardiomyocytes pour la poursuite de la caractérisation des cardiomyocytes de patients AF

La pluripotence des cellules ES/iPS est à double tranchant, puisqu'elle permet de générer n'importe quel type cellulaire de l'organisme, mais en même temps, rend aussi cette différenciation difficile à contrôler. La tendance actuelle consiste à aborder la différenciation des cellules du point de vue de la biologie du développement, en essayant de reproduire *in vitro* les événements clés qui régulent la différenciation précoce d'un tissu. L'embryogenèse cardiaque implique l'orchestration de plusieurs voies de signalisations, tantôt activées, tantôt réprimées, de façon à permettre de franchir les différentes étapes jusqu'à l'obtention des cardiomyocytes fonctionnels (*voir résultats point IV-A-1*).

J'ai donc décidé de suivre cette approche pour trouver un nouveau protocole de différenciation cardiaque, compatible avec notre nouveau mode de culture des iPS. Malheureusement, aucun des protocoles testés ne fut satisfaisant. J'ai donc entrepris de développer un protocole compatible avec nos lignées iPS. Lors de mes précédents travaux, j'avais aussi pris conscience qu'il était nécessaire de coupler la différenciation à une méthode de sélection/enrichissement des cardiomyocytes efficace de façon à permettre une caractérisation des cellules la plus juste possible.

A. Pré-requis

1- Développement embryonnaire du cœur

Le cœur est le premier organe à être formé lors de l'embryogenèse chez les vertébrés, afin d'assurer l'apport en nutriments et en oxygène à l'embryon grandissant et d'éliminer ses déchets dès que le nombre de cellules ne permet plus une diffusion efficace. Le développement cardiaque est un processus complexe coordonné temporairement et spatialement, débutant à la fin de la 2^e semaine de vie intra-utérine lors de la gastrulation et se terminant à la fin de la 8^e semaine de vie embryonnaire après la formation des artères coronaires (voire les revues ([Abu-Issa and Kirby, 2007](#); [Van Vliet et al., 2012](#); [Zhang et al., 2012a](#))). Nous nous limiterons ici au stade précoce du développement cardiaque, c'est-à-dire jusqu'à la formation des quatre cavités cardiaques.

Le développement cardiaque est initié au moment de la gastrulation, processus conduisant à la formation des trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Elle débute par l'apparition de la ligne primitive, correspondant à un sillon médian formé à la surface de l'épiblaste dans la partie caudale de l'embryon (**figure 20-A,B**). Une partie des cellules de l'épiblaste subissent une transition épithélio-mésenchymateuse et s'invaginent au niveau de la ligne primitive, se concentrant dans l'interstice entre l'épiblaste et l'hypoblaste (**figure 20-C**). Elles y forment de façon transitoire le mésendoderme : une première vague d'invagination aboutit à la formation de l'endoderme viscéral et une seconde conduit à la formation du mésoderme (**figure 20-C**) ([Van Vliet et al., 2012](#)). La formation de la ligne primitive et l'invagination des cellules de l'épiblaste sont sous le contrôle de membres de la superfamille du TGF β (*Transforming Growth Factor β*), en particulier du BMP4 (*Bone morphogenic Protein 4*) et de Nodal, ainsi que des protéines des familles Wnt

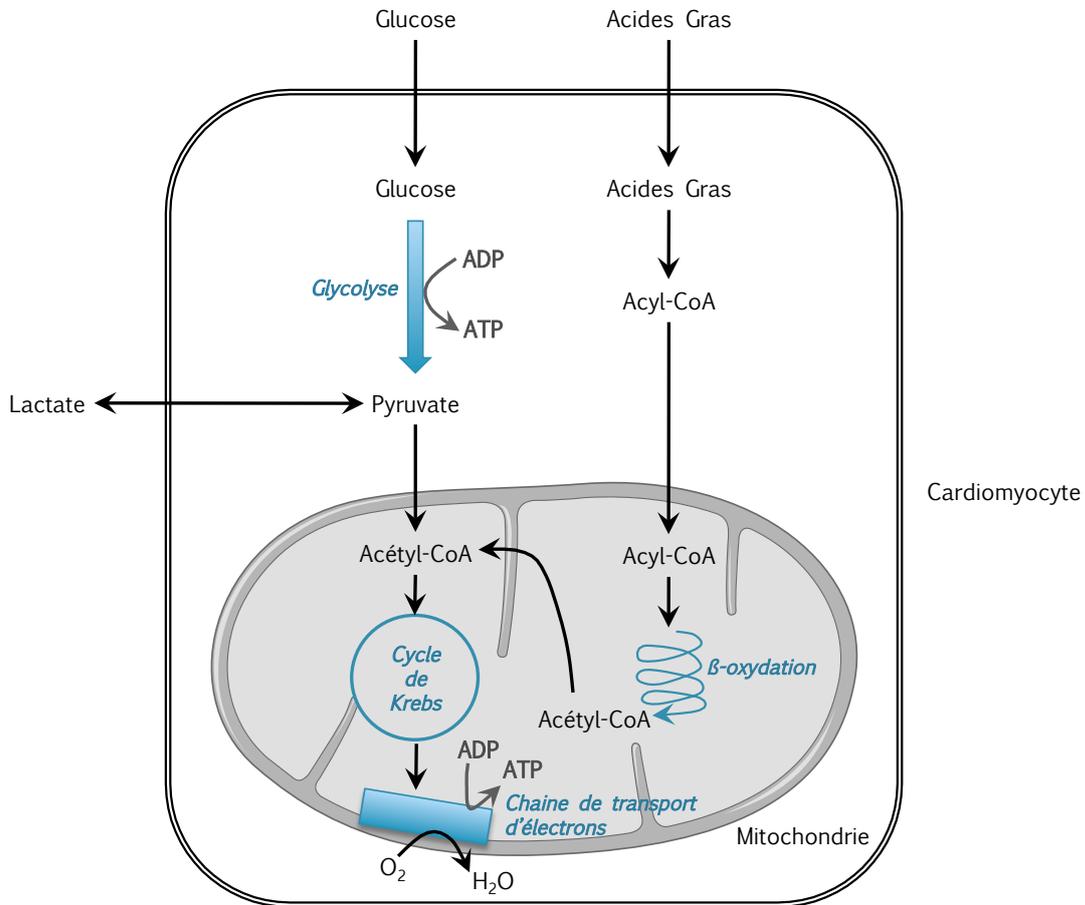


FIGURE 21 : Métabolisme énergétique du cœur (adaptée d'après (Onay-Besikci, 2006))

Le glucose, le lactate et les acides gras sont les principales sources d'énergie du cœur. Le pyruvate est produit à partir du glucose via la glycolyse ou du lactate via son oxydation. Le pyruvate entre ensuite dans la mitochondrie où il subit une décarboxylation, pour former de l'acétyl-CoA. Les acides gras, quant à eux, sont activés dans le cytosol sous forme d'esters-CoA (acyl-CoA), puis entrent dans la mitochondrie par le biais de la navette acyl-carnitine. Les acyl-CoA sont dégradés via la β -oxydation, produisant de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA issu de la décarboxylation du pyruvate ou de la β -oxydation entre dans le cycle de Krebs. Celui-ci produit du pouvoir réducteur (NADH, H⁺ et FADH₂) utilisé par la chaîne de transport d'électrons pour produire de l'ATP.

ATP : Adénosine TriPhosphate, CoA : coenzyme A, FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide, NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

(*Wingless/INT*) et FGF (*Fibroblast Growth Factors*) (voir revues (Brade et al., 2013; Murry and Keller, 2008)). Il est important de noter que la signalisation Wnt/ β -caténine a un effet biphasique sur la différenciation cardiaque. Elle est d'abord requise pour la formation de la ligne primitive et l'induction du mésoderme. Par contre, pour que la différenciation cardiaque puisse se poursuivre, il est impératif que cette voie soit inhibée (Tzahor, 2007).

Au niveau de la partie antérieure de la ligne primitive, les cellules invaginées s'en écartent pour former de part et d'autre le mésoderme splanchnique antérieur, dont une partie va subir une spécification cardiaque et former le mésoderme cardiogénique comportant les progéniteurs cardiovasculaires. Ces deux groupes de cellules mésodermiques migrent ensuite de façon symétrique vers la partie céphalique de l'embryon, en avant de la membrane oropharyngée (**figure 20-D**), où ils se rejoignent pour former le croissant cardiaque (aussi appelé premier champ cardiaque) (**figure 20-E-1**). Celui-ci va ensuite fusionner dans sa partie médiane pour former le tube cardiaque linéaire (**figure 20-E-2**) : cette étape correspond à la différenciation des progéniteurs cardiaques en cardiomyocytes, capables de se contracter. La différenciation des progéniteurs du premier champ cardiaque serait sous contrôle de facteurs BMPs, FGFs et d'inhibiteurs de la voie Wnt/ β -caténine (DKK1 et Cressent), sécrétés par l'endoderme antérieur (Brade et al., 2013). Le tube cardiaque linéaire comporte une oreillette et un ventricule primitifs, respectivement connectés au pôle veineux et au pôle artériel (**figure 20-E-2**). Il subit rapidement une courbure vers la droite de façon à rassembler les pôles artériel et veineux et à disposer parallèlement les futurs compartiments cardiaques (**figure 20-E-3**). Un second champ de progéniteurs cardiaques, sous-jacent au croissant cardiaque et issu du mésoderme pharyngé, contribue à la croissance du tube cardiaque (**figure 20-E-3**). Le premier champ cardiaque conduit à la formation du ventricule gauche et d'une partie des oreillettes. Le second champ cardiaque génère, quant à lui, le ventricule droit, la majeure partie des oreillettes, les artères, les cellules pacemakers et le système de conduction (**figure 20-E-4**) (Kelly, 2012).

2- Bioénergétique des cardiomyocytes

Dans le cas d'une maladie mitochondriale telle que l'AF, la question du métabolisme énergétique des cardiomyocytes générés à partir des iPS m'est apparue essentielle.

Au niveau cardiaque, l'ATP est essentiellement produit à partir d'hydrates de carbone (glucose et lactate) et d'acides gras (**figure 21**). Selon le stade de développement, l'une ou l'autre source énergétique est privilégiée (voir la revue (Onay-Besikci, 2006)). En effet, alors que la production d'ATP repose sur la glycolyse et l'oxydation du lactate dans les cardiomyocytes embryonnaires et fœtaux, elle dépend principalement de la β -oxydation des acides gras dans les cardiomyocytes adultes. La transition métabolique s'opère lors de la période néonatale en réponse à une augmentation des besoins énergétiques du cœur (travail plus intense et croissance). Au niveau cellulaire, elle se traduit notamment par une augmentation rapide et importante de la quantité de myofibrilles et de mitochondries, qui deviennent dès lors la principale source d'énergie des cardiomyocytes (Smith and Page, 1977).

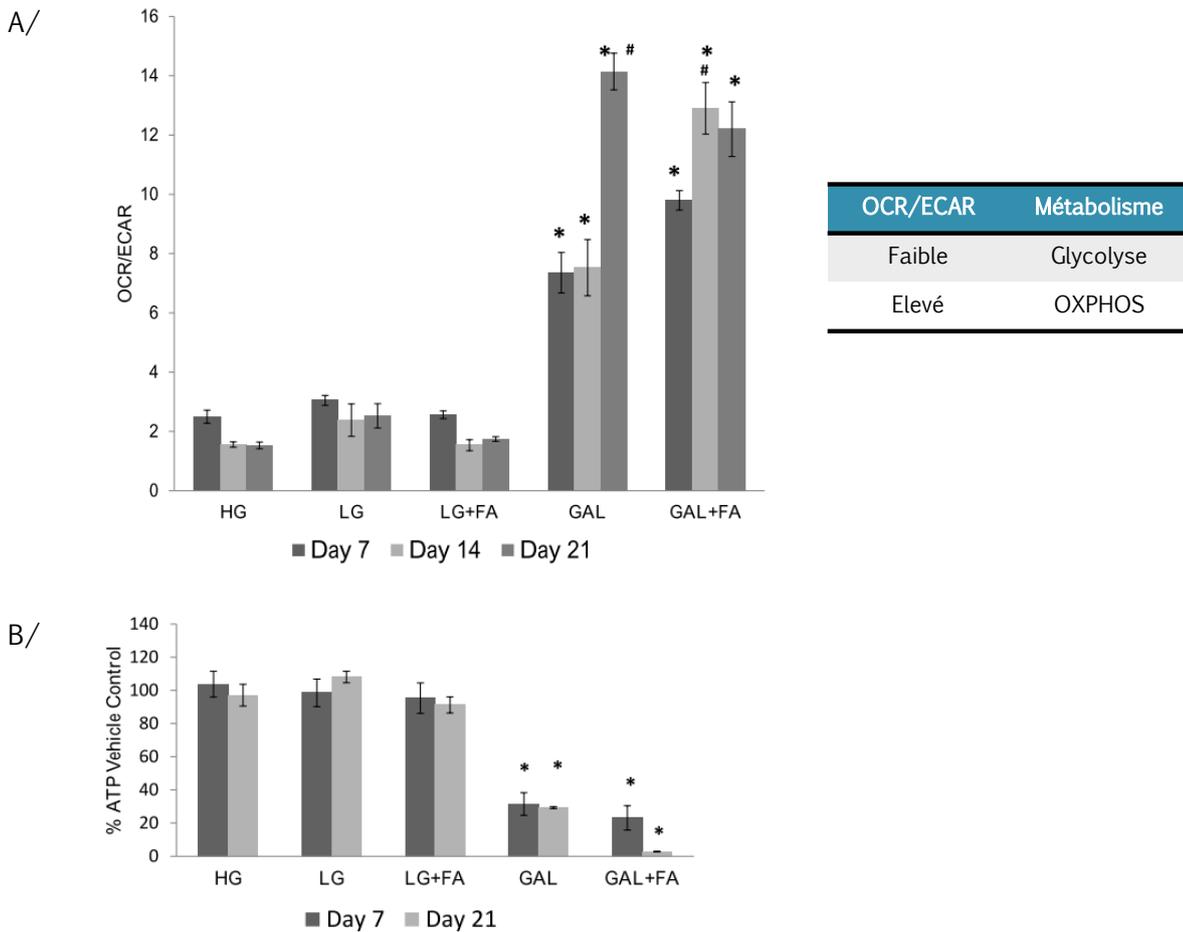


FIGURE 22 : Bioénergétique des cardiomyocytes dérivés d'iPS

A/ Métabolisme des cardiomyocytes dérivés des iPS selon la composition du milieu de culture (substrats énergétiques), pour différents temps en culture. La glycolyse est toujours privilégiée en présence de glucose dans le milieu. La phosphorylation oxydative n'est réellement activée que lorsque le glucose a été remplacé par du galactose.

B/ Niveaux d'ATP dans les cardiomyocytes dérivés des iPS après inhibition de l'ATP synthase (complexe V) par l'oligomycine. L'effet de cette inhibition est très limité dans les cardiomyocytes cultivés en milieu avec glucose, confirmant ainsi que la grande majorité de l'ATP n'est pas produit par la chaîne respiratoire mitochondriale, mais plutôt par la glycolyse. Elle a en revanche davantage d'impact sur les cardiomyocytes cultivés avec du galactose, témoignant de leur dépendance à la chaîne respiratoire mitochondriale pour leur production énergétique.

ECAR : ExtraCellular Acidification Rate (milipH/min), FA : Fatty Acids (100µM oleic acid + 50µM palmitic acid), GAL : Galactose (10 mM), HG : High Glucose (4,5g/L), LG : Low Glucose (1g/L), OCR : Oxygen Consumption Rate (pmoles/min), OXPHOS : OXydatiVe PHOSphorylation.

(graphiques extraits de (Rana et al., 2012))

Les cellules ES/iPS ont un métabolisme essentiellement glycolytique suffisant pour couvrir leurs besoins énergétiques, mais leur différenciation cardiaque nécessiterait l'activation du métabolisme mitochondrial (Chung et al., 2007). On peut se demander : quelle est l'ampleur de cette activation ? Après cela, quel est le site de production d'ATP privilégié dans les cardiomyocytes en culture ? Ces questions ont récemment suscité l'intérêt de l'industrie pharmaceutique dans le cadre de la mise au point de modèles cellulaires pour l'évaluation précoce de la toxicité cardiaque de candidats médicaments (Rana et al., 2012). Les milieux de culture classiques comportent généralement du glucose en quantité physiologique (1g/L) ou supraphysiologique (4,5g/L), mais pas d'acides gras. Dans ces conditions, les cardiomyocytes ont un métabolisme majoritairement glycolytique (**figure 22-A,B**). L'ajout d'acides gras dans le milieu n'est cependant pas suffisant pour induire un switch métabolique vers la phosphorylation oxydative (**figure 22-A,B**). En revanche, cela est possible et efficace en remplaçant le glucose du milieu de culture par du galactose, éventuellement supplémenté avec des acides gras (**figure 22-A,B**) (Rana et al., 2012). Ces résultats montrent que les cardiomyocytes peuvent adapter leur métabolisme suivant le substrat énergétique disponible et qu'il est donc possible de les forcer à utiliser leurs mitochondries. L'inconvénient de cette étude est qu'elle mentionne la durée des suivis mais pas l'âge des cardiomyocytes utilisés. Il n'est donc pas possible de connaître leur degré de maturation, qui a probablement un impact sur leur capacité à opérer cette transition métabolique.

3- Aspect technique : méthodes de sélection/enrichissement des cardiomyocytes

A défaut d'avoir des protocoles de différenciation cardiaque efficaces à 100%, la sélection/enrichissement en cardiomyocytes apparaît aujourd'hui indispensable dans le cadre d'applications cliniques, mais aussi pour le développement de modèles cellulaires. En effet, les cardiomyocytes doivent souvent être maintenus en culture pendant de longues périodes afin de révéler un phénotype, ce qui laisse le temps aux cellules non-cardiaques « contaminantes » de proliférer et d'envahir l'espace aux dépens des cellules cardiaques qui ne se divisent plus. La prolifération incontrôlée des cellules non-cardiaques peut entraîner l'arrêt des contractions des cardiomyocytes, qui ne peuvent alors plus être distingués des autres cellules, voire le décollement du tapis cellulaire et donc la perte pure et simple des cellules. Enfin, un manque d'homogénéité cellulaire peut compliquer, voire fausser la caractérisation ultérieure des cardiomyocytes.

Plusieurs approches ont été rapportées pour se débarrasser, ou du moins limiter l'impact des cellules non-cardiaques : (1) la dissection manuelle, (2) la séparation par centrifugation à travers un gradient de Percoll™, et enfin (3) le tri par FACS. Les deux dernières techniques requièrent une dissociation complète des zones contractiles.

Dissection manuelle

La « colonisation » des boîtes de culture par les cellules non-cardiaques peut être limitée par dissection des zones contractiles au moyen d'un scalpel, d'une aiguille ou d'une pipette, suivie de leur transfert dans de nouvelles boîtes de culture (Kehat et al., 2001). Cette technique nécessite un

système d'agrandissement optique en conditions stériles (microscope ou loupe) et doit être répétée en moyenne toutes les 2-3 semaines. Le principal risque est de perdre les zones contractiles au moment de leur manipulation ou par manque d'adhésion au nouveau support. Bien que fastidieuse et chronophage, cette technique est la moins dommageable pour les cellules, car elle préserve l'intégrité des zones contractiles et donc les contacts entre cardiomyocytes (Hattori et al., 2010).

Migration à travers un gradient de Percoll™

Après isolation, les cellules obtenues lors du protocole de différenciation cardiaque sont séparées par centrifugation sur un gradient discontinu de Percoll™ (Laflamme et al., 2007; Xu et al., 2002, 2006). Bien que cette technique permette un enrichissement des cardiomyocytes de l'ordre de quatre fois, elle reste peu utilisée car elle génère des pertes.

Tri cellulaire

Les méthodes d'enrichissement des cardiomyocytes par tri cellulaire sont de deux types : les méthodes génétiques et non génétiques.

Les méthodes génétiques sont généralement basées sur l'expression transgénique d'une protéine fluorescente sous contrôle d'un promoteur de gènes cardiaques, tels que α MHC et NKX2.5, et permettent d'atteindre une pureté d'environ 90% (Anderson et al., 2007; Elliott et al., 2011). Il est aussi possible d'affiner le tri avec des promoteurs de gènes spécifiques de sous-types cardiaques, tels que MLC2v et cGATA6, respectivement pour isoler des cardiomyocytes ventriculaires et nodaux (Bizy et al., 2013; Zhu et al., 2010). L'utilisation d'un gène de résistance à un antibiotique plutôt que d'une protéine fluorescente pourrait s'avérer plus pratique car elle permettrait de s'affranchir de la dissociation des cellules et du tri, et cela avec un enrichissement équivalent (Anderson et al., 2007). Bien que très efficaces, ces techniques restent malgré tout peu utilisées car les lignées ES/iPS sont difficilement transfectables.

Les méthodes non génétiques reposent sur l'identification de caractères permettant d'isoler directement les cardiomyocytes sans modifications préalables des cellules ES/iPS. Ainsi, des travaux ont été menés afin d'identifier des marqueurs de surface permettant d'isoler directement les (i) cardiomyocytes : *Signal Regulatory Protein Alpha* (SIRP α) (Dubois et al., 2011) et *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) (Uosaki et al., 2011), ou (ii) les progéniteurs cardiovasculaires : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2* (VEGFR2, KDR, Flk1), *Stem Cell Factor Receptor* (SCFR, c-Kit), et *Platelet-Derived Growth Factor Receptor- α* (PDGFR α) (Kattman et al., 2011; Yang et al., 2008). La sélection des progéniteurs cardiaques par cette méthode semble être plus subtile que celle des cardiomyocytes car elle (1) repose sur la détection d'un couple de marqueurs de surface ayant une expression différentielle : KDR^{low}/c-KIT^{neg} (Yang et al., 2008) et KDR^{low}/PDGFR α ^{high} (Kattman et al., 2011), (2) nécessite l'identification préalable de la fenêtre de temps pendant laquelle ces précurseurs sont abondants et (3) implique une différenciation terminale dirigée pour privilégier les cardiomyocytes et limiter la production de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales.

A côté de l'utilisation classique des marqueurs de surface pour le tri des cellules cardiaques, Hattori et al. ont proposé une sélection basée sur la différence de contenu en mitochondries entre

les cardiomyocytes et les cellules non-cardiaques contaminantes (Hattori et al., 2010). Cette méthode repose sur le tri par FACS des cellules dont les mitochondries actives ont préalablement séquestré la sonde fluorescente *TetraMethylRhodamine Methyl ester perchlorate* (TMRM). Cette sonde mitochondriale est la moins toxique du marché car elle est éliminée des cellules en l'espace de 24 heures (Hattori et al., 2010). Cette technique a fait ses preuves sur les cardiomyocytes isolés de cœurs ou d'embryons de rat, mais aussi sur les cardiomyocytes issus de la différenciation d'ES/iPS de souris, de singe et humaines (Hattori et al., 2010). Elle ne permet cependant pas d'isoler les progéniteurs cardiaques car ces derniers ne sont pas assez chargés en mitochondries. Bien que pleine de promesses, cette approche soulève notamment la question du moment adéquat pour trier les cardiomyocytes, c'est-à-dire à quel degré de maturation des cardiomyocytes le contenu en mitochondries est suffisant pour être stringent ? Enfin, elle ne serait certainement pas appropriée pour une maladie mitochondriale telle que l'AF, bien que l'on ignore dans quelle mesure et à partir de quel moment le potentiel de membrane mitochondriale est affecté.

En ce qui me concerne...

J'ai toujours disséqué manuellement les zones contractiles à l'aide d'un scalpel, d'abord pour les isoler de la boîte mère et permettre un suivi plus facile, puis autant de fois que nécessaire en fonction de la prolifération des cellules non-cardiaques contaminantes. Ces dernières peuvent théoriquement être éliminées avec des traitements par des inhibiteurs de la réplication, sans affecter les cardiomyocytes qui sont des cellules post-mitotiques. Cette méthode est plutôt utilisée pour isoler les cardiomyocytes après digestion enzymatique de cœurs de rats, que pour se débarrasser des cellules contaminantes dans des protocoles de différenciation (Engel et al., 2005). J'ai toutefois décidé de compléter la dissection manuelle des zones contractiles par un tel traitement de façon à en diminuer la fréquence. Pour cela, j'ai utilisé la *Cytosine-1-β-D-arabinofuranoside* (AraC, [N° CAS : 147-94-4]) à 20μM pendant 48h, qui est un inhibiteur de la synthèse d'ADN dans les cellules de mammifère, n'ayant pas d'effet sur la synthèse d'ARN. Bien que ce traitement se soit révélé assez efficace, j'ai dû y renoncer, car plusieurs semaines après, les zones contractiles avaient changé d'apparence : elles semblaient souffrir de l'absence de ces cellules contaminantes, notamment pour leur ancrage à la boîte de culture.

Pendant longtemps, je fus incapable de dissocier les zones contractiles, excluant ainsi la possibilité de trier les cardiomyocytes par FACS. J'ai fini par trouver une méthode de dissociation efficace dans la publication de Hattori *et al.* que j'ai pu appliquer sur les zones contractiles produites avec mon deuxième protocole de différenciation (Hattori et al., 2010). Plutôt que de passer les cardiomyocytes au FACS et de risquer de les abimer, j'ai finalement opté pour une méthode d'enrichissement passant par la formation de « cardiac bodies » (Hattori et al., 2010), dont le principe sera expliqué ci-après au *point IV-B-1-c.*

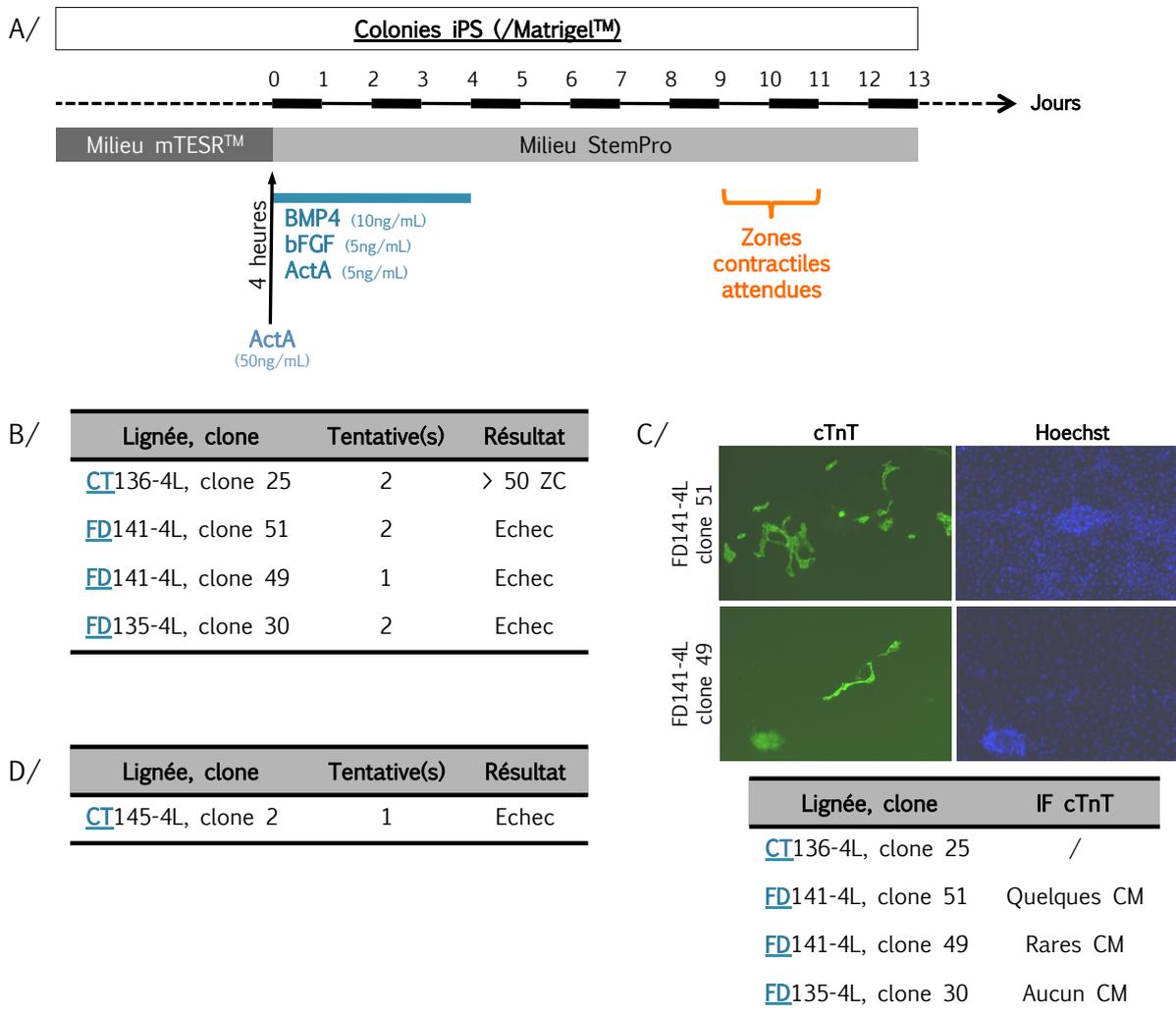


FIGURE 23 : Démarche de mise au point d'un protocole de différenciation cardiaque

A/ Détail du protocole de différenciation cardiaque proposé par Carpenter *et al.* (Carpenter *et al.*, 2011).

B/ Résultat du test du protocole de Carpenter *et al.* pour différentes lignées.

C/ Marquage de la troponine T cardiaque dans les boîtes de différenciation.

D/ Détails des protocoles de Zhang *et al.* et Yang *et al.* basés sur le même principe que celui de Carpenter *et al.*, mais avec des étapes supplémentaires (Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011b).

ActA : Activin A, bFGF : basic Fibroblast Growth Factor, BMP4 : Bone Morphogenic Protein 4, CM : cardiomyocytes, CT : contrôles, cTnT : cardiac Troponin T, DKK1 : Dickkopf 1 homolog, FD : Patient Friedreich, IF : immunofluorescence, RA : retinoic acid, RAi : retinoic acid inhibitor, ZC : zones contractiles.

B. Résultats

1- Mise au point d'un protocole de différenciation cardiaque

a) Démarche

Le point de départ de mon protocole de différenciation directe fut le protocole publié par Carpenter *et al.* : à la fois simple et prometteur, il avait l'avantage d'utiliser des iPS cultivées dans les mêmes conditions que nous, c'est-à-dire sur Matrigel™ dans du mTESR1™ (**figure 23-A**) (Carpenter *et al.*, 2011). Le Matrigel™ a aussi l'avantage d'avoir une composition proche de la membrane basale entourant les cardiomyocytes (seule manque la fibronectine) (Kibbey, 1994), ce qui doit probablement faciliter la différenciation cardiaque.

Pour commencer, j'ai testé le protocole de Carpenter *et al.* sur 4 clones (1CT et 3 FD), mais seul CT136-4L clone 25 a donné des zones contractiles, en quantité et taille intéressantes, justifiant de poursuivre dans cette voie (**figure 23-B**). Plusieurs raisons pouvaient expliquer l'absence de zones contractiles pour les 3 clones de patients (FD) : (1) Les cardiomyocytes étaient présents, mais isolés ou non fonctionnels, d'où l'absence de zones contractiles. Pour évaluer cette hypothèse, j'ai réalisé un immunomarquage de la troponine T cardiaque (cTnT), sur l'ensemble des cellules différenciées obtenues à l'issue des 14 jours du protocole (**figure 23-C**). L'immunofluorescence a révélé quelques cardiomyocytes isolés pour les clones 51 et 49, mais aucun pour le clone 30, signifiant que le protocole n'avait clairement pas fonctionné sur ces cellules. (2) Il se pourrait donc que l'efficacité du protocole dépende du clone iPS et/ou de l'état de pluripotence initial des colonies. Ces deux hypothèses sont cependant peu probables. En effet, les clones de la lignée iPS FD141-4L ont déjà pu être différenciés en cardiomyocytes par la méthode des EB. De plus, nous ne lançons jamais de protocoles de différenciation sur des iPS présentant des traces de différenciation préalables (défaut de pluripotence) car ils sont voués à l'échec et seraient un réel gaspillage de temps et de consommables. (3) La capacité de réponse des iPS à ce protocole de différenciation aurait aussi pu être liée au génotype (CT versus FD) et ainsi refléter un phénotype, tel que l'absence de récepteurs aux facteurs de croissance, une perturbation des voies de signalisation en aval, etc. Pour cela, j'ai testé le protocole sur un second contrôle, CT145-4L clone 2, sans plus de succès que pour les clones de patients, ce qui permet donc d'écarter cette 3^e hypothèse (**figure 23-D**). (4) Enfin, il est possible que la différenciation cardiaque selon Carpenter *et al.* avec le traitement initial Activine A/bFGF/BMP4, ne soit pas suffisante pour aboutir à une différenciation cardiaque efficace avec la plupart de nos lignées iPS et qu'il faille guider davantage la différenciation (*voir intro. point III-C*). J'ai donc tenté de compléter le protocole de Carpenter *et al.* à l'aide d'autres protocoles présentant un début similaire et des étapes additionnelles (**figure 23-E**) (Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011b) : l'association Carpenter/Yang fut un échec, par contre le couple Carpenter/Zhang fut couronnée de succès sur le contrôle CT145-4L clone 2 et le patient FD141-4L clone 51. Les étapes du protocole final sont détaillées ci-après au *point IV-B-1-b*.

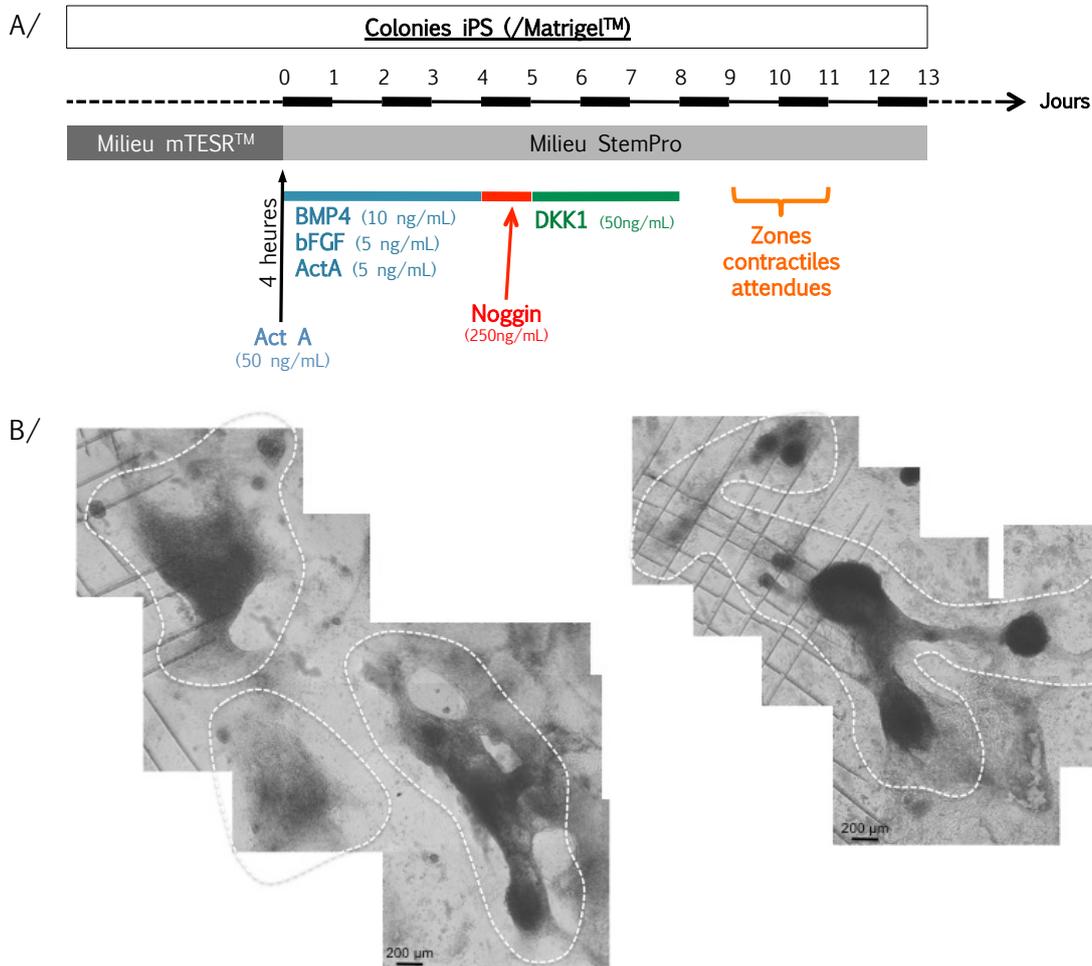


FIGURE 24 : Protocole N°2 version finale

A/ Détail de la version finale du protocole de différenciation cardiaque.

B/ Photographie de zones contractiles du patient FD141-4L clone 51 obtenues grâce à ce protocole. Echelle : 200µm. ActA : Activin A, bFGF : basic Fibroblast Growth Factor, BMP4 : Bone Morphogenic Protein 4, DKK1 : Dickkopf 1 homolog.

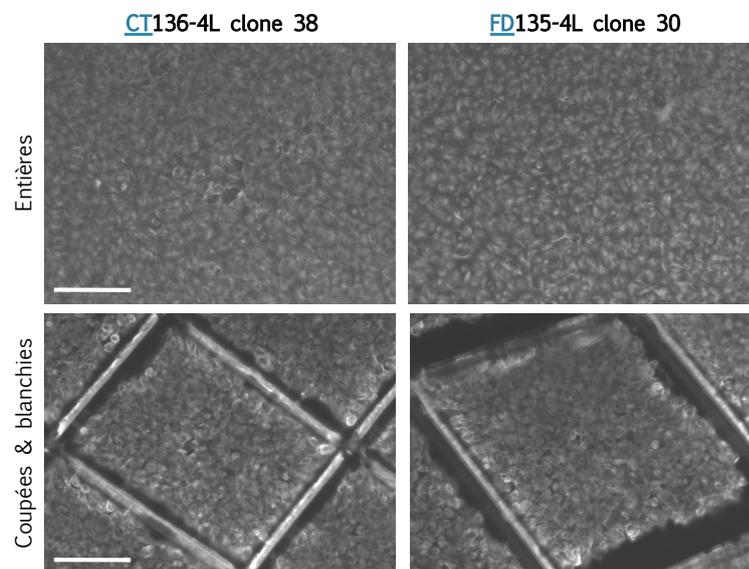


FIGURE 25 : Effet du pré-découpage des lignées iPS

Immunofluorescence sur colonies d'iPS entières ou préalablement coupées et blanchies du contrôle CT136-5L clone 38 et d'un patient FD135-4L clone 30. Cellules fixées avec une solution à 4% paraformaldéhyde. Marquage avec un anticorps anti-β-tubuline (IGBMC). Echelle : 100 µm.

b) Protocole final

La base de ce protocole est un milieu sans sérum, le milieu StemPro dont la composition est donnée à l'annexe 3 (Carpenter et al., 2011). Le protocole de différenciation cardiaque débute par une induction de 4 heures avec une forte concentration d'Activine A (50ng/mL) (**figure 24-A**) (Carpenter et al., 2011). En absence de sérum, une telle concentration permet d'amorcer la différenciation des cellules à la fois en mésoderme et en endoderme (Kubo et al., 2004). Cette première étape permet de se rapprocher des conditions de différenciation *in vivo*, puisque l'endoderme est un acteur clé de la différenciation cardiaque du mésoderme (*voir résultats point IV-A-1*). Ce bref traitement a cependant une certaine toxicité, car il entraîne le décollement d'une grande quantité de cellules et la formation de trous dans les colonies. L'étape suivante consiste à exposer les cellules à de faibles concentrations d'Activine A (5ng/mL), de bFGF (5ng/mL) et de BMP4 (10ng/mL) pendant 4 jours (**figure 24-A**) (Carpenter et al., 2011). Ce cocktail participe à la formation de mésoderme, puis à sa spécification cardiaque (Kattman et al., 2011; Laflamme et al., 2007; Zhang et al., 2012a, 2008). Malgré le rôle important de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement embryonnaire cardiaque (*voir résultats point IV-A-1-b*), l'ajout de Wnt3a entre les jours 1 et 4 n'aurait que peu d'effets sur le rendement de la différenciation cardiaque (Kattman et al., 2011), probablement car cette voie est déjà efficacement activée par le couple Activine A/BMP4 qui stimulerait la production endogène de Wnt1, Wnt3a et Wnt8a (Paige et al., 2010). Le traitement Activine A/bFGF/BMP4 doit ensuite être interrompu pour que le processus de différenciation puisse se poursuivre. En effet, le bFGF inhibe la différenciation des progéniteurs cardiaques en cardiomyocytes (Zhang et al., 2012a) et la signalisation BMP est un frein à la maturation cardiaque (Kattman et al., 2011). L'étape d'après est un traitement d'un jour au Noggin (250ng/mL), un antagoniste de la voie BMP (**figure 24-A**). En effet, outre l'arrêt du traitement au BMP4, l'inhibition de la voie BMP après l'induction du mésoderme cardiaque s'est révélée être un bon moyen d'augmenter l'efficacité de différenciation des cellules ES/iPS (Kattman et al., 2011; Zhang et al., 2011b). Le protocole se termine par un traitement de 3 jours au DKK1 (50ng/mL), un puissant inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine (**figure 24-A**). Rappelons que cette voie de signalisation, importante pour l'induction du mésoderme, doit cependant être inhibée par la suite pour permettre la différenciation terminale des cardiomyocytes (Buikema et al., 2013; Naito et al., 2006). Après cela, les cellules sont maintenues dans le milieu de culture sans facteurs de croissance jusqu'à l'apparition des premières zones contractiles autour du 10^e jour.

Ce protocole avait une bonne efficacité avec nos lignées iPS, à l'exception du contrôle CT136-4L clone 34 et du patient FD141-4L clone 49 qui y étaient totalement réfractaires. Leur point commun était que leurs colonies apparaissaient transparentes sous loupe binoculaire, alors qu'elles sont normalement de couleur plutôt grise/blanche (**figure 13**). Je me suis rendue compte qu'il était possible de faire « blanchir » les clones 34 et 49 en coupant les colonies comme lors d'un passage et en les laissant reposer 1h à température ambiante ou 30 min à 37°C. Le protocole de différenciation cardiaque s'est révélé très efficace sur ces colonies artificiellement blanchies. Le pré-découpage des colonies entraîne une décompaction des cellules (**figure 25**), ce qui semble les

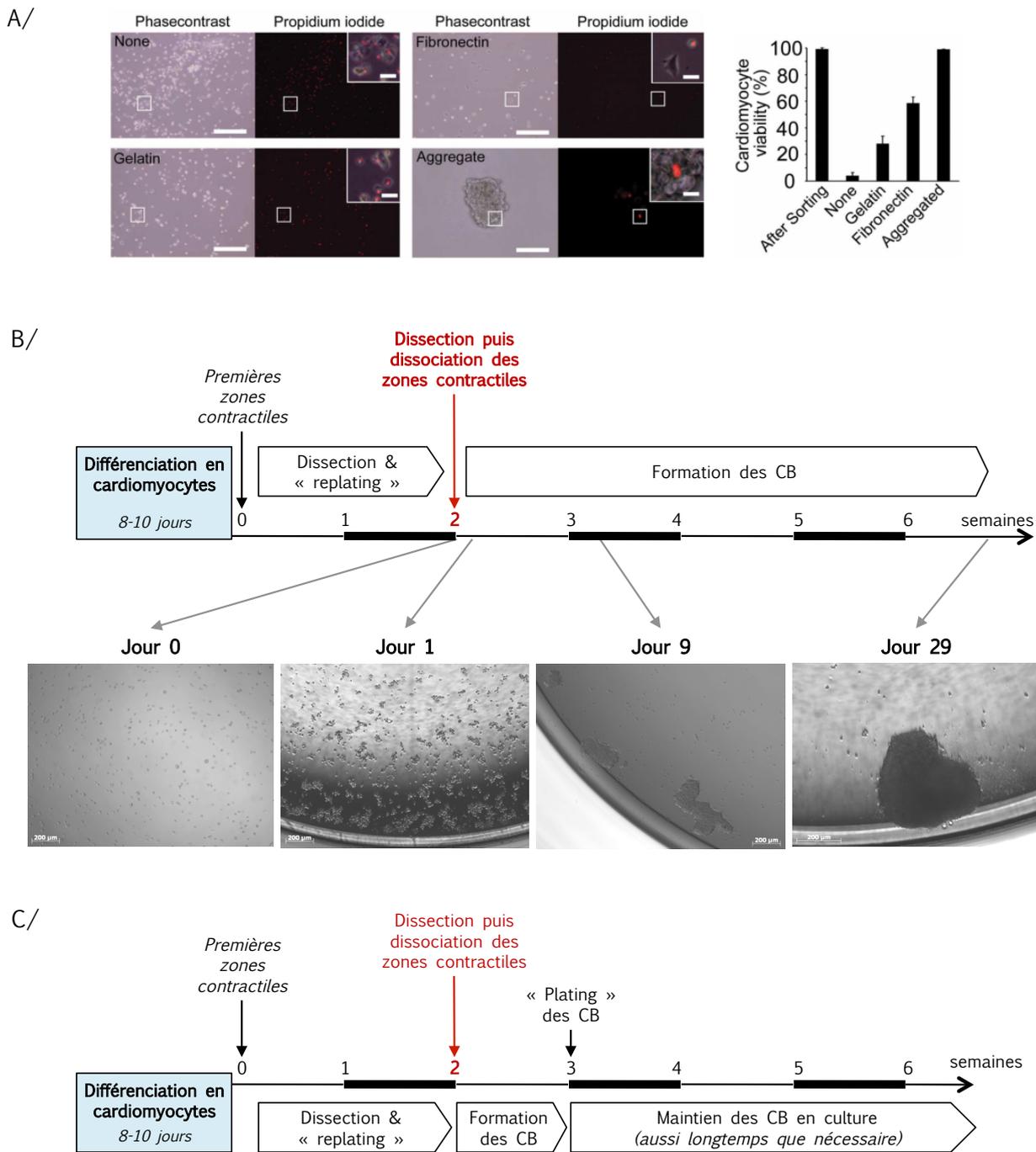


FIGURE 26 : Processus de sélection/enrichissement des cardiomyocytes

A/ Extrait de la figure S16 de (Hattori et al., 2010) : Culture des cardiomyocytes après tri par FACS dans différentes conditions (aucune matrice, gélatine, fibronectine et agrégat en suspension) et effet sur la viabilité des cellules.

B/ Mise au point du processus de formation des cardiac bodies sur 7 semaines (avec les plaques 96 puits à faible adhérence et à fond plat).

D/ Processus final de formation des cardiac bodies (avec les plaques 96 puits à faible adhérence et à fond rond).

CB : Cardiac Bodies

rendre plus réceptives aux traitements par les facteurs de croissance. Par soucis d'homogénéité nous avons appliqué ce pré-découpage de façon systématique à l'ensemble de nos clones iPS, permettant même d'augmenter le rendement de différenciation de certains d'entre eux (ex : FD135-4L clone 30, FD141-4L clone 62).

c) Méthode de sélection/enrichissement utilisée

Outre la méthode de sélection par densité mitochondriale, Hattori *et al.* montraient dans leur *Supplementary Data* (fig S16) que la reconstitution de zones contractiles après tri des cardiomyocytes par FACS permettait d'augmenter leur viabilité, comparé à une culture en cellules isolées (**figure 26-A**) (Hattori *et al.*, 2010) : pour cela, il suffit de les ensemercer dans une plaque 96 puits à faible adhérence, de les centrifuger et de les mettre en culture pendant quelques jours dans un milieu adapté. Ces zones contractiles reconstituées seront appelées « Cardiac Bodies » (CB) dans la suite de ma thèse.

Je me suis inspirée de cette technique pour élaborer une méthode d'enrichissement des cellules cardiaques, dont les étapes sont illustrées **figure 26** et détaillées ci-après. Lors de la découverte des premières zones contractiles dans les boîtes mères (soit 8-10 jours après le début du protocole de différenciation cardiaque), j'effectue une dissection manuelle de l'ensemble des zones contractiles identifiées et je les transfère dans de nouvelles boîtes, recouvertes d'une couche de gélatine et contenant du milieu CM5 (*annexe 3*). Cette étape prend généralement quelques jours car les zones contractiles n'apparaissent pas toutes au même moment et peuvent aussi être très nombreuses. Une fois attachées à leur nouvelle boîte, les zones contractiles adoptent une forme plus géométrique, ce qui permettra de les délimiter plus facilement par la suite. Deux semaines après la découverte des zones contractiles, j'effectue une seconde dissection en prenant soin de couper au plus près des zones contractiles de façon à limiter au maximum la présence de cellules non-cardiaques contaminantes. Tous les morceaux ainsi récupérés subissent une dissociation enzymatique pendant 30 min à 37°C, dans un mix proche de celui utilisé par Hattori *et al.* contenant notamment de la collagénase de type II et de la trypsine (*annexe 3*) (Hattori *et al.*, 2010). Le traitement enzymatique est complété par une dissociation mécanique à la pipette P200, réalisée au milieu et à la fin de l'incubation à 37°C de façon à n'avoir que des cellules isolées (**figure 26-B, jour 0**). Les cellules ainsi dissociées sont ensemençées à une densité de 15000 cellules par puit dans des plaques 96 puits à faible adhérence (Ultra-Low attachment plate, flat bottom Corning®, Costar®, CLS3474) et dans le milieu CB adapté à la culture des cellules en suspension (*annexe 3*) (Hattori *et al.*, 2010), puis replacées dans l'incubateur à 37°C. Dès le lendemain, on peut observer que de petits agrégats composés de quelques cellules se sont formés spontanément pendant la nuit et qu'ils se contractent (**figure 26-B, jour 1**). La taille de ces agrégats cardiaques augmente avec le temps, jusqu'à former de gros cardiac bodies (**figure 26-B, jours 9 et 29**). L'intérêt des plaques à faible adhérence est double : en maintenant les cellules en suspension, elles (1) permettent aux cardiomyocytes de se mouvoir sous l'effet de leurs contractions et ainsi de se rejoindre pour

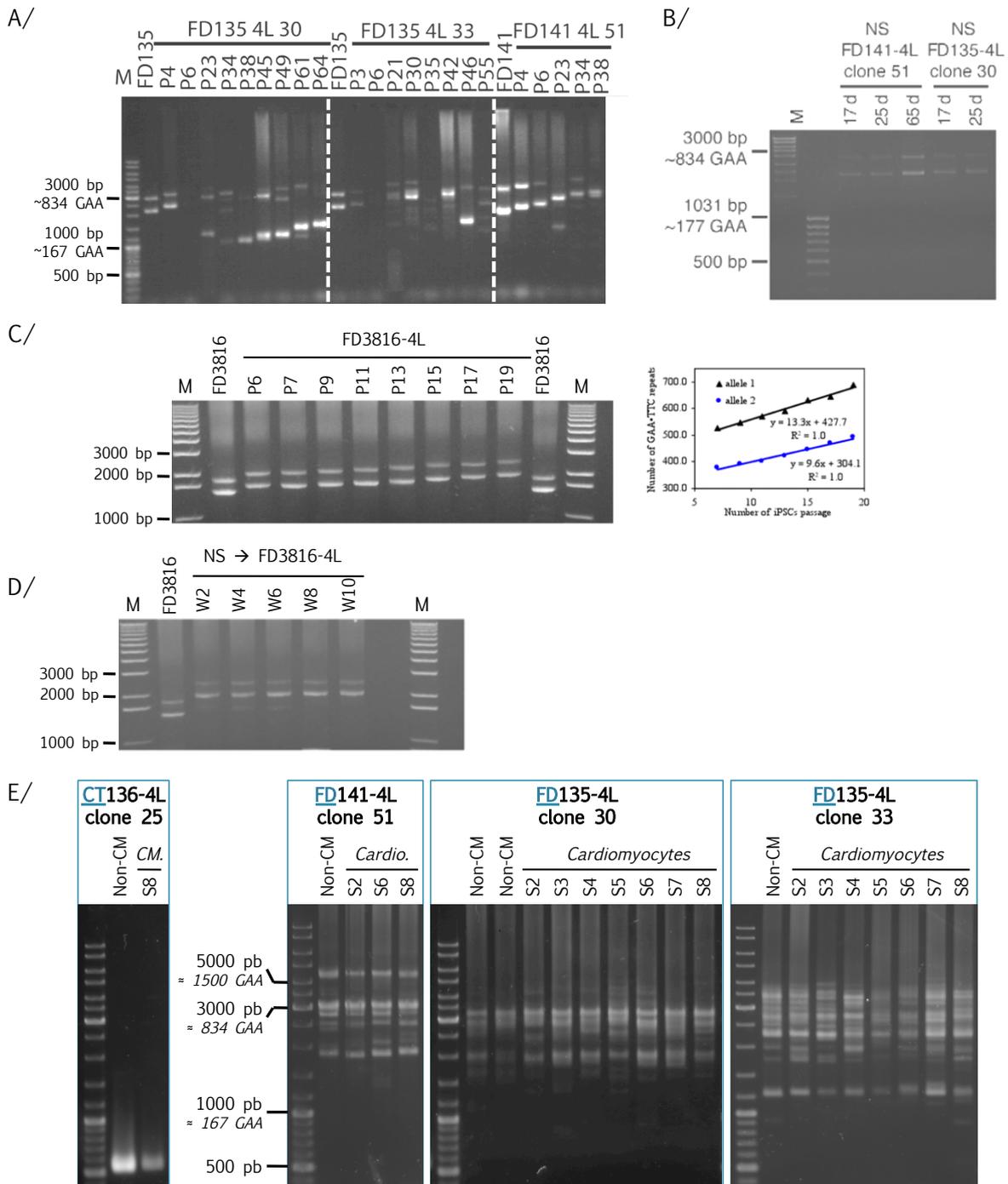


FIGURE 27 : Comportement de l'expansion (GAA)_n dans les iPS, les progéniteurs neuronaux et les cardiomyocytes

Détermination par PCR de la longueur des répétitions (GAA) de lignées iPS de patients et des progéniteurs neuronaux (neurosphères) obtenus par différenciation.

A/ iPS de notre laboratoire : suivi de la taille des expansions (GAA)_n de trois clones iPS de patients (*figure issue de (Hick et al., 2013)*). Au début de chaque série, la lignée de fibroblastes de départ, puis différents passages pour chaque clone iPS.

B/ Neurosphères obtenues par différenciation des iPS de notre laboratoire (*figure issue de (Hick et al., 2013)*).

C/ iPS du laboratoire de J. Gottesfeld : suivi de la taille des expansions (GAA)_n de la lignée iPS du patients FD3816 (*figure issue de (Du et al., 2012a)*). Au début et à la fin, la lignée de fibroblastes de départ, et entre les deux, différents passages de la lignée iPS.

D/ Neurosphères obtenues par différenciation de la lignée FD3816 du laboratoire de J. Gottesfeld (*figure issue de (Du et al., 2012a)*).

E/ Panel des répétitions GAA amplifiées par PCR à partir des cardiomyocytes d'un contrôle (CT136-4L clone 25) et de patients (FD141-4L clone 51 et FD135-4L clones 30 et 33).

bp : base pair, CM : Cardiomyocytes, d : days, M : marqueur de taille, Non-CM : cellules non-cardiaques présentes dans la boîte de différenciation, NS : neurospheres, P : passage, pb : paires de bases, S : Semaine, W : weeks.

reformer des agrégats homogènes et (2) placent les éventuelles cellules non-cardiaques dans un état de latence qui empêche leur prolifération.

Pour finir, j'ai pu réduire le temps de formation des cardiac bodies à moins d'une semaine en utilisant des plaques 96 puits à faible adhérence et à fond rond (Ultra-Low attachment plate, round bottom, Corning®, Costar®, CLS7007) qui facilitent la rencontre des cardiomyocytes, sans pour autant la forcer comme c'est le cas de la centrifugation. Cette amélioration m'a permis d'avoir des cardiac bodies seulement 3 semaines après l'apparition des premiers cardiomyocytes et prêts à être utilisés pour diverses expériences (**figure 26-C**). J'ai pu les maintenir en l'état jusqu'à l'âge de 4 mois avec des « replating » mensuels.

2- Caractérisation des cardiomyocytes obtenus

a) Phénotype AF : comportement de l'expansion $(GAA)_n$

L'expansion $(GAA)_n$ est soumise à une instabilité liée à sa longueur et à son caractère répétitif (voir intro. point I-C-1-b). Au niveau somatique, cette instabilité se traduit par l'accumulation d'allèles de tailles différentes au sein des tissus, en particulier au niveau des DRG et du cervelet (De Biase et al., 2007a, 2007b). L'hypothèse selon laquelle l'instabilité somatique serait impliquée à la fois dans la spécificité tissulaire et dans la progression de la maladie reste à démontrer. En fait, nous disposons de très peu d'études de ce phénomène chez les patients, principalement par manque d'accessibilité des tissus atteints. D'où l'intérêt d'étudier le comportement de l'expansion $(GAA)_n$ dans les iPS et leurs dérivés neuronaux et cardiaques. Il a ainsi été établi que l'expansion $(GAA)_n$ était soumise à une instabilité dans les iPS, dont les modalités sont différentes suivant les lignées (**figure 27-A,C**) : alors que dans nos lignées iPS, l'expansion est très dynamique avec à la fois des extensions et des contractions (Hick et al., 2013), les lignées du laboratoire de J. Gottesfeld présentent uniquement un accroissement linéaire de leurs expansions avec le temps (Du et al., 2012a; Ku et al., 2010). Malgré cela, la différenciation des iPS en progéniteurs neuronaux (neurospheres) s'accompagne, dans les deux cas, d'une stabilisation de la taille des expansions (**figure 27-B,D**) (Du et al., 2012a; Hick et al., 2013).

Du point de vue expérimental, les expansions peuvent être facilement suivies dans les iPS et les progéniteurs neuronaux en récupérant le surplus de colonies ou de neurospheres lors des passages hebdomadaires. Comme il s'agit d'une multiplication clonale, les cellules passées, prises au hasard, constituent un échantillon reflétant la population initiale. Le caractère post-mitotique des cardiomyocytes implique, quant à lui, une démarche un peu différente. En effet, récupérer aléatoirement quelques zones contractiles ne garantit pas que l'échantillon prélevé soit représentatif de la totalité des cardiomyocytes. De plus, on ne peut pas exclure la possibilité que le nombre de répétitions GAA puisse impacter le processus de différenciation, favorisant par exemple les cellules avec les expansions les plus courtes. Il était donc nécessaire de procéder à l'homogénéisation préalable des cardiomyocytes à analyser. Pour cela, les zones contractiles ont été disséquées, dissociées puis divisées en fractions de 15000 cellules, destinées à former des cardiac bodies génétiquement équivalents.

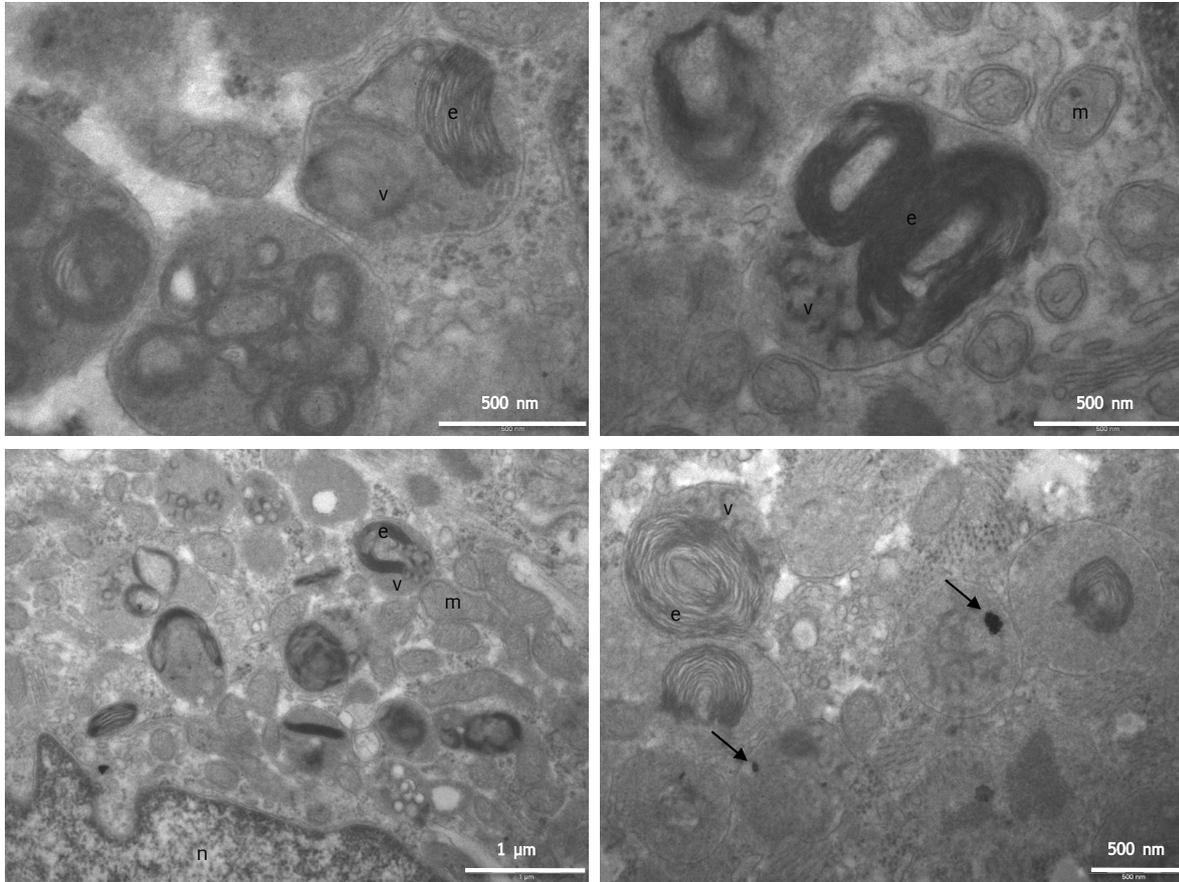


FIGURE 28 : Anomalies ultrastructurales révélées par microscopie électronique dans des cardiomyocytes âgés de 4 mois (milieu avec glucose)

Grosses vésicules à double membrane avec des enroulements membranaires et des dépôts de fer.
e : enroulement membranaire, *m* : mitochondrie normale, *n* : noyau, *v* : vésicule, flèche : dépôt de fer.

Le suivi du comportement des expansions $(GAA)_n$ dans les cardiac bodies sur une durée de 8 semaines, a montré (1) qu'il y avait beaucoup plus d'allèles de tailles différentes dans les cardiomyocytes que dans iPS et les progéniteurs neuronaux (qui en comptent généralement, 2 voire 3) et (2) que ces expansions semblent globalement stables sur la période de temps considérée (**figure 27-E**). La légère variabilité observable parfois d'un échantillon à l'autre ne reflète probablement pas une réelle instabilité, mais plutôt une faiblesse de la PCR, liée au caractère répétitif de la séquence à amplifier. Enfin, j'ai aussi pu montrer que les longueurs des répétitions GAA des cellules non-cardiaques contaminantes de la boîte de différenciation étaient équivalentes à celles détectées dans les cardiomyocytes (**figure 27-E**). Ce résultat offre ainsi une voie de valorisation pour ces cellules dans la prédiction de la taille des expansions des cardiomyocytes, permettant ainsi de conserver ces derniers pour les expériences de caractérisation.

b) Phénotype AF : études de cardiomyocytes AF âgés de 4 mois

L'analyse en microscopie électronique des cardiomyocytes obtenus avec le protocole de différenciation N°1 avait été particulièrement informative, notamment sur l'état des mitochondries. Rappelons qu'à l'âge d'un mois, rien ne permettait de distinguer les cardiomyocytes des patients de ceux des individus contrôles ([Hick et al., 2013](#)). Ce n'est qu'autour de 2 mois que des anomalies mitochondriales devenaient visibles dans les cardiomyocytes de patients. Elles étaient de deux types : (1) une dégénérescence mitochondriale principalement caractérisée par des mitochondries à la matrice sombre dont on ne distinguait les crêtes que lorsqu'elles étaient collapsées, et (2) une prolifération/accumulation de mitochondries normales ([Hick et al., 2013](#)). Il était intéressant de voir comment allait évoluer ce phénotype avec le temps et notamment si d'autres aspects de la physiopathologie de la maladie allaient se manifester.

Des cardiomyocytes générés avec le nouveau protocole de différenciation ont ainsi été maintenus en culture pendant 4 mois, puis soumis à leur tour à une analyse en microscopie électronique (CM de patients : FD135-4L clone 30, FD141-4L clones 49 et 51 / CM de contrôles : CT136-4L clone 25 et CT145-4L clone 2). Celle-ci a révélé la présence de grosses vésicules à double membrane contenant des enroulements membranaires au sein de zones avec des mitochondries normales. Cela pourrait être de grosses mitochondries qui dégénèrent ou des vésicules de dégradation (**figure 28**) (*voir discussion point II-B-2-b*). Ces structures comportaient aussi des dépôts de fer, opaques aux électrons, matérialisés par des points noirs, isolés ou sous forme de petits agrégats (**figure 28**). Cette dernière donnée corrèle avec la présence de fer observée de façon récurrente dans le tissu cardiaque des patients ([Lamarque et al., 1980](#); [Michael et al., 2006](#)). Or, l'accumulation de fer dans les mitochondries est une conséquence secondaire au déficit en frataxine (*voir intro. point I-D-4*) et sous-tend ici une progression dans la physiopathologie de la maladie au cours des deux mois de culture supplémentaires.

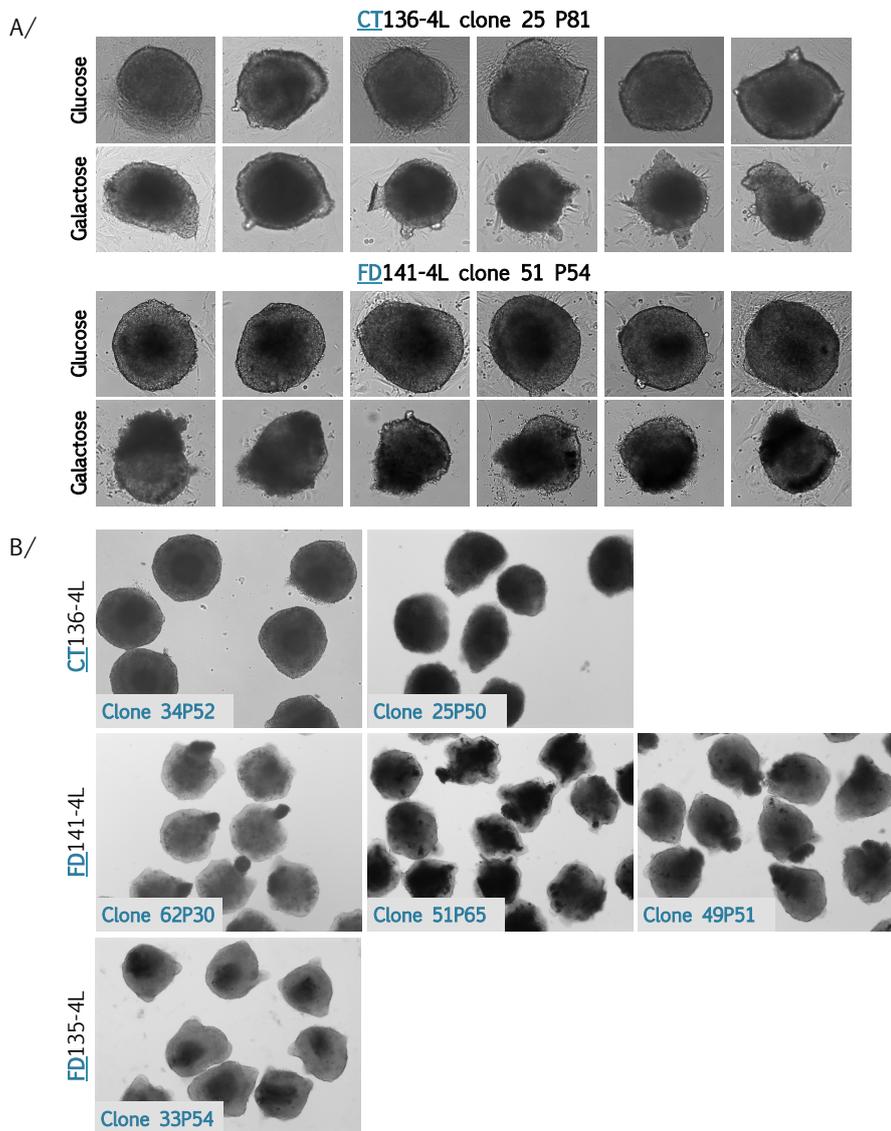


FIGURE 29 : Effet de la déplétion en glucose sur la morphologie des cardiac bodies

A/ Comparaison des cardiac bodies d'un clone contrôle (CT136-4L clone 25) et d'un clone patient (FD141-4L clone 51) après une vingtaine de jours passés dans un milieu avec glucose ou galactose.

B/ Cardiac bodies âgés de 2 mois de deux clones contrôles (CT136-4L clones 25 et 34) et de quatre clones patients (FD141-4L clones 49, 51 et 62, FD135-4L clone 33), ayant passé 1 mois en milieu sans glucose.

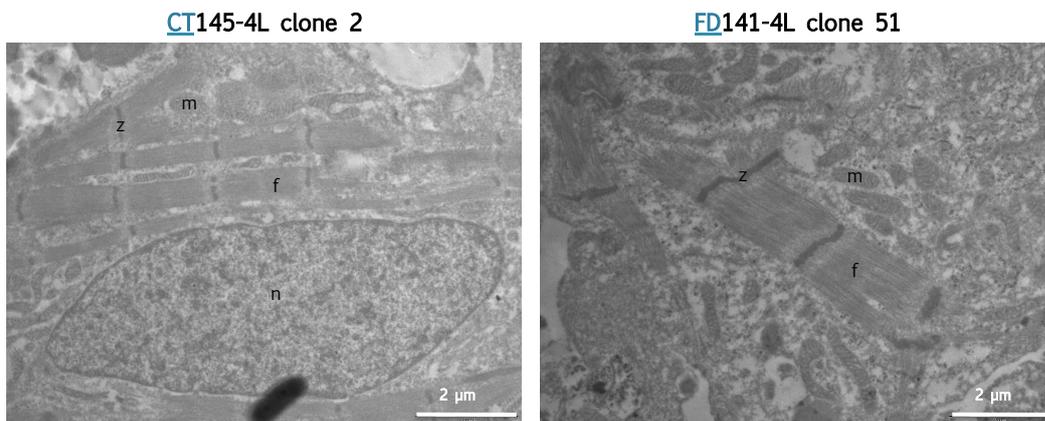


FIGURE 30 : Analyse en microscopie électronique de cardiomyocytes âgés de 2 mois, ayant passé un mois en milieu déplété en glucose.

Aucune anomalie ultrastructurale flagrante n'a été observée dans les cardiomyocytes.

m : mitochondrie, *n* : noyau, *f* : filament contractile, *z* : strie Z.

c) Phénotype AF : impact d'un métabolisme mitochondrial forcé

Les travaux de Rana *et al.*, montrant que les cardiomyocytes générés à partir d'iPS n'utilisaient quasiment pas leurs mitochondries pour leur métabolisme énergétique, m'ont vivement interpellés (Rana *et al.*, 2012) (*voir résultats point IV-A-2*). En effet, cela suggère que la dégénérescence mitochondriale, détectée par microscopie électronique dans les cardiomyocytes de patients, pourrait ne pas avoir de répercussions sur les cellules dans les conditions classiques de culture. Le switch métabolique de la glycolyse à la phosphorylation oxydative pourrait certainement s'opérer de façon spontanée si l'on permettait aux cardiomyocytes de mûrir plus longtemps en culture. Or, la possibilité de les rendre métaboliquement dépendants de leurs mitochondries en remplaçant le glucose du milieu de culture par du galactose et des acides gras m'a semblé être plus appropriée, car à la fois simple et rapide. Cela promettait aussi de révéler, voire d'amplifier l'impact de l'atteinte mitochondriale observée en microscopie électronique (Rana *et al.*, 2012).

Pour tester cette hypothèse, j'ai d'abord réalisé le suivi de cardiac bodies d'un patient (FD141-4L clone 51) et d'un contrôle (CT136-4L clone 25) cultivés dans du milieu avec du galactose et des acides gras sur une durée d'un mois. Après une vingtaine de jours de déplétion en glucose, les cardiac bodies du patient présentaient des spots sombres centraux associés à de la desquamation en périphérie, faisant penser à de la mort cellulaire (**figure 29-A**). Cette première observation suggérait une plus grande sensibilité des cardiomyocytes de patients à l'activation forcée du métabolisme mitochondrial. Un tel phénotype n'avait jamais été observé dans du milieu classique avec glucose. La sensibilité des cardiomyocytes de patients AF a pu être confirmée par la suite sur les deux lignées de patients : FD141-4L clones 49, 51 et 62 (**figure 29-B**) et FD135-4L clone 30 (*data not shown*). Le clone 33 de la lignée FD135-4L semblait toutefois moins affecté par l'absence de glucose car il ne présentait pas la desquamation caractéristique (**figure 29-B**). Ces résultats jusque là très encourageant laissent présager une atteinte cellulaire sévère. Et pourtant, l'analyse en microscopie électronique de ces cardiac bodies n'a pas révélé d'anomalies mitochondriales flagrantes dans les cardiomyocytes de patients (**figure 30**), alors que c'était le cas pour les analyses précédentes à 2 et 4 mois en milieu avec glucose .

d) Maturation et type de cardiomyocytes

Comme la cardiomyopathie associée à l'AF affecte un cœur mature et principalement le ventricule gauche, il était important d'évaluer à la fois la diversité des cardiomyocytes générés (ventriculaires versus atriaux) ainsi que leur degré de maturation (embryonnaire/fœtal versus adulte) pour estimer la pertinence des résultats obtenus jusqu'à présent.

Les protéines constituant les myofilaments cardiaques telles que les deux isoformes majeures de la chaîne légère de la myosine, MLC2a et MLC2v, sont couramment utilisées à cet effet (**figure 31-A(i)**) (Kamakura *et al.*, 2013; Lian *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012b). MLC2a est exprimée dans les cardiomyocytes de l'atrium quel que soit leur degré de maturité, mais aussi dans les cardiomyocytes ventriculaires immatures où elle précède l'expression de MLC2v (Chuva de Sousa Lopes *et al.*, 2006;

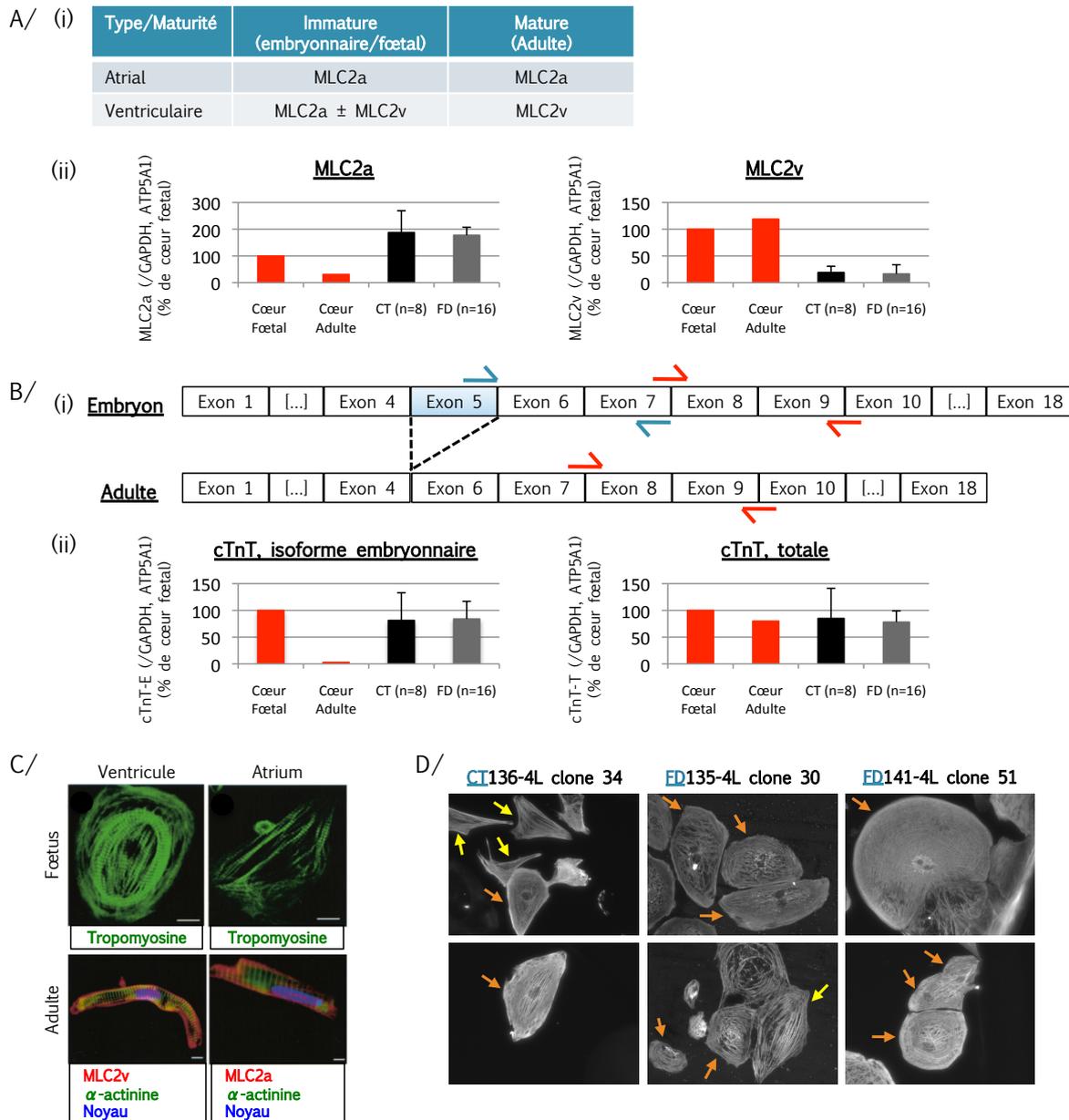


FIGURE 31 : Diversité et stade de développement des cardiomyocytes âgés de deux mois

A/ Etude des isoformes de la chaîne légère de la myosine : (i) Tableau récapitulatif de l'expression des isoformes MLC2a et MLC2v selon le type et la maturité des cardiomyocytes. (ii) Quantification relative par qRT-PCR de l'expression de MLC2a et de MLC2v dans les cardiomyocytes âgés de 2 mois, comparativement à des échantillons commerciaux d'ARNm de cœurs humains fœtaux et adultes.

B/ Etude des isoformes de la troponine T cardiaque : (i) Schéma illustrant l'épissage alternatif de l'exon 5 entre les formes embryonnaire (inclus) et adulte (exclus) de la cTnT, ainsi que la position des amorces utilisées pour la quantification relative de l'expression de la forme embryonnaire (flèches bleues) et de la totalité (embryonnaire + adulte) (flèches rouges). (ii) Quantification relative par qRT-PCR de l'expression de l'isoforme embryonnaire, ainsi que de l'ensemble des formes de la cTnT, en comparaison avec des échantillons commerciaux d'ARNm de cœurs humains fœtaux et adultes.

C/ Immunofluorescences sur cultures primaires de cardiomyocytes humains, *extraites de (Mummery et al., 2003)*. Les cardiomyocytes fœtaux ventriculaire et atrial ont été marqués avec un anticorps anti-tropomyosine. Les cardiomyocytes adultes ont été marqués avec un anticorps anti- α -actinine (vert) et un anticorps anti-MLC2v (rouge) ou anti-MLC2a (rouge). Les noyaux sont en bleu.

D/ Marquage de la cTnT dans des cardiomyocytes contrôles (CT136-4L clone 34) et de patient (FD135-4L clone 30 et FD141-4L clone 51) révélant la présence vraisemblable de cellules ventriculaires (flèches oranges) et atriales (flèches jaunes) (par comparaison avec les clichés en C/).

ATP5A1 : ATP synthase α subunit 1, CT : contrôles, cTnT : cardiac Troponin T, FD : Patient AF, GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, MLC2a : Myosin light chain atrial isoform, MLC2v : Myosin light chain ventricular subunit.

Kubalak et al., 1994). La coexpression de MLC2a et MLC2v caractérise donc les cardiomyocytes ventriculaires fœtaux, dont la maturation s'accompagne de l'extinction progressive de l'expression de MLC2a (Kamakura et al., 2013; Lian et al., 2012; Segev et al., 2005; Zhang et al., 2012b). Exprimé seul, MLC2v est un marqueur des cardiomyocytes ventriculaires adultes. L'étude de ces deux protéines est suffisante pour déterminer la diversité et le stade de développement des cardiomyocytes, lorsqu'elles sont détectées par immunofluorescence ou par FACS. Or, dans la mesure où j'ai réalisé des qRT-PCR, il était nécessaire de procéder à des expériences complémentaires pour pouvoir conclure. Pour cela, j'ai aussi étudié l'expression de la troponine T cardiaque (cTnT, TNNT2) dont l'ARNm subit un épissage alternatif menant à l'exclusion de l'exon 5 dans sa forme adulte (Cooper and Ordahl, 1985), ainsi que la morphologie des cardiomyocytes en culture et l'organisation de leurs myofilaments (**figure 31-C**) (Mummery et al., 2003). En effet, les cardiomyocytes ventriculaires fœtaux sont ovoïdes et caractérisés par des myofilaments périphériques disposés de façon circulaire, alors que les cardiomyocytes fœtaux de l'atrium ont une forme plus géométrique avec des fibres contractiles rectilignes. Enfin, les cardiomyocytes adultes sont très allongés et plutôt rectangulaires.

A l'âge de deux mois, les cardiomyocytes expriment fortement MLC2a, mais peu MLC2v (respectivement, deux fois plus et cinq fois moins que le cœur fœtal) (**figure 31-A(ii)**). Etant donné l'âge des cardiomyocytes, il est fort probable que ces niveaux d'expression reflètent leur immaturité, plutôt que la présence prépondérante de cardiomyocytes de type atrial. Leur immaturité a pu être confirmée par l'expression largement majoritaire de l'isoforme embryonnaire de la cTnT, à l'image du cœur fœtal (**figure 31-B(ii)**). Enfin, le marquage par immunofluorescence de la cTnT dans les cardiomyocytes générés à partir de nos lignées iPS a révélé une majorité de cellules avec des faisceaux contractiles circulaires en périphérie, évoquant des cardiomyocytes fœtaux ventriculaires (**figure 31-D**). Des cellules aux limites plus géométriques ont aussi pu être identifiées, suggérant la présence de cardiomyocytes de type atrial, mais dans une moindre mesure (**figure 31-D**).

C. Conclusion

J'ai réussi à établir un protocole de différenciation cardiaque directe efficace avec nos lignées iPS qui m'a permis de produire suffisamment de cardiomyocytes pour approfondir leur caractérisation. J'ai ainsi pu montrer, qu'un maintien en culture de 4 mois permettait d'observer une progression dans la physiopathologie de la maladie, avec l'apparition de dépôts de fer (*voir résultats point IV-B-2-b*). J'ai toutefois rencontré des difficultés lorsque j'ai voulu réaliser des expériences sur cellules vivantes, qui requièrent d'avoir à la fois des cardiomyocytes contrôles et de patients, mais aussi qu'ils aient le même âge. Or, la désynchronisation des lignées iPS cultivées sur Matrigel™, couplée aux variations de l'état de nos lignées, a fait qu'il était souvent difficile de réunir ces deux conditions. Alors qu'elle semblait bien engagée, ma tentative pour accélérer l'apparition du phénotype en forçant le métabolisme mitochondrial n'a malheureusement pas donné les résultats escomptés.

Les résultats que j'ai obtenus au cours de la seconde partie de ma thèse étaient insuffisants pour conduire à la rédaction d'un second papier.

Discussion

Génotype	Lignées	N° Clone	Efficacité protocole N°1	Efficacité protocole N°2
Contrôle	CT136-4L	25	2/10	8/10
		34	3/10	9/10
	CT145-4L	2	1/10	6/10
Patient	FD135-4L	30	0/10	9,5/10
		33	NE	7/10
	FD141-4L	49	5/10	6/10
		51	3/10	9/10
		62	NE	8/10

TABLEAU 13 : Efficacité de différenciation cardiaque des différents clones iPS selon le protocole utilisé
 Appréciation personnelle (note sur 10) des meilleurs rendements obtenus pour chaque clone.
 NE : Non évalué.

I. Différenciation des iPS en cardiomyocytes

Parmi les types de différenciations fréquemment réalisés à partir des cellules ES/iPS, la différenciation cardiaque est considérée comme la plus « facile ». Pourtant, si l'on considère le nombre de protocoles de différenciation disponibles dans la littérature, il semblerait que de nombreux laboratoires n'aient pas trouvé le protocole adapté à leurs cellules avec l'efficacité escomptée et aient donc dû développer leur propre protocole. Nous faisons partie de ces laboratoires.

A. Efficacité des protocoles de différenciation

1- Généralités

Je me suis rendue compte, à mes dépens, que de nombreux paramètres influent sur la culture des cellules ES/iPS et sur leur capacité à être différenciées efficacement en un type cellulaire donné. Voici les cinq paramètres que j'ai pu identifier :

(1) La lignée cellulaire elle-même. En effet, nous avons vu au *point III-C* de l'introduction que les lignées ES/iPS avaient une propension naturelle à se différencier dans un type cellulaire (Bock et al., 2011; Osafune et al., 2008). Le fait que nos clones iPS n'avaient pas tous la même facilité à générer des cardiomyocytes va dans ce sens (**tableau 13**).

(2) Le mode de culture des iPS. Les protocoles de différenciation sont souvent adaptés à une certaine façon de cultiver les iPS et n'autorisent généralement pas de variations de ces conditions. Les modalités les plus fréquentes concernent les associations support/milieu (feeders/milieu HES, Matrigel™/milieu mTESR1™, Matrigel™/milieu conditionné) ainsi que l'organisation des cellules (en colonies distinctes ou en tapis cellulaire confluent). Bien que bénéfique pour l'état général de nos lignées iPS, la transition de feeders/milieu HES à Matrigel™/milieu mTESR1™ s'est avérée rhéiditoire pour le protocole de différenciation N°1, dont l'efficacité avait terriblement diminué (*voir résultats point III-C-3*).

(3) L'état de pluripotence des cellules. J'ai malheureusement pu en faire l'expérience à plusieurs reprises au cours de ma thèse. En effet, les iPS sont extrêmement sensibles aux variations de qualité des supports et milieux de culture, en particulier les feeders, le bFGF et le KSR et dans une moindre mesure le Matrigel™ et le mTESR1™ dont la qualité était plus constante. Lorsque la qualité d'un de ces composants est altérée, l'état des lignées se dégrade très vite : cela se traduit par une augmentation importante de la différenciation spontanée, empêchant alors d'utiliser les cellules dans le cadre d'une différenciation ciblée. Il est généralement préférable de décongeler des lignées saines plutôt que d'attendre un retour à une situation normale, qui peut prendre plusieurs semaines après remplacement du lot de milieu ou de facteur incriminé. De plus, il est difficile de juger de l'impact réel de cette période trouble sur les lignées iPS. Le cas des iPS du patient FD135-4L clone 30 est un peu différent, puisque lorsqu'elles étaient cultivées sur feeders, 50% des colonies

étaient systématiquement différenciées. Leur état général s'est nettement amélioré avec le passage sur Matrigel™/mTESR1™ et ce clone s'est même révélé être celui au plus fort potentiel de différenciation cardiaque (**tableau 13**).

(4) Le protocole de différenciation choisi. Le **tableau 13** illustre bien l'influence du choix du protocole de différenciation sur le rendement de la différenciation. Le rendement du protocole N°2 était nettement supérieur à celui du protocole N°1, et cela pour l'ensemble des lignées.

(5) L'expérimentateur. Au début de ma thèse je travaillais seule sur la partie cardiaque du projet iPS. Suite au départ de la post-doctorante en charge du projet iPS, la technicienne qui travaillait avec elle s'est greffée à mon projet, et s'est avérée être une aide très précieuse. Il a donc fallu que je la forme à la différenciation et à la culture des cardiomyocytes et que je lui transmette tous mes petits « trucs et astuces ». J'ai essayé d'être la plus précise possible. Cependant, l'appréciation et la façon de faire restent propres à chacun et sont donc source de variabilité. Typiquement, le choix de lancer un protocole de différenciation sur un clone donné est basé sur l'appréciation du fait qu'il soit « prêt », c'est-à-dire que les colonies aient la taille et la couleur adéquates. De même, lors de la fragmentation des colonies d'iPS pour former des EB du protocole N°1, il s'agit de générer des morceaux ni trop gros, ni trop petits. Enfin, je me suis rendue compte que la façon de pré-découper les colonies pour le protocole N°2, en terme de taille du quadrillage mais aussi d'orientation de l'aiguille lors de la découpe, influait sur le rendement du protocole.

2- Protocole N°1 : différenciation indirecte via les EB

L'efficacité plutôt mauvaise du protocole de différenciation N°1 peut notamment s'expliquer par son manque de spécificité, due au passage par le stade d'EB, au traitement à l'acide ascorbique et enfin à la présence de sérum dans le milieu de culture.

Il a été établi que les EB étaient constitués de cellules des trois feuillets embryonnaires, et mimeraient donc le développement embryonnaire précoce (*voir résultats point III-A-2*). Or, les cellules sont loin d'y être aussi bien organisées et ordonnées que dans l'embryon : elles doivent donc certainement recevoir des signaux paracrines contradictoires qui rendent leur différenciation moins efficace. De plus, suivant leur taille, les EB sont plus ou moins enclins à générer des cardiomyocytes. Comme notre méthode de formation des EB était basée sur notre appréciation de la taille idéale des fragments de colonies iPS à mettre en suspension, elle produisait une population d'EB de tailles très variables, ce qui avait un impact certain sur le rendement de la différenciation et sur sa reproductibilité.

Le principal facteur cardiogénique de ce protocole était l'acide ascorbique, dont l'effet passe par une augmentation de la synthèse du collagène et de la production des ROS, et non par l'activation ou la répression de voies de signalisation spécifiques, comme c'est le cas lors du développement embryonnaire. Le pouvoir cardiogénique de l'acide ascorbique est donc plutôt limité, comparé à celui des facteurs de croissance des familles Wnt, FGF et TGFβ.

Le milieu CM20 (**annexe 3**), utilisé dans la seconde partie du protocole de différenciation, comporte du sérum de vœu fœtal. Or, celui-ci contient des facteurs de croissance de nature et en

quantité inconnues : il peut y avoir aussi bien des activateurs que des inhibiteurs de la différenciation cardiaque, compliquant encore un peu plus le processus de différenciation. L'utilisation de sérum animal pose aussi le problème de la variabilité de composition d'un fournisseur à l'autre ou d'un lot à l'autre, et donc de reproductibilité. C'est pour ces deux raisons que le sérum a été banni de la plupart des protocoles de différenciation des cellules ES/iPS humaines utilisés aujourd'hui, qui utilisent plutôt un équivalent artificiel à la composition contrôlée.

3- Protocole N°2 : différenciation directe

L'efficacité du protocole de différenciation N°2 est, quant à elle, considéré comme bonne. Avec ce protocole, une différenciation réussie donne autour d'un million de cellules cardiaques à partir d'une B35 (boîte de culture de diamètre 35 mm) : les zones contractiles sont grandes et leurs contractions sont visibles à l'œil nu. De tels rendements ont été obtenus pour les iPS du contrôle CT136-4L (clones 25 et 34) et des patients FD141-4L (clones 51 et 62) et FD135-4L (clone 30). Avec ce dernier clone, j'ai même pu obtenir jusqu'à 2.500.000 cardiomyocytes à partir d'une B35 d'iPS. Et pourtant, même avec ces lignées à fort potentiel, l'efficacité du protocole pouvait fortement varier d'une fois à l'autre : les raisons des rendements réduits voire des échecs restaient souvent inexpliquées. Nous avons cependant pu identifier qu'outre l'état de pluripotence des iPS et le choix du « bon moment » pour démarrer la différenciation, la densité et l'espacement des colonies étaient des paramètres importants. L'avantage de ce protocole est qu'avec un peu d'expérience, il est possible de savoir dès les premiers jours si la différenciation est bien partie, notamment en regardant la morphologie des cellules qui prolifèrent.

4- Transférabilité du protocole de différenciation N°2 à d'autres lignées iPS

La question de la transférabilité d'un protocole de différenciation à d'autres lignées ES/iPS est essentielle pour juger de sa valeur. C'est un test que j'aurais voulu faire, mais cela n'a pas été possible car je n'ai pas eu accès à d'autres lignées. Cependant, le fait que le protocole N°2 fonctionne sur des clones aux « caractères » différents (colonies blanches versus colonies transparentes, et colonies à vitesse de croissance différente), permet de supposer que ce protocole fonctionnerait aussi avec d'autres lignées.

B. Améliorations et perspectives

1- Coût de la différenciation et modifications possibles

Par curiosité, j'ai calculé le coût d'une différenciation cardiaque avec les protocoles N°1 et 2 à partir de 2 B35 d'un clone iPS : cette estimation est restreinte à la phase d'amplification des iPS et à la période nécessaire à l'apparition des premières zones contractiles. J'ai exclu le coût de l'entretien des cardiomyocytes a posteriori, mais aussi le coût du travail humain nécessaire à la mise en œuvre de ces protocoles, bien que ces deux postes de dépense ne soient pas négligeables. Il

	Protocole N°1	Protocole N°2
Amplification préalable des iPS	10 € (pour 7 jours)	9 € (pour 4 jours)
Durée du protocole de différenciation	20 jours	10 jours
Coût de la différenciation	21 €	42 €
TOTAL	31 €	51 €

TABLEAU 14 : Estimation du coût de revient des protocoles de différenciation cardiaque utilisés
Coûts calculés pour une différenciation à partir de 2 B35. Le détail des calculs est disponible en annexe 4.

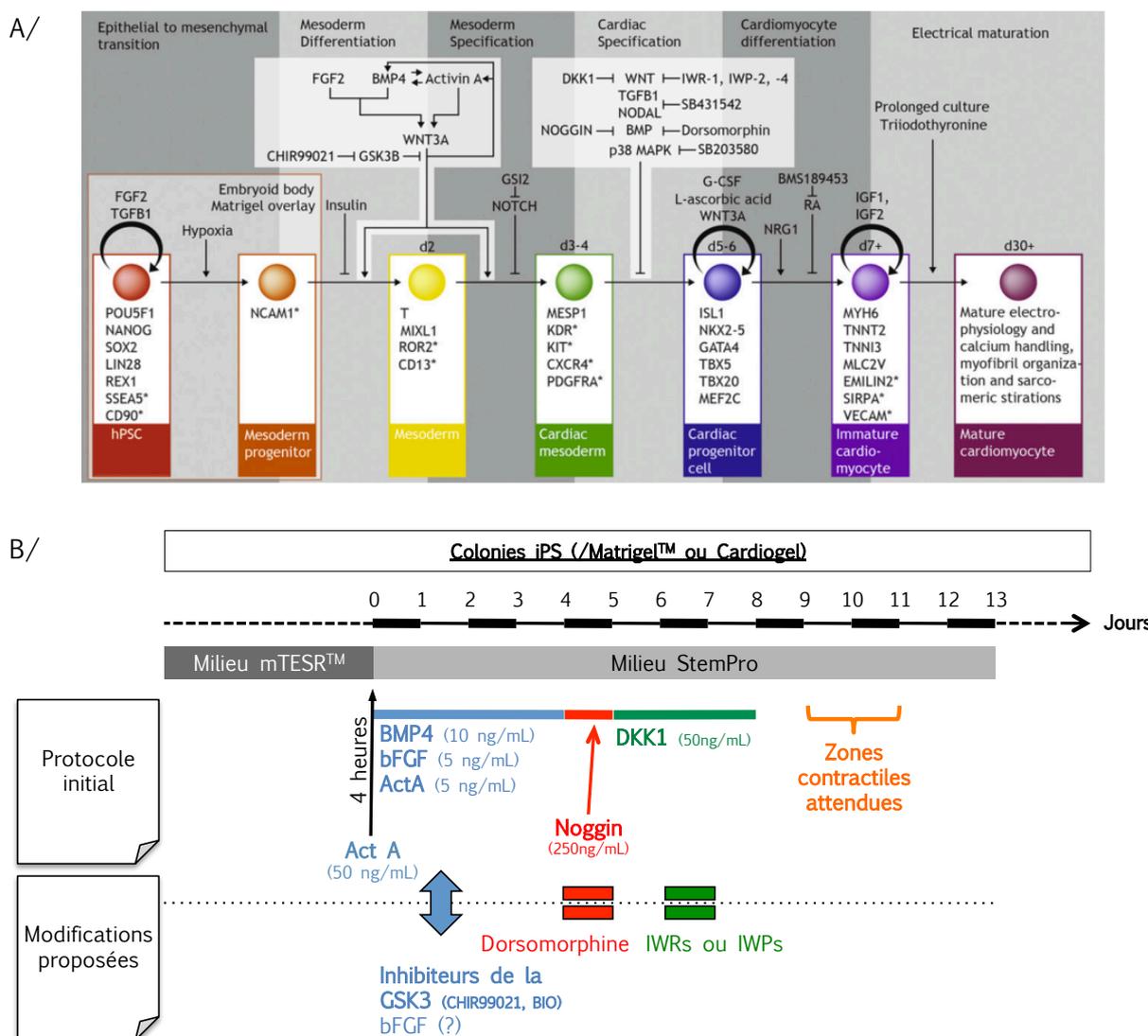


FIGURE 32 : Améliorations possibles du protocole de différenciation cardiaque N°2

A/ Schéma des connaissances concernant les facteurs impliqués dans la différenciation cardiaque des cellules pluripotentes (issue de (Burridge et al., 2012)). Facteurs influençant la progression à travers les 6 étapes majeures de la cardiogenèse à partir des cellules pluripotentes : (1) transition épithélio-mésenchymateuse, (2) différenciation du mésoderme, (3) spécification du mésoderme, (4) spécification cardiaque, (5) différenciation des cardiomyocytes et (6) maturation électrique. En dessous de chaque étape, sont répertoriés les marqueurs associés à chacun des 7 types cellulaires. Les marqueurs de surface sont suivis d'un astérisque.

B/ Modifications envisagées du protocole de différenciation N°2.

ActA : Activine A, bFGF : basic Fibroblast Growth Factor, BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4, DKK1 : Dkkopf-1, GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3, IWP : Inhibitors of Wnt Production, IWR : Inhibitors of Wnt Response.

s'agissait de mettre l'accent sur les protocoles en eux-même. Le coût de l'amplification des iPS pour les deux protocoles est équivalent et s'élève à environ 10€ (**tableau 14**). Le coût de la différenciation en tant que telle du protocole N°2 est le double de celle du protocole N°1 (42€ versus 21€), principalement à cause des facteurs de croissance qui comptent pour 28€ (**tableau 14, annexe 4**).

Dans un premier temps, le coût du protocole N°2 pourrait être légèrement réduit par le remplacement de certains facteurs de croissance par un composé chimique équivalent. Ainsi le Noggin pourrait être substitué par la dorsomorphine, un inhibiteur spécifique des récepteurs du BMP de type 1 (ALK2, 3 et 6). De même le DKK1 pourrait être remplacé par l'un des inhibiteurs de la voie Wnt des familles IWRs (*Inhibitors of Wnt Response*) ou IWPs (*Inhibitors of Wnt production*). Les IWRs stabilisent l'Axine, limitant la dislocation du complexe APC/Axine/GSK3 β /CK1 γ chargé d'initier la dégradation de la β -caténine, alors que les IWPs inhibent la Porcupine, une cystéine-palmitoyltransférase, empêchant ainsi la palmitoylation des protéines Wnt, indispensable à leur sécrétion (Chen et al., 2009).

Des modifications plus profondes du protocole de différenciation pourraient aussi être entreprises de façon à améliorer son efficacité, mais aussi à le simplifier et donc à en réduire le coût. En effet, il apparaît clairement que la modulation de la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle primordial dans la différenciation cardiaque *in vivo* : dans un premier temps, son activation est nécessaire à l'induction du mésoderme, puis son inhibition permet la spécification cardiaque (*voir résultats point IV-A-1*). Or, dans le protocole N°2, seule l'inhibition secondaire de la voie est contrôlée. Son activation initiale n'est que présumée. Celle-ci résulterait de l'induction de l'expression endogène des ligands Wnt1, Wnt3a et Wnt8a sous l'action du couple Activine A/BMP4 (Paige et al., 2010). Les récents travaux de Lian et al. montrent que la simple modulation de la voie Wnt/ β -caténine suffirait à générer efficacement des cardiomyocytes (Lian et al., 2012). De façon intéressante, l'activation initiale de cette voie permet de s'affranchir du traitement à l'Activine A/BMP4 pour l'induction du mésoderme, puisque de façon réciproque, elle active la production endogène de BMP2/BMP4 et de Nodal (Lian et al., 2012). L'autre avantage est que cette voie peut être régulée uniquement avec des composés chimiques : l'activation peut se faire par l'application d'inhibiteurs de l'enzyme GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) comme BIO ou CHIR99021, et la répression par les IWRs ou IWPs mentionnés ci-dessus. Il faudrait aussi voir si le traitement au bFGF pendant les quatre premiers jours apporte un réel plus ou s'il peut être omis. Je maintiendrai toutefois le traitement au Noggin (ou à la dorsomorphine) après l'induction du mésoderme, qui agirait de façon synergique avec l'inhibition de la voie Wnt pour augmenter l'efficacité de différenciation cardiaque (Zhang et al., 2012a). Pour résumer, il s'agirait donc en fait de modifier l'étape d'induction du mésoderme, en remplaçant le couple Activine A/BMP4 par un activateur de la voie Wnt et éventuellement de s'affranchir du bFGF (**figure 32**).

De façon plus anecdotique, il serait intéressant de remplacer le Matrigel™, dont la composition est proche mais pas totalement identique à la MEC cardiaque, par du Cardiogel qui est une matrice sécrétée par les fibroblastes cardiaques (Baharvand et al., 2005; VanWinkle et al., 1996). Il faudrait cependant vérifier que l'association Cardiogel/mTESR1™ permette aussi aux iPS de proliférer à l'état indifférencié sur au moins un passage. Dans le cas contraire, il faudrait envisager

d'amplifier les iPS sur Matrigel™ puis de les transférer sur Cardiogel un jour avant de lancer le protocole de différenciation. Le Cardiogel n'est à ce jour pas une matrice commercialisée et doit donc être préparée soi-même, ce qui augmente le risque de variabilité de composition, et éventuellement de qualité.

2- Affranchissement des iPS

Du fait de l'extrême sensibilité des iPS à leurs conditions de culture et des problèmes que cela engendre, l'idéal serait tout simplement de pouvoir s'en affranchir : soit totalement, en effectuant une conversion directe (transdifférenciation) des fibroblastes en cardiomyocytes, soit partiellement, en générant des progéniteurs cardiaques à partir de l'ensemble des lignées iPS.

a) *La conversion directe (transdifférenciation)*

La conversion directe est conceptuellement attrayante car elle est nettement plus rapide et plus efficace qu'une dérivation d'iPS. Les données disponibles concernent principalement la conversion de fibroblastes murins cardiaques et/ou dermiques en cardiomyocytes. Différentes approches ont ainsi été proposées : la surexpression des facteurs de transcription cardiaques Gata4/Mef2c/Tbx5 (leda et al., 2010), la brève expression des facteurs de pluripotence Oct4/Sox2/Klf4 suivie d'une culture dans un milieu cardiogénique (Efe et al., 2011) ou encore la transfection transitoire des microARN 1/133/208/499 (Jayawardena et al., 2012). Le traitement des fibroblastes par l'inhibiteur de la voie de signalisation JAK/STAT (JI1, pour *Jak Inhibitor 1*), empêchant la formation d'intermédiaires iPS, permet d'améliorer nettement le rendement de la transdifférenciation (Efe et al., 2011; Jayawardena et al., 2012). La conversion de fibroblastes humains en progéniteurs cardiaques est, quant à elle, possible par la coexpression des facteurs de transcription ETS2 (*v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2*) et MESP1 (*Mesoderm Posterior homolog 1*) associée au traitement à l'Activine A et au BMP2 (Islas et al., 2012). Les facteurs peuvent aussi être introduits dans les cellules à l'état de protéine, en les couplant à un PTD (*Protein transduction domain*) tel que le peptide TAT, permettant ainsi de s'affranchir de toute modification génétique des cellules (Islas et al., 2012). La conversion directe des cellules est une approche prometteuse mais encore balbutiante, qui est loin de supplanter les iPS. La reproductibilité d'un laboratoire à l'autre n'est pas garantie à en juger par les récents travaux de Chen et al. qui n'ont pas réussi à générer des cardiomyocytes à partir de fibroblastes de souris avec le trio de facteurs de transcription Gata4/Mef2c/Tbx5 proposé par leda et al. (Chen et al., 2012; leda et al., 2010).

b) *Production et culture de progéniteurs cardiaques*

Partir de progéniteurs cardiovasculaires plutôt que d'iPS devrait permettre de garantir une production de cardiomyocytes plus efficace, plus rapide et avec davantage de reproductibilité. Nous avons déjà vu qu'il était possible d'isoler des précurseurs cardiovasculaires grâce à l'expression

différentielle des marqueurs de surface $KDR^{low}/c-KIT^{neg}$ (Yang et al., 2008) ou $KDR^{low}/PDGFR\alpha^{high}$ (Kattman et al., 2011) (voir résultats point IV-A-3) : à chaque fois, les progéniteurs subissaient une différenciation terminale en cardiomyocytes directement après le tri par FACS. Dans le cas présent, il s'agirait en fait de stabiliser ces cellules à l'état de progéniteurs, afin de pouvoir les amplifier, idéalement de les congeler, et de les différencier en cardiomyocytes en fonction des besoins. Il semblerait que la stabilisation des progéniteurs cardiovasculaires soit assez facile, et même d'une telle évidence que les publications ont tendance à limiter ces informations (Blin et al., 2010; Christoforou et al., 2013; Leschik et al., 2008). Si toutefois le maintien des progéniteurs en culture s'avérait difficile, il pourrait être intéressant de tester les conditions de culture des précurseurs cardiaques isolés à partir de biopsies de cœurs humains adultes ou fœtaux : par exemple, un milieu avec 10% de SVF et du bFGF (Smits et al., 2009) ou un milieu comportant de 2% de B27, du bFGF, de l'EGF, de la cardiotrophine-1 et de la thrombine (Messina et al., 2004). Dans ces conditions, les précurseurs peuvent être maintenus en culture pendant au moins 25 passages (Smits et al., 2009). Les progéniteurs cardiovasculaires sont multipotents et peuvent générer non seulement des cellules cardiaques, mais aussi des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales (Yang et al., 2008), il sera donc aussi nécessaire d'établir des conditions permettant de biaiser leur différenciation terminale vers la lignée cardiaque.

3- Dérivation de nouvelles lignées iPS

L'un des problèmes majeurs de nos lignées iPS est leur manque d'homogénéité, du point de vue de leur comportement en culture (morphologie, vitesse de croissance, propension à la différenciation spontanée), mais aussi de leur capacité à être différenciées en un type cellulaire particulier. Deux raisons pourraient expliquer cela :

Les lignées iPS dont nous disposons au laboratoire ont été dérivées peu après la publication des travaux des équipes de Yamanaka et de Thomson, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de S. Viville qui voulait introduire cette nouvelle technologie à l'IGBMC (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Le recul sur cette technologie émergente était alors plus que limité, ce qui explique que les débuts furent difficiles et tâtonnant et me laisse penser que nos lignées n'ont peut-être pas été générées de façon optimale. De plus, nos lignées iPS ont été produites en plusieurs vagues, d'abord les lignées du patient FD135 et du contrôle CT136, puis la lignée du patient FD141 et enfin la lignée du contrôle CT145.

La stabilité génétique est une caractéristique des cellules ES/iPS sensée garantir leur capacité d'auto-renouvellement et leur pluripotence. Il a été rapporté que les cellules ES/iPS à petits passages avaient effectivement un caryotype diploïde, mais qu'elles subissaient des altérations génétiques en cas de culture prolongée, comme n'importe quelle autre lignée cellulaire (voir revues (Hussein et al., 2012; Lefort et al., 2009)) : ainsi, les changements les plus fréquemment observés sont un gain de bras de chromosomes (12p, 17q) ou de chromosomes entiers (12, 17, X). Des trisomies des chromosomes 1, 8 et 20 ont aussi été observées, mais dans une moindre mesure. L'hypothèse étant que ces altérations génétiques leur confèreraient un avantage en terme de survie et de prolifération.

Dans le cas particulier des iPS, il semblerait qu'une reprogrammation incomplète, caractérisée par l'absence d'extinction de certains transgènes, soit aussi une cause d'aneuploïdie (Ramos-Mejia et al., 2010). Les conditions de culture des ES/iPS pourraient participer à l'apparition de ces anomalies chromosomiques : en effet, les passages par traitement enzymatique (collagénase, dispase, trypsine) génèreraient davantage d'aneuploïdie que ceux par coupage manuel, qui induirait des anomalies plus ponctuelles. Il faut cependant préciser qu'avec la technique de coupage manuel, l'expérimentateur introduit un biais puisqu'il choisit de couper uniquement les plus « belles » colonies, potentiellement déjà dotées d'un avantage génétique à l'origine de leur « attrait ». Le support de culture serait lui aussi vecteur d'anomalies chromosomiques. De façon intéressante, l'association Matrigel™/mTESR1™ permettrait de maintenir un caryotype normal sur plus de cinquante passages (soit environ 200 jours avec nos lignées iPS) (Ludwig et al., 2006). Pour toutes ces raisons, il est vivement recommandé d'effectuer un caryotypage régulier des lignées ES/iPS en culture pour vérifier la diploïdie des cellules. Le caryotype de nos lignées n'a été effectué qu'une seule fois (au début de ma thèse), il était alors normal. On ne peut donc pas exclure que des remaniements chromosomiques soient la cause du manque d'homogénéité de nos lignées iPS.

Il serait donc certainement judicieux de dériver de nouvelles lignées iPS avec les méthodes actuelles, plus performantes et aussi plus « propres » car non intégratives (voir *intro. point III-B-1-b*). Il est possible de le faire soi-même grâce à des kits prêts à l'emploi ou mieux encore, de le déléguer à des organismes compétents.

II. Phénotype des cardiomyocytes AF

A. Timing d'apparition du phénotype

Nous avons pu montrer que les cardiomyocytes de patients jeunes et immatures (<1mois) ne présentaient pas d'atteinte mitochondriale (Hick et al., 2013). Ce n'est qu'à partir du moment où les fibres contractiles sont organisées en sarcomères (entre 1 et 2 mois), que les mitochondries commencent à dégénérer (Hick et al., 2013). Nous allons discuter ici des différentes méthodes développées pour accélérer la maturation des cardiomyocytes dérivés d'iPS/ES et potentiellement l'apparition du phénotype malade.

1- Maturation générale des cardiomyocytes

Il faut compter 6 à 10 ans pour que des cardiomyocytes humains néonataux atteignent un phénotype adulte *in vivo*. Bien que ce délai ne soit pas réaliste pour des cardiomyocytes en culture, l'hypothèse qu'une maturation spontanée serait possible lors d'une culture prolongée a été testée. Ainsi, le suivi sur un an de cardiomyocytes dérivés d'iPS a révélé un ralentissement des contractions, une hypertrophie des cellules, un changement des motifs d'expression de MLC2a et MLC2v (voir *résultats point IV-B-2-d*) ainsi que des modifications sarcomériques avec l'apparition progressive des différentes bandes (d'abord Z (14 jours), puis A et I (30 jours), H (180 jours) et enfin M (360 jours)) (Kamakura et al., 2013). De plus, une maturation électrophysiologique a aussi pu être observée après

Paramètre	CM immature (fœtal ventriculaire)	CM mature (adulte ventriculaire)	CM dérivés de nos iPS
Morphologie			
Volume de la cellule	Petit	Grand	NE
Forme	Circulaire/irrégulière	Rectangulaire	Plutôt ovoïde
Noyau	1	2 (≈25% des CM)	Binucléation assez fréquente
Structure			
Sarcomères (striations)	Désorganisés	Organisés	Organisés, après 1 mois de culture
Tubules T	-	+	Jamais observé
MLC2v	+/-	+++	+
MLC2a	+++	+	+++
Métabolisme			
Mitochondries	Réseau réticulé irrégulier, faible quantité	Distribution régulière, représentent 20-40% du volume cellulaire	Réseau réticulé
Potentiel de membrane mitochondrial (en valeur absolue)	Faible	Elevé	NE
Métabolisme du glucose	Elevé	Faible	NE
Métabolisme des acides gras	Faible	Elevé	NE
Electrophysiologie			
Contraction spontanée	Oui	Non	Oui
Potentiel diastolique maximum	Env. -40 mV	Env. -85 mV	NE
Amplitude du PA	70-90 mV	110-120 mV	NE

TABLEAU 15 : Evaluation du degré de maturation des cardiomyocytes (complété d'après (Mummery et al., 2012; Robertson et al., 2013; Yang et al., 2014))

CM : CardioMyocytes, Env. : environ, MLC2a : Myosin Light chain 2, atrial isoform : MLC2v : Myosin Light chain 2, ventricular isoform. mV : millivolts, NE : non évalué, PA : Potentiel d'Action

seulement trois mois de culture (Sartiani et al., 2007). Bien que le caractère embryonnaire de nos cardiomyocytes âgés de deux mois soit incontestable (voir résultats point IV-B-2-d), ils présentaient toutefois deux caractéristiques des cardiomyocytes adultes, à savoir la binucléation fréquente et les sarcomères organisés, ce qui suggère que le processus de maturation avait débuté (**tableau 15**). L'ensemble de ces données montre que la maturation spontanée est possible, mais très lente.

De nombreux efforts ont été fournis pour développer des méthodes permettant d'accélérer la maturation des cardiomyocytes en culture (voir revue de (Yang et al., 2014)). Elles visent à se rapprocher des conditions environnementales dans lesquelles évoluent les cardiomyocytes *in vivo*. On peut citer : (1) l'utilisation d'une matrice de collagène à la rigidité proche de celle de la matrice extracellulaire cardiaque (Jacot et al., 2010), (2) la culture des cardiomyocytes avec une contrainte de forme et d'organisation topographique (McDevitt et al., 2002), (3) la stimulation électrique (Radisic et al., 2004), (4) la signalisation chimique induite par les agonistes adrénergiques, l'hormone thyroïdienne T3, ou encore l'IGF-1 (Földes et al., 2011; Lee et al., 2010; Montessuit et al., 2006), (5) la culture en 3D couplée à l'application d'un stress mécanique (Zimmermann et al., 2002), (6) les interactions avec les cellules non-cardiomyocytes (Kim et al., 2010). Ces approches n'ont pas toutes les mêmes effets. Parmi les plus fréquents, on retrouve : une meilleure organisation des faisceaux contractiles, l'hypertrophie des cellules, l'acquisition de caractéristiques électrophysiologiques adultes et une augmentation de la force des contractions.

Bien que la cardiomyopathie de l'AF se déclare sur un cœur mature, l'étude de cardiomyocytes de type embryonnaire/fœtal offre la possibilité d'étudier la physiopathologie cardiaque précoce, avant l'apparition des premiers symptômes. Il serait aussi intéressant de comparer l'impact du déficit en frataxine sur les cardiomyocytes embryonnaires et sur les cardiomyocytes maturés artificiellement par l'une des méthodes proposées ci-dessus. Personnellement, je combinerais la culture en 3D avec stress mécanique, qui engendre un niveau d'organisation structurale très proche des cardiomyocytes adultes (sarcomères, jonctions, tubule T) (Zimmermann et al., 2002), au traitement à l'IGF-1, qui permet d'activer le métabolisme des acides gras (Montessuit et al., 2006).

2- Maturation par l'utilisation forcée des mitochondries

Les méthodes de maturation présentées précédemment visent principalement l'organisation structurale des cardiomyocytes et leur fonctionnalité. L'effet potentiel sur leur métabolisme n'a pas été envisagé, sauf dans le cas de l'IGF-1 dont l'effet sur l'expression de PPAR α est connu (Montessuit et al., 2006). Or, le problème du métabolisme des cardiomyocytes issus des iPS est une préoccupation émergente, dans le cadre de tests de toxicité cardiaque (Rana et al., 2012), mais aussi de la modélisation de pathologies cardiaques de l'adulte, telle que la dysplasie ventriculaire droite arythmogène (voir intro. point III-D-2) (Kim et al., 2013; Ma et al., 2013) ou encore l'ataxie de Friedreich.

Rana et al. ont confirmé que le métabolisme énergétique des cardiomyocytes dérivés des iPS était lui aussi de type embryonnaire et reposait donc principalement sur la glycolyse (Rana et al., 2012). Il est cependant possible d'opérer un switch vers la phosphorylation oxydative en remplaçant

le glucose par du galactose avec éventuellement des acides gras (Rana et al., 2012) (voir résultats point IV-A-2). Il a été proposé que le bilan net de la production d'ATP par l'oxydation du galactose en pyruvate serait nul (car le métabolisme du galactose en glucose-1-phosphate est lent), forçant ainsi les cellules à augmenter leur utilisation de la phosphorylation oxydative pour générer suffisamment d'ATP et ainsi assurer leur survie (Robinson et al., 1992; Rossignol et al., 2004). Cette stratégie a déjà été utilisée pour forcer le métabolisme mitochondrial de cellules musculaires, de fibroblastes et des cellules cancéreuses (HepG2, HeLa) (Aguer et al., 2011; Kase et al., 2013; Marroquin et al., 2007; Robinson et al., 1992; Rossignol et al., 2004). Le reproche que l'on peut cependant faire à cette méthode est qu'elle va à l'encontre de la physiologie puisqu'*in vivo*, les cardiomyocytes ont toujours accès au glucose. Même si les cardiomyocytes adultes produisent leur énergie par oxydation des acides gras, ils gardent la capacité d'utiliser le glucose ou un autre substrat si nécessaire.

Les travaux de Kim *et al.* et de Ma *et al.* sur la dysplasie ventriculaire droite arythmogène (ARVD/C) sont les premières études montrant que l'induction du métabolisme adulte dans des cardiomyocytes dérivés d'iPS joue un rôle critique dans l'établissement du phénotype d'une maladie à déclenchement tardif (Kim et al., 2013; Ma et al., 2013). En effet, l'âge médian d'apparition des symptômes dans l'ARVD/C est de 26 ans. Cette pathologie se caractérise par une infiltration lipidique du myocarde et la perte de cardiomyocytes, principalement dans le ventricule droit. L'accumulation lipidique et la tendance à l'apoptose ne se sont pas manifestées spontanément dans les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients ARVD/C, même après 2-3 mois passés en culture (Kim et al., 2013). Ce phénotype a cependant pu être induit par l'activation de PPAR α , un régulateur majeur du métabolisme des acides gras, caractéristique des cardiomyocytes adultes (Kim et al., 2013). De plus, la stimulation conjointe de PPAR γ , normalement exprimé dans les adipocytes et les macrophages (Semple et al., 2006), mais dont l'hyperactivation au niveau cardiaque fait partie de la physiopathologie de l'ARVD/C, a permis d'amplifier le phénotype, résultant en une lipogénèse accrue et une apoptose prononcée (Kim et al., 2013). La question de savoir si l'hyperactivation de PPAR γ était suffisante pour induire le phénotype n'a pas été abordée. L'aspect intéressant de ce papier est l'induction du métabolisme adulte (via PPAR α) dans un milieu avec glucose mais contenant des composés qui simulent la régulation hormonale naturelle : l'insuline, la dexaméthasone (corticostéroïde de synthèse) et l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) (Kim et al., 2013). Chez Kim *et al.*, la durée du traitement des cardiomyocytes avec le milieu adipogénique était d'un mois, contre seulement deux semaines chez Ma *et al.* (Kim et al., 2013; Ma et al., 2013), ce qui est une durée raisonnable.

Activation forcée des mitochondries dans les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients AF

Dans notre cas, le problème était un peu différent puisque les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients AF présentaient spontanément une atteinte mitochondriale, détectée par microscopie électronique. Mais suite à la publication de Rana *et al.*, la question des répercussions réelles de cette atteinte à l'échelle cellulaire s'est posée. C'est ce qui a motivé notre choix de forcer le métabolisme mitochondrial. L'inconvénient est que nous n'avons pas pu vérifier par nous-même que le métabolisme

de nos cardiomyocytes était bien glycolytique dans le milieu avec glucose, et qu'il avait effectivement switché vers la phosphorylation oxydative dans le milieu avec galactose. Certaines études ont montré que l'activation de la phosphorylation oxydative s'accompagnait notamment d'une augmentation de l'expression du complexe IV de la chaîne respiratoire (Aguer et al., 2011; Rossignol et al., 2004) et de la phosphorylation de l'AMPK (5' AMP-activated protein kinase) (Aguer et al., 2011), mais ces observations ne font pas l'unanimité (Kase et al., 2013).

De façon intéressante, il a été montré que la culture de fibroblastes de patients présentant divers défauts de la chaîne respiratoire dans un milieu avec du galactose affectait leur survie : l'impact sur la survie était fonction de la sévérité du déficit de la chaîne respiratoire (Robinson et al., 1992). Ces données sont en accord avec notre observation de la desquamation de cellules à la surface des cardiac bodies de patients AF cultivés en milieu avec galactose (**figure 29**). Cela laisse supposer que les cardiomyocytes de patients AF présenteraient effectivement un déficit de la chaîne respiratoire, mais qu'il n'a d'effet délétère que lorsque celle-ci est mise à contribution pour la production d'ATP. Rossignol *et al.* ont montré que la culture des cellules HeLa en milieu avec galactose entraînait une augmentation de la quantité de crêtes dans les mitochondries (Rossignol et al., 2004). C'est aussi une impression que j'avais eue avec nos cardiomyocytes (à la fois de contrôles et de patients), mais je ne suis pas en mesure de la confirmer objectivement. Il n'y a malheureusement pas de données disponibles quant à l'effet du galactose sur l'ultrastructure des mitochondries lorsque celles-ci ont une chaîne respiratoire défectueuse. Comme les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients présentaient de la desquamation, on peut supposer que ces cellules affectées ont été éliminées par les différents lavages lors de la préparation des échantillons pour la microscopie électronique. Ainsi, les cellules qui ont été analysées ne seraient pas celles qui ont été le plus affectées. Il pourrait même s'agir de « survivantes », qui auraient peut-être trouvé un moyen de s'adapter.

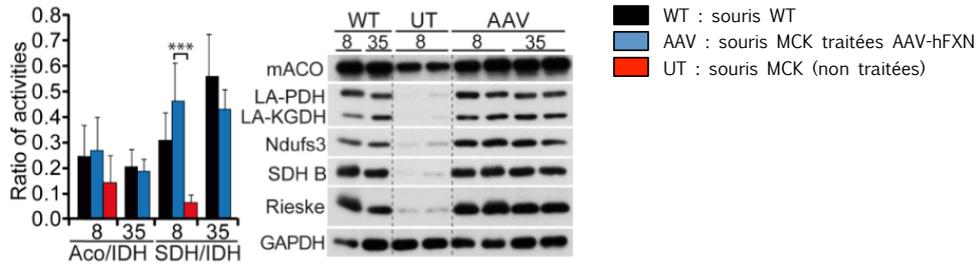
B. Caractérisation du phénotype AF

1- Instabilité de l'expansion $(GAA)_n$

L'expansion $(GAA)_n$ est très dynamique dans les iPS et l'instabilité qui en résulte se détecte facilement par PCR à quelques passages d'intervalle (**figure 27**). La différenciation des iPS en précurseurs neuronaux et en cardiomyocytes semble abolir cette instabilité (**figure 27**). Il est simplement possible que les expansions $(GAA)_n$ soient moins dynamiques dans les tissus différenciés et que l'instabilité ne soit visible que sur de plus longues périodes. En effet, l'accumulation d'allèles de tailles différentes, notamment dans les DRG et le cervelet, se fait à l'échelle de la vie du patient, pas de quelques semaines (De Biase et al., 2007a, 2007b). Il serait intéressant de déterminer le rythme de cette instabilité chez les patients, mais cela implique des prélèvements réguliers sur plusieurs dizaines d'années, ce qui n'est pas envisageable.

Il est aussi important de préciser qu'une PCR classique comme celle que nous faisons ne permet d'amplifier et de ne détecter que les tailles d'expansions $(GAA)_n$ majoritaires. Typiquement, les allèles rares (<10%) ne peuvent être identifiés (Gomes-Pereira et al., 2004). Cette donnée renforce

A/



B/

C/

D/

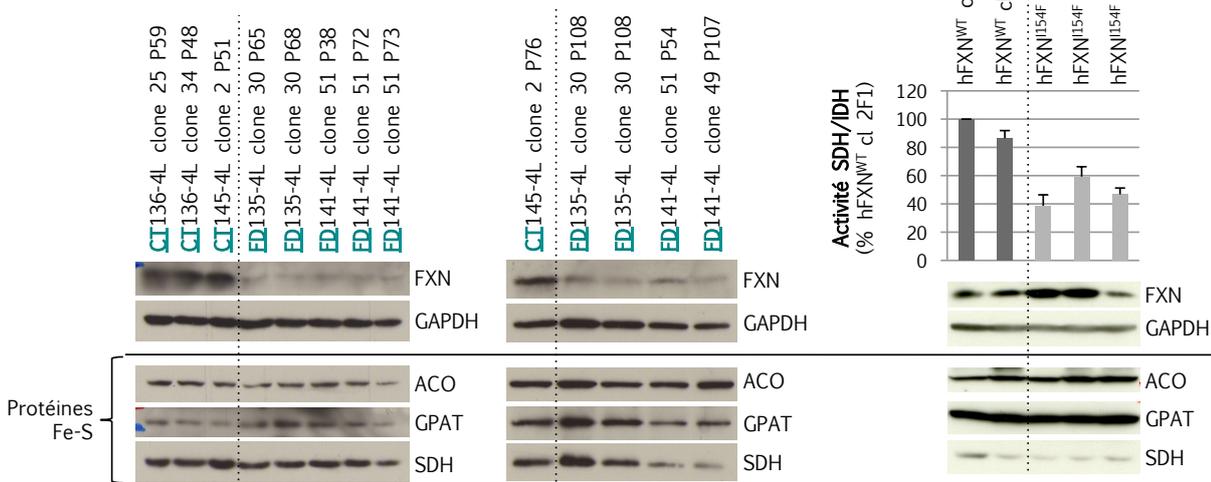


FIGURE 33 : Etude du contenu en protéines Fe-S dans les cardiomyocytes dérivés d'iPS

A/ Mesure des activités enzymatiques de l'aconitase et de la SDH, ainsi que du contenu en apoformes de protéines Fe-S (mACO, NDUFS3, SDH, Rieske) dans le cœur des souris MCK (*figure issue de (Perdomini et al., 2014, in press)*). Ne considérer que ce qui concerne les échantillons WT et UT (correspondant aux souris MCK).

B/ et C/ Western blot sur cardiomyocytes âgés de 2 et 4 mois réalisés respectivement à partir de 8 et 6 µg de protéines de chaque échantillon (les contrôles sont situés à gauche de la ligne discontinue) : détection de la frataxine, de la GAPDH (contrôle de charge) et de 3 protéines Fe-S : ACO, GPAT et SDH.

D/ Quantification de l'activité SDH (haut) et du contenu en apoforme de protéines Fe-S (bas) (ACO, GPAT, SDH) dans le modèle cellulaire humanisé. Deux clones contrôles (hFXN^{WT} clones 2F1 et 1D12 exprimant la frataxine humaine WT) et trois clones mutants (hFXN^{I154F} clones 2C1, 1D3 et C6 exprimant la frataxine humaine porteuse de la mutation ponctuelle I154F). Rappelons que dans ce modèle, la mutation I154F affecte la fonctionnalité de la frataxine, mais n'entraîne pas de déficit.

ACO : ACOnitase, FXN : Frataxine, GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase, GPAT : Glutamate Phosphoribosylpyrophosphate AmidoTransferase, MCK : Muscle Creatine Kinase, NDUFS3 : NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, SDH : Succinate DésHydrogénase, WT : wild-type.

l'idée selon laquelle une légère instabilité ne pourrait de toute façon pas être détectée par ce biais, car les nouveaux allèles produits seraient trop rares pour être amplifiés. Cela confirme aussi que les expansions $(GAA)_n$ sont soumises à une instabilité massive dans les iPS. Le seul moyen d'estimer la variété de tailles des expansions $(GAA)_n$ est de réaliser une « small-pool PCR » (Gomes-Pereira et al., 2004) : cette méthode consiste à amplifier les répétitions GAA à partir de seulement quelques molécules d'ADN, mais à répéter l'opération sur une multitude de dilutions d'un même échantillon. Les amplicons sont ensuite révélés par Southern blot grâce à la grande sensibilité de la radioactivité. Une post-doctorante avait tenté d'introduire cette technique au laboratoire, mais sans succès.

2- Physiopathologie

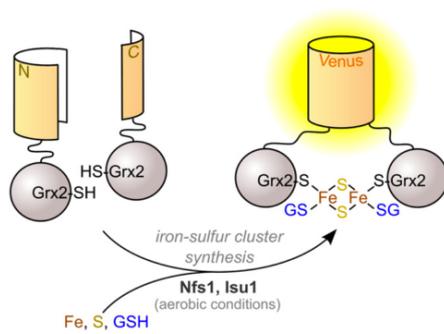
a) Les protéines Fe-S

Le déficit d'activité des enzymes Fe-S est à la base de la physiopathologie de l'AF, puisqu'il découle directement de la réduction du taux de frataxine (**figure 8**) : rappelons qu'un déficit d'activité aconitase a été montré dans le cœur et les DRG de patients, mais uniquement dans le cœur pour les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire (Bradley et al., 2000; Rötig et al., 1997). La mesure de ces activités est donc une analyse biochimique incontournable pour pouvoir justifier la modélisation de l'AF par les cardiomyocytes issus d'iPS de patients. Or, les protocoles de mesure de l'activité enzymatique de l'aconitase et de la SDH (*succinate déshydrogénase, complexe II*) dont nous disposons au laboratoire requièrent au moins 1 million de cellules de chaque échantillon, quantité difficilement atteignable avec certains de nos clones.

De façon intéressante, il a été récemment montré dans le modèle murin MCK, que le déficit d'activité des protéines Fe-S était associé à une diminution importante du contenu en apoprotéines correspondantes (**figure 33-A**) (Perdomini et al., 2014 ; in press). En effet, l'absence du/des centres Fe-S conduit à la déstabilisation puis à la dégradation des apoprotéines, à l'exception de l'aconitase dont l'apoforme IRP1 (*IRE (Iron Responsive Element)-binding Protein 1*) exerce une fonction primordiale dans le contrôle de l'homéostasie du fer en se liant aux séquences IRE de certains ARNm (le récepteur de la transferrine et les ferritines par exemple).

La réalisation de western blots à partir de cardiomyocytes est plus réaliste en terme de quantités nécessaires, puisque quelques μg de protéines suffisent. J'ai donc pu analyser le contenu en apoforme de trois protéines Fe-S (ACO, GPAT et SDH) dans des cardiomyocytes dérivés d'iPS âgés de 2 et 4 mois (**figure 33-B,C**). Contrairement aux cardiomyocytes du modèle murin MCK, les cardiomyocytes de patients n'ont pas de déficit flagrant en apoprotéines. Il serait toutefois hâtif d'en conclure que les cardiomyocytes AF n'ont pas de déficit de biosynthèse des centres Fe-S. En effet, il faut d'abord rappeler que le modèle murin MCK est un KO conditionnel et que, par conséquent, la frataxine est sélectivement et totalement délétée dans le cœur et les muscles squelettiques de ces souris (Puccio et al., 2001). Or, tout comme les patients, les cardiomyocytes produits à partir des iPS AF ont un taux résiduel en frataxine. Comparé aux contrôles, l'activité résiduelle de la SDH est inférieure à 20% dans les souris MCK (**figure 33-A**) (Perdomini et al., 2014, in press), et selon les sources, de l'ordre de 50% (Rötig et al., 1997) ou de 20% (Bradley et al., 2000) dans le cœur des

A/



B/

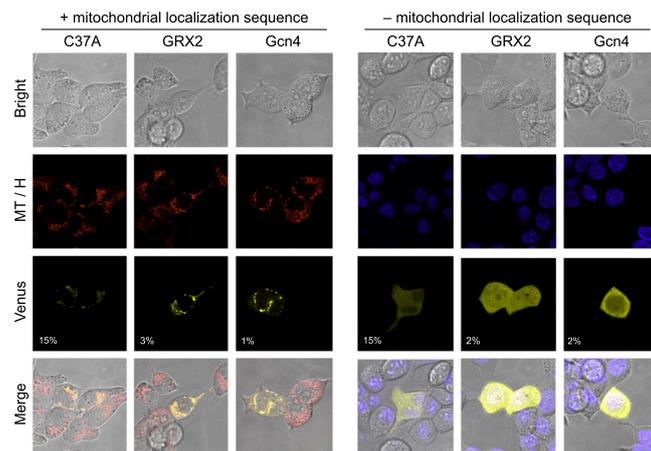


FIGURE 34 : Système Venus de détection des centres Fe-S (d'après (Hoff et al., 2009))

A/ Principe du système de détection des centres Fe-S. Les extrémités Nt et Ct de la protéine Venus sont fusionnées à la protéine GRX2. Lorsque celle-ci lie un centre [2Fe-2S], elle se dimérise, et complète ainsi les deux extrémités de la protéine Venus, qui fluoresce.

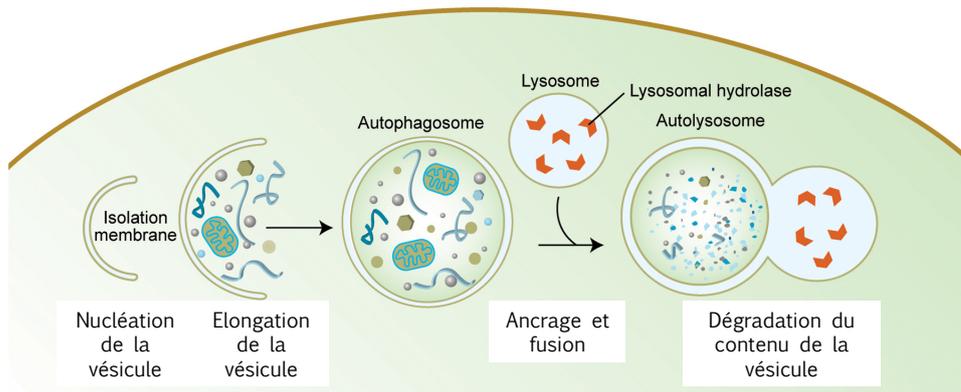
B/ Validation du système effectuée sur les cellules HEK293T (clichés pris au microscopie confocal).

Grx2 : Glutaredoxine-2. C37A : forme mutée de la protéine Grx2 qui ne lui permet pas de lier de centre [2Fe-2S] et ne peut donc pas se dimériser. Gcn4 : activateur transcriptionnel (leucine-zipper) de la levure qui se dimérise spontanément MT : Mitotracker Red, H : Hoechst.

patients AF (2 patients considérés à chaque fois). Mon hypothèse est que la carence en centres Fe-S causée par le déficit en frataxine aurait un impact sur l'activité des enzymes Fe-S, mais qu'elle n'est pas assez sévère pour avoir des répercussions visibles sur les apoprotéines dans les cardiomyocytes de patients AF. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué par western blot l'état de protéines Fe-S dans le modèle de fibroblastes murins humanisés pour le gène de la frataxine créé au laboratoire (Calmels et al., 2009). Ces cellules, délétées pour la frataxine murine endogène, expriment une frataxine humaine avec la mutation ponctuelle I154F, à l'origine d'un problème de maturation, d'une tendance à l'agrégation et d'une altération de sa fonction (**tableau 2**) (Correia et al., 2008). Ce modèle reproduit le phénotype biochimique complet associé à l'AF avec notamment 50% d'activité SDH résiduelle (**figure 33-D-haut**), mais pas le déficit en apoforme des différentes protéines Fe-S testées (**figure 33-D-bas**). Ces résultats vont dans le sens de mon hypothèse et suggèrent que le déficit en centres Fe-S lié à un taux résiduel en frataxine, ne peut pas être mis en évidence dans notre modèle cellulaire par la détection des protéines Fe-S en western blot.

Quelles pourraient être les alternatives permettant d'évaluer la production des centres Fe-S et/ou l'activité des enzymes Fe-S ? (1) La première possibilité serait de mesurer l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale au travers de la consommation en oxygène des cellules, grâce à l'appareil *XF24 Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience) (Zhang et al., 2012c). Cette technique ne peut cependant pas se suffire à elle-même, car une activité réduite de la chaîne respiratoire peut certes refléter un déficit d'activité des protéines Fe-S constituant les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire, mais aussi simplement l'immaturation des cellules cardiaques (*voir résultats point IV-B-2-d*) (Rana et al., 2012). (2) Une seconde possibilité consisterait à détecter directement les centres Fe-S produits grâce au système mis au point par Hoff et al. (Hoff et al., 2009). Cet outil est basé sur la complémentarité des fragments Nt et Ct de la protéine fluorescente Venus sous l'effet de la dimérisation de la Glutarédoxine-2 (GRX2) en présence de centres [2Fe-2S] (**figure 34-A**). Ce système prometteur a été testé avec succès sur les cellules HEK293 (**figure 34-B**) (Hoff et al., 2009), mais soulève un certain nombre de questions quant à son utilisation sur les cardiomyocytes AF. La première difficulté à dépasser est la transfection des deux plasmides porteurs de ce système. En effet, les méthodes de transfection habituelles (X-tremeGENE™ de Roche, jetPei™ de Polyplus Transfection) sont très peu efficaces avec les cardiomyocytes, qui seraient beaucoup plus réceptifs aux adénovirus (Maass and Buvoli, 2007). Il s'agira ensuite de déterminer si le système est assez sensible pour permettre la détection de la supposée différence de contenu en centres [2Fe-2S] entre les cardiomyocytes contrôles et patients, sachant qu'il faudra aussi certainement tester plusieurs âges. Une limite non négligeable de cet outil est qu'il omet les centres [4Fe-4S], cofacteurs de nombreuses protéines, telles que l'ACO (1[4Fe-4S]), la GPAT (1[4Fe-4S]) et la SDH (1[2Fe-2S], 1[4Fe-4S] et 1[3Fe-4S]). (3) Enfin, une troisième possibilité serait d'optimiser les mesures des activités enzymatiques des protéines Fe-S sur de petits nombres de cellules.

A/



B/

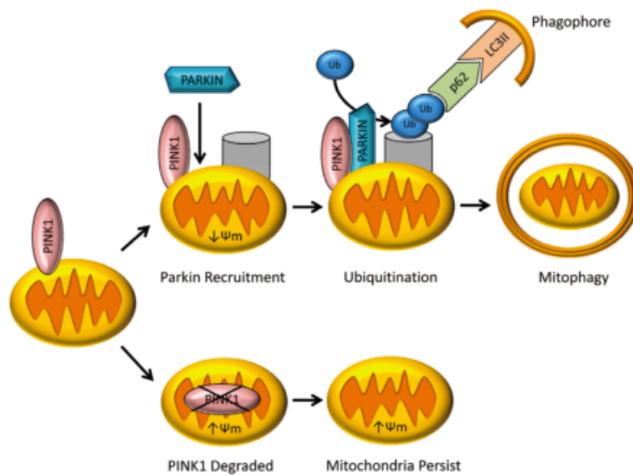


FIGURE 35 : Autophagie et mitophagie

A/ Principe de l'autophagie : l'autophagie non sélective est notamment activée lorsque les cellules sont privées de nutriments. Elle dégrade une grande variété de composés cytosoliques, dont des protéines (malformées, agrégées) et différents types d'organites (mitochondries, réticulum endoplasmique, peroxysomes). Ces éléments cellulaires sont progressivement empaquetés par des membranes isolées, appelées phagophores, pour former des autophagosomes clos. Ces derniers fusionnent ensuite avec les lysosomes, et constituent alors des autolysosomes, permettant la dégradation de leur contenu et leur recyclage.

(issue de http://www.wormbook.org/chapters/www_autophagy/autophagyfig1leg.jpg)

B/ Initiation de la mitophagie : La mitophagie est initiée par une baisse du potentiel de membrane mitochondriale, qui est un signal pour l'accumulation de PINK1 et la translocation de Parkin à la mitochondrie défectueuse. Parkin ubiquitine les protéines à la surface de la mitochondrie, ce qui constitue le signal pour son encapsulation dans un autophagosome et sa dégradation ultérieure.

(issue de (Thomas and Gustafsson, 2013))

b) Atteinte mitochondriale : dégénérescence ou dégradation ?

L'autophagie et la mitophagie sont deux processus indispensables à l'homéostasie des cardiomyocytes et à leur adaptation au stress (voir revue (Thomas and Gustafsson, 2013)). L'autophagie est un mécanisme général de recyclage de composants cellulaires et d'élimination des organites surnuméraires ou défectueux via leur encapsulation au sein d'une vacuole à double membrane, l'autophagosome, et sa fusion avec un lysosome (**figure 35-A**). La mitophagie est, quant à elle, un cas particulier d'autophagie, dédié à la dégradation sélective des mitochondries. Mais pour autant, la dégradation des mitochondries ne se fait pas systématiquement par la mitophagie. L'élimination des mitochondries défectueuses protège contre la mort cellulaire et stimule la production de nouvelles mitochondries fonctionnelles. Il est important d'éliminer les mitochondries endommagées car celles-ci produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et peuvent éventuellement relarguer des facteurs pro-apoptotiques ou encore entraîner la nécrose des cellules via l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP). De façon intéressante, les maladies liées à un dysfonctionnement de l'autophagie sont associées à de sévères cardiomyopathies (voir revue (Thomas and Gustafsson, 2013)).

L'analyse en microscopie électronique de l'ultrasstructure des mitochondries dans les cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients a montré : (1) à l'âge de deux mois, une dégénérescence mitochondriale, caractérisée par une matrice sombre et parfois des crêtes collapsées (Hick et al., 2013) et (2) à l'âge de quatre mois, de grosses vésicules contenant des enroulements membranaires et parfois des dépôts de fer (**figure 28**). Ces « vésicules » pourraient être soit des mitochondries en phase de dégénérescence plus avancée soit des structures de dégradation/recyclage impliquées dans l'autophagie et/ou la mitophagie. Il est cependant peu probable que ces vésicules soient des autophagosomes, car ces structures vésiculaires renferment des organites entiers (non digérés) et donc facilement indentifiables, en particulier lorsqu'il s'agit de mitochondries (**figure 35**) (voir revue (Mizushima et al., 2010)). L'autolysosome est un organel hybride obtenu par fusion d'un autophagosome et d'un lysosome et contient du matériel à différents stades de dégradation (**figure 35**) : étant donné la netteté de certains enroulements membranaires il est difficile de concevoir qu'ils soient en cours de dégradation. Je pencherais donc plutôt pour l'accumulation de mitochondries géantes qui dégènèrent : les enroulements membranaires pourraient correspondre aux crêtes, plus ou moins collapsées. On peut logiquement se demander pourquoi ces mitochondries défectueuses n'ont pas été prises en charge par le système de dégradation de la cellule ? Serait-il défaillant ? Un moyen assez simple de voir si le processus de dégradation, en particulier la mitophagie, a été initié, est d'étudier la localisation des protéines Pink1, Parkin et p62, spécifiquement recrutées à la membrane des mitochondries engagées dans un processus de mitophagie (**figure 35-B**) (voir revue (Thomas and Gustafsson, 2013)).

Ces données, bien que très préliminaires engagent à étudier l'impact potentiel de l'autophagie et/ou de la mitophagie dans la physiopathologie cardiaque de l'ataxie de Friedreich.

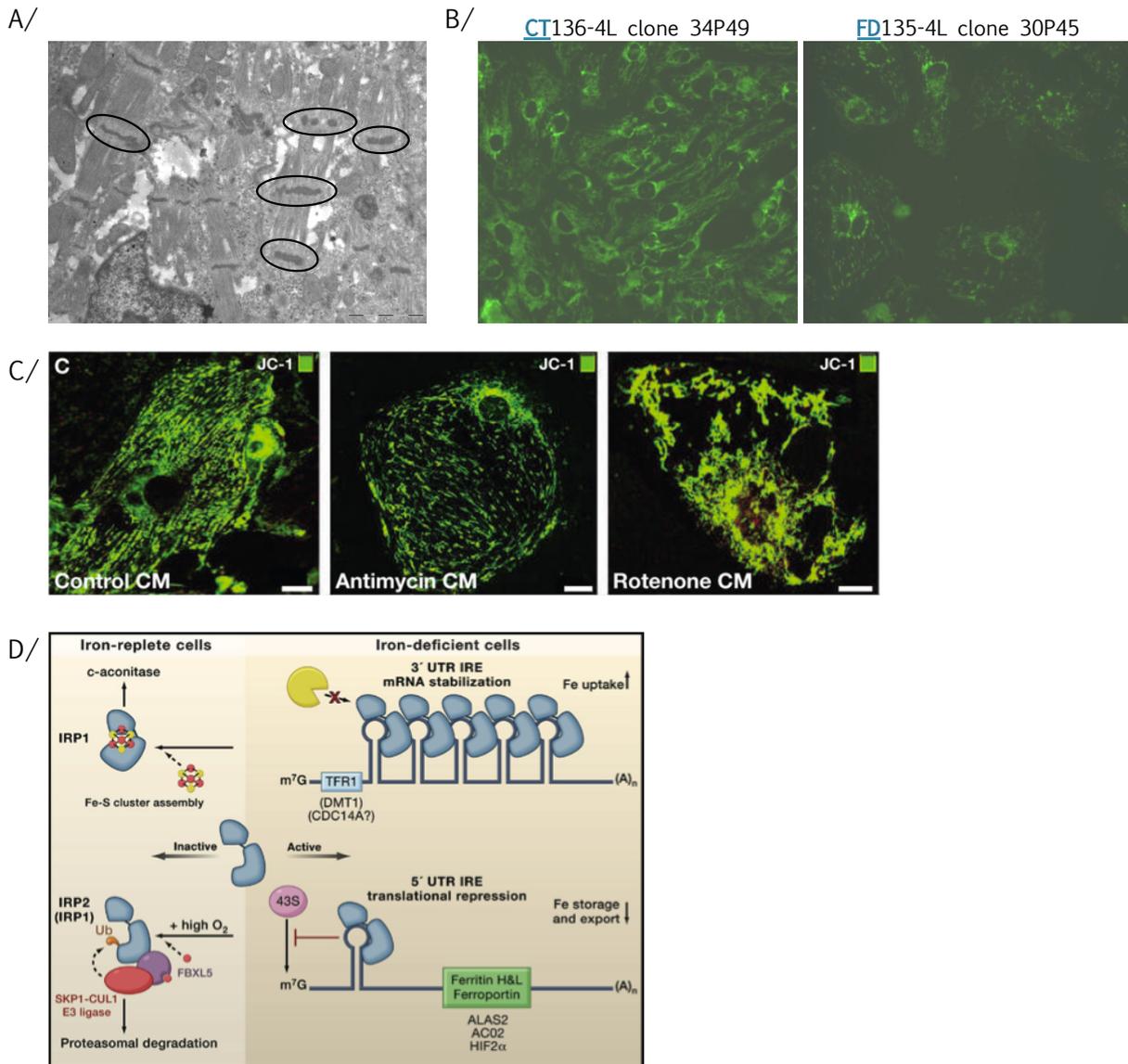


FIGURE 36 : Résultats et informations complémentaires en relation avec les travaux de Lee *et al.*, 2013

A/ Anomalies des stries Z des sarcomères (entourées) - en zig-zag, épaissies ou encore interrompues - qui ont pu être observées par microscopie électronique à la fois dans les cardiomyocytes de contrôles et de patients, suggérant un effet du maintien en culture prolongée.

B/ Marquage des mitochondries des cardiomyocytes d'un contrôle (CT136-4L clone 34) et d'un patient (FD135-4L clone 30) au MitoTracker Green, révélant une modification de l'organisation du réseau mitochondrial dans les cardiomyocytes de patients après avoir été cultivés pendant 1 mois dans du milieu avec galactose.

C/ Marquage des mitochondries de cardiomyocytes isolés à partir d'EB avec la sonde JC-1 montrant un réseau mitochondrial normal (non traités), et des réseaux mitochondriaux à l'architecture anormale obtenus suite au traitement à l'antimycine (inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire) ou à la roténone (inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire)(issues de (Chung *et al.*, 2007)).

D/ Régulation du métabolisme du fer par les IRP (schéma issu de (Hentze *et al.*, 2010))

C. Commentaire des travaux de Lee et al., 2013

C'est avec un grand étonnement que j'ai découvert les travaux sur les cardiomyocytes dérivés d'iPS réalisés par le laboratoire de Chung-Wah Siu (Lee et al., 2013), car l'AF n'existe quasiment pas en Chine (Labuda et al., 2000). Cela explique aussi certainement pourquoi leur papier n'est basé que sur l'étude des iPS d'une patiente AF (et d'un contrôle). De plus, seuls deux clones pour chaque génotype ont été utilisés, ce qui tend à limiter un peu plus la portée de cette étude. La patiente, âgée de 35 ans, présente les atteintes neurologiques classiques de l'AF ainsi que des signes d'insuffisance cardiaque. Seule une taille d'expansion $(GAA)_n$, d'un peu plus de 600 répétitions, a pu être amplifiée dans les fibroblastes de la patiente, mais comme le taux de frataxine résiduel est d'environ 20% (Lee et al., 2013), le diagnostic ne peut être remis en cause. Il est possible qu'elle ait une deuxième expansion, bien plus longue, qui n'a pu être amplifiée par leur PCR. La taille de l'expansion $(GAA)_n$ détectée dans les iPS est un peu plus grande que celle des fibroblastes, suggérant une instabilité, conformément aux données préalablement publiées (Du et al., 2012a; Hick et al., 2013; Ku et al., 2010).

Leurs iPS étaient cultivées sur Matrigel™/mTERS1™, comme les nôtres. Pour les différencier en cardiomyocytes, ils ont utilisé le protocole de Burridge et al., basé sur la formation d'EB calibrés par agrégation forcée et leur culture sous 5% d'oxygène dans un milieu contenant du BMP4, du bFGF, de l'insuline, des lipides et de l'alcool polyvinylique (Burridge et al., 2011). L'efficacité annoncée de ce protocole, aussi sensé être universel, est de près de 95% (Burridge et al., 2011). Il semblerait que la promesse de ce protocole soit tenue, car Lee et al. ont notamment pu répéter 6 fois la quantification des ROS dans les cardiomyocytes, mesure effectuée sur deux millions de cellules par clones à chaque fois. Il n'est cependant pas mentionné à partir de quelle quantité de cellules iPS était lancé le protocole de différenciation. On peut regretter que l'âge des cardiomyocytes utilisés lors des différentes expériences ne soit pas toujours annoncé : il semblerait cependant qu'ils n'avaient jamais plus d'un mois, ce qui est plutôt jeune au regard des données dont nous disposons. La caractérisation physiopathologique des cardiomyocytes de la patiente AF a été faite dans des conditions normales de culture (1) ou en présence de quantités de fer non toxiques (2).

(1) Ils ont ainsi montré que les myofilaments des cardiomyocytes AF étaient désorganisés (Lee et al., 2013) : ils sont moins visibles et présentent des anomalies de stries Z, qui sont non-rectilignes, irrégulières ou encore discontinues. *Nous avons aussi pu observer des irrégularités de stries Z de façon ponctuelle à la fois dans les cardiomyocytes de patients et de contrôles âgés de 4 mois, suggérant qu'elles résulteraient plutôt de la durée passée en culture que de leur génotype (figure 36-A). Par contre l'organisation globale des filaments contractiles était la même chez les contrôles et les patients (figure 31-D).* L'ultrastructure des mitochondries n'a pas été commentée, suggérant qu'elles étaient d'aspect tout à fait normal, conformément à nos données sur les jeunes cardiomyocytes. En revanche, le réseau mitochondrial apparaissait, lui aussi, désorganisé. *J'ai également pu faire cette observation sur des cardiomyocytes de la patiente FD135 (clone 30) âgés de deux mois, dont un fut passé en milieu dépleté en glucose (figure 36-B). L'organisation fragmentée du réseau mitochondrial est semblable à celle obtenue par traitement de cardiomyocytes à*

l'antimycine, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire (figure 36-C) (Chung et al., 2007). Je n'ai malheureusement pas pu confirmer cette observation sur d'autres clones de patients. De façon intéressante, le nombre de copies de l'ADN mitochondrial est réduit de plus de 40% dans les cardiomyocytes AF, ce qui suggère une atteinte de la fonction mitochondriale et est en accord avec les données issues des patients (Bradley et al., 2000). Malgré cela, la production d'ATP ainsi que la quantité de ROS étaient équivalentes entre les cardiomyocytes contrôles et patients (Lee et al., 2013). Ainsi dans les conditions de culture classiques, l'atteinte des cardiomyocytes de patients est plutôt limitée ce qui n'est pas surprenant étant donné leur âge.

(2) Bien que la cardiomyopathie de l'AF ne soit pas due à une augmentation de la charge globale en fer du cœur des patients, puisque seulement 1-10% des cellules présentent des dépôts de fer (Michael et al., 2006; Murphy and Oudit, 2010; Ramirez et al., 2012), il est tout de même intéressant d'étudier l'impact du fer sur les cardiomyocytes. L'ajout de fer (100µM Fe²⁺, 48h) dans le milieu de culture entraîne une surcharge en fer spécifiquement dans les cardiomyocytes AF, avec comme répercussions une hypertrophie des cellules, une diminution de la synthèse d'ATP, une augmentation de la production des ROS et du BNP (marqueur de stress), et une altération des flux calciques spontanés (Lee et al., 2013). En cas d'augmentation du fer dans les cellules, le système de régulation constitué par les IRP permet normalement de diminuer l'expression du récepteur de la transferrine et d'augmenter parallèlement l'expression des ferritines, afin de réduire l'import du fer et d'optimiser son stockage, dans le but de limiter les effets délétères d'un excès de fer (figure 36-D). Or, dans le cas des cardiomyocytes de patients AF, cette régulation semble moins efficace car les variations d'expression du récepteur de la transferrine et de la ferritine H sont moindres par rapport aux contrôles (Lee et al., 2013). Cette observation reflète indirectement le déficit de biosynthèse des centres Fe-S. En effet, dans les cardiomyocytes de patients AF, déficients en frataxine, la production basale des centres Fe-S est théoriquement réduite. Une augmentation de fer intracellulaire aurait donc vite fait de saturer le système, ne permettant probablement qu'une très faible augmentation de la synthèse des centres Fe-S, contrairement aux possibilités d'adaptation plus étendues des contrôles. Ainsi, alors que dans les cardiomyocytes contrôles la majorité des protéines IRP1 possèdent un centre Fe-S, les cardiomyocytes patients auraient davantage d'IRP1 dépourvus de centres Fe-S et donc capables de se fixer aux éléments régulateurs IRE des ARNm, limitant ainsi la dégradation des ARNm du récepteur de la transferrine et augmentant celle des ferritines (figure 36-D). La conséquence directe est la surcharge en fer observée dans les cardiomyocytes de patients.

Ces travaux sont intéressants, mais nécessitent d'être confirmés sur d'autres lignées iPS de patients AF, idéalement par d'autres laboratoires.

III. Cardiomyocytes obtenus par différenciation des iPS, un bon modèle de l'AF ?

Lien avec les patients donneurs

Les données cliniques dont nous disposons sur les deux patientes AF donneuses des fibroblastes de peau à l'origine de nos lignées iPS indiquent que la patiente FD135 est beaucoup plus sévèrement atteinte que la patiente FD141. Cette dernière, âgée de 42 ans au moment du

prélèvement, n'avait d'ailleurs pas développé de cardiomyopathie. La différence de sévérité de ces deux cas est liée à la taille de leur plus petite expansion ($(GAA)_n$) [$(GAA)_1$ (FD135) = 600 répétitions ; $(GAA)_1$ (FD141) = 400 répétitions]. Rappelons que la sévérité et la vitesse de progression de la maladie sont inversement corrélées avec le nombre de répétitions GAA de la plus petite expansion (Dürr et al., 1996). On aurait donc pu s'attendre à ce que le phénotype des cardiomyocytes dérivés des lignées iPS de ces patientes reflète davantage leur propre atteinte : et notamment à ce que les cardiomyocytes de la lignée FD141 ne soient pas particulièrement affectés. Or ce n'était pas le cas, puisqu'il n'y avait pas de différence notable quant à la dégénérescence des mitochondries en microscopie électronique entre les cardiomyocytes générés à partir des patients FD141 et FD135. Si l'on considère la taille des expansions ($(GAA)_n$) amplifiées pour le suivi sur 8 semaines, il apparaît que dans les cardiomyocytes, les plus petites expansions des clones 51 (patiente FD141) et 30 (patiente FD135) sont de taille tout à fait équivalente (500 répétitions) (**figure 27-E**), expliquant logiquement la proximité de leur phénotype. Les plus petites expansions du clone 33 (patiente FD135) étaient quant à elles encore plus petites (230 répétitions seulement), cela pourrait d'ailleurs expliquer pourquoi ce clone en particulier ne semblait pas être affecté par la culture dans le milieu avec galactose (pas de desquamation) (**figure 29-B**). Etant donné qu'il n'y a pas ou peu d'instabilité dans les cardiomyocytes, ces réajustements sont certainement imputables à l'instabilité préalable de l'expansion ($(GAA)_n$) dans les iPS. Ainsi, la correspondance entre le phénotype des cardiomyocytes en culture et les symptômes du patient donneur est peut-être vraie dans le cas de mutations ponctuelles, mais pas dans le cas de mutations dynamiques, comme les expansions de triplets GAA.

Validation du modèle ?

La validation des cardiomyocytes dérivés d'iPS de patients comme modèle de l'AF passe par la démonstration de la conservation des caractéristiques moléculaires, avec le maintien de l'expansion ($(GAA)_n$) et du taux réduit en frataxine, mais aussi et surtout par la reproduction fidèle du phénotype biochimique identifié chez les patients : l'activité réduite des enzymes Fe-S, l'accumulation mitochondriale de fer et les marques de stress oxydant. J'ai été en mesure de montrer que la mutation a été conservée lors de la différenciation cardiaque et qu'elle est bien associée à un déficit en frataxine. J'ai aussi pu mettre en évidence une atteinte mitochondriale des cardiomyocytes de patients AF, caractérisée par une dégénérescence des mitochondries et plus tard des dépôts de fer, suggérant une progression du phénotype. Par contre, je n'ai pas réussi à évaluer l'activité des enzymes Fe-S, élément clé de la physiopathologie de l'AF. En l'état actuel des données que nous avons, le modèle ne peut malheureusement pas être validé.

Apports potentiels de ce modèle une fois validé

Malgré les résultats un peu déroutants de l'analyse par microscopie électronique des cardiomyocytes cultivés en milieu avec galactose, je reste convaincue qu'il serait dans notre intérêt d'accélérer la maturation des cardiomyocytes, de façon à se rapprocher au plus près de cardiomyocytes de type adulte. La caractérisation des cardiomyocytes embryonnaires n'est cependant pas dénuée d'intérêt et doit aussi être poursuivie.

En terme de perspectives, il serait intéressant de réaliser des analyses de protéomique et transcriptomique, à différents stades de la progression de l'atteinte mitochondriale. Cela pourrait permettre d'identifier des voies impliquées dans ce processus et/ou ses répercussions. Ces approches non biaisées pourraient être complétées par l'évaluation du potentiel de membrane mitochondriale et l'étude de l'intégrité de l'ADN mitochondrial, deux paramètres reflétant l'état des mitochondries. Dans la mesure où l'étude électrophysiologique des neurones obtenus par différenciation d'iPS de patients a révélé un retard de développement/maturation (Eigentler et al., 2013; Hick et al., 2013), il serait certainement intéressant d'effectuer de telles analyses sur les cardiomyocytes de façon à déterminer si c'est aussi le cas au niveau cardiaque. Enfin, les résultats intéressants de Lee *et al.* sur la caractérisation des cardiomyocytes de patients AF en présence de fer encouragent à approfondir l'étude du métabolisme du fer dans ces cellules (Lee et al., 2013).

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.
- Abraham, S., Sheridan, S.D., Laurent, L.C., Albert, K., Stubban, C., Ulitsky, I., Miller, B., Loring, J.F., and Rao, R.R. (2010). Propagation of human embryonic and induced pluripotent stem cells in an indirect co-culture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *393*, 211–216.
- Abu-Issa, R., and Kirby, M.L. (2007). Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 45–68.
- Aguer, C., Gambarotta, D., Mailloux, R.J., Moffat, C., Dent, R., McPherson, R., and Harper, M. (2011). Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS One* *6*, e28536.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Ismail, O., Varshney, D., Lymperi, S., Sandi, C., Trabzuni, D., and Pook, M. (2008). The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 735–746.
- Alboliras, E.T., Shub, C., Gomez, M.R., Edwards, W.D., Hagler, D.J., Reeder, G.S., Seward, J.B., and Tajik, A.J. (1986). Spectrum of cardiac involvement in Friedreich's ataxia: clinical, electrocardiographic and echocardiographic observations. *Am. J. Cardiol.* *58*, 518–524.
- Allegrucci, C., and Young, L.E. (2007). Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum. Reprod. Update* *13*, 103–120.
- Anderson, D., Self, T., Mellor, I.R., Goh, G., Hill, S.J., and Denning, C. (2007). Transgenic enrichment of cardiomyocytes from human embryonic stem cells. *Mol. Ther.* *15*, 2027–2036.
- Anderson, P.R., Kirby, K., Hilliker, A.J., and Phillips, J.P. (2005). RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3397–3405.
- Anheim, M., Fleury, M., Monga, B., Laugel, V., Chaigne, D., Rodier, G., Ginglinger, E., Boulay, C., Courtois, S., Drouot, N., et al. (2010). Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics* *11*, 1–12.
- Anheim, M., Tranchant, C., and Koenig, M. (2012). The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N. Engl. J. Med.* *366*, 636–646.
- Araki, R., Hoki, Y., Uda, M., Nakamura, M., Jincho, Y., Tamura, C., Sunayama, M., Ando, S., Sugiura, M., Yoshida, M.A., et al. (2011). Crucial role of c-Myc in the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* *29*, 1362–1370.
- Arnold, P., Boulat, O., Maire, R., Kuntzer, T., Neurologie, S. De, Clinique, L.D.C., Hospitalier, C., and Vaudois, U. (2006). Expanding view of phenotype and oxidative stress in Friedreich's ataxia patients with and without idebenone. *Schweizer Arch. Für Neurol. Und Psychiatr.* *157*, 169–176.
- Arrigoni, O., and De Tullio, M.C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta* *1569*, 1–9.
- Baharvand, H., Azarnia, M., Parivar, K., and Ashtiani, S.K. (2005). The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *38*, 495–503.
- Bar-Nur, O., Russ, H. a, Efrat, S., and Benvenisty, N. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* *9*, 17–23.
- Barbeau, a, Roy, M., Sadibelouiz, M., and Wilensky, M. a (1984). Recessive ataxia in Acadians and “Cajuns”. *Can. J. Neurol. Sci.* *11*, 526–533.

- Bartolo, C., Mendell, J.R., and Prior, T.W. (1998). Identification of a missense mutation in a Friedreich's ataxia patient: implications for diagnosis and carrier studies. *Am. J. Med. Genet.* 79, 396–399.
- Bartsch, C., Bekhite, M.M., Wolheim, A., Richter, M., Ruhe, C., Wissuwa, B., Marciniak, A., Müller, J., Heller, R., Figulla, H.-R., et al. (2011). NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic acid treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 432–443.
- Bauwens, C.L., Peerani, R., Niebruegge, S., Woodhouse, K. a, Kumacheva, E., Husain, M., and Zandstra, P.W. (2008). Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. *Stem Cells* 26, 2300–2310.
- Ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., and Nusse, R. (2008). Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell* 3, 508–518.
- De Biase, I., Rasmussen, A., Endres, D., Al-Mahdawi, S., Monticelli, A., Coccozza, S., Pook, M., and Bidichandani, S.I. (2007a). Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich's ataxia patients. *Ann. Neurol.* 61, 55–60.
- De Biase, I., Rasmussen, A., Monticelli, A., Al-Mahdawi, S., Pook, M., Coccozza, S., and Bidichandani, S.I. (2007b). Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics* 90, 1–5.
- De Biase, I., Chutake, Y.K., Rindler, P.M., and Bidichandani, S.I. (2009). Epigenetic silencing in Friedreich ataxia is associated with depletion of CTCF (CCCTC-binding factor) and antisense transcription. *PLoS One* 4, e7914.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T., and Patel, P.I. (1997). Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1251–1256.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T., and Patel, P.I. (1998). The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 111–121.
- Bit-Avragim, N., Perrot, A., Schöls, L., Hardt, C., Kreuz, F.R., Zühlke, C., Bubel, S., Laccone, F., Vogel, H.-P., Dietz, R., et al. (2001). The GAA repeat expansion in intron 1 of the frataxin gene is related to the severity of cardiac manifestation in patients with Friedreich's ataxia. *J. Mol. Med.* 78, 626–632.
- Bizy, A., Guerrero-Serna, G., Hu, B., Ponce-Balbuena, D., Willis, B.C., Zarzoso, M., Ramirez, R.J., Sener, M.F., Mundada, L. V, Klos, M., et al. (2013). Myosin light chain 2-based selection of human iPSC-derived early ventricular cardiac myocytes. *Stem Cell Res.* 11, 1335–1347.
- Blin, G., Nury, D., Stefanovic, S., Neri, T., Guillevic, O., Brinon, B., Bellamy, V., Rücker-Martin, C., Barbry, P., Bel, A., et al. (2010). A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 120, 1125–1139.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2007). Clonal analysis of human embryonic stem cell differentiation into teratomas. *Stem Cells* 25, 1924–1930.
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., et al. (2011). Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. *Cell* 144, 439–452.
- Boulting, G.L., Kiskinis, E., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., Wainger, B.J., Williams, D.J., Kahler, D.J., Yamaki, M., Davidow, L., et al. (2011). A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 279–286.
- Brade, T., Pane, L.S., Moretti, A., Chien, K.R., and Laugwitz, K.-L. (2013). Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3.
- Bradley, J.L., Blake, J.C., Chamberlain, S., Thomas, P.K., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. (2000). Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 9, 275–282.

- Bradley, J.L., Homayoun, S., Hart, P.E., Schapira, A.H. V, and Cooper, J.M. (2004). Role of oxidative damage in Friedreich's ataxia. *Neurochem. Res.* 29, 561–567.
- Briggs, J. a, Sun, J., Shepherd, J., Ovchinnikov, D. a, Chung, T.L., Nayler, S.P., Kao, L.P., Morrow, C. a, Thakar, N.Y., Soo, S.Y., et al. (2012). Integration-Free Induced Pluripotent Stem Cells Model Genetic and Neural Developmental Features of Down Syndrome Etiology. *Stem Cells*.
- Buggisch, M., Ateghang, B., Ruhe, C., Strobel, C., Lange, S., Wartenberg, M., and Sauer, H. (2007). Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J. Cell Sci.* 120, 885–894.
- Buikema, J.W., Mady, A.S., Mittal, N. V, Atmanli, A., Caron, L., Doevendans, P. a, Sluijter, J.P.G., and Domian, I.J. (2013). Wnt/ β -catenin signaling directs the regional expansion of first and second heart field-derived ventricular cardiomyocytes. *Development* 140, 4165–4176.
- Bulteau, A.-L., O'Neill, H. a, Kennedy, M.C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., and Szveda, L.I. (2004). Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* 305, 242–245.
- Bunse, M., Bit-Avragim, N., Riefflin, A., Perrot, A., Schmidt, O., Kreuz, F.R., Dietz, R., Jung, W.-I., and Osterziel, K.J. (2003). Cardiac energetics correlates to myocardial hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Ann. Neurol.* 53, 121–123.
- Burridge, P.W., Anderson, D., Priddle, H., Barbadillo Muñoz, M.D., Chamberlain, S., Allegrucci, C., Young, L.E., and Denning, C. (2007). Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability. *Stem Cells* 25, 929–938.
- Burridge, P.W., Thompson, S., Millrod, M. a, Weinberg, S., Yuan, X., Peters, A., Mahairaki, V., Koliatsos, V.E., Tung, L., and Zambidis, E.T. (2011). A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PLoS One* 6, e18293.
- Buta, C., David, R., Dressel, R., Emgård, M., Fuchs, C., Gross, U., Healy, L., Hescheler, J., Kolar, R., Martin, U., et al. (2013). Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res.* 11, 552–562.
- Calmels, N., Schmucker, S., Wattenhofer-Donzé, M., Martelli, A., Vaucamps, N., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Bouton, C., Koenig, M., and Puccio, H. (2009). The first cellular models based on frataxin missense mutations that reproduce spontaneously the defects associated with Friedreich ataxia. *PLoS One* 4, e6379.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423–1427.
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Faucheux, B., Trouillas, P., et al. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1771–1780.
- Cao, N., Liu, Z., Chen, Z., Wang, J., Chen, T., Zhao, X., Ma, Y., Qin, L., Kang, J., Wei, B., et al. (2011). Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res.* 1–18.
- Carpenter, L., Carr, C., Yang, C.-T., Stuckey, D., Clarke, K., and Watt, S.M. (2011). Efficient Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Generates Cardiac Cells Which Provide Protection following Myocardial Infarction in the Rat. *Stem Cells Dev.* 1–30.
- Carvajal-Vergara, X., Sevilla, A., D'Souza, S.L., Ang, Y.-S., Schaniel, C., Lee, D.-F., Yang, L., Kaplan, A.D., Adler, E.D., Rozov, R., et al. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465, 808–812.
- Casazza, F., and Morpurgo, M. (1996). The varying evolution of Friedreich's ataxia cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 77, 895–898.
- De Castro, M., García-Planells, J., Monrós, E., Cañizares, J., Vázquez-Manrique, R., Vilchez, J.J., Urtasun, M., Lucas, M., Navarro, G., Izquierdo, G., et al. (2000). Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum. Genet.* 106, 86–92.

- Chamberlain, S., Shaw, J., Rowland, A., Wallis, J., South, S., Nakamura, Y., von Gabain, A., Farrall, M., and Williamson, R. (1988). Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature* 334, 248–250.
- Chamberlain, S.J., Chen, P., Ng, K.Y., Bourgois-Rocha, F., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E.S., and Lalande, M. (2010). Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17668–17673.
- Chan, E.M., Ratanasirinawoot, S., Park, I.-H., Manos, P.D., Loh, Y.-H., Huo, H., Miller, J.D., Hartung, O., Rho, J., Ince, T. a, et al. (2009). Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat. Biotechnol.* 27, 1033–1037.
- Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.-W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., et al. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* 5, 100–107.
- Chen, J.X., Krane, M., Deutsch, M.-A., Wang, L., Rav-Acha, M., Gregoire, S., Engels, M.C., Rajarajan, K., Karra, R., Abel, E.D., et al. (2012). Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ. Res.* 111, 50–55.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., et al. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111–123.
- Chin, M.H., Pellegrini, M., Plath, K., and Lowry, W.E. (2010). Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 263–269.
- Cho, Y.M., Kwon, S., Pak, Y.K., Seol, H.W., Choi, Y.M., Park, D.J., Park, K.S., and Lee, H.K. (2006). Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1472–1478.
- Christoforou, N., Liau, B., Chakraborty, S., Chellapan, M., Bursac, N., and Leong, K.W. (2013). Induced pluripotent stem cell-derived cardiac progenitors differentiate to cardiomyocytes and form biosynthetic tissues. *PLoS One* 8, e65963.
- Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., and Terzic, A. (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 4 Suppl 1, S60–7.
- Chuva de Sousa Lopes, S.M., Hassink, R.J., Feijen, A., van Rooijen, M. a, Doevendans, P. a, Tertoolen, L., Brutel de la Rivière, A., and Mummery, C.L. (2006). Patterning the heart, a template for human cardiomyocyte development. *Dev. Dyn.* 235, 1994–2002.
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Rai, M., Begu, A., Serroukh, Y., Depondt, C., Musuaya, A.E., Marhfour, I., Ladrière, L., Moles Lopez, X., et al. (2012). Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Ann. Neurol.* 72, 971–982.
- Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.-M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., and Ollagnier de Choudens, S. (2013). Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 733–740.
- Conley, B.J., Trounson, A.O., and Mollard, R. (2004). Human embryonic stem cells form embryoid bodies containing visceral endoderm-like derivatives. *Fetal Diagn. Ther.* 19, 218–223.
- Cooper, T.A., and Ordahl, C.P. (1985). A single cardiac troponin T gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternate splicing. *J. Biol. Chem.* 260, 11140–11148.
- Coppola, G., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Perretti, A., Santoro, L., Vita, G., Toscano, A., Amboni, M., Grimaldi, G., et al. (1999). Why do some Friedreich's ataxia patients retain tendon reflexes? A clinical, neurophysiological and molecular study. *J. Neurol.* 246, 353–357.

- Correia, A.R., Pastore, C., Adinolfi, S., Pastore, A., and Gomes, C.M. (2008). Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *FEBS J.* 275, 3680–3690.
- Cossée, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J.L., and Koenig, M. (1997). Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7452–7457.
- Cossée, M., Dürr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschütter, A., et al. (1999). Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.* 45, 200–206.
- Cossée, M., Puccio, H., Gansmuller, a, Koutnikova, H., Dierich, a, LeMeur, M., Fischbeck, K., Dollé, P., and Koenig, M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1219–1226.
- Crespo, F.L., Sobrado, V.R., Gomez, L., Cervera, A.M., and McCreath, K.J. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species mediate cardiomyocyte formation from embryonic stem cells in high glucose. *Stem Cells* 28, 1132–1142.
- Dedobbeleer, C., Rai, M., Donal, E., Pandolfo, M., and Unger, P. (2012). Normal left ventricular ejection fraction and mass but subclinical myocardial dysfunction in patients with Friedreich's ataxia. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* 13, 346–352.
- Delatycki, M.B., and Corben, L. a (2012). Clinical features of Friedreich ataxia. *J. Child Neurol.* 27, 1133–1137.
- Delatycki, M.B., Paris, D.B., Gardner, R.J., Nicholson, G. a, Nassif, N., Storey, E., MacMillan, J.C., Collins, V., Williamson, R., and Forrest, S.M. (1999a). Clinical and genetic study of Friedreich ataxia in an Australian population. *Am. J. Med. Genet.* 87, 168–174.
- Delatycki, M.B., Knight, M., Koenig, M., Cossée, M., Williamson, R., and Forrest, S.M. (1999b). G130V, a common FRDA point mutation, appears to have arisen from a common founder. *Hum. Genet.* 105, 343–346.
- Deutsch, E.C., Santani, A.B., Perlman, S.L., Farmer, J.M., Stolle, C. a, Marusich, M.F., and Lynch, D.R. (2010). A rapid, noninvasive immunoassay for frataxin: utility in assessment of Friedreich ataxia. *Mol. Genet. Metab.* 101, 238–245.
- Devine, M.J., Ryten, M., Vodicka, P., Thomson, A.J., Burdon, T., Houlden, H., Cavaleri, F., Nagano, M., Drummond, N.J., Taanman, J.-W., et al. (2011). Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus. *Nat. Commun.* 2, 440.
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.I., Ristow, M., and Shoelson, S.E. (2000). Crystal structure of human frataxin. *J. Biol. Chem.* 275, 30753–30756.
- Dolgin, E. (2010). Putting stem cells to the test. *Nat. Med.* 16, 1354–1357.
- Du, J., Campau, E., Soragni, E., Ku, S., Puckett, J.W., Dervan, P.B., and Gottesfeld, J.M. (2012a). Role of mismatch repair enzymes in GAA·TTC triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* 287, 29861–29872.
- Du, J., Cullen, J.J., and Buettner, G.R. (2012b). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 443–457.
- Dubois, N.C., Craft, A.M., Sharma, P., Elliott, D. a, Stanley, E.G., Elefanty, A.G., Gramolini, A., and Keller, G. (2011). SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 1011–1018.
- Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J., and Lutz, T. (2002). A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2635–2643.
- Dürr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J.L., Brice, A., and Koenig, M. (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N. Engl. J. Med.* 335, 1169–1175.
- Dutka, D.P., Donnelly, J.E., Nihoyannopoulos, P., Oakley, C.M., and Nunez, D.J. (1999). Marked variation in the cardiomyopathy associated with Friedreich's ataxia. *Heart* 81, 141–147.

- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J. a, and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277–280.
- Efe, J. a, Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, J., and Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat. Cell Biol.* 13, 215–222.
- Egashira, T., Yuasa, S., Suzuki, T., Aizawa, Y., Yamakawa, H., Matsuhashi, T., Ohno, Y., Tohyama, S., Okata, S., Seki, T., et al. (2012). Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc. Res.* 95, 419–429.
- Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., et al. (2012). Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci. Transl. Med.* 4, 145ra104.
- Eigentler, A., Boesch, S., Schneider, R., Dechant, G., and Nat, R. (2013). Induced Pluripotent Stem Cells from Friedreich Ataxia Patients Fail to Up-regulate Frataxin during in vitro Differentiation to Peripheral Sensory Neurons. *Stem Cells Dev.* 1–50.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., et al. (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568–577.
- Elliott, D. a, Braam, S.R., Koutsis, K., Ng, E.S., Jenny, R., Lagerqvist, E.L., Biben, C., Hatzistavrou, T., Hirst, C.E., Yu, Q.C., et al. (2011). NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. *Nat. Methods* 8, 1–7.
- Emond, M., Lepage, G., Vanasse, M., and Pandolfo, M. (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* 55, 1752–1753.
- Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y., and Keating, M.T. (2005). p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 19, 1175–1187.
- Englard, S., and Seifter, S. (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu. Rev. Nutr.* 6, 365–406.
- Epplen, C., Epplen, J.T., Frank, G., Mitterski, B., Santos, E.J., and Schöls, L. (1997). Differential stability of the (GAA)_n tract in the Friedreich ataxia (STM7) gene. *Hum. Genet.* 99, 834–836.
- Evans-Galea, M. V, Carrodus, N., Rowley, S.M., Corben, L. a, Tai, G., Saffery, R., Galati, J.C., Wong, N.C., Craig, J.M., Lynch, D.R., et al. (2012). FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* 71, 487–497.
- Fantus, I.G., Janjua, N., Senni, H., and Andermann, E. (1991). Glucose intolerance in first-degree relatives of patients with Friedreich's ataxia is associated with insulin resistance: evidence for a closely linked inherited trait. *Metabolism.* 40, 788–793.
- Fantus, I.G., Seni, M.H., and Andermann, E. (1993). Evidence for abnormal regulation of insulin receptors in Friedreich's ataxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 60–63.
- Fatima, A., Xu, G., Shao, K., Papadopoulos, S., Lehmann, M., Arnáiz-Cot, J.J., Rosa, A.O., Nguemo, F., Matzkies, M., Dittmann, S., et al. (2011). In vitro modeling of ryanodine receptor 2 dysfunction using human induced pluripotent stem cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 28, 579–592.
- Feng, Q., Lu, S.-J., Klimanskaya, I., Gomes, I., Kim, D., Chung, Y., Honig, G.R., Kim, K.-S., and Lanza, R. (2010). Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 28, 704–712.
- Festenstein, R. (2006). Breaking the silence in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.* 2, 512–513.
- Filla, a, De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G., and Coccozza, S. (1996). The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 554–560.

- Finocchiaro, G., Baio, G., Micossi, P., Pozza, G., and di Donato, S. (1988). Glucose metabolism alterations in Friedreich's ataxia. *Neurology* 38, 1292–1296.
- Földes, G., Mioulane, M., Wright, J.S., Liu, A.Q., Novak, P., Merkely, B., Gorelik, J., Schneider, M.D., Ali, N.N., and Harding, S.E. (2011). Modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte growth: a testbed for studying human cardiac hypertrophy? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50, 367–376.
- Forrest, S.M., Knight, M., Delatycki, M.B., Paris, D., Williamson, R., King, J., Yeung, L., Nassif, N., and Nicholson, G.A. (1998). The correlation of clinical phenotype in Friedreich ataxia with the site of point mutations in the FRDA gene. *Neurogenetics* 1, 253–257.
- Frazzon, J., and Dean, D.R. (2001). Feedback regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14751–14753.
- Freund, C., Ward-van Oostwaard, D., Monshouwer-Kloots, J., van den Brink, S., van Rooijen, M., Xu, X., Zweigerdt, R., Mummery, C., and Passier, R. (2008). Insulin redirects differentiation from cardiogenic mesoderm and endoderm to neuroectoderm in differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 724–733.
- Fujita, R., Agid, Y., Trouillas, P., Seck, a, Tommasi-Davenas, C., Driesel, a J., Olek, K., Grzeschik, K.H., Nakamura, Y., Mandel, J.L., et al. (1989). Confirmation of linkage of Friedreich ataxia to chromosome 9 and identification of a new closely linked marker. *Genomics* 4, 110–111.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 85, 348–362.
- Gellera, C., Castellotti, B., Mariotti, C., Mineri, R., Seveso, V., Didonato, S., and Taroni, F. (2007). Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics* 8, 289–299.
- Gerber, J., Mühlhoff, U., and Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* 4, 906–911.
- Ghosh, Z., Wilson, K.D., Wu, Y., Hu, S., Quertermous, T., and Wu, J.C. (2010). Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One* 5, e8975.
- Gomes-Pereira, M., Bidichandani, S.I., and Monckton, D.G. (2004). Analysis of unstable triplet repeats using small-pool polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 277, 61–76.
- Gorres, K.L., and Raines, R.T. (2010). Prolyl 4-hydroxylase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45, 106–124.
- Gottesfeld, J.M., Rusche, J.R., and Pandolfo, M. (2013). Increasing frataxin gene expression with histone deacetylase inhibitors as a therapeutic approach for Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* 126, 147–154.
- Grabczyk, E., and Usdin, K. (2000a). The GAA*TTC triplet repeat expanded in Friedreich's ataxia impedes transcription elongation by T7 RNA polymerase in a length and supercoil dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 28, 2815–2822.
- Grabczyk, E., and Usdin, K. (2000b). Alleviating transcript insufficiency caused by Friedreich's ataxia triplet repeats. *Nucleic Acids Res.* 28, 4930–4937.
- Graichen, R., Xu, X., Braam, S.R., Balakrishnan, T., Norfiza, S., Sieh, S., Soo, S.Y., Tham, S.C., Mummery, C., Colman, A., et al. (2008). Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation.* 76, 357–370.
- Greene, E., Entezam, A., Kumari, D., and Usdin, K. (2005). Ancient repeated DNA elements and the regulation of the human frataxin promoter. *Genomics* 85, 221–230.
- Greene, E., Mahishi, L., Entezam, A., Kumari, D., and Usdin, K. (2007). Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res.* 35, 3383–3390.

- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R. a (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 249–257.
- Han, J.W., and Yoon, Y. (2012). Epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 205–223.
- Hanauer, a, Chery, M., Fujita, R., Driesel, a J., Gilgenkrantz, S., and Mandel, J.L. (1990). The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 133–137.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creyghton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., et al. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250–264.
- Harding, A.E. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104, 589–620.
- Harding, A.E., and Hewer, R.L. (1983). The heart disease of Friedreich's ataxia: a clinical and electrocardiographic study of 115 patients, with an analysis of serial electrocardiographic changes in 30 cases. *Q. J. Med.* 52, 489–502.
- Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y., Yuasa, S., Li, W., Yamakawa, H., Tanaka, T., Onitsuka, T., et al. (2010). Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat. Methods* 7, 61–66.
- He, Y., Alam, S.L., Proteasa, S. V, Zhang, Y., Lesuisse, E., Dancis, A., and Stemmler, T.L. (2004). Yeast frataxin solution structure, iron binding, and ferroxidase interaction. *Biochemistry* 43, 16254–16262.
- Hebinck, J., Hardt, C., Schöls, L., Vorgerd, M., Briedigkeit, L., Kahn, C.R., and Ristow, M. (2000). Heterozygous expansion of the GAA tract of the X25/frataxin gene is associated with insulin resistance in humans. *Diabetes* 49, 1604–1607.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142, 24–38.
- Herman, D., Jenssen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S.L., and Gottesfeld, J.M. (2006). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.* 2, 551–558.
- Hewer, R. (1969). The heart in Friedreich's ataxia. *Br. Heart J.* 31, 5–14.
- Hewer, R.L. (1968). Study of fatal cases of Friedreich's ataxia. *Br. Med. J.* 3, 649–652.
- Hick, A., Wattenhofer-Donzé, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J.P., Vaucamps, N., Gall, D., Lambot, L., André, C., Reutenauer, L., et al. (2013). Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* 6, 608–621.
- Hirayama, K., Takayanagi, T., Nakamura, R., Yanagisawa, N., Hattori, T., Kita, K., Yanagimoto, S., Fujita, M., Nagaoka, M., and Satomura, Y. (1994). Spinocerebellar degenerations in Japan: a nationwide epidemiological and clinical study. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 153, 1–22.
- Hoff, K.G., Culler, S.J., Nguyen, P.Q., McGuire, R.M., Silberg, J.J., and Smolke, C.D. (2009). In vivo fluorescent detection of Fe-S clusters coordinated by human GRX2. *Chem. Biol.* 16, 1299–1308.
- Hu, B.-Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J. a, and Zhang, S.-C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4335–4340.
- Huang, H.-P., Chen, P.-H., Hwu, W.-L., Chuang, C.-Y., Chien, Y.-H., Stone, L., Chien, C.-L., Li, L.-T., Chiang, S.-C., Chen, H.-F., et al. (2011). Human Pompe disease-induced pluripotent stem cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4851–4864.

- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D. a (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1269–1275.
- Hudsmith, L.E., and Neubauer, S. (2009). Magnetic resonance spectroscopy in myocardial disease. *JACC. Cardiovasc. Imaging* *2*, 87–96.
- Hussein, S.M.I., Elbaz, J., and Nagy, A. a (2012). Genome damage in induced pluripotent stem cells: Assessing the mechanisms and their consequences. *Bioessays*.
- Ieda, M., Fu, J.-D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B.G., and Srivastava, D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* *142*, 375–386.
- Islas, J.F., Liu, Y., Weng, K., Robertson, M.J., Zhang, S., Prejusa, A., Harger, J., Tikhomirova, D., Chopra, M., Iyer, D., et al. (2012). Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 13016–13021.
- Isnard, R., Kalotka, H., Dürr, A., Cossée, M., Schmitt, M., Pousset, F., Thomas, D., Brice, A., Koenig, M., and Komajda, M. (1997). Correlation between left ventricular hypertrophy and GAA trinucleotide repeat length in Friedreich's ataxia. *Circulation* *95*, 2247–2249.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* *6*, 88–95.
- Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., et al. (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* *471*, 225–229.
- Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Gepstein, A., Arbel, G., Caspi, O., Miller, L., Belhassen, B., Nof, E., Glikson, M., et al. (2012). Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 990–1000.
- Jacot, J.G., Kita-Matsuo, H., Wei, K. a, Chen, H.S.V., Omens, J.H., Mercola, M., and McCulloch, A.D. (2010). Cardiac myocyte force development during differentiation and maturation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1188*, 121–127.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* *132*, 1273–1282.
- Jayawardena, T.M., Egemnazarov, B., Finch, E. a, Zhang, L., Payne, J.A., Pandya, K., Zhang, Z., Rosenberg, P., Mirotsov, M., and Dzau, V.J. (2012). MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ. Res.* *110*, 1465–1473.
- Jitpimolmard, S., Small, J., King, R.H., Geddes, J., Misra, P., McLaughlin, J., Muddle, J.R., Cole, M., Harding, A.E., and Thomas, P.K. (1993). The sensory neuropathy of Friedreich's ataxia: an autopsy study of a case with prolonged survival. *Acta Neuropathol.* *86*, 29–35.
- Jung, C.B., Moretti, A., Mederos y Schnitzler, M., Iop, L., Storch, U., Bellin, M., Dorn, T., Ruppenthal, S., Pfeiffer, S., Goedel, A., et al. (2012). Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Mol. Med.* *4*, 180–191.
- Juopperi, T. a, Kim, W.R., Chiang, C.-H., Yu, H., Margolis, R.L., Ross, C. a, Ming, G., and Song, H. (2012). Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Mol. Brain* *5*, 17.
- Justice, C.M., Den, Z., Nguyen, S. V, Stoneking, M., Deininger, P.L., Batzer, M.A., and Keats, B.J. (2001). Phylogenetic analysis of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *J. Mol. Evol.* *52*, 232–238.
- Kamakura, T., Makiyama, T., Sasaki, K., Yoshida, Y., Wuriyanghai, Y., Chen, J., Hattori, T., Ohno, S., Kita, T., Horie, M., et al. (2013). Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture. *Circ. J.* *77*.

- Karlberg, T., Schagerlöf, U., Gakh, O., Park, S., Ryde, U., Lindahl, M., Leath, K., Garman, E., Isaya, G., and Al-Karadaghi, S. (2006). The structures of frataxin oligomers reveal the mechanism for the delivery and detoxification of iron. *Structure* 14, 1535–1546.
- Kase, E.T., Nikolić, N., Bakke, S.S., Bogen, K.K., Aas, V., Thoresen, G.H., and Rustan, A.C. (2013). Remodeling of oxidative energy metabolism by galactose improves glucose handling and metabolic switching in human skeletal muscle cells. *PLoS One* 8, e59972.
- Kattman, S.J., Witty, A.D., Gagliardi, M., Dubois, N.C., Niapour, M., Hotta, A., Ellis, J., and Keller, G. (2011). Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* 8, 228–240.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 108, 407–414.
- Kelly, R.G. (2012). The second heart field.
- Khan, R.J., Andermann, E., and Fantus, I.G. (1986). Glucose intolerance in Friedreich's ataxia: association with insulin resistance and decreased insulin binding. *Metabolism*. 35, 1017–1023.
- Kibbey, M.C. (1994). Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *J. Tissue Cult. Methods* 16, 227–230.
- Kim, C., Majdi, M., Xia, P., Wei, K. a, Talantova, M., Spiering, S., Nelson, B., Mercola, M., and Chen, H.-S.V. (2010). Non-cardiomyocytes influence the electrophysiological maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes during differentiation. *Stem Cells Dev.* 19, 783–795.
- Kim, C., Wong, J., Wen, J., Wang, S., Wang, C., Spiering, S., Kan, N.G., Forcales, S., Puri, P.L., Leone, T.C., et al. (2013). Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* 494, 105–110.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.
- Kim, E., Napierala, M., and Dent, S.Y.R. (2011a). Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Res.* 39, 8366–8377.
- Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.-H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., et al. (2011b). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 1117–1119.
- Kipps, A., Alexander, M., Colan, S.D., Gauvreau, K., Smoot, L., Crawford, L., Darras, B.T., and Blume, E.D. (2009). The longitudinal course of cardiomyopathy in Friedreich's ataxia during childhood. *Pediatr. Cardiol.* 30, 306–310.
- Kishimoto, Y., Saito, N., Kurita, K., Shimokado, K., Maruyama, N., and Ishigami, A. (2013). Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 579–584.
- Klopper, F., Delatycki, M.B., Corben, L.A., Bradshaw, J.L., Rance, G., and Georgiou-Karistianis, N. (2011). The test of everyday attention reveals significant sustained volitional attention and working memory deficits in friedreich ataxia. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 17, 196–200.
- Koeppen, A.H. (2011). Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* 303, 1–12.
- Koeppen, A.H., and Mazurkiewicz, J.E. (2013). Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 78–90.
- Koeppen, A.H., Michael, S.C., Knutson, M.D., Haile, D.J., Qian, J., Levi, S., Santambrogio, P., Garrick, M.D., and Lamarque, J.B. (2007). The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: the role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol.* 114, 163–173.

- Koeppen, A.H., Morral, J. a, Davis, A.N., Qian, J., Petrocine, S. V, Knutson, M.D., Gibson, W.M., Cusack, M.J., and Li, D. (2009). The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol.* 118, 763–776.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O., and Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* 16, 345–351.
- Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E. a, Altun, G., Laurent, L.C., Loring, J.F., Napierala, M., and Gottesfeld, J.M. (2010). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA·TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell* 7, 631–637.
- Kubalak, S.W., Miller-Hance, W.C., O'Brien, T.X., Dyson, E., and Chien, K.R. (1994). Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis. *J. Biol. Chem.* 269, 16961–16970.
- Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J.M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., Fehling, H.J., and Keller, G. (2004). Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 131, 1651–1662.
- Kujala, K., Paavola, J., Lahti, A., Larsson, K., Pekkanen-Mattila, M., Viitasalo, M., Lahtinen, A.M., Toivonen, L., Kontula, K., Swan, H., et al. (2012). Cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia reveals early and delayed afterdepolarizations. *PLoS One* 7, e44660.
- Kumari, D., and Usdin, K. (2012). Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clin. Epigenetics* 4, 2.
- Kumari, D., Biacsi, R.E., and Usdin, K. (2011). Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in friedreich ataxia cells. *J. Biol. Chem.* 286, 4209–4215.
- Labuda, M., Labuda, D., Miranda, C., Poirier, J., Soong, B.W., Barucha, N.E., and Pandolfo, M. (2000). Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion. *Neurology* 54, 2322–2324.
- Laflamme, M. a, Chen, K.Y., Naumova, A. V, Muskheli, V., Fugate, J. a, Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., et al. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* 25, 1015–1024.
- Lahti, A.L., Kujala, V.J., Chapman, H., Koivisto, A.-P., Pekkanen-Mattila, M., Kerkelä, E., Hyttinen, J., Kontula, K., Swan, H., Conklin, B.R., et al. (2012a). Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis. Model. Mech.* 5, 220–230.
- Lahti, A.L., Kujala, V.J., Chapman, H., Koivisto, A.-P., Pekkanen-Mattila, M., Kerkelä, E., Hyttinen, J., Kontula, K., Swan, H., Conklin, B.R., et al. (2012b). Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis. Model. Mech.* 5, 220–230.
- Lai, M.I., Wendy-Yeo, W.Y., Ramasamy, R., Nordin, N., Rosli, R., Veerakumarasivam, A., and Abdullah, S. (2011). Advancements in reprogramming strategies for the generation of induced pluripotent stem cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 291–301.
- Lamarche, J.B., Côté, M., and Lemieux, B. (1980). The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can. J. Neurol. Sci.* 7, 389–396.
- Lan, F., Lee, A.S., Liang, P., Sanchez-Freire, V., Nguyen, P.K., Wang, L., Han, L., Yen, M., Wang, Y., Sun, N., et al. (2013). Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 101–113.
- Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., and Fontecave, M. (2006). Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J. Biol. Chem.* 281, 16256–16263.
- Lee, Y.-K., Ng, K.-M., Chan, Y.-C., Lai, W.-H., Au, K.-W., Ho, C.-Y.J., Wong, L.-Y., Lau, C.-P., Tse, H.-F., and Siu, C.-W. (2010). Triiodothyronine promotes cardiac differentiation and maturation of embryonic stem cells via the classical genomic pathway. *Mol. Endocrinol.* 24, 1728–1736.

- Lee, Y.-K., Ho, P.W.-L., Schick, R., Lau, Y.-M., Lai, W.-H., Zhou, T., Li, Y., Ng, K.-M., Ho, S.-L., Esteban, M.A., et al. (2013). Modeling of Friedreich ataxia-related iron overloading cardiomyopathy using patient-specific-induced pluripotent stem cells. *Pflugers Arch.*
- Lefort, N., Perrier, A.L., Laâbi, Y., Varela, C., and Peschanski, M. (2009). Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regen. Med.* 4, 899–909.
- Leschik, J., Stefanovic, S., Brinon, B., and Pucéat, M. (2008). Cardiac commitment of primate embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* 3, 1381–1387.
- Levenstein, M.E., Ludwig, T.E., Xu, R.-H., Llanas, R. a, VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., and Thomson, J. a (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24, 568–574.
- Li, J., Stouffs, M., Serrander, L., Banfi, B., Bettioli, E., Charnay, Y., Steger, K., Krause, K., and Jaconi, M.E. (2006). The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol. Biol. Cell* 17, 3978–3988.
- Li, K., Besse, E.K., Ha, D., Kovtunovych, G., and Rouault, T. a (2008). Iron-dependent regulation of frataxin expression: implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2265–2273.
- Li, M., Liu, G.-H., and Izpisua Belmonte, J.C. (2012). Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 524–535.
- Lian, X., Hsiao, C., Wilson, G., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Azarin, S.M., Raval, K.K., Zhang, J., Kamp, T.J., and Palecek, S.P. (2012). Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E1848–57.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831–838.
- Lill, R., and Mühlhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 669–700.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68–73.
- Liu, J., Verma, P.J., Evans-Galea, M. V, Delatycki, M.B., Michalska, A., Leung, J., Crombie, D., Sarsero, J.P., Williamson, R., Dottori, M., et al. (2011). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev.* 7, 703–713.
- Lodi, R., Cooper, J.M., Bradley, J.L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D.J., and Schapira, a H. (1999). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11492–11495.
- Lodi, R., Rajagopalan, B., Blamire, a M., Cooper, J.M., Davies, C.H., Bradley, J.L., Styles, P., and Schapira, a H. (2001). Cardiac energetics are abnormal in Friedreich ataxia patients in the absence of cardiac dysfunction and hypertrophy: an in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *Cardiovasc. Res.* 52, 111–119.
- Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476–5479.
- Long, L.H., and Halliwell, B. (2009). Artefacts in cell culture: pyruvate as a scavenger of hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 700–704.
- Ludwig, T.E., Bergendahl, V., Levenstein, M.E., Yu, J., Probasco, M.D., and Thomson, J. a (2006). Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat. Methods* 3, 637–646.
- Lynch, D.R., Deutsch, E.C., Wilson, R.B., and Tennekoon, G. (2012). Unanswered Questions in Friedreich Ataxia. *J. Child Neurol.*

- Ma, D., Wei, H., Lu, J., Ho, S., Zhang, G., Sun, X., Oh, Y., Tan, S.H., Ng, M.L., Shim, W., et al. (2013). Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 34, 1122–1133.
- Maass, A.H., and Buoli, M. (2007). Cardiomyocyte preparation, culture, and gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 366, 321–330.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 595–605.
- Mantovan, M.C., Martinuzzi, a, Squarzanti, F., Bolla, a, Silvestri, I., Liessi, G., Macchi, C., Ruzza, G., Trevisan, C.P., and Angelini, C. (2006). Exploring mental status in Friedreich's ataxia: a combined neuropsychological, behavioral and neuroimaging study. *Eur. J. Neurol.* 13, 827–835.
- Marchetto, M.C.N., Yeo, G.W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2009). Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 4, e7076.
- Marchetto, M.C.N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143, 527–539.
- Marroquin, L.D., Hynes, J., Dykens, J. a, Jamieson, J.D., and Will, Y. (2007). Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants. *Toxicol. Sci.* 97, 539–547.
- Martinez-Fernandez, A., Nelson, T.J., Ikeda, Y., and Terzic, A. (2010). c-MYC independent nuclear reprogramming favors cardiogenic potential of induced pluripotent stem cells. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 3, 13–23.
- Mascalchi, M., Salvi, F., Piacentini, S., and Bartolozzi, C. (1994). Friedreich's ataxia: MR findings involving the cervical portion of the spinal cord. *AJR. Am. J. Roentgenol.* 163, 187–191.
- Mateo, I., Llorca, J., Volpini, V., Corral, J., Berciano, J., and Combarros, O. (2004). Expanded GAA repeats and clinical variation in Friedreich's ataxia. *Acta Neurol. Scand.* 109, 75–78.
- Matsa, E., Rajamohan, D., Dick, E., Young, L., Mellor, I., Staniforth, A., and Denning, C. (2011). Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur. Heart J.* 32, 952–962.
- McCabe, D.J.H., Ryan, F., Moore, D.P., McQuaid, S., King, M.D., Kelly, a., Daly, K., Barton, D.E., and Murphy, R.P. (2000). Typical Friedreich's ataxia without GAA expansions and GAA expansions without typical Friedreich's ataxia. *J. Neurol.* 247, 346–355.
- McCormack, M.L., Guttman, R.P., Schumann, M., Farmer, J.M., Stolle, C.A., Campuzano, V., Koenig, M., and Lynch, D.R. (2000). Frataxin point mutations in two patients with Friedreich's ataxia and unusual clinical features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 68, 661–664.
- McDevitt, T.C., Angello, J.C., Whitney, M.L., Reinecke, H., Hauschka, S.D., Murry, C.E., and Stayton, P.S. (2002). In vitro generation of differentiated cardiac myofibers on micropatterned laminin surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 472–479.
- McLeod, J.G. (1971). An electrophysiological and pathological study of peripheral nerves in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Sci.* 12, 333–349.
- Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M.V.G., Coletta, M., et al. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 95, 911–921.
- Meyer, C., Schmid, G., Görlitz, S., Ernst, M., Wilkens, C., Wilhelms, I., Kraus, P.H., Bauer, P., Tomiuk, J., Przuntek, H., et al. (2007). Cardiomyopathy in Friedreich's ataxia-assessment by cardiac MRI. *Mov. Disord.* 22, 1615–1622.
- Michael, S., Petrocine, S. V, Qian, J., Lamarche, J.B., Knutson, M.D., Garrick, M.D., and Koeppen, A.H. (2006). Iron and iron-responsive proteins in the cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Cerebellum* 5, 257–267.

- De Michele, G., Filla, A., Cavalcanti, F., Di Maio, L., Pianese, L., Castaldo, I., Calabrese, O., Monticelli, A., Varrone, S., and Campanella, G. (1994). Late onset Friedreich's disease: clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *57*, 977-979.
- De Michele, G., Perrone, F., Filla, a., Mirante, E., Giordano, M., De Placido, S., and Campanella, G. (1996). Age of onset, sex, and cardiomyopathy as predictors of disability and survival in Friedreich's disease: A retrospective study on 119 patients. *Neurology* *47*, 1260-1264.
- Mirkin, S.M. (2007). Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* *447*, 932-940.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D.L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., et al. (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* *8*, 633-638.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* *140*, 313-326.
- Mohr, J.C., de Pablo, J.J., and Palecek, S.P. (2006). 3-D microwell culture of human embryonic stem cells. *Biomaterials* *27*, 6032-6042.
- Monrós, E., Moltó, M.D., Martínez, F., Cañizares, J., Blanca, J., Vilchez, J.J., Prieto, F., de Frutos, R., and Palau, F. (1997). Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am. J. Hum. Genet.* *61*, 101-110.
- Montermini, L., Richter, a, Morgan, K., Justice, C.M., Julien, D., Castellotti, B., Mercier, J., Poirier, J., Capozzoli, F., Bouchard, J.P., et al. (1997a). Phenotypic variability in Friedreich ataxia: role of the associated GAA triplet repeat expansion. *Ann. Neurol.* *41*, 675-682.
- Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., Cavalcanti, F., Pianese, L., Iodice, L., Farina, G., Monticelli, A., et al. (1997b). The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1261-1266.
- Montessuit, C., Palma, T., Viglino, C., Pellieux, C., and Lerch, R. (2006). Effects of insulin-like growth factor-I on the maturation of metabolism in neonatal rat cardiomyocytes. *Pflugers Arch.* *452*, 380-386.
- Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flügel, L., Dorn, T., Goedel, A., Höhnke, C., Hofmann, F., et al. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1397-1409.
- Moretti, A., Laugwitz, K.-L., Dorn, T., Sinnecker, D., and Mummery, C. (2013). Pluripotent stem cell models of human heart disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *3*.
- Morral, J. a, Davis, A.N., Qian, J., Gelman, B.B., and Koeppen, A.H. (2010). Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol.* *120*, 97-108.
- Mottram, P.M., Delatycki, M.B., Donelan, L., Gelman, J.S., Corben, L., and Peverill, R.E. (2011). Early changes in left ventricular long-axis function in Friedreich ataxia: relation with the FXN gene mutation and cardiac structural change. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* *24*, 782-789.
- Mou, X., Wu, Y., Cao, H., Meng, Q., Wang, Q., Sun, C., Hu, S., Ma, Y., and Zhang, H. (2012). Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with different karyotypes of Down syndrome. *Stem Cell Res. Ther.* *3*, 14.
- Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Brink, S., Hassink, R., van der Heyden, M., Opthof, T., Pera, M., de la Riviere, A.B., et al. (2003). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* *107*, 2733-2740.
- Mummery, C.L., Zhang, J., Ng, E.S., Elliott, D. a, Elefanty, A.G., and Kamp, T.J. (2012). Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ. Res.* *111*, 344-358.

- Murad, S., Grove, D., Lindberg, K.A., Reynolds, G., Sivarajah, A., and Pinnell, S.R. (1981). Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 2879–2882.
- Murphy, C.J., and Oudit, G.Y. (2010). Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *J. Card. Fail.* 16, 888–900.
- Murry, C.E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132, 661–680.
- Nair, M., Adinolfi, S., Pastore, C., Kelly, G., Temussi, P., and Pastore, A. (2004). Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, CyaY: mapping the iron binding sites. *Structure* 12, 2037–2048.
- Naito, A.T., Shiojima, I., Akazawa, H., Hidaka, K., Morisaki, T., Kikuchi, A., and Komuro, I. (2006). Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19812–19817.
- Nakajima, Y., Sakabe, M., Matsui, H., Sakata, H., Yanagawa, N., and Yamagishi, T. (2009). Heart development before beating. *Anat. Sci. Int.* 84, 67–76.
- Nayler, S., Gatei, M., Kozlov, S., Gatti, R., Mar, J.C., Wells, C.A., Lavin, M., and Wolvetang, E. (2012). Induced pluripotent stem cells from ataxia-telangiectasia recapitulate the cellular phenotype. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 523–535.
- Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schüle, B., Dolmetsch, R.E., Langston, W., et al. (2011). LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 8, 267–280.
- Nieto, A., Correia, R., de Nóbrega, E., Montón, F., Hess, S., and Barroso, J. (2012). Cognition in Friedreich ataxia. *Cerebellum* 11, 834–844.
- O'Connor, M.D., Kardel, M.D., Iosifina, I., Youssef, D., Lu, M., Li, M.M., Vercauteren, S., Nagy, A., and Eaves, C.J. (2008). Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1109–1116.
- Odorico, J.S., Kaufman, D.S., and Thomson, J. a (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19, 193–204.
- Oh, S.K., Kim, H.S., Ahn, H.J., Seol, H.W., Kim, Y.Y., Park, Y. Bin, Yoon, C.J., Kim, D.-W., Kim, S.H., and Moon, S.Y. (2005). Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUHES1, SNUHES2, and SNUHES3. *Stem Cells* 23, 211–219.
- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J.M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S.L., Manos, P.D., Rossi, D.J., et al. (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPSC cells. *Nat. Cell Biol.* 13, 541–549.
- Ohshima, K., Montermini, L., Wells, R.D., and Pandolfo, M. (1998). Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 14588–14595.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells. *Nat. Methods* 8, 409–412.
- Ommen, S.R. (2011). Hypertrophic cardiomyopathy. *Curr. Probl. Cardiol.* 36, 409–453.
- Onay-Besikci, A. (2006). Regulation of cardiac energy metabolism in newborn. *Mol. Cell. Biochem.* 287, 1–11.
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R.J., Fitz-Gerald, C.S., Sato, Y., Cowan, C. a, Chien, K.R., and Melton, D. a (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* 26, 313–315.

- Paige, S.L., Osugi, T., Afanasiev, O.K., Pabon, L., Reinecke, H., and Murry, C.E. (2010). Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One* 5, e11134.
- Pandolfo, M. (2009). Friedreich ataxia: the clinical picture. *J. Neurol.* 256 *Suppl* , 3–8.
- Panicker, L.M., Miller, D., Park, T.S., Patel, B., Azevedo, J.L., Awad, O., Masood, M.A., Veenstra, T.D., Goldin, E., Stubblefield, B.K., et al. (2012). Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109.
- Park, I-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877–886.
- Passier, R., Oostwaard, D.W., Snapper, J., Kloots, J., Hassink, R.J., Kuijk, E., Roelen, B., de la Riviere, A.B., and Mummery, C. (2005). Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 23, 772–780.
- Payne, R.M., and Wagner, G.R. (2012). Cardiomyopathy in Friedreich ataxia: clinical findings and research. *J. Child Neurol.* 27, 1179–1186.
- Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., and Pook, M. a (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *J. Neurochem.* 126 *Suppl* , 65–79.
- Perdomini, M., Belbellaa, B., Monassier, L., Reutenauer, L., Messaddeq, N. , Nathalie Cartier, Crystal, RG., Aubourg, P., Puccio, H. (2014). Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich ataxia. *Nature Medicine*. IN PRESS.
- Petit, I., Kesner, N.S., Karry, R., Robicsek, O., Aberdam, E., Müller, F.J., Aberdam, D., and Ben-Shachar, D. (2012). Induced pluripotent stem cells from hair follicles as a cellular model for neurodevelopmental disorders. *Stem Cell Res.* 8, 134–140.
- Pianese, L., Cavalcanti, F., De Michele, G., Filla, A., Campanella, G., Calabrese, O., Castaldo, I., Monticelli, A., and Coccozza, S. (1997). The effect of parental gender on the GAA dynamic mutation in the FRDA gene. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 460–463.
- Di Prospero, N. a, Baker, A., Jeffries, N., and Fischbeck, K.H. (2007). Neurological effects of high-dose idebenone in patients with Friedreich’s ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 6, 878–886.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* 27, 181–186.
- Punga, T., and Bühler, M. (2010). Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol. Med.* 2, 120–129.
- Py, B., and Barras, F. (2010). Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 436–446.
- Quattrocchi, M., Thorrez, L., and Sampaolesi, M. (2013). Pluripotent stem cell derivation and differentiation toward cardiac muscle: novel techniques and advances in patent literature. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 7, 18–28.
- Radisic, M., Park, H., Shing, H., Consi, T., Schoen, F.J., Langer, R., Freed, L.E., and Vunjak-Novakovic, G. (2004). Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 18129–18134.
- Rajagopalan, B., Francis, J.M., Cooke, F., Korlipara, L.V.P., Blamire, A.M., Schapira, A.H. V, Madan, J., Neubauer, S., and Cooper, J.M. (2010). Analysis of the factors influencing the cardiac phenotype in Friedreich’s ataxia. *Mov. Disord.* 25, 846–852.
- Raman, S. V, Phatak, K., Hoyle, J.C., Pennell, M.L., McCarthy, B., Tran, T., Prior, T.W., Olesik, J.W., Lutton, A., Rankin, C., et al. (2011). Impaired myocardial perfusion reserve and fibrosis in Friedreich ataxia: a mitochondrial cardiomyopathy with metabolic syndrome. *Eur. Heart J.* 32, 561–567.
- Ramirez, R.L., Qian, J., Santambrogio, P., Levi, S., and Koeppen, A.H. (2012). Relation of cytosolic iron excess to cardiomyopathy of Friedreich’s ataxia. *Am. J. Cardiol.* 110, 1820–1827.

- Ramos-Mejia, V., Muñoz-Lopez, M., Garcia-Perez, J.L., and Menendez, P. (2010). iPSC lines that do not silence the expression of the ectopic reprogramming factors may display enhanced propensity to genomic instability. *Cell Res.* *20*, 1092–1095.
- Rana, P., Anson, B., Engle, S., and Will, Y. (2012). Characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: bioenergetics and utilization in safety screening. *Toxicol. Sci.* *130*, 117–131.
- Raya, A., Rodríguez-Pizà, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J., Consiglio, A., Castellà, M., Río, P., Sleep, E., et al. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* *460*, 53–59.
- Regner, S.R., Lagedrost, S.J., Plappert, T., Paulsen, E.K., Friedman, L.S., Snyder, M.L., Perlman, S.L., Mathews, K.D., Wilmot, G.R., Schadt, K. a, et al. (2012). Analysis of echocardiograms in a large heterogeneous cohort of patients with friedreich ataxia. *Am. J. Cardiol.* *109*, 401–405.
- Ren, Y., Lee, M.Y., Schliffke, S., Paavola, J., Amos, P.J., Ge, X., Ye, M., Zhu, S., Senyei, G., Lum, L., et al. (2011). Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *51*, 280–287.
- Ribaï, P., Pousset, F., Tanguy, M.-L., Rivaud-Pechoux, S., Le Ber, I., Gasparini, F., Charles, P., Béraud, A.-S., Schmitt, M., Koenig, M., et al. (2007a). Neurological, cardiological, and oculomotor progression in 104 patients with Friedreich ataxia during long-term follow-up. *Arch. Neurol.* *64*, 558–564.
- Ribaï, P., Pousset, F., Tanguy, M.-L., Rivaud-Pechoux, S., Le Ber, I., Gasparini, F., Charles, P., Béraud, A.-S., Schmitt, M., Koenig, M., et al. (2007b). Neurological, cardiological, and oculomotor progression in 104 patients with Friedreich ataxia during long-term follow-up. *Arch. Neurol.* *64*, 558–564.
- Rizzi, R., Di Pasquale, E., Portararo, P., Papait, R., Cattaneo, P., Latronico, M.V.G., Altomare, C., Sala, L., Zaza, a, Hirsch, E., et al. (2012). Post-natal cardiomyocytes can generate iPSC cells with an enhanced capacity toward cardiomyogenic re-differentiation. *Cell Death Differ.* *19*, 1162–1174.
- Robertson, C., Tran, D.D., and George, S.C. (2013). Concise Review: Maturation Phases of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells* 829–837.
- Robicsek, O., Karry, R., Petit, I., Salman-Kesner, N., Müller, F.-J., Klein, E., Aberdam, D., and Ben-Shachar, D. (2013). Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. *Mol. Psychiatry* *18*, 1067–1076.
- Robinson, B.H., Petrova-Benedict, R., Buncic, J.R., and Wallace, D.C. (1992). Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem. Med. Metab. Biol.* *48*, 122–126.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., and Capaldi, R.A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* *64*, 985–993.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* *17*, 215–217.
- Saccà, F., Puorro, G., Antenora, A., Marsili, A., Denaro, A., Piro, R., Sorrentino, P., Pane, C., Tessa, A., Brescia Morra, V., et al. (2011). A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS One* *6*, e17627.
- Sachlos, E., and Auguste, D.T. (2008). Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: a strategy for stem cell differentiation. *Biomaterials* *29*, 4471–4480.
- Said, G., Marion, M.H., Selva, J., and Jamet, C. (1986). Hypotrophic and dying-back nerve fibers in Friedreich's ataxia. *Neurology* *36*, 1292–1299.
- Sakamoto, N., Chastain, P.D., Parniewski, P., Ohshima, K., Pandolfo, M., Griffith, J.D., and Wells, R.D. (1999). Sticky DNA: self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia. *Mol. Cell* *3*, 465–475.

- Sánchez-Danés, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jiménez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., Di Guglielmo, C., Ezquerro, M., Patel, B., Giralt, A., et al. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol. Med.* 4, 380–395.
- Santoro, L., De Michele, G., Perretti, a, Crisci, C., Coccozza, S., Cavalcanti, F., Ragno, M., Monticelli, a, Filla, a, and Caruso, G. (1999). Relation between trinucleotide GAA repeat length and sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 93–96.
- Sartiani, L., Bettioli, E., Stillitano, F., Mugelli, A., Cerbai, E., and Jaconi, M.E. (2007). Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells* 25, 1136–1144.
- Sato, H., Takahashi, M., Ise, H., Yamada, A., Hirose, S., Tagawa, Y., Morimoto, H., Izawa, A., and Ikeda, U. (2006). Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 107–112.
- Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z., and Festenstein, R. (2003). DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* 422, 909–913.
- Schadt, K. a, Friedman, L.S., Regner, S.R., Mark, G.E., Lynch, D.R., and Lin, K.Y. (2012). Cross-sectional analysis of electrocardiograms in a large heterogeneous cohort of Friedreich ataxia subjects. *J. Child Neurol.* 27, 1187–1192.
- Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., and Puccio, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3521–3531.
- Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donzé, M., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One* 6, e16199.
- Schoenle, E.J., Boltshauser, E.J., Baekkeskov, S., Landin Olsson, M., Torresani, T., and von Felten, A. (1989). Preclinical and manifest diabetes mellitus in young patients with Friedreich's ataxia: no evidence of immune process behind the islet cell destruction. *Diabetologia* 32, 378–381.
- Schöls, L., Amoiridis, G., Przuntek, H., Frank, G., Epplen, J.T., and Epplen, C. (1997). Friedreich's ataxia. Revision of the phenotype according to molecular genetics. *Brain* 120 (Pt 1), 2131–2140.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. a, and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11307–11312.
- Schulz, J.B., Dehmer, T., Schöls, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., Bürk, K., Matson, W., Dichgans, J., Beal, M.F., et al. (2000). Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* 55, 1719–1721.
- Segev, H., Kenyagin-Karsenti, D., Fishman, B., Gerech-Nir, S., Ziskind, A., Amit, M., Coleman, R., and Itskovitz-Eldor, J. (2005). Molecular analysis of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Dev. Growth Differ.* 47, 295–306.
- Seibler, P., Graziotto, J., Jeong, H., Simunovic, F., Klein, C., and Krainc, D. (2011). Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J. Neurosci.* 31, 5970–5976.
- Semple, R.K., Chatterjee, V.K.K., and O'Rahilly, S. (2006). PPAR gamma and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 116, 581–589.
- Sheridan, S.D., Surampudi, V., and Rao, R.R. (2012). Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells Int.* 2012, 738910.
- Siu, C.-W., Lee, Y.-K., Ho, J.C.-Y., Lai, W.-H., Chan, Y.-C., Ng, K.-M., Wong, L.-Y., Au, K.-W., Lau, Y.-M., Zhang, J., et al. (2012). Modeling of lamin A/C mutation premature cardiac aging using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Aging (Albany, NY)* 4, 803–822.
- Smith, H.E., and Page, E. (1977). Ultrastructural changes in rabbit heart mitochondria during the perinatal period. Neonatal transition to aerobic metabolism. *Dev. Biol.* 57, 109–117.

- Smits, A.M., van Vliet, P., Metz, C.H., Korfage, T., Sluijter, J.P., Doevendans, P. a, and Goumans, M.-J. (2009). Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nat. Protoc.* 4, 232–243.
- Snyder, M., Seyer, L., Lynch, D.R., Resnick, A., and Zesiewicz, T. a (2012). Cardiac dysfunction exacerbated by endocrinopathies in Friedreich ataxia: a case series. *J. Child Neurol.* 27, 1316–1319.
- Stehling, O., and Lill, R. (2013). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a011312.
- Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2007). Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene* 26, 5564–5576.
- Sun, N., Panetta, N.J., Gupta, D.M., Wilson, K.D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A.M., Robbins, R.C., Longaker, M.T., et al. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15720–15725.
- Sun, N., Yazawa, M., Liu, J., Han, L., Sanchez-Freire, V., Abilez, O.J., Navarrete, E.G., Hu, S., Wang, L., Lee, A., et al. (2012). Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci. Transl. Med.* 4, 130ra47.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takahashi, T., Lord, B., Schulze, P.C., Fryer, R.M., Sarang, S.S., Gullans, S.R., and Lee, R.T. (2003). Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 107, 1912–1916.
- Takami, T., and Sakaida, I. (2011). Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 48, 103–106.
- The HD iPSC Consortium (2012). Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington’s disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell Stem Cell* 11, 264–278.
- Thomas, R.L., and Gustafsson, Å.B. (2013). Mitochondrial Autophagy. *Circ. J.* 77, 2449–2454.
- Tompkins, J.D., Hall, C., Chen, V.C. -y., Li, a. X., Wu, X., Hsu, D., Couture, L. a., and Riggs, a. D. (2012). Epigenetic stability, adaptability, and reversibility in human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Tsai, C.-L., and Barondeau, D.P. (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* 49, 9132–9139.
- Tsou, A.Y., Paulsen, E.K., Lagedrost, S.J., Perlman, S.L., Mathews, K.D., Wilmot, G.R., Ravina, B., Koeppen, A.H., and Lynch, D.R. (2011). Mortality in Friedreich ataxia. *J. Neurol. Sci.* 307, 46–49.
- Tzahor, E. (2007). Wnt/beta-catenin signaling and cardiogenesis: timing does matter. *Dev. Cell* 13, 10–13.
- Ungrin, M.D., Joshi, C., Nica, A., Bauwens, C., and Zandstra, P.W. (2008). Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One* 3, e1565.
- Unverferth, D. V, Schmidt, W.R., Baker, P.B., and Wooley, C.F. (1987). Morphologic and functional characteristics of the heart in Friedreich’s ataxia. *Am. J. Med.* 82, 5–10.
- Uosaki, H., Fukushima, H., Takeuchi, A., Matsuoka, S., Nakatsuji, N., Yamanaka, S., and Yamashita, J.K. (2011). Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PLoS One* 6, e23657.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G.Q., and Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 407–411.

- Vankan, P. (2013). Prevalence gradients of Friedreich's Ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *J. Neurochem.* *126 Suppl* , 11–20.
- VanWinkle, W.B., Snuggs, M.B., and Buja, L.M. (1996). Cardiogel: a biosynthetic extracellular matrix for cardiomyocyte culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *32*, 478–485.
- Vázquez-Manrique, R.P., González-Cabo, P., Ros, S., Aziz, H., Baylis, H.A., and Palau, F. (2006). Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *FASEB J.* *20*, 172–174.
- Vidarsson, H., Hyllner, J., and Sartipy, P. (2010). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes for in vitro and in vivo applications. *Stem Cell Rev.* *6*, 108–120.
- Van Vliet, P., Wu, S.M., Zaffran, S., and Pucéat, M. (2012). Early cardiac development: a view from stem cells to embryos. *Cardiovasc. Res.* *96*, 352–362.
- Wang, Y., Chen, G., Song, T., Mao, G., and Bai, H. (2010). Enhancement of cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells. *Sci. China. Life Sci.* *53*, 581–589.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* *7*, 618–630.
- Weidemann, F., Rummey, C., Bijmens, B., Störk, S., Jasaityte, R., Dhooge, J., Baltabaeva, A., Sutherland, G., Schulz, J.B., and Meier, T. (2012). The heart in Friedreich ataxia: definition of cardiomyopathy, disease severity, and correlation with neurological symptoms. *Circulation* *125*, 1626–1634.
- Weidemann, F., Störk, S., Liu, D., Hu, K., Herrmann, S., Ertl, G., and Niemann, M. (2013). Cardiomyopathy of friedreich ataxia. *J. Neurochem.* *126 Suppl* , 88–93.
- Weitzer, G. (2006). Embryonic stem cell-derived embryoid bodies: an in vitro model of eutherian pregastrulation development and early gastrulation. *Handb. Exp. Pharmacol.* 21–51.
- Wells, R.D. (2008). DNA triplexes and Friedreich ataxia. *FASEB J.* *22*, 1625–1634.
- Willis, J.H., Isaya, G., Gakh, O., Capaldi, R. a, and Marusich, M.F. (2008). Lateral-flow immunoassay for the frataxin protein in Friedreich's ataxia patients and carriers. *Mol. Genet. Metab.* *94*, 491–497.
- Wolf, C., Boesch, S., Metzler, B., Weirich-Schwaiger, H., Trieb, T., and Schocke, M.F.H. (2008). Phosphorus-31 two-dimensional chemical shift imaging in the myocardium of patients with late onset of Friedreich ataxia. *Mol. Imaging Biol.* *10*, 24–29.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämmäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* *458*, 766–770.
- Xia, G., Santostefano, K., Hamazaki, T., Liu, J., Subramony, S.H., Terada, N., and Ashizawa, T. (2012). Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells to Model Spinocerebellar Ataxia Type 2 In vitro. *J. Mol. Neurosci.*
- Xu, C., Police, S., Rao, N., and Carpenter, M.K. (2002). Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ. Res.* *91*, 501–508.
- Xu, C., Police, S., Hassanipour, M., and Gold, J.D. (2006). Cardiac bodies: a novel culture method for enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* *15*, 631–639.
- Xu, R., Peck, R.M., Li, D.S., Feng, X., Ludwig, T., and Thomson, J.A. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat. Methods* *2*, 185–190.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* *10*, 678–684.
- Yang, J., Cai, J., Zhang, Y., Wang, X., Li, W., Xu, J., Li, F., Guo, X., Deng, K., Zhong, M., et al. (2010). Induced pluripotent stem cells can be used to model the genomic imprinting disorder Prader-Willi syndrome. *J. Biol. Chem.* *285*, 40303–40311.

- Yang, L., Soonpaa, M.H., Adler, E.D., Roepke, T.K., Kattman, S.J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G.W., Linden, R.M., et al. (2008). Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453, 524–528.
- Yang, X., Pabon, L., and Murry, C.E. (2014). Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ. Res.* 114, 511–523.
- Yazawa, M., Hsueh, B., Jia, X., Pasca, A.M., Bernstein, J. a, Hallmayer, J., and Dolmetsch, R.E. (2011). Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature* 471, 230–234.
- Yoon, T., and Cowan, J. a (2003). Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6078–6084.
- Yoon, T., and Cowan, J. a (2004). Frataxin-mediated iron delivery to ferrocyclase in the final step of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 25943–25946.
- Yu, J., Vodyanik, M. a, Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. a, Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Zhang, J., Wilson, G.F., Soerens, A.G., Koonce, C.H., Yu, J., Palecek, S.P., Thomson, J. a, and Kamp, T.J. (2009). Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.* 104, e30–41.
- Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Zhang, Y., Tse, H-F., et al. (2011a). A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* 8, 31–45.
- Zhang, J., Liu, J., Huang, Y., Chang, J.Y.F., Liu, L., McKeehan, W.L., Martin, J.F., and Wang, F. (2012a). FRS2 α -mediated FGF signals suppress premature differentiation of cardiac stem cells through regulating autophagy activity. *Circ. Res.* 110, e29–39.
- Zhang, J., Klos, M., Wilson, G.F., Herman, A.M., Lian, X., Raval, K.K., Barron, M.R., Hou, L., Soerens, A.G., Yu, J., et al. (2012b). Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ. Res.* 111, 1125–1136.
- Zhang, J., Nuebel, E., Wisidagama, D.R.R., Setoguchi, K., Hong, J.S., Van Horn, C.M., Imam, S.S., Vergnes, L., Malone, C.S., Koehler, C.M., et al. (2012c). Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells. *Nat. Protoc.* 7, 1068–1085.
- Zhang, P., Li, J., Tan, Z., Wang, C., Liu, T., Chen, L., Yong, J., Jiang, W., Sun, X., Du, L., et al. (2008). Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* 111, 1933–1941.
- Zhang, Q., Jiang, J., Han, P., Yuan, Q., Zhang, J., Zhang, X., Xu, Y., Cao, H., Meng, Q., Chen, L., et al. (2011b). Direct differentiation of atrial and ventricular myocytes from human embryonic stem cells by alternating retinoid signals. *Cell Res.* 21, 579–587.
- Zhu, W.-Z., Xie, Y., Moyes, K.W., Gold, J.D., Askari, B., and Laflamme, M. a (2010). Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ. Res.* 107, 776–786.
- Zimmermann, W.-H., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Didié, M., Münzel, F., Heubach, J.F., Kostin, S., Neuhuber, W.L., and Eschenhagen, T. (2002). Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ. Res.* 90, 223–230.
- Zouari, M., Feki, M., Ben Hamida, C., Larnaout, A., Turki, I., Belal, S., Mebazaa, A., Ben Hamida, M., and Hentati, F. (1998). Electrophysiology and nerve biopsy: comparative study in Friedreich's ataxia and Friedreich's ataxia phenotype with vitamin E deficiency. *Neuromuscul. Disord.* 8, 416–425.
- Zühlke, C., Laccone, F., Cossée, M., Kohlschütter, A., Koenig, M., and Schwinger, E. (1998). Mutation of the start codon in the FRDA1 gene: linkage analysis of three pedigrees with the ATG to ATT transversion points to a unique common ancestor. *Hum. Genet.* 103, 102–105.

Zühlke, C.H., Dalski, a, Habeck, M., Straube, K., Hedrich, K., Hoeltzenbein, M., Konstanzer, a, Hellenbroich, Y., and Schwinger, E. (2004). Extension of the mutation spectrum in Friedreich's ataxia: detection of an exon deletion and novel missense mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* *12*, 979-982.

Annexes

ANNEXE 1 : Références bibliographiques du TABLEAU 2

- Al-Mahdawi, S., Pook, M., and Chamberlain, S. (2000). A novel missense mutation (L198R) in the Friedreich's ataxia gene. *Hum. Mutat.* *16*, 95.
- Anheim, M., Mariani, L.-L., Calvas, P., Cheuret, E., Zagnoli, F., Odent, S., Seguela, C., Marelli, C., Fritsch, M., Delaunoy, J.-P., et al. (2012). Exonic deletions of FXN and early-onset Friedreich ataxia. *Arch. Neurol.* *69*, 912-916.
- Bartolo, C., Mendell, J.R., and Prior, T.W. (1998). Identification of a missense mutation in a Friedreich's ataxia patient: implications for diagnosis and carrier studies. *Am. J. Med. Genet.* *79*, 396-399.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T., and Patel, P.I. (1997). Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am. J. Hum. Genet.* *60*, 1251-1256.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* *271*, 1423-1427.
- De Castro, M., García-Planells, J., Monrós, E., Cañizares, J., Vázquez-Manrique, R., Vílchez, J.J., Urtasun, M., Lucas, M., Navarro, G., Izquierdo, G., et al. (2000). Genotype and phenotype analysis of Friedreich's ataxia compound heterozygous patients. *Hum. Genet.* *106*, 86-92.
- Cossée, M., Dürr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschütter, A., et al. (1999). Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.* *45*, 200-206.
- Doudney K, Pook M, Al-Mahdawi S, Carvajal J, Hillerman R, and Chamberlain S. (1997). A novel splice site mutation (384+1G-A) in the Friedreich's ataxia gene. *Jum Mutat* *11* : 415.
- Filla, a, De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G., and Coccozza, S. (1996). The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* *59*, 554-560.
- Forrest, S.M., Knight, M., Delatycki, M.B., Paris, D., Williamson, R., King, J., Yeung, L., Nassif, N., and Nicholson, G.A. (1998). The correlation of clinical phenotype in Friedreich ataxia with the site of point mutations in the FRDA gene. *Neurogenetics* *1*, 253-257.
- Gellera, C., Castellotti, B., Mariotti, C., Mineri, R., Seveso, V., Didonato, S., and Taroni, F. (2007). Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics* *8*, 289-299.
- Labuda, M., Poirier, J., and Pandolfo, M. (1999). A missense mutation (W155R) in an American patient with Friedreich Ataxia. *Hum. Mutat.* *13*, 506-506.
- Lamba, L.D., Ciotti, P., Giribaldi, G., Di Maria, E., Varese, A., Di Stadio, M., Schenone, A., Mandich, P., and Bellone, E. (2009). Friedreich's ataxia: a new mutation in two compound heterozygous siblings with unusual clinical onset. *Eur. Neurol.* *61*, 240-243.
- McDaniel D., Woodley C., Langford L., and Subromany S. (2003). A novel frataxin mutation and unusual heterozygote expansion associated with a very late onset case of FA. *Am J Hum Genet* *73* : 258.
- McCormack, M.L., Guttmann, R.P., Schumann, M., Farmer, J.M., Stolle, C.A., Campuzano, V., Koenig, M., and Lynch, D.R. (2000). Frataxin point mutations in two patients with Friedreich's ataxia and unusual clinical features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *68*, 661-664.
- De Michele, G., Filla, a, Cavalcanti, F., Tammara, a, Monticelli, a, Pianese, L., Di Salle, F., Perreti, a, Santoro, L., Caruso, G., et al. (2000). Atypical Friedreich ataxia phenotype associated with a novel missense mutation in the X25 gene. *Neurology* *54*, 496-499.
- Pook, M.A. (2000). Identification of three novel frameshift mutations in patients with Friedreich's ataxia. *J. Med. Genet.* *37*, 38e-38.

- Potter, N.T., Miller, C. a, and Anderson, I.J. (2000). Mutation detection in an equivocal case of Friedreich's ataxia. *Pediatr. Neurol.* 22, 413–415.
- Spacey, S.D., Szczygielski, B.I., Young, S.P., Hukin, J., Selby, K., and Snutch, T.P. (2004). Malaysian siblings with friedreich ataxia and chorea: a novel deletion in the frataxin gene. *Can. J. Neurol. Sci.* 31, 383–386.
- Zhu, D., Burke, C., Leslie, A., and Nicholson, G. a (2002). Friedreich's ataxia with chorea and myoclonus caused by a compound heterozygosity for a novel deletion and the trinucleotide GAA expansion. *Mov. Disord.* 17, 585–589.
- Zühlke, C., Laccone, F., Cossée, M., Kohlschütter, A., Koenig, M., and Schwinger, E. (1998). Mutation of the start codon in the FRDA1 gene: linkage analysis of three pedigrees with the ATG to ATT transversion points to a unique common ancestor. *Hum. Genet.* 103, 102–105.
- Zühlke, C.H., Dalski, a, Habeck, M., Straube, K., Hedrich, K., Hoeltzenbein, M., Konstanzer, a, Hellenbroich, Y., and Schwinger, E. (2004). Extension of the mutation spectrum in Friedreich's ataxia: detection of an exon deletion and novel missense mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* 12, 979–982.

ANNEXE 2 : Consommables

Catégorie	Consommables (fournisseur, référence catalogue)
Milieux de culture	<ul style="list-style-type: none"> - Knockout™ DMEM (Life Technologies, cat. no. 10829-018) - mTeSR1™ (STEMCELL technologies, cat. no. 05850) - DMEM/Ham F12 with GlutaMAX™ (Life technologies, cat. no 31331-028) - StemPro34 medium (Life technologies, cat. no. 10639-011) - α-MEM (Life technologies, cat. no. 22571-020) - DMEM no glucose (Life technologies, cat. no. 11966-025)
Sérum ou équivalents	<ul style="list-style-type: none"> - Fetal bovine serum (batch dependant) - Knockout™ Serum Replacement (Life technologies, cat. no. 10828-028)
Culture divers	<ul style="list-style-type: none"> - L-Glutamine 200mM 100x solution (Life technologies, cat. no. 25030-024) - Non essential amino acid (MEM NEAA, Life technologies, cat. no. 11140) - Penicillin/Streptomycin 100x solution (Pen/Strep, Life technologies, cat. no. 15140-122) - 2-mercaptoethanol (Life technologies, cat. no. 31350-010) - Ca²⁺- and Mg²⁺-free Dulbecco PBS (Life technologies, cat. no. 14190-094) - Insulin-Transferrin-Selenium 100x solution (ITS, Life technologies, cat. no. 51500-056) - Bovine serum albumin (BSA, Sigma, cat. no. A2153) - Sodium Pyruvate (Life technologies, cat. No. 11360-088)
Matrices	<ul style="list-style-type: none"> - Matrigel™ hESC-qualified Matrix (BD, cat. no. 354277) - Gélatin (Milipore)
Facteurs de croissance	<ul style="list-style-type: none"> - Recombinant Human/Mouse/Rat Activin A (R&D systems, cat. no. 338-AC-010) - Recombinant Human BMP4 (R&D systems, cat. no. 314-BP-010) - FGF basic Human Recombinant (Peprotech, cat. no. 100-18B-B) - Recombinant Human Noggin Fc Chimera (R&D systems, cat. no. 3344-NG-050)
Composés chimiques	<ul style="list-style-type: none"> - Ascorbic acid (AA, Sigma, cat. no. A5960) - D-(+)-Galactose (Signa, cat. no G5388) - Oleic acid (Sigma, cat. no O1383) - Palmitic acid (Sigma, cat. no P5585) - HEPES (service de culture)
Enzymes	<ul style="list-style-type: none"> - Collagenase type IV (Life technologies, cat. no 17104-019) - Collagenase type II (Life technologies, cat. no. 17101-015) - Dispase (Life technologies, cat. No. 17105-041) - Trypsin-EDTA 0,25% (Life technologies, cat. no. 25200-056)

ANNEXE 3 : COMPOSITION DES MILIEUX UTILISES

Milieu	Composition	Utilisation
Culture des iPS		
Milieu HES	80% KO-DMEM	Culture des iPS sur feeders
	20% KSR	
	2mM Glutamine	
	1% NEAA	
	1% PenStrep	
	0,1mM 2-mercaptoethanol	
mTESR1™	(Ludwig et al., 2006)	Culture des iPS sur Matrigel™
Protocole de différenciation N°1		
Milieu EB	80% DMEM/Ham F12 with GlutaMAX™	Formation et culture des EB en suspension (J0 à J5)
	20% KSR	
	1% NEAA	
	1% PenStrep	
	0,1mM 2-mercaptoethanol	
Milieu CM20	80% DMEM/Ham F12 with GlutaMAX™	Culture des EB sur gélatine (J6 et suivants)
	20% SVF	
	1% NEAA	
	1% PenStrep	
	0,1mM 2-mercaptoethanol	
Protocole de différenciation N°2		
Milieu StemPro	StemPro®34-SFM	Obtention de zones contractiles à partir des iPS sur Matrigel™
	2mM Glutamine	
	1% PenStrep	
	0,1mM 2-mercaptoethanol	
	50 µg/mL acide ascorbique	
Milieu CM5	95% DMEM/Ham F12 with GlutaMAX™	Milieu de culture : - Des zones contractiles - Des cardiac bodies après plating sur gélatine
	5% SVF	
	1% NEAA	
	1% PenStrep	
	0,1mM 2-mercaptoethanol	
Mix de dissociation	Tampon ADS (116mM NaCl, 20mM HEPES, 12,5mM NaH ₂ PO ₄ , 5,6mM glucose, 5,4mM KCl et 0,8mM MgSO ₄ ; pH 7,35)	Milieu de dissociation des zones contractiles
	0,1% de Collagénase de type II	
	0,125% de Trypsine-EDTA	
Milieu CB	90% α-MEM	Former les « cardiac bodies » (CB) en suspension (en semaine 3)
	10% SVF	
	2 mM L-Gln	
	1% ITS	
	0,05% BSA	
	1% PenStrep	
	0,1mM 2-mercaptoethanol	
Divers		
Milieu sans glucose (avec galactose)	95% DMEM w/o glucose	Forcer le métabolisme mitochondrial des cardiomyocytes
	10 mM Galactose	
	5% SVF	
	2 mM L-Gln	
	1% NEAA	
	1% Sodium-Pyruvate	
	5 mM HEPES	
	1% PenStrep	
	0,1mM 2-mercaptoethanol	
	100 µM Oleic acid	
50 µM Palmitic acid		

ANNEXE 4 : Détail du calcul des coûts des protocoles de différenciation N°1 et N°2

Protocole N°1

- Calculs effectués pour 1 B60 (équivalent à 2 B35)

- Support culture des iPS :

Dénomination (unité)	Quantités vendues	Prix (€)	Quantités nécessaires	Coût (€)
Feeders (B60)	6	33,8	1	5,6
Gélatine (mL)	500	30	2	0,1
			TOTAL	5,8

- Milieu de culture HES :

Dénomination (unité)	Quantités vendues	Prix (€)	Quantités nécessaires	Coût (€)
KO-DMEM (mL)	500	17,64	400	14,1
KSR (mL)	500	276	100	55,2
L-Gln (mL)	100	14,28	5	0,7
PenStrep (mL)	100	20,2	5	1,0
β-Me (mL)	20	4,08	1	0,2
			TOTAL pour 500 mL	71,2
			TOTAL pour 31 mL	4,4

- SOUS-TOTAL amplification des iPS : **10,2**

- ULAP :

Dénomination (unité)	Quantités vendues	Prix (€)	Quantités nécessaires (mL/g)	Coût (€)
ULAP (équivalents puits)	144	269	1	1,9

- Milieu de formation des EB :

Dénomination (unité)	Quantités vendues	Prix (€)	Quantités nécessaires (mL/g)	Coût (€)
DMEM/Ham F12 w Glx (mL)	500	23,19	400	18,6
KSR (mL)	500	276	100	55,2
PenStrep (mL)	100	20,2	5	1,0
β-Me (mL)	20	4,08	1	0,2
AA (g)	25	23,1	0,0088	0,0
			TOTAL pour 500 mL	75,0
			TOTAL pour 15 mL	2,2

suite derrière...

- Milieu de culture des CM :

Dénomination (unité)	Quantités vendues	Prix (€)	Quantités nécessaires (mL/g)	Coût (€)
DMEM/Ham F12 w Glx (mL)	500	23,19	400	18,6
SVF (mL)	500	80,3	100	16,1
PenStrep (mL)	100	20,2	5	1,0
β-Me (mL)	20	4,08	1	0,2
AA (g)	25	23,1	0,0088	0,0
TOTAL pour 500 mL				35,8
TOTAL pour 235 mL				16,8

- SOUS-TOTAL différenciation : 20,96

- Coût total : 31,13

Protocole N°2

- Calculs effectués pour 1 B35.

- Amplification des iPS (sur 4 jours) :

Dénomination (unité)	Quantités vendues	Prix (€)	Quantités nécessaires	Coût (€)
mTESR (mL)	500	299	6	3,6
matrigel (B35)	300	275	1	0,9
TOTAL 1 B35				4,5
TOTAL 1 B60				9

- Milieu de différenciation (sans facteurs de croissance) :

Pour 500 mL de milieu :				
Dénomination (unité)	Quantités vendues	Prix (€)	Quantités nécessaires (mL/g)	Coût (€)
StemPro34 (mL)	500	197,76	500	197,8
L-Gln (mL)	100	14,28	5	0,7
Pen/Strep (mL)	100	20,2	5	1,0
β -Me (mL)	20	4,08	1	0,2
AA (g)	25	23,1	0,025	0,0
TOTAL pour 500 mL				199,7
TOTAL pour 16,5 mL				6,6

- Facteurs de croissance :

Dénomination (unité)	Quantités vendues	Prix (€)	Prix du ng (€)	Quantités nécessaires (ng)	Coût (€)
ActA (μ g)	10	235	0,0235	105	2,5
bFGF (μ g)	50	170	0,0034	30	0,1
BMP4 (μ g)	10	390	0,039	60	2,3
Noggin (μ g)	50	315	0,0063	375	2,4
DKK1 (μ g)	10	310	0,031	225	7,0
TOTAL					14,2

- SOUS-TOTAL différenciation 20,8 pour 1 B35 41,7 pour 1 B60

- Coût total : 25,3 pour une B35 50,7 pour une B60

Développement d'un nouveau modèle cellulaire de l'ataxie de Friedreich : différenciation de cellules pluripotentes induites de patients en cardiomyocytes

Résumé

L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie neurodégénérative récessive due à un déficit en frataxine, une protéine mitochondriale très conservée. Elle est souvent associée à une atteinte cardiaque. Le déficit en frataxine est responsable d'une diminution de l'activité des enzymes Fe-S et d'une accumulation mitochondriale de fer.

Les cellules pluripotentes induites (iPS) générées par reprogrammation de cellules somatiques constituent un outil puissant pour le développement de modèles de maladies monogéniques. Les cardiomyocytes obtenus par différenciation des iPS de patients AF développent une atteinte mitochondriale après 1 mois en culture. Celle-ci se complète par l'apparition secondaire de dépôts de fer, visibles après 4 mois en culture, indiquant une progression dans la physiopathologie de la maladie.

Notre étude montre la capacité de ces cardiomyocytes à modéliser le phénotype cardiaque de l'AF, offrant ainsi l'opportunité d'approfondir leur caractérisation physiopathologique.

Mots clés : *ataxie de Friedreich, cardiomyocytes, Cellules Pluripotentes Induites, différenciation, mitochondrie, frataxine.*

Résumé en anglais

Friedreich's ataxia (FA) is a recessive neurodegenerative disorder due to a deficit of frataxin, a highly conserved mitochondrial protein. It is commonly associated with a hypertrophic cardiomyopathy. The main pathophysiological consequences are a decrease of Fe-S enzyme activities and mitochondrial iron accumulation.

The recent technical advances in the generation of induced pluripotent stem cells (iPS) from somatic cells provide a powerful tool to create disease-specific cellular models. Cardiomyocytes derived from FA-iPS present altered mitochondria after 1 month in culture. After 4 months in culture, iron deposits can be found in degenerating mitochondria, indicating a progression in the pathophysiology of the disease.

Our study illustrates the ability of iPS-derived cardiomyocytes to model the cardiac phenotype associated with FA, and offers new opportunities to further investigate pathological mechanisms linked to frataxin deficiency.

Key words : *Friedreich's ataxia, cardiomyocytes, Induced Pluripotent Stem Cells, differentiation, mitochondria, frataxin.*