



HAL
open science

Transfert de gènes dans un modèle murin de la maladie de Sandhoff à l'aide d'un vecteur scAAV9 : intérêt d'une double voie d'administration ?

Laura Rouvière

► To cite this version:

Laura Rouvière. Transfert de gènes dans un modèle murin de la maladie de Sandhoff à l'aide d'un vecteur scAAV9 : intérêt d'une double voie d'administration ?. Génétique. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB052 . tel-02122925

HAL Id: tel-02122925

<https://theses.hal.science/tel-02122925>

Submitted on 7 May 2019

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.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale Bio SPC

Thèse de doctorat

Spécialité : Génétique

**Transfert de gènes dans un modèle murin de la
maladie de Sandhoff à l'aide d'un vecteur scAAV9 :
intérêt d'une double voie d'administration ?**

Présentée et soutenue publiquement par :

Laura Rouvière

Le 27 octobre 2017

Devant un jury composé de :

Pr Thierry LEVADE

Rapporteur

Pr Jérôme AUSSEIL

Rapporteur

Pr Isabelle DESGUERRE

Examinatrice

Dr Caroline SEVIN

Examinatrice

Dr Catherine CAILLAUD

Directrice de thèse

Tout d'abord, je souhaite remercier le Pr Thierry Levade et le Pr Jérôme Ausseil pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon jury de thèse. Merci également au Dr Caroline Sevin et au Pr Isabelle Desguerre qui ont accepté d'être examinatrices.

Je remercie chaleureusement le Dr Catherine Caillaud ma directrice de thèse pour m'avoir donné l'opportunité de travailler avec elle sur ce projet en Master 2, puis en thèse. Ces quatre années ont été très enrichissantes, j'ai appris beaucoup grâce à elle. Je la remercie pour toute la confiance qu'elle m'a accordée, ainsi que pour son écoute et ses encouragements. Je souhaite souligner sa disponibilité, même si nous n'étions pas tout le temps sur le même site, elle a toujours trouvé du temps pour répondre à mes mails, mes appels, ainsi que pour des réunions. Par ailleurs, je la remercie pour l'aide qu'elle m'a apportée lors de la rédaction de ce manuscrit.

Merci au Dr Mario Pende pour son accueil au sein de son laboratoire.

Merci au Dr Ganna Panasyuk pour ses nombreux conseils scientifiques tout au long de cette thèse. Merci pour son enthousiasme et le partage de ses nombreuses connaissances techniques.

Je souhaite remercier l'équipe de Martine Barkats pour son expertise sur l'AAV9, et notamment Aurore Bresse pour son aide lors des injections du vecteur. Je remercie également le Dr Marie Vanier pour sa très grande expertise concernant l'analyse lipidique. Je la remercie pour avoir pris le temps de nous expliquer toute la technique dans les moindres détails. Je remercie le Pr Jonathan Cooper pour avoir accepté d'analyser nos échantillons pour l'étude neuropathologique.

Par ailleurs je remercie l'ensemble du personnel de l'animalerie qui a pris soin de nos animaux. Un remerciement particulier pour Virginie qui s'en est occupé la plupart du temps.

Je remercie vivement Natalia Niemir qui m'a formé pendant mon stage de Master 2.

Merci à Jean-Philippe, Emilie et Sabine du service de Biochimie B de l'Hôpital Necker-Enfants Malades. Merci pour leurs judicieux conseils techniques. Je n'étais pas présente tout le temps, mais j'ai passé de très bons moments en leur compagnie.

Merci à Salimata pour son aide précieuse lors des HPTLC. Nous avons formé un super binôme pour mener à bien ces analyses.

Merci à Paola, stagiaire en Master 2, qui a pris part dans ce projet et qui a contribué à son avancement.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'étage et du Département Croissance et Signalisation de l'INEM. J'ai rencontré énormément de personnes venant d'horizons divers durant cette thèse et qui ont contribué à la bonne ambiance de travail.

Je tiens à remercier vivement Manuela, Martina et Cecilia pour tous les bons moments de sérieux, mais aussi de rire au labo comme à l'extérieur. Talha mon voisin de paillasse qui m'a souvent fait rire. Vonda pour sa bonne humeur et ses discussions toujours aussi passionnantes lors des déjeuners. Nicolas pour ses blagues, ses nombreux conseils scientifiques, ainsi que pour avoir essayé d'améliorer mon accent anglais. Merci à tous les autres : Delphine, Ning, Chantal, Kazuyo, Anton, Tristan et Anne-Sophie. Merci aussi aux anciens passés par là : Caroline, Gregory, Aurélien, Aurore et David ainsi que tous les autres.

Je tiens à remercier mes amis qui m'ont soutenu pendant cette thèse. Mes amis de magistère de Génétique qui pour la plupart étaient en thèse aussi. Merci en particulier à Mégane pour tous nos restos à parler de nos thèses respectives. A mes chers amis rencontrés durant la passerelle, Mathieu, Marion, Roxane, Audrey et Marion. Merci pour tous nos week-ends toujours aussi sympathiques. Merci aussi à mes amies de P1, et à Fiona amie de très longue date.

Bien sûr, merci à ma famille : Mes parents qui me font confiance et ont toujours cru en moi, me fournissant ainsi l'opportunité d'effectuer des études longues. Merci à ma très chère sœur Marion qui s'est toujours intéressée à ce que je faisais. Je tiens aussi à remercier mes grands-parents.

Merci à Antoine qui est là depuis le début de cette thèse. Scientifiquement, merci d'avoir écouté mes répétitions de présentations, merci pour tes nombreux conseils durant l'écriture de cette thèse. Merci infiniment pour ton soutien quotidien qui n'a jamais failli, merci aussi pour ta patience. Nous avons parcouru un beau chemin en parallèle de cette thèse. Contrairement à cette thèse, il ne s'arrête pas là, de nouvelles aventures nous attendent.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	8
Abbréviations	10
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
INTRODUCTION.....	15
I. Du lysosome aux maladies lysosomales	16
A) Le lysosome.....	16
1) Dégradation	17
2) Voies de signalisation liées aux lysosomes	20
3) Exocytose lysosomale	21
B) Maladies lysosomales	23
1) Classification	23
2) Signes cliniques	26
II. Les gangliosidoses à GM2	27
A) Biochimie des gangliosidoses	27
1) Les gangliosides	27
2) Les hexosaminidases	33
B) Génétique des gangliosidoses.....	36
1) Mutations sur le gène <i>HEXA</i>	38
2) Mutations sur le gène <i>HEXB</i>	39
3) Mutations sur le gène <i>GM2AP</i>	39
C) Formes cliniques des gangliosidoses à GM2	40
1) Forme infantile	40
2) Forme juvénile.....	41
3) Forme adulte.....	41
D) Modèles animaux	41
1) Modèles de grande taille.....	41
2) Modèles murins	43
III. Physiopathologie de la maladie de Sandhoff	47
A) La neuroinflammation et ses conséquences	47
1) Activation microgliale	48
2) Suractivation des marqueurs de l'inflammation.....	50

3)	Altération de la sensibilité des neurones	53
B)	Altération du système immunitaire	54
C)	Altération de l'homéostasie du calcium et stress du réticulum endoplasmique	55
D)	Accumulations secondaires et autophagie.....	57
1)	Accumulations secondaires lipidiques	58
2)	Accumulations secondaires similaires à d'autres maladies neurodégénératives ...	59
E)	Altération de la concentration cellulaire en fer	60
IV.	Approches thérapeutiques	61
A)	Thérapies moléculaires	63
1)	Thérapie enzymatique de substitution	63
2)	Utilisation de molécules chaperonnes	65
3)	Inhibiteurs de la biosynthèse des substrats	66
4)	Anti-inflammatoires	68
B)	Thérapie cellulaire	69
C)	Thérapie génique	70
1)	Vecteurs viraux non AAV	71
2)	Vecteurs viraux adéno-associés (AAV)	73
3)	Voies d'administration possibles pour cibler le SNC.....	79
4)	Utilisation de l'AAV9 dans des maladies à atteinte neurologique.....	82
5)	Essais précliniques pour les gangliosidoses à GM2	84
	OBJECTIFS DE LA THESE	91
	RESULTATS.....	95
I.	Article 1	96
A)	Avant-propos	96
B)	Article 1	99
C)	Résultats complémentaires	145
II.	Article 2	148
A)	Avant-propos	148
B)	Article 2	150
III.	Etude de la voie de signalisation MTOR et du processus autophagique dans les gangliosidoses à GM2	193
A)	Introduction	193
1)	Voie mTOR	193
2)	Autophagie	194

3)	Activité de TFEB.....	196
B)	Matériel et méthodes	198
1)	Souris Sandhoff	198
2)	Fibroblastes de patients	198
3)	Génération des MEF (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>).....	199
4)	Immunoblots.....	200
5)	Immunofluorescence	200
6)	Analyse histologique par immunohistochimie	200
C)	Résultats	201
1)	Voie mTOR et dérégulation	201
2)	Dérégulation de l'autophagie	203
3)	Etat de TFEB dans les gangliosidoses à GM2	205
D)	Discussion et perspectives.....	206
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	209
A)	Choix de la méthode d'administration et du promoteur.....	212
1)	Voies d'administration	212
2)	Dose utilisée	214
3)	Choix du promoteur.....	215
B)	Mise au point d'un transfert de gènes chez les souris Sandhoff à l'âge adulte ...	215
C)	Utilisation de traitements complémentaires	218
1)	Thérapies déjà expérimentées dans la maladie de Sandhoff	218
2)	Autres traitements pouvant être envisagés	219
D)	Réponse immunitaire.....	221
1)	Réponses immunitaires vis à vis de l'AAV et impact sur l'efficacité des traitements.....	221
2)	Solutions pour éviter les réponses immunitaires	223
	BIBLIOGRAPHIE	225

Résumé

La maladie de Sandhoff est une maladie génétique rare due à des mutations du gène *HEXB*. Elle se caractérise par un double déficit en hexosaminidase A ($\alpha\beta$) et B ($\beta\beta$), responsable d'une accumulation de ganglioside GM2 essentiellement dans le système nerveux central (SNC). Cliniquement, la maladie débute dès les premiers mois de vie et le décès survient vers l'âge de 3 ans. A ce jour, aucun traitement n'est disponible pour cette maladie. Le modèle murin obtenu par invalidation du gène *Hexb* est un bon outil pour le développement d'approches thérapeutiques, car il présente un phénotype proche de la maladie humaine.

Le but principal de mon projet de thèse était d'explorer une approche de transfert de gène dans le modèle murin de la maladie de Sandhoff en utilisant un vecteur scAAV9. Ce vecteur a la particularité de pouvoir traverser la barrière hématoencéphalique et de transduire le SNC après administration intraveineuse (IV). Un vecteur codant la chaîne β des hexosaminidases, appelé scAAV9-Hexb, a précédemment été administré par voie IV à des souris en période néonatale à une dose de $3,5 \times 10^{13}$ vg/kg. Les souris traitées ont survécu comme les souris normales (>700 jours) sans développer d'atteinte neurologique, ni périphérique alors que les souris Sandhoff non traitées sont décédées vers l'âge de 4 mois. J'ai réalisé toutes les analyses à long terme des souris traitées en utilisant des tests de comportements, ainsi que des analyses tissulaires 24 mois après le traitement. Une analyse lipidique par HPTLC a montré que la surcharge en ganglioside GM2 est totalement absente au niveau du cerveau (4 mois après l'injection), alors que dans le cervelet cette accumulation est non significative, mais pas totalement absente. Aucun symptôme lié à cette surcharge n'a été mis en évidence chez les souris à 24 mois, mais nous nous sommes posés la question d'un possible effet délétère à long terme en cas d'extrapolation à la clinique.

Nous avons donc décidé de tester une double administration IV + ICV (intracérébroventriculaire) en utilisant le même vecteur et la même dose globale de façon à mieux corriger le cervelet. Deux groupes de souris ont été injectés en période néonatale en utilisant des doses différentes dans les deux compartiments. Les analyses ont montré que dans le cerveau, à court terme, la restauration de l'activité enzymatique est partielle, mais significative. Par ailleurs, il existe une absence totale de surcharge en GM2, ainsi qu'une

correction des biomarqueurs associés à la maladie. Dans le cervelet, l'efficacité du traitement a été montrée seulement pour le groupe traité avec la dose la plus importante en ICV, ce qui suggère qu'une dose minimale en ICV est nécessaire pour atteindre de manière globale le SNC. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse à long terme. Concernant le foie, nos résultats ont montré qu'une dose IV minimale est nécessaire pour obtenir une baisse de l'accumulation lipidique. Ce travail a permis de définir les doses minimales nécessaires dans chaque compartiment (IV et ICV) et il montre que la double administration peut être avantageuse pour traiter toutes les régions du SNC et notamment les plus atteintes, comme le cervelet. Il va maintenant nous permettre de traiter de façon optimale les souris adultes.

L'autre but de mon projet était d'explorer les défauts de signalisation et la physiopathologie cellulaire dans la maladie de Sandhoff en utilisant des études *in vivo* et *in vitro*. Les études *in vitro* ont été réalisées sur des fibroblastes de patients et des cellules embryonnaires murines (MEF) obtenues à partir des souris *Hexb*^{-/-} et la surcharge lysosomale a été confirmée dans ces cellules. La voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) a été analysée et nous avons montré qu'elle était dérégulée. L'activité autophagique a aussi été étudiée et nous avons mis en évidence une augmentation du nombre d'autophagosomes chez les souris *Hexb*^{-/-} suggérant un défaut de cette voie. Ces résultats apportent de nouveaux biomarqueurs qui pourront être utilisés pour tester l'efficacité des thérapies dans la maladie de Sandhoff. Ils nous offrent également de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient être testées en combinaison avec le transfert de gène.

Abbréviations

AAV: Vecteur adéno-associé

BHE: Barrière hématoencéphalique

BMT: Transplantation de moelle osseuse

CD-MPR: Récepteur cation-dépendant

CE: Cholestérol esters

CERT: *Ceramide transport protein*

CI-MPR: Récepteur cation-indépendant

DAMP: *Damage-associated molecular pattern*

EBSS: *Earle's balanced salt solution*

ERK: *Extra-cellular signal-regulated kinase*

Gal-Cer: Galactosylcéramide

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*

GlcCer: Glucosylcéramide

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

GSL: Glycosphingolipide

ICM: Intracisternale

ICV: Intracérébroventriculaire

IL1 β : Interleukine 1

ITR: Séquences répétées inversées

IV: Intraveineux

JAK2: Janus kinase 2

LacCer: Lactosylcéramide

LCR: Liquide céphalorachidien

LIMP-2: *Lysosomal integral protein-2*

M6P: Mannose 6 phosphate

M6PR: Récepteur mannose 6 phosphate
MEF: *Mouse embryonic fibroblast*
MIP-1 α : *Macrophage inducer protein-1 α*
MSL: Maladie de surcharge lysosomale
mTORC1: *Mammalian target of rapamycin complex 1*
NB-DGJ: N-butyldeoxygalactonojirimycine
NB-DNJ: N-butyldeoxynojirimycine
NKT: *Natural killer T*
NP1: Pentraxine neuronale
ORF: Phase ouverte de lecture
PMCA: *Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*
RE: Réticulum endoplasmique
ROS: *Reactive oxygen species*
S1P: Sphingosine-1-phosphate
S6K: *Ribosomal protein S6 kinase*
SERCA: *Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*
SNC: Système nerveux central
STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*
TFEB: *Transcription factor EB*
TGF β : *Transforming growth factor*
TNF α : *Tumor necrosis factor*
TSC: *Tuberous sclerosis complex*

Liste des figures

Figure 1 : Observation de lysosomes en microscopie électronique.	16
Figure 2 : Transport des hydrolases acides comportant des résidus M6P vers le lysosome (Coutinho et al., 2012a).	18
Figure 3 : Modèles d'adressage au lysosome du matériel à dégrader (Luzio et al., 2007).	19
Figure 4 : Fonctions du lysosome (Fraldi et al., 2016).	22
Figure 5 : Bases biochimiques et cellulaires des maladies lysosomales (Futerman and van Meer, 2004).	25
Figure 6 : Structure générale des gangliosides (Miljan and Bremer, 2002).	28
Figure 7 : Voie de biosynthèse des glycosphingolipides majeurs (Ichikawa and Hirabayashi, 1998).	31
Figure 8 : Endocytose et digestion des glycosphingolipides par les lysosomes (Kolter and Sandhoff, 2006).	32
Figure 9 : Voie de dégradation des glycosphingolipides (Kolter and Sandhoff, 2006).	33
Figure 10 : Modèle prédictif de l'Hex A et de l'activateur du GM2 (Mark et al., 2003).	34
Figure 11 : Modèle de simulation de l'hydrolyse du GM2 par l'hexosaminidase A grâce au GM2AP (Kolter and Sandhoff, 2006).	35
Figure 12 : Variants des gangliosidoses avec leurs gènes et enzymes correspondant(e)s, et les accumulations spécifiques de glycolipides avec leur lieu d'accumulation.	37
Figure 13 : Relation entre activité résiduelle et sévérité clinique (Conzelmann et al., 1983)..	38
Figure 14 : Tache rouge cerise au fond d'œil chez un patient Tay-Sachs (Bley et al., 2011)..	40
Figure 15 : Voie de dégradation des gangliosides illustrant les différences entre l'homme et la souris (Sango et al., 1995).	45
Figure 16 : Possibles mécanismes impliqués dans la pathogénèse des maladies lysosomales (Futerman and van Meer, 2004).	47
Figure 17 : Cycle potentiel provoquant la mort neuronale dans les MSL (Bosch and Kielian, 2015).	48
Figure 18 : Voies pathologiques induisant une neurodégénérescence dans les maladies lysosomales (Wu and Proia, 2004).	53
Figure 19 : Modèle d'action de la pentraxine neuronale dans la maladie de Sandhoff (Hooper et al., 2016).	54

Figure 20 : Possible lien entre les sphingolipides et l'apoptose dans les gangliosidoses à GM2 et la maladie de Gaucher (Ginzburg et al., 2004).....	57
Figure 21 : Constituants cellulaires de la BHE (Abbott et al., 2006).....	61
Figure 22 : Stratégies thérapeutiques pour les maladies lysosomales. Adapté à partir de (Futerman and van Meer, 2004).	62
Figure 23 : Thérapie génique ex vivo et in vivo (Penati et al., 2017)	71
Figure 24 : Génome général d'un adénovirus (Simonato et al., 2013).	72
Figure 25 : Génome général des rétrovirus (Simonato et al., 2013)	73
Figure 26 : Représentation du génome d'un virus adéno-associé sauvage (<i>wild-type</i> , WT) (Saraiva et al., 2016).	74
Figure 27 : Cycle de vie de l'AAV (Balakrishnan and R. Jayandharan, 2014).	75
Figure 28 : Processus de production d'un rAAV par triple transfection (Saraiva et al., 2016).	76
Figure 29 : Voies possibles pour l'administration d'un vecteur AAV recombinant (Saraiva et al., 2016).....	81
Figure 30 : Présentation du schéma de l'étude avec les différents sous-groupes et les analyses prévues pour chacun d'entre eux.....	96
Figure 31 : Activités des hexosaminidases chez les souris traitées à 24 mois (par comparaison avec les souris de 2 et 4 mois).....	145
Figure 32: Activités enzymatiques de l' α -fucosidase et de la β -glucuronidase dans le cerveau, le tronc cérébral et le foie.....	146
Figure 33 : Niveau de LAMP-1 dans le cerveau	147
Figure 34 : mTORC1 est un régulateur de la croissance cellulaire en reliant l'information aux processus métaboliques (Ben-Sahra and Manning, 2017).	194
Figure 35 : Régulation de l'activité de TFEB (Martini-Stoica et al., 2016)	197
Figure 36: Etude in vitro de l'activation de S6P.	202
Figure 37 : Etude in vivo de la voie mTOR	203
Figure 38: Etude du flux autophagique dans des cellules MEF.....	204
Figure 39 : Etude du flux autophagique chez les souris Sandhoff	205
Figure 40: Localisation cellulaire de TFEB dans les cellules MEF de souris <i>Hexb</i> ^{-/-}	206
Figure 41 : Schéma récapitulatif des résultats des différentes voies d'administration du vecteur scAAV9- <i>Hexb</i> testées chez les souris <i>Hexb</i> ^{-/-} avec les doses et les résultats correspondants.	211

Figure 42: Survie des souris Sandhoff traitées par voie intracrânienne (Cachón-González et al., 2014).....	217
--	-----

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classement des maladies lysosomales en fonction de la nature du composé accumulé. Adapté à partir de (Ballabio and Gieselmann, 2009).....	24
Tableau 2 : Substrats physiologiques et artificiels des hexosaminidases. Adapté de (Kolter and Sandhoff, 2006).....	36
Tableau 3 : Description des mutations présentes dans différents modèles de chats atteints de gangliosidose à GM2 (Lawson and Martin, 2016).....	43
Tableau 4 : Caractéristiques des différents vecteurs AAV. Adapté à partir de (Lisowski et al., 2015; Saraiva et al., 2016).....	78
Tableau 5 : Description des essais précliniques par voie intracérébrale.	87
Tableau 6 : Description des essais précliniques par voie intraveineuse.	88

INTRODUCTION

I. DU LYSOSOME AUX MALADIES LYSOSOMALES

A) LE LYSOSOME

Le lysosome a été décrit pour la première fois il y a plus de soixante ans par le Pr Christian de Duve (Berthet and De Duve, 1951). Des années plus tard, il a été montré grâce à la microscopie électronique que les lysosomes sont des organites subcellulaires de morphologie hétérogène et présents de manière ubiquitaire dans les cellules eucaryotes (figure 1). Ils représentent 5 % du volume intracellulaire. Les lysosomes ont un environnement acide et contiennent des hydrolases permettant la dégradation de substrats spécifiques. Ils renferment aussi des protéines impliquées dans le transport des substrats à dégrader, dans l'acidification ou encore dans la fusion avec d'autres structures cellulaires (Saftig and Klumperman, 2009).

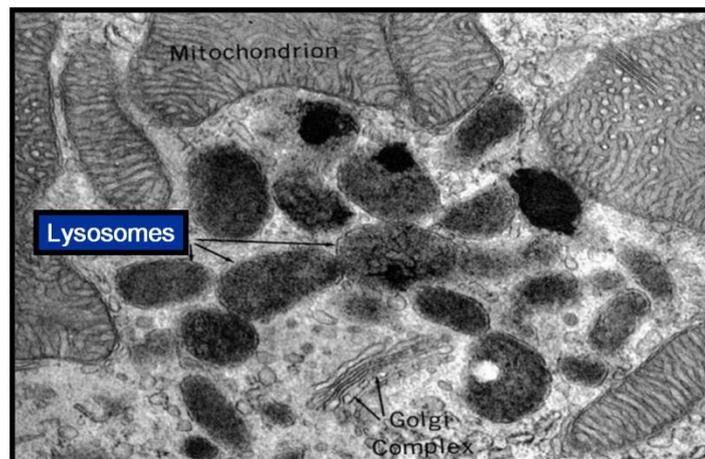


Figure 1 : Observation de lysosomes en microscopie électronique.

Les lysosomes sont le lieu de dégradation des macromolécules. Leur taille est comprise entre 0,05 et 0,5 μm .

Pendant longtemps, le lysosome a été uniquement décrit comme un incinérateur cellulaire, se limitant à dégrader les déchets produits ou captés par la cellule, puis à les recycler en métabolites. Depuis quelques années, il est maintenant clair que le lysosome est aussi impliqué dans de nombreuses autres fonctions, telles que la sécrétion, la réparation de la

membrane plasmique, l'homéostasie énergétique de la cellule et la réponse immunitaire (Settembre et al., 2013a).

1) Dégradation

Le lysosome a pour principal rôle de dégrader des macromolécules telles que les lipides complexes ou les oligosaccharides, générant divers métabolites qui seront ensuite réutilisés par la cellule. Il s'agit d'un organite qui a un pH acide (environ 5), ceci grâce à des ATPases H^+ localisées dans sa membrane et permettant l'entrée de protons. L'acidité ainsi générée est essentielle pour le bon fonctionnement du lysosome.

a) **Hydrolases acides**

Pour effectuer sa mission, le lysosome contient plus d'une cinquantaine d'hydrolases acides solubles ainsi que des protéines membranaires. La nature du composé qu'elles sont capables de dégrader varie d'une hydrolase à l'autre. Il existe ainsi des glycosidases, des protéases, des lipases, des nucléases, des phosphatases et des sulfatases. Comme la plupart des protéines, ces hydrolases acides sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et sont glycosylées sur des résidus asparagine. Ensuite, lorsqu'elles arrivent dans l'appareil de Golgi, elles sont pour la plupart spécifiquement reconnues par une phosphotransférase (GlcNAc-1-phosphotransférase) qui va permettre de générer des résidus mannose-6-phosphate (M6P) sur des oligosaccharides N-liés. Au niveau du réseau trans-Golgien, ces enzymes sont ensuite reconnues par deux récepteurs différents capables de se fixer aux résidus M6P : un récepteur cation-dépendant (CD-MPR) et un récepteur cation-indépendant (CI-MPR). Le complexe que forment les hydrolases avec les récepteurs M6P (M6PR) va ensuite être empaqueté dans des vésicules possédant une enveloppe constituée de clathrine en vue de leur transport vers les endosomes et les lysosomes (Braulke and Bonifacino, 2009; Coutinho et al., 2012a). Les hydrolases se détachent ensuite des récepteurs sous l'effet de l'acidité de la vésicule qui les contient et dans laquelle elles vont exercer leur action. Les récepteurs M6P sont quant à eux renvoyés dans le réseau trans-Golgien (Ghosh et al. 2003) (Figure 2).

Il est à noter que les récepteurs M6P sont aussi localisés au niveau des membranes cellulaires. En effet, certains récepteurs rejoignent la membrane plasmique grâce au recyclage à partir des endosomes précoces ou tardifs ou suite à une erreur d'adressage au niveau du

réseau trans-Golgien. Un autre point important est que certaines hydrolases échappent au M6PR malgré la présence de leurs résidus M6P. Elles vont alors être excrétées dans le milieu extracellulaire par un mécanisme d'exocytose. Ces enzymes présentes dans le milieu extracellulaire vont ensuite pouvoir être recaptées par les récepteurs M6P présents au niveau de la membrane plasmique des cellules avoisinantes.

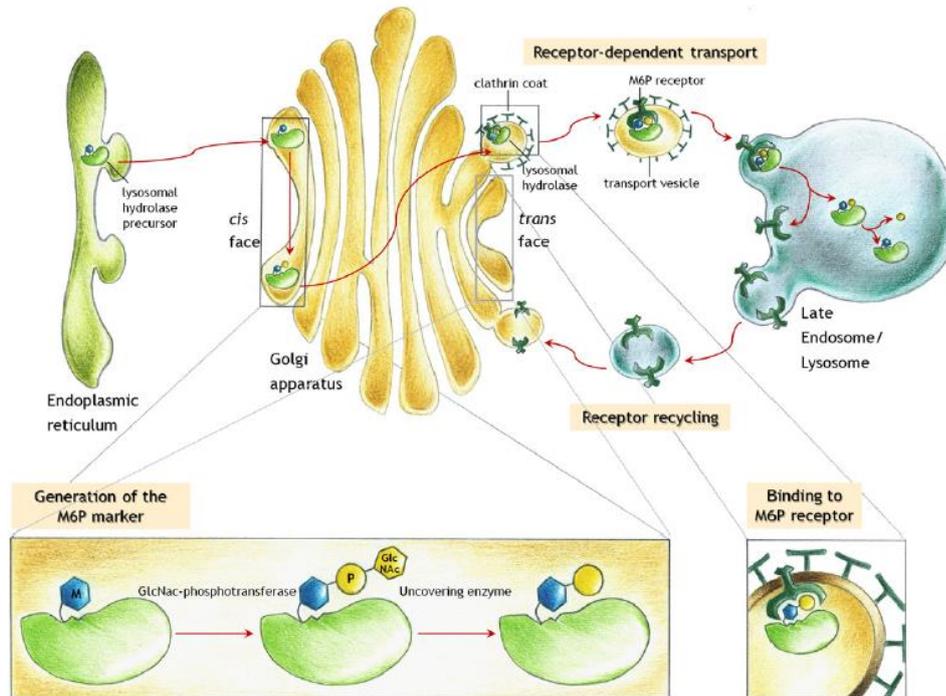


Figure 2 : Transport des hydrolases acides comportant des résidus M6P vers le lysosome (Coutinho et al., 2012a).

La UDP-N-acétylglucosamine 1-phosphotransférase (GlcNac-phosphotransférase) et la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acétylglucosaminidase (*uncovering enzyme*) sont responsables de la formation des résidus M6P.

Les M6PR ont donc un rôle majeur dans la délivrance des hydrolases lysosomales aux lysosomes, mais il a été montré qu'ils n'étaient pas les seuls impliqués, car certaines hydrolases n'ont pas de résidus M6P. Ainsi, la glucocérebrosidase est adressée aux lysosomes grâce au récepteur LIMP-2 (*lysosomal integral protein-2*) (Coutinho et al., 2012b).

Nous venons de voir comment les hydrolases acides sont transportées vers le lysosome après leur synthèse. Le matériel à dégrader doit lui aussi être apporté au lysosome et en fonction de la provenance du matériel à dégrader, les routes vers le lysosome sont différentes.

b) Dégradation du matériel d'origine extracellulaire : voie de l'endocytose

Pour le matériel extracellulaire, la cellule utilise principalement la voie de l'endocytose. Le matériel à digérer est internalisé dans la cellule, puis adressé aux endosomes précoces et ensuite aux endosomes tardifs. Ceux-ci vont ensuite fusionner avec les lysosomes afin de permettre la dégradation du matériel. Plusieurs modèles existent concernant la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes (figure 3) :

- Dans le premier modèle, dit de « maturation », les endosomes tardifs mûrissent pour devenir des lysosomes, ceci par des changements au niveau des protéines qui les composent.
- Dans le deuxième modèle, appelé « vésiculaire », les endosomes tardifs vont bourgeonner pour délivrer les molécules aux lysosomes.
- Dans le troisième modèle, appelé « *kiss and run* », les lysosomes et endosomes tardifs vont fusionner de manière transitoire pour échanger leur matériel, puis se séparer.
- Enfin, dans le quatrième modèle, appelé « hybride », les endosomes tardifs et les lysosomes vont fusionner de manière permanente. Ensuite, le retrait des composés caractéristiques de l'endosome va laisser la possibilité au lysosome de se reformer (Luzio et al. 2007).

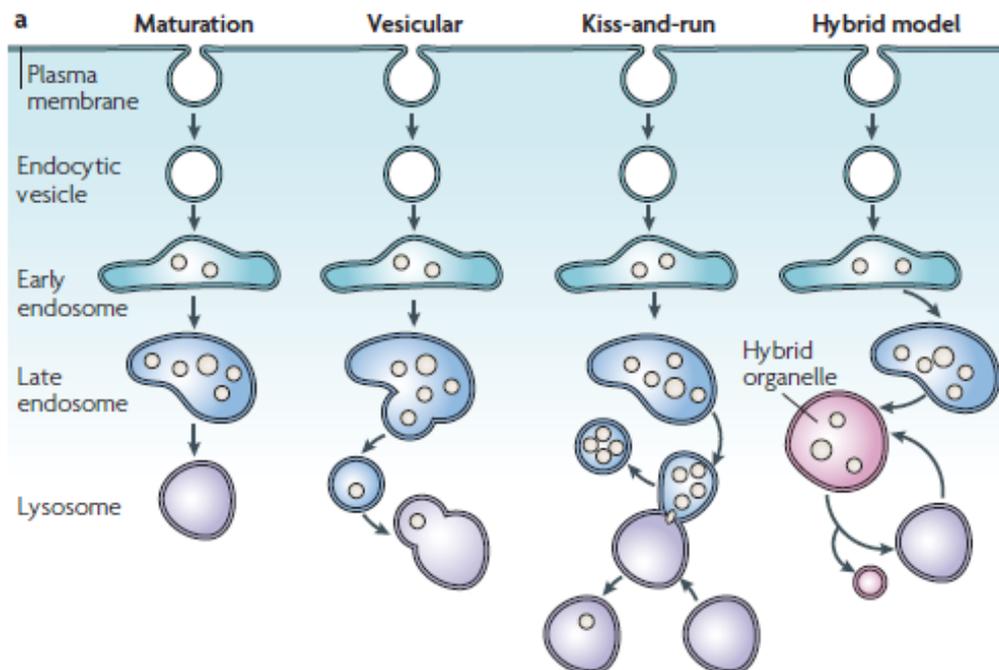


Figure 3 : Modèles d'adressage au lysosome du matériel à dégrader (Luzio et al., 2007).

c) Dégradation du matériel d'origine intracellulaire : autophagie

Le matériel intracellulaire quant à lui accède aux lysosomes par un mécanisme d'autophagie qui est un processus par lequel la cellule dégrade son propre cytoplasme. Il existe trois principaux types d'autophagie :

- **La microautophagie** : Des protéines cytoplasmiques sont captées par le lysosome par invagination directe avant d'être dégradées (Mijaljica et al. 2011).
- **L'autophagie médiée par les chaperonnes** : Les protéines cytoplasmiques sont apportées aux lysosomes grâce à des chaperonnes et à des récepteurs responsables de leur internalisation dans les lysosomes (Kaushik and Cuervo, 2012).
- **La macroautophagie** : Lorsque que l'on parle d'autophagie au sens général du terme, c'est de celle-ci dont il s'agit. Dans ce cas, il y a formation d'un organite appelé autophagosome qui est responsable de la séquestration d'une partie du cytoplasme. Cet autophagosome va ensuite fusionner avec le lysosome, permettant ainsi la dégradation du matériel internalisé, puis son recyclage.

L'autophagie est activée par différents stress intracellulaires ou extracellulaires. L'absence de nutriments et d'hormones, un stress du réticulum endoplasmique ou une infection pathogène peuvent être responsables de l'activation du processus autophagique. Au cours des dernières années, il a été montré que plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de l'autophagie (He and Klionsky, 2009; Ravikumar et al., 2010).

2) Voies de signalisation liées aux lysosomes

Il a été montré que le lysosome est impliqué dans la régulation du métabolisme cellulaire. De ce fait, il peut s'adapter à un environnement changeant via des voies de signalisation, notamment grâce au complexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), une kinase qui contrôle la croissance cellulaire. Cette kinase est activée par des hormones, des acides aminés, l'oxygène ou encore le stress. Elle permet de faire la balance entre la biosynthèse et l'activité catabolique. Ainsi, en fonction du statut nutritionnel, elle peut réguler la fonction du lysosome (Yu et al., 2010). Le complexe mTORC1 régule notamment le complexe ULK1-ATG13-FIP200, qui est quant à lui responsable de la biogenèse des autophagosomes, c'est-à-dire qu'il favorise l'initiation de l'autophagie.

Lorsque les nutriments sont présents, le complexe mTORC1 actif va directement phosphoryler la kinase du complexe ULK1-ATG13-FIP200, ce qui va inhiber son activité. Ainsi, mTORC1 inhibe l'autophagie en présence de nutriments (Ganley et al., 2009). Dans la situation inverse où l'apport en nutriment est absent, mTORC1 est inactif et l'autophagie est induite par le complexe ULK1-ATG13-FIP200. L'activation du complexe mTORC1 est dépendante du lysosome lui-même. Il a ainsi été montré récemment que l'accumulation d'acides aminés à l'intérieur du lysosome permettait son ciblage et donc son activité au niveau de la membrane du lysosome (Yu et al., 2010). L'implication du lysosome dans la détection des nutriments donne une nouvelle vision de cet organelle. Il s'agit d'un capteur et d'un régulateur permettant l'adaptation de la cellule à son environnement.

La découverte de TFEB (*transcription factor EB*) a confirmé cette nouvelle vision du lysosome. En effet, ce facteur de transcription est le régulateur de tout un réseau de gènes impliqués dans la biogenèse et l'activité du lysosome. L'expression de ces gènes est régulée positivement par TFEB, contrôlant ainsi le nombre de lysosomes présents dans la cellule et permettant aux cellules de dégrader les substrats à éliminer en fonction de leurs besoins (Sardiello et al., 2009). De plus, il a aussi été montré que TFEB régule l'expression des gènes impliqués dans l'induction de l'autophagie. En effet, la surexpression de TFEB augmente le nombre d'autophagosomes dans la cellule (Settembre et al., 2011). Dans les conditions normales, TFEB est localisé au niveau du cytoplasme et il est inactif. En cas de manque de nutriment ou de stress, TFEB va être transloqué au niveau du noyau, pour pouvoir induire l'expression de ses gènes cibles (Settembre et al., 2011). Cette translocation est régulée par des phosphorylations : la forme phosphorylée va rester dans le cytoplasme tandis que la forme déphosphorylée va entrer dans le noyau. A ce jour, plusieurs kinases impliquées dans cette régulation ont été identifiées, dont mTORC1 (Settembre et al., 2012) qui est connu pour réguler négativement la translocation du TFEB dans le noyau (explications détaillées dans la partie III des résultats).

3) Exocytose lysosomale

Il a été montré que le lysosome pouvait sécréter son contenu à l'extérieur de la cellule, ceci par un processus d'exocytose qui implique une translocation de la membrane lysosomale au niveau de la membrane plasmique. Cette fusion est la conséquence d'un mécanisme régulé par le Ca^{2+} . Ce processus implique la vésicule SNARE VAMP7, un détecteur des niveaux de calcium, la synaptotagmine (SYT7), des cibles SNARE (SNAP 23), la syntaxine 4

présente sur la membrane plasmique et les protéines RAB à la surface lysosomale. Par ailleurs, un autre acteur important est MCOLN1, un canal Ca^{2+} présent sur la surface lysosomale (Settembre et al., 2013a). L'exocytose lysosomale n'est pas seulement responsable de la sécrétion du contenu lysosomal, elle a aussi un rôle dans la réparation de la membrane plasmique. En effet, lorsqu'il y a des défauts au niveau de la membrane, les lysosomes vont se diriger vers cette zone, puis fusionner avec la membrane de façon à réparer les sites altérés (Gerasimenko et al., 2001; Reddy et al., 2001). L'exocytose lysosomale est régulée transcriptionnellement par TFEB. En effet, TFEB régule positivement le déplacement du lysosome et sa fusion avec la membrane, ceci par la régulation de plusieurs gènes qui vont à leur tour permettre une induction de MCOLN1 (Medina et al., 2011).

Ainsi, depuis quelques années, le lysosome n'est plus seulement considéré comme un simple organelle permettant le recyclage des « déchets » de la cellule, mais comme un organelle capable de s'adapter et qui communique avec les autres compartiments de façon à maintenir l'homéostasie cellulaire, essentiel à la survie des cellules. La figure 4 résume les différentes fonctions du lysosome: dégradation, signalisation et sécrétion.

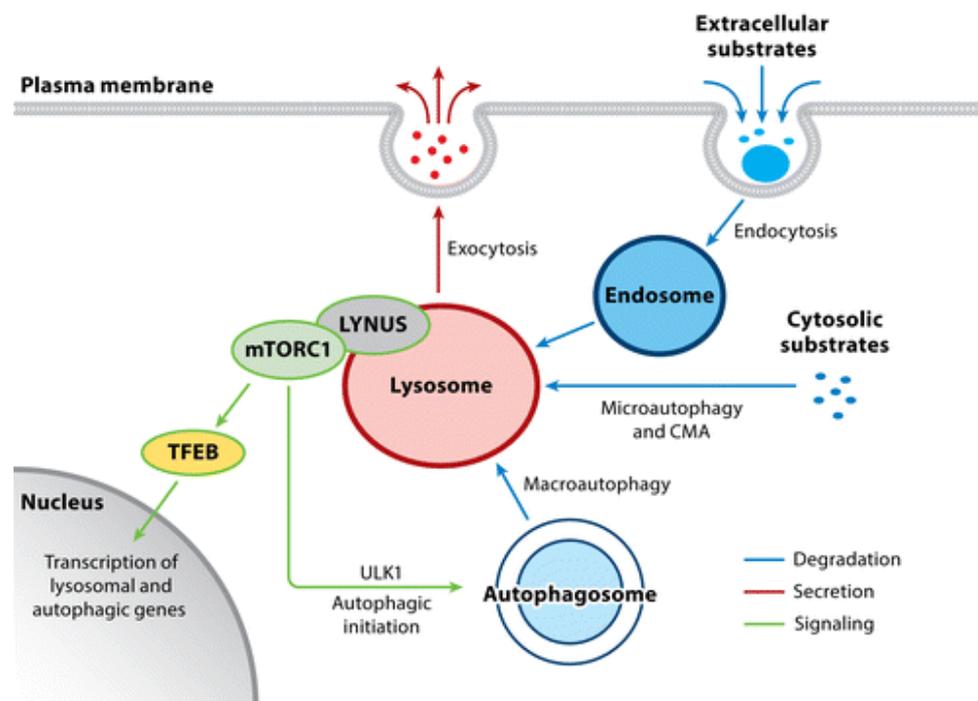


Figure 4 : Fonctions du lysosome (Fraldi et al., 2016).

B) MALADIES LYSOSOMALES

Les maladies de surcharge lysosomale (MSL) sont un groupe de pathologies héréditaires du métabolisme regroupant une cinquantaine d'affections différentes. Leur prévalence globale est d'environ 1 pour 5000-7000 naissances (Meikle et al., 1999), mais elles sont individuellement rares. Elles sont caractérisées par le déficit d'une enzyme, d'un cofacteur ou d'un transporteur impliqué dans la fonction du lysosome. Elles s'accompagnent d'une accumulation de substrats non dégradés dans le compartiment lysosomal, ce qui induit un dysfonctionnement de plusieurs tissus et organes.

1) Classification

La grande majorité des maladies lysosomales sont dues à des anomalies touchant les hydrolases lysosomales, empêchant ainsi la dégradation d'une macromolécule spécifique par le lysosome. Ces maladies peuvent être classées en fonction de la nature du composé qui est anormalement accumulé. Une distinction est ainsi faite entre les mucopolysaccharidoses, les sphingolipidoses, les oligosaccharidoses, les glycoprotéinoses et les glycogénoses. Le tableau 1 présente les principales maladies lysosomales (classées selon la nature du composé accumulé) avec leurs déficits enzymatiques/protéiques associés.

Maladies	Protéines impliquées
Mucopolysaccharidoses (MPS) et maladies apparentées	
MPS I (Hurler)	α -L-iduronidase
MPS II (Hunter)	Iduronate-2-sulfatase
MPS IIIA (Sanfilippo type A)	Sulfamidase
MPS IIIB (Sanfilippo type B)	N-Acétyle- α -glucosaminidase
MPS IIIC (Sanfilippo type C)	Acétyle-CoA : α -glucosamide N-acetyltransferase
MPS IIID (Sanfilippo type D)	N-Acétyleglucosamine-6-sulfatase
MPS IVA (Morquio type A)	N-Acétylegalactosamine-6-sulfate-sulfatase
MPS IVB (Morquio type B)	β -galactosidase
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arylsulfatase B
MPSVII (Sly)	β -glucuronidase
Déficit multiple en sulfatases (Austin)	FGE (<i>formylglycine generating enzyme</i>)
Pycnodysostose	Cathepsine K
Déficit en hyaluronidase	Hyaluronidase
Sphingolipidoses et maladies apparentées	
Fabry	α -Galactosidase A
Farber	Céramidase
Gaucher	β -Glucosidase
Krabbe	Galactocérébrosidase
Leucodystrophie métachromatique	Arylsulfatase A
Niemann-Pick types A et B	Sphingomyélinase
Niemann-Pick type C	NPC1 ou NPC2
Gangliosidose à GM1	β -Galactosidase
Gangliosidose à GM2 variant B (Tay-Sachs)	Hexosaminidase A
Gangliosidose à GM2 variant 0 (Sandhoff)	Hexosaminidases A et B
Gangliosidose à GM2 variant AB (déficit en activateur)	Activateur du GM2
Oligosaccharidoses et glycoprotéinoses	
α -Fucosidose	α -Fucosidase
α -Mannosidose	α -Mannosidase
β -Mannosidose	β -Mannosidase
Sialidose	Sialidase
Maladie de Schindler/Kanzaki	α -N-Acétylegalactosaminidase
Aspartyleglucosaminurie	N-aspartyleglucosaminidase
Mucopolidose de type II	N-acétyleglucosamine-1-phosphotransférase sous-unité α/β
Mucopolidose de type III	N-acétyleglucosamine-1-phosphotransférase sous-unité γ
Mucopolidose de type IV	Mucopolipine 1
Maladie de Salla	Transporteur de l'acide sialique
Glycogénoses	
Pompe	α -glucosidase acide
Danon	LAMP-1
Céroïde-lipofuscinoses	
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN1	Palmitoyl protéine thioestérase
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN2	Tripeptidyl peptidase I
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN3	CLN3
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN4	CSP alpha
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN5	CLN5
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN6	CLN6
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN7	CLN7 ou MFSD8 : <i>major facilitator superfamily domain 8</i>
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN8	CLN8
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN10	Cathepsine D
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN11	Progranuline
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN12	ATPase type 13A2
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN13	Cathepsine F
Céroïde-lipofuscinosse au locus CLN14	CLN14 : <i>potassium channel tetramerisation domain containing 7</i>

Tableau 1 : Classement des maladies lysosomales en fonction de la nature du composé accumulé. Adapté à partir de (Ballabio and Gieselmann, 2009).

Les anomalies responsables de ces maladies peuvent être très différentes (figure 5). Il s'agit le plus souvent de mutations provoquant le défaut d'activité enzymatique d'une hydrolase acide (maladie de Gaucher, de Fabry, mucopolysaccharidoses, ...). D'autres maladies sont liées à l'absence d'une protéine impliquée dans le bon fonctionnement de l'enzyme (déficits en activateurs). Certaines affections sont dues à des anomalies des modifications post-traductionnelles (glycosylations) des hydrolases acides altérant soit leur ciblage vers le lysosome (mucopolysaccharidoses II/III), soit leur capacité de dégradation (maladie d'Austin). D'autres sont causées par le déficit d'une protéine constitutive de la membrane du lysosome (maladie de Danon) ou d'un transporteur (cystinose). Il a plus récemment été montré que des mutations affectant des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire ou la biogénèse des lysosomes provoquent aussi des maladies de surcharge (Xu and Ren, 2015).

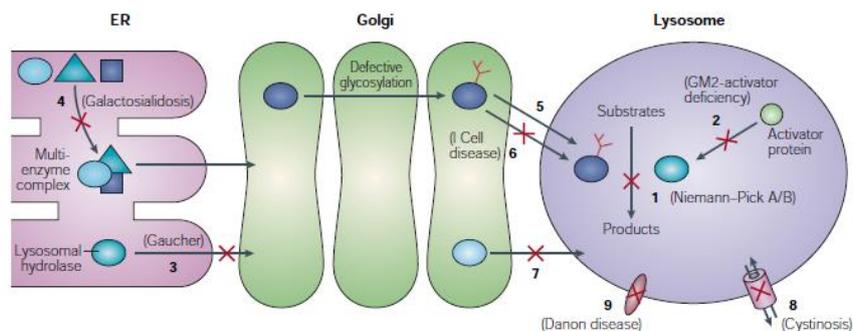


Figure 5 : Bases biochimiques et cellulaires des maladies lysosomales (Futerman and van Meer, 2004).

1) Défaut d'activité enzymatique d'une hydrolase acide. 2) Défaut d'une protéine impliquée dans l'activité des hydrolases acides. 3 et 4) Transport défectueux d'une hydrolase lysosomale hors du réticulum endoplasmique. 5 et 6) Dans le Golgi, glycosylation défectueuse responsable d'une activité réduite de l'hydrolase, ou empêchant celle-ci d'atteindre le lysosome. 7) Dans le Golgi, défaut de transport de l'hydrolase acide. 8,9) Défaut au niveau des protéines membranaires du lysosome.

Suite à ces anomalies, une accumulation primaire de substrat va se développer à l'intérieur du lysosome, engendrée par le déficit enzymatique ou protéique. Elle va entraîner un dysfonctionnement général du lysosome qui va aboutir à des accumulations secondaires de composés, mais aussi d'organites censés fusionner avec le lysosome (Platt et al., 2012). Il va s'ensuivre une altération du trafic intracellulaire et des voies de signalisation contrôlant le métabolisme cellulaire. Ces phénomènes sont également associés à une augmentation du stress oxydatif et à une réaction inflammatoire. La conséquence est un dysfonctionnement généralisé de la cellule qui est souvent responsable de la mort cellulaire (voir chapitre physiopathologie).

2) Signes cliniques

Bien que les protéines lysosomales soient exprimées de manière ubiquitaire, l'accumulation de substrats non dégradés atteint en général certains organes ou tissus où ces substrats ont un renouvellement très fréquent. Ainsi, des organes différents peuvent être affectés selon les maladies lysosomales, aboutissant à des tableaux cliniques variables. Les maladies lysosomales ont cependant souvent une atteinte multisystémique, fréquemment associée à une neurodégénérescence sévère induisant un retard psychomoteur. Parfois, d'autres tissus sont affectés comme le muscle, le cœur ou les organes viscéraux. Dans ces cas, une faiblesse musculaire, une cardiomyopathie et/ou une organomégalie peuvent apparaître. Il est à noter que les maladies lysosomales sont d'évolution progressive, c'est-à-dire que les symptômes apparaissent petit à petit au cours du temps (à l'inverse d'autres maladies du métabolisme qui peuvent débiter de manière aiguë), ceci suite à l'accumulation de plus en plus importante de substrats non dégradés.

Par ailleurs, en fonction de la nature des mutations causales, différentes formes cliniques peuvent exister pour une même maladie, avec des âges d'apparition variables. Ainsi, on peut observer des tableaux allant de la forme infantile sévère (voire même fœtale) à des formes plus tardives (juvéniles ou adultes) présentant une atteinte plus modérée. Ceci s'explique par le fait que le degré d'atteinte fonctionnelle est directement lié à la présence ou non de la protéine mutée, elle-même liée à la sévérité de la (des) mutation(s) causale(s) au niveau génomique. Dans le cas de mutations au niveau des hydrolases lysosomales, si l'activité enzymatique est très faible ou nulle, l'apparition de la maladie sera précoce et le phénotype sévère. A l'inverse, si l'activité enzymatique est un peu moins affectée (activité enzymatique résiduelle non négligeable), la progression de la maladie sera plus lente et les symptômes apparaîtront plus tardivement.

II. LES GANGLIOSIDOSES A GM2

Les gangliosidoses à GM2 sont des maladies de surcharge lysosomale appartenant aux sphingolipidoses, un groupe d'affections qui se caractérisent par une accumulation de glycosphingolipides dans plusieurs organes et notamment dans le système nerveux central (SNC). Les gangliosidoses à GM2 sont composées de trois maladies résultant de défauts génétiques sur des gènes différents. La maladie de Tay-Sachs est la plus fréquente (notamment dans la population ashkénaze), puis vient la maladie de Sandhoff, et enfin le très rare déficit en activateur du GM2. Ces maladies se caractérisent par un déficit enzymatique (ou d'activateur) aboutissant à une accumulation de gangliosides GM2. Dans le cas de la maladie de Sandhoff, il existe également une accumulation de glycolipides (GA2 et globosides). Les sphingolipides s'accumulent essentiellement dans le SNC, ces maladies ont toutes un tableau neurologique.

A) BIOCHIMIE DES GANGLIOSIDOSES

Les gangliosides sont les glycosphingolipides qui s'accumulent dans les gangliosidoses suite au déficit des hexosaminidases, qui sont les hydrolases lysosomales responsables de leur dégradation. Dans ce sous-chapitre seront détaillées d'une part, les voies de synthèse et de dégradation ainsi que la fonction des glycosphingolipides et d'autre part, le mode d'action des hexosaminidases.

1) Les gangliosides

a) Structure générale des glycosphingolipides et des gangliosides

De manière générale, les glycosphingolipides se composent d'une partie oligosaccharidique liée à une partie lipidique (céramide ou sphingosine) par une liaison glycosidique. Les glycosphingolipides sont une classe de glycolipides composant les membranes plasmiques, aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Il y a environ 300-400 glycosphingolipides connus à ce jour (Ichikawa and Hirabayashi, 1998). Ils peuvent être séparés en deux grandes catégories : les neutres et les chargés. Les sphingolipides neutres incluent les globosides et les cérébrosides, tandis que les sphingolipides chargés comprennent notamment les gangliosides et les sulfatides.

Les gangliosides ont été découverts dans les années 30 par Ernst Klenk lorsqu'il a analysé post-mortem des tissus de cerveau provenant d'un patient atteint de maladie de Tay-Sachs appelée à l'époque idiotie amaurotique infantile. Ces lipides ont la particularité d'être composés d'un ou plusieurs acide(s) sialique(s). C'est en 1956 qu'ils ont été classés en utilisant pour la première fois une nomenclature témoignant de leur complexité. Il en existe plusieurs sortes dont la classification dépend du nombre d'acide sialique et de leur propriété donnant une migration différente en chromatographie en couche mince. Les six gangliosides majeurs sont schématisés dans la figure 6.

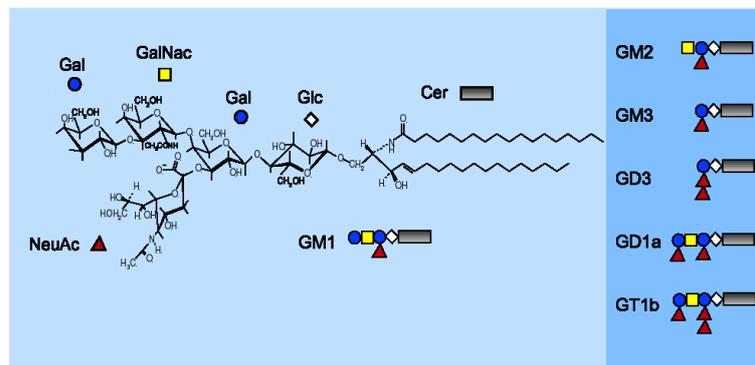


Figure 6 : Structure générale des gangliosides (Miljan and Bremer, 2002).

Quelques gangliosides ayant des structures différentes sont présentés ici. G : gangliosides, M : monosialo, D : disialo, T : trisialo. Glc : glucose, Gal : galactose, GalNac : N-acétylgalactosamine, NeuAc : acide N-acétylneuraminique aussi appelé acide sialique. Le céramide (rectangle gris) est composé de deux chaînes aliphatiques (sphingosine et acide gras).

Au total, 188 gangliosides ont été décrits à ce jour chez les vertébrés. Ils sont trouvés de manière ubiquitaire dans les tissus et les fluides, bien qu'ils soient plus abondants au niveau du SNC (Yu et al., 2011). Leur proportion change en fonction du développement du cerveau. En effet, dans les cerveaux humain et murin embryonnaires, ce sont les GM3 et les GD3 qui prédominent. Après le développement du cerveau, l'expression de ces gangliosides simples diminue pour laisser place aux gangliosides plus complexes, tels que GM1, GD1a, GD1b et GT1b (Yu et al., 2011).

b) Localisation et fonctions

Les glycosphingolipides sont localisés au niveau des membranes plasmiques de la cellule. Leur portion lipidique est présente au niveau de la membrane, tandis que la partie ose forme des résidus se projetant au niveau de l'espace extracellulaire. A la surface des cellules, les réseaux que forment les glycosphingolipides sont espèce et type cellulaire dépendants. De plus, ils ne sont pas figés, ils peuvent s'adapter à l'environnement. Ainsi, en fonction de la croissance cellulaire, de la différenciation, ou encore dans le cadre d'une réponse immunitaire, les réseaux qu'ils forment peuvent changer de caractéristiques. Les réseaux lipidiques formés par les glycosphingolipides sont de véritables microdomaines lipidiques enrichis en glycosylphosphatidylinositol (GPI), sphingomyéline et cholestérol (Munro, 2003). Ces microdomaines sont aussi appelés radeaux lipidiques (Brown and London, 2000). Les gangliosides sont essentiellement présents au niveau de ces radeaux lipidiques sur la membrane plasmique, mais aussi sur la membrane nucléaire (Yu et al., 2011).

Les fonctions biologiques des gangliosides sont très variées. Ils sont impliqués dans la reconnaissance cellule/cellule, l'adhésion et la transduction du signal pour ceux localisés au niveau de la membrane plasmique. Plus récemment, leur présence sur la membrane nucléaire a été montré comme jouant un rôle dans l'homéostasie du calcium à l'intérieur du noyau comme à l'extérieur (Ledeen and Wu, 2011). Comme les gangliosides sont surtout localisés au niveau du SNC, nous allons nous focaliser ici sur leurs fonctions les plus connues au niveau neuronal.

- **Fonction dans la différenciation et la maturation neuronale** : Leur action au cours du développement est primordiale. Comme dit précédemment, les gangliosides les plus simples (GM3 et GD3), composés seulement d'un glucose et d'un galactose ainsi que d'un petit nombre d'acide sialique, sont présents en grande partie sur les cellules souches neuronales pendant l'embryogénèse, tandis que les gangliosides plus complexes sont impliqués lors des processus très complexes tels que l'astrogénèse et la neurogénèse (Schengrund, 2015). Les mécanismes de régulation de ce changement de composition en gangliosides sont inconnus à ce jour, à l'exception de l'implication de la glucosyltransférase. Concernant leur rôle, il y a encore beaucoup d'incertitude, même si différentes équipes s'y intéressent. Il a notamment été montré que les gangliosides ont une action sur la calmoduline kinase II qui est impliquée dans le développement du cerveau (Kanatsu et al., 2012).

- **Implication dans la transmission neuronale** : Plusieurs équipes ont montré que les gangliosides sont impliqués dans la stabilisation des synapses et au niveau des circuits neuronaux impliqués dans la mémoire et l'apprentissage (Ando et al., 2004; Zhang et al., 2011). De plus, les gangliosides auraient une action sur la PMCA (*plasma membrane Ca²⁺ ATPase*), jouant ainsi sur la transmission synaptique, par la régulation de l'homéostasie du calcium (Jiang et al., 2014).
- **Implication dans la neuroprotection** : Il a été montré que les gangliosides ont un rôle protecteur au niveau du SNC, notamment en inhibant la voie de signalisation ERK (Zhang et al., 2011). Un double *knock-out* empêchant la synthèse des gangliosides GD2/GM2 et des GD3 entraîne une activation de l'inflammation et notamment du complément, aboutissant à une neurodégénérescence. Les gangliosides seraient alors impliqués dans la régulation du complément (Ohmi et al., 2009).

Les gangliosides qui sont les glycolipides principaux au niveau du SNC ont donc des fonctions essentielles pour le bon fonctionnement de la cellule neuronale. Ils sont dynamiques, leur métabolisme et leur adressage sont dus à des processus coordonnés, incluant leur biosynthèse et des régulations de trafic intercellulaire.

c) Biosynthèse des gangliosides

Comme nous l'avons vu plus tôt, les glycosphingolipides sont composés d'une partie lipidique (souvent un céramide) et d'une partie glucidique. Leur synthèse commence à la surface du réticulum endoplasmique (RE) où sont formés les céramides. A partir de là, ceux-ci vont être transférés jusqu'à l'appareil de Golgi grâce à une protéine de transfert nommée CERT (*ceramide transport protein*) ou par flux vésiculaire (Hanada et al., 2003). Ensuite, leur glycosylation va avoir lieu dans le Golgi et le réseau trans-golgien (figure 7) (Sandhoff and Harzer 2013).

La première étape de glycosylation, c'est-à-dire la formation de glucosylcéramide (GlcCer) ou de galactosylcéramide (Gal-Cer) à partir d'un céramide (Cer) a lieu au niveau de la surface cytosolique de la membrane de l'appareil de Golgi pour le GlcCer et dans le RE pour le Gal-Cer. Ceci se fait grâce à la GlcCer synthase ou à la GalCer synthase. Dans le cas de la synthèse des gangliosides, c'est du glucosylcéramide qui est formé. C'est après son passage dans la lumière du Golgi que le GlcCer va être converti en lactosylcéramide (LacCer). Par la suite, toujours dans le Golgi et son réseau, ces LacCer vont être sialilés, c'est-à-dire que l'acide sialique va être ajouté de façon à former des petits précurseurs

gangliosidiques (GM3/GD3/GT3). C'est grâce à des glycosyltransférases que des gangliosides plus complexes vont être synthétisés. Ils vont ensuite rejoindre les surfaces cellulaires grâce à des vésicules de transport (Sandhoff and Harzer, 2013).

Pendant longtemps, la plupart des maladies décrites impliquant le métabolisme des sphingolipides étaient des maladies liées à leur catabolisme, mais on sait maintenant qu'il existe aussi des maladies liées à leur biosynthèse. Quelques rares cas avaient été observés comme par exemple une épilepsie autosomique récessive liée à un déficit en GM3 synthase (Simpson et al., 2004). Au cours des dernières années, d'autres maladies génétiques associées à une anomalie de la biosynthèse ont été décrites (Astudillo et al., 2015; Sabourdy et al., 2015). Ainsi, des maladies génétiques dues à des défauts de la synthèse de céramide, de galactosphingolipides et de gangliosides ont été rapportées confirmant le rôle critique des sphingolipides dans le bon fonctionnement cellulaire. Par exemple, des mutations sur le gène *B4GALNT1* codant la GM2/GD2 synthase sont responsables d'une paraplégie spastique à transmission autosomique récessive. Il a été montré chez ces patients une atrophie corticale et sous-corticale, ainsi qu'une absence de GM2 et une accumulation du GM3 au niveau des fibroblastes (Harlalka et al., 2013).

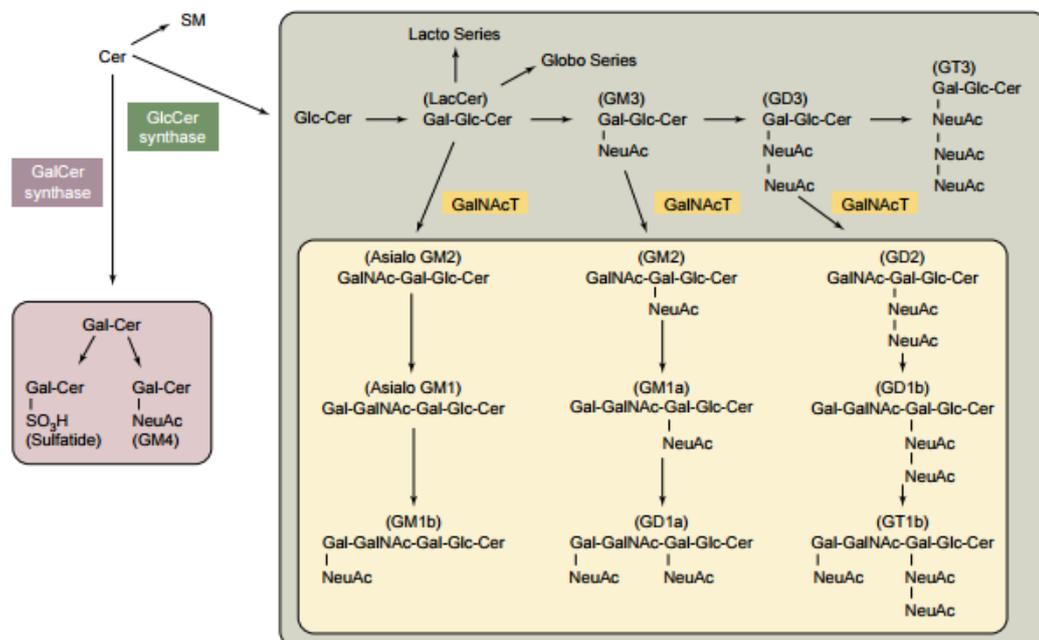


Figure 7 : Voie de biosynthèse des glycosphingolipides majeurs (Ichikawa and Hirabayashi, 1998).

La première étape consiste en une transformation du céramide en glucosylcéramide ou galactosylcéramide grâce à la GlcCer synthase et à la GalCer synthase respectivement. La plupart des GSL proviennent du glucosylcéramide (rectangle vert), à l'inverse du galactosylcéramide qui est la source seulement de quelques GSL comme le GM4 ou encore les sulfatides (rectangle violet).

d) Catabolisme des glycosphingolipides

Pour procéder à leur renouvellement en fonction des besoins de la cellule à un instant donné, les glycosphingolipides peuvent être dégradés par des enzymes spécifiques dans le lysosome. Pour arriver jusqu'à ce compartiment, les lipides vont être transportés par la voie endosomale après leur endocytose à l'intérieur du cytoplasme. La figure 8 détaille ce transport.

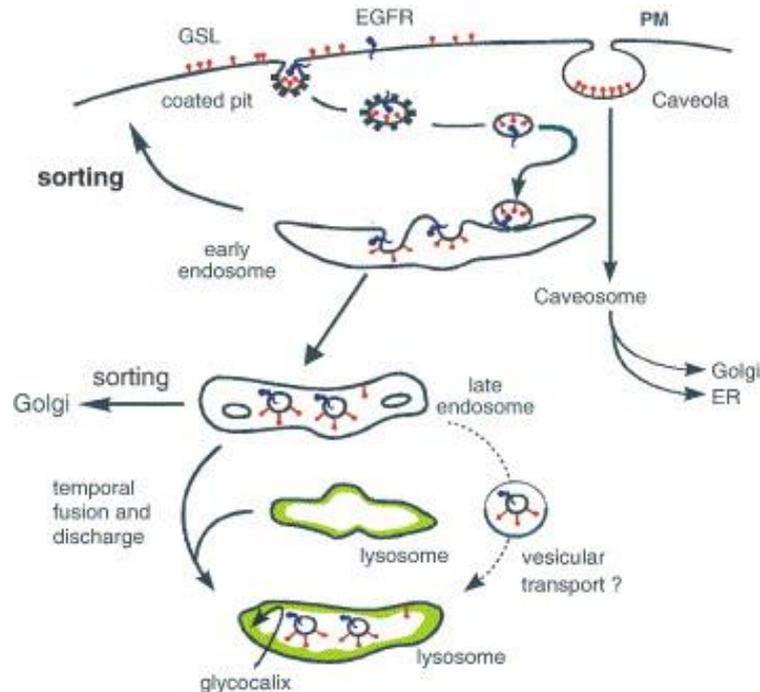


Figure 8 : Endocytose et digestion des glycosphingolipides par les lysosomes (Kolter and Sandhoff, 2006).

Des parties de la membrane incluant des GSL sont incorporées dans la membrane des vésicules endosomales. Les vésicules atteignent le compartiment lysosomal par la voie endosomale. Sur ce schéma, la fusion transitoire d'un endosome tardif contenant le contenu à dégrader avec le lysosome est présentée, mais les autres modèles possibles sont évoqués dans le chapitre I.

Une fois arrivés au niveau du lysosome, les glycosphingolipides se trouvent au niveau de la membrane, tandis que les hydrolases responsables de leur dégradation sont à l'intérieur du lysosome. Des protéines activatrices, appelées saposines ou SAP, vont permettre l'interaction entre les substrats lipidiques à dégrader et les hydrolases lysosomales. A ce jour, cinq protéines de ce type sont connues (saposines A, B, C, D et l'activateur du GM2). Beaucoup d'enzymes lysosomales ont besoin de ces activateurs pour dégrader leur substrat. Les différentes voies de dégradation des sphingolipides sont présentées dans la figure 9. Concernant les gangliosidoses à GM2, l'accumulation du GM2 est due soit à un déficit isolé

de l'hexosaminidase A, soit à un déficit combiné des hexosaminidases A et B, soit à une altération de l'activateur de GM2. Cette accumulation est la cause des maladies de Sandhoff, de Tay-Sachs et du déficit en activateur. Dans le cas de la maladie de Sandhoff, le déficit en hexosaminidase B provoque en plus une accumulation d'autres glycolipides.

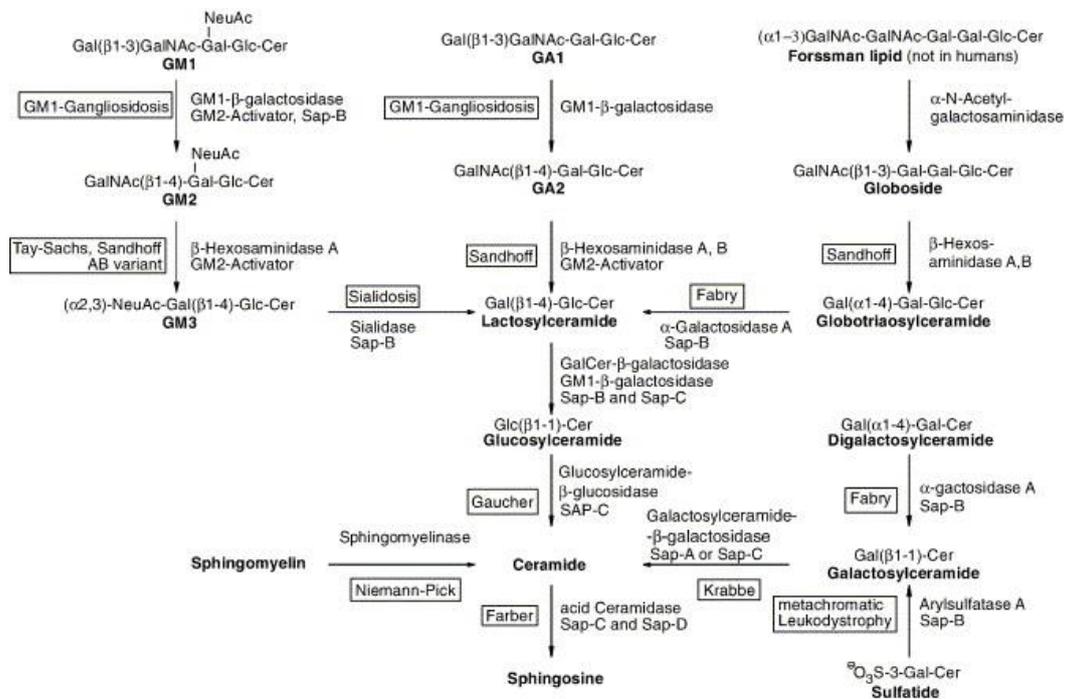


Figure 9 : Voie de dégradation des glycosphingolipides (Kolter and Sandhoff, 2006).

Chaque étape est associée à une maladie lysosomale donnée, conséquence du déficit d'une enzyme provoquant l'accumulation d'un substrat. Le nom de chaque maladie lysosomale est indiqué (encadrés), ainsi que les saposines nécessaires à certaines étapes de dégradation. Le variant AB désigne la forme de gangliosidose à GM2 liée à une anomalie de la protéine activatrice du GM2.

2) Les hexosaminidases

a) **Structure**

Les hexosaminidases (ou β -N-acétylhexosaminidases) sont des enzymes dimériques composées de deux sous-unités, l'une appelée α (528 résidus) et l'autre β (556 résidus), codées par deux gènes différents, mais ayant une origine commune lors de l'évolution. Leur formation dans le RE donne naissance à trois enzymes différentes : deux homodimères l'Hex B ($\beta\beta$) et l'Hex S ($\alpha\alpha$) et un hétérodimère l'Hex A ($\alpha\beta$). La dimérisation des sous-unités est nécessaire à leur activité. Chaque unité a son propre site actif, la sous-unité β hydrolyse des substrats non chargés, tandis que la sous-unité α va être capable de dégrader des substrats

chargés négativement. Seul, l'hétérodimère Hex A est capable de catalyser le résidu N-acétylgalactosaminide (GalNAc) du ganglioside GM2 et ceci à l'aide de la protéine activatrice du GM2.

L'étude par cristallographie a permis de modéliser ces enzymes de façon à mieux comprendre leur mode d'action (Mark et al., 2003). La chaîne α est composée de deux polypeptides d'une taille totale de 55 kDa, alors que la chaîne β contient trois polypeptides de 50 kDa au total. La protéine activatrice du GM2 quant à elle est un monomère de 22 kDa comportant 160 acides aminés. La figure 10 présente un modèle de cristallisation de l'Hex A avec la protéine activatrice. Pour permettre la dégradation du GM2, les produits des gènes *HEXA*, *HEXB* et *GM2A* vont subir des transports intracellulaires et des modifications post-traductionnelles de manière à former un complexe (figure 10).

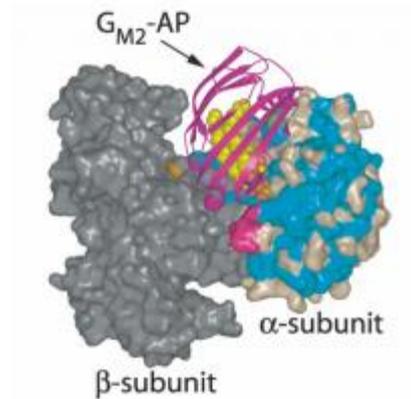


Figure 10 : Modèle prédictif de l'Hex A et de l'activateur du GM2 (Mark et al., 2003).

Les acides aminés de la chaîne α conservés avec la chaîne β sont colorés en bleus, les résidus non identiques sont en gris clair. La plupart des acides aminés sont au niveau du $(\beta/\alpha)_8$ du domaine II. Concernant la chaîne β , elle est colorée en gris, et les résidus au niveau du site actif sont notés en orange. La protéine GM2AP se présente avec une rainure entre les 2 chaînes et c'est à cet endroit-là que le sucre GalNAc du GM2 va être présenté à la sous-unité α . La partie de couleur magenta donne une boucle, qui peut être retirée de la sous-unité β au cours de modifications post-traductionnelles permettant la régulation des fonctions métaboliques de cette sous-unité.

b) Activité

L'hydrolyse du GM2 sur la surface vésiculaire anionique est facilitée par la coopération de deux protéines, l'Hex A et la protéine activatrice du GM2, aussi appelée GM2AP. C'est lorsque le pH est acide que le GM2, qui est protoné amphiphile, va se lier aux membranes de surface anioniques riches en BMP du lysosome. Wendeler *et al.* ont proposé un modèle concernant la reconnaissance du GM2 par le GM2AP. Celui-ci est en conformation

ouverte lorsqu'il n'est pas lié à un lipide. Il va se fixer à la surface de la membrane contenant le GM2 grâce à deux boucles hydrophobes. Le ganglioside est reconnu sur sa partie céramide grâce à un site spécifique à l'intérieur de la cavité. Ensuite, lorsque la queue du céramide est complètement insérée au niveau de la cavité, il y a un mouvement des boucles mobiles hydrophobes qui va faire que le GM2AP va être en position fermée (Wendeler et al., 2004). Le complexe va ensuite être reconnu par l'Hex A et la dégradation va avoir lieu. En figure 11, se trouve un schéma décrivant ce modèle de dégradation.

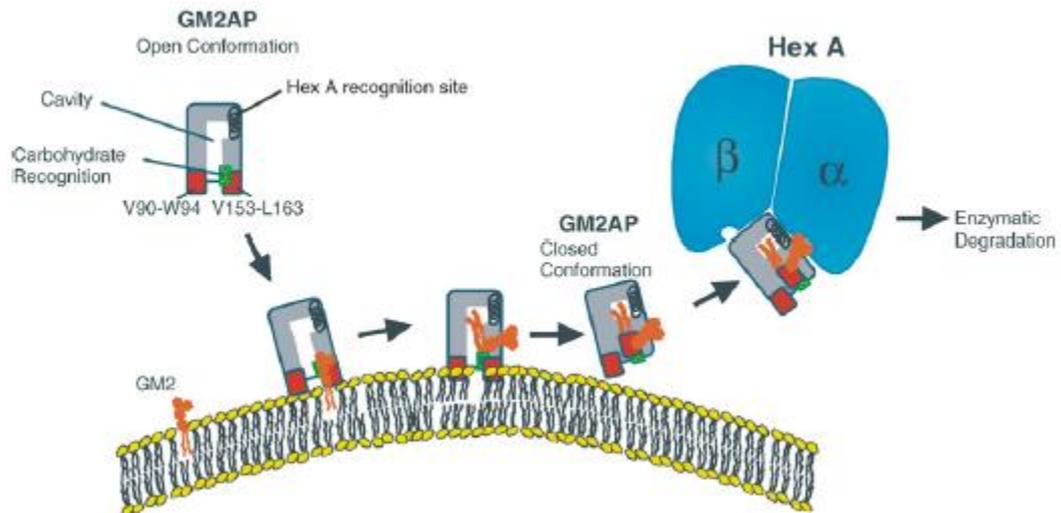


Figure 11 : Modèle de simulation de l'hydrolyse du GM2 par l'hexosaminidase A grâce au GM2AP (Kolter and Sandhoff, 2006).

Le site se liant au glycolipide est délimité par deux boucles hydrophobes (V90-W94 et V153-L163). La boucle la plus flexible (V153-L163) contrôle l'entrée au niveau de la cavité hydrophobe permettant la conformation fermée et ouverte. GM2AP : protéine activatrice du GM2, Hex A : β -hexosaminidase A.

Le ganglioside GM2 n'est pas le seul substrat des hexosaminidases. En effet, d'autres glycolipides (se composant pour la plupart d'un résidu β -N-acétylgalactosamine) sont connus pour s'accumuler dans les gangliosidoses à GM2 et ils sont soit substrats de l'hexosaminidase A, soit de l'hexosaminidase B ou bien des deux. Par ailleurs, des oligosaccharides (se composant d'un résidu β -N-acétylglucosamine) s'accumulent spécifiquement dans la maladie de Sandhoff. Ces différents composés sont listés dans le tableau n°2. Le rôle joué par les différentes isoenzymes des hexosaminidases et par l'activateur du GM2 dans le catabolisme de ces différents substrats peut être déduit de l'accumulation spécifique à chaque forme de gangliosidoses à GM2. Comme le GA2 s'accumule principalement dans la maladie de Sandhoff, il est clair que l'hexosaminidase B est en partie responsable de la dégradation de ce

composé. De même, le globoside et les oligosaccharides s'accumulent seulement dans la maladie de Sandhoff, ce qui signifie que ces composés sont seulement dégradés par l'hexosaminidase B. Outre les substrats physiologiques, il existe aussi des substrats artificiels utilisés notamment à des fins diagnostiques. Le substrat MUG peut être hydrolysé par les hexosaminidase A et B, tandis que le substrat MUGS (sulfaté) peut uniquement être dégradé par l'hexosaminidase A (et l'hexosaminidase S, $\alpha\alpha$).

Substrats naturels			Substrats synthétiques	
Enzymes	Composés accumulés		Enzymes	Composés accumulés
	Glycolipides	Oligosaccharides		
Hex A	GA2 GM2 Lyso-GM2 GD1a-GalNAc GM1b-GalNAc GM1a- GalNAc	-----	Hex A et Hex B	4-méthylumbelliferyl-2-acétamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (MUG)
Hex B	Globosides GA2	Possédant un résidu N-acétylhexosamine	Hex A	4-méthylumbelliferyl-7-(6-Sulfo-2-Acétamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (MUGS)

Tableau 2 : Substrats physiologiques et artificiels des hexosaminidases. A partir de (Kolter and Sandhoff, 2006)

B) GENETIQUE DES GANGLIOSIDOSES

Les anomalies génétiques affectant les chaînes α ou β ou la protéine GM2AP aboutissent à trois maladies différentes. D'après la classification de Sandhoff, ces affections sont nommées en fonction de l'isoenzyme restant intacte et fonctionnelle. Ainsi, le variant B est dû à des mutations du gène *HEXA* codant la chaîne α , ce qui aboutit à un déficit en Hex A (et Hex S), mais l'Hex B reste fonctionnelle. Il s'agit de la maladie de Tay-Sachs. Dans cette maladie, il y a uniquement une accumulation de GM2 au niveau du SNC. Le variant 0, aussi appelé maladie de Sandhoff, est quant à lui, dû à des mutations du gène *HEXB* codant la chaîne β ce qui aboutit à un double déficit en Hex A et Hex B (mais l'homodimère Hex S

reste présent). Dans cette maladie, il y a une accumulation de GM2, mais aussi d'autres glycolipides (GA2 et Gb4) dans le SNC et dans les organes périphériques. Enfin, le variant AB résulte de mutations sur le gène *GM2A* codant la protéine GM2AP. Dans ce cas, les différentes hexosaminidases sont présentes et fonctionnelles, mais le GM2 reste sur la membrane du lysosome et n'est donc pas dégradé (figure 12).

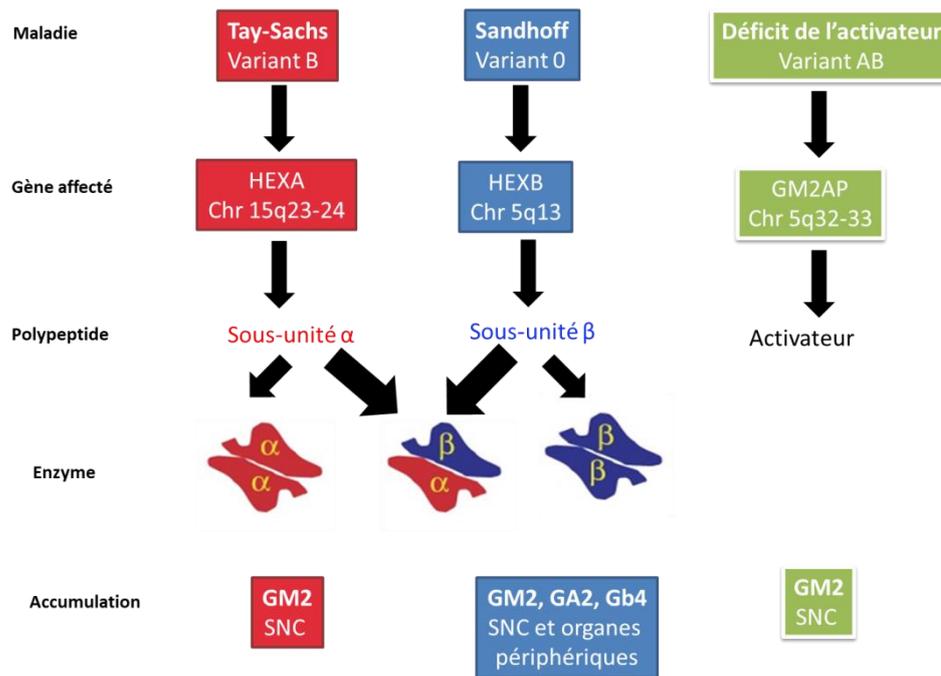


Figure 12 : Variants des gangliosidoses avec leurs gènes et enzymes correspondant(e)s, et les accumulations spécifiques de glycolipides avec leur lieu d'accumulation.

En fonction du type de mutation touchant les gènes *HEXA* ou *HEXB*, différentes formes de la maladie sont possibles. Plus l'activité enzymatique des hexosaminidases est faible, plus la forme de la maladie est sévère. Une corrélation existe donc entre l'âge d'apparition de la maladie et les fonctions cataboliques des hexosaminidases. Ceci a été confirmé à l'aide d'un test utilisant du ganglioside GM2 marqué radioactivement sur des cellules provenant de différents patients (figure n°13). Dans les formes infantiles, l'activité des hexosaminidases est presque nulle et le GM2 est non dégradé. En revanche, dans les formes adultes, une légère activité des hexosaminidases est présente permettant de dégrader un peu de GM2. Il a ainsi été montré qu'environ 10% d'activité résiduelle par rapport à une personne normale est nécessaire pour ne pas développer la maladie. En dessous de cette

limite, la maladie peut progressivement apparaître, ceci plus ou moins rapidement en fonction du type de mutation (Sandhoff and Harzer, 2013).

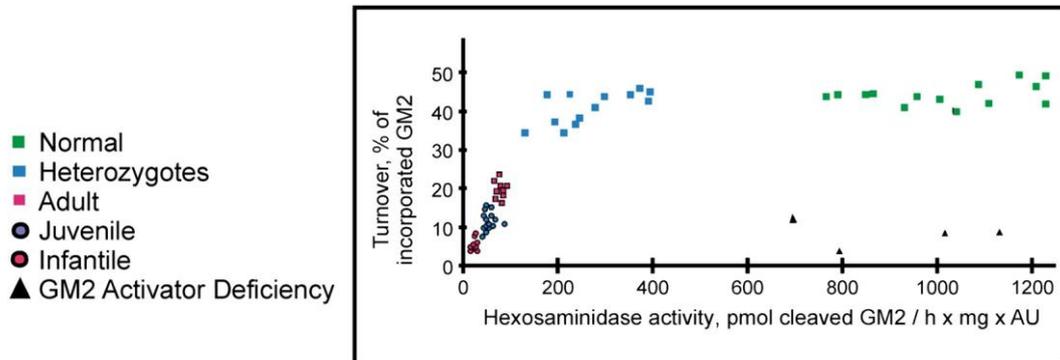


Figure 13 : Relation entre activité résiduelle et sévérité clinique (Conzelmann et al., 1983)

Afin de vérifier expérimentalement l'activité de l'enzyme, des études ont été réalisées sur des cultures de fibroblastes. Du GM2 marqué radioactivement a été ajouté à des cellules présentant une activité en hexosaminidase A différente et le taux de GM2 incorporé a été mesuré. Une corrélation entre activité enzymatique et quantité de GM2 incorporé a été montrée : le taux de dégradation du GM2 augmente avec l'activité résiduelle. Pour obtenir une dégradation correcte, une activité résiduelle de 10-15% de la normale est nécessaire. Les cellules possédant une activité résiduelle supérieure à cette limite ont une dégradation du GM2 normale.

1) Mutations sur le gène *HEXA*

Les mutations sur le gène *HEXA* sont responsables de la maladie de Tay-Sachs, dont la prévalence est de 1 pour 201 000 naissances (Meikle et al., 1999). Ainsi, dans la population mondiale, 1 personne sur 300 est hétérozygote pour cette maladie qui est considérée comme rare. Par contre, dans la population ashkénaze, cette maladie est plus commune (1 personne sur 30 est porteuse). Le gène *HEXA* code la chaîne α des hexosaminidases. Il se situe sur le chromosome 15 au niveau du bras long (15q23), il s'étend sur 45 kb et se compose de 14 exons. A ce jour, plus de 150 mutations différentes ont été décrites. Les insertions/délétions ou les mutations ponctuelles générant un codon stop prématuré aboutissent à une absence totale d'enzyme et génèrent les formes les plus sévères. Certaines mutations ponctuelles ou d'épissage peuvent être responsables de formes moins sévères, si elles sont associées à une activité enzymatique résiduelle suffisante pour retarder le phénotype. Quelques mutations sont

connues pour être fréquentes dans certaines populations. Ainsi, une insertion de 4 pb dans l'exon 11 appelée c.1274-1277dup est particulièrement commune chez les ashkénazes (Myerowitz and Costigan, 1988; Navon and Proia, 1989; Paw et al., 1990; Triggs-Raine et al., 2001). Une délétion de 7,6 kb emportant l'exon 1, une partie de l'intron 1 et la région du promoteur est quant à elle fréquente chez les canadiens français (Myerowitz and Hogikyan, 1987). La mutation ponctuelle c.533G>A (p.Arg178His) plutôt impliquée dans les formes juvéniles est fréquemment retrouvée chez les patients originaires du Portugal ou d'Italie (Montalvo et al., 2005; dos Santos et al., 1991). La mutation ponctuelle c.805G>A (p.Gly269Ser) probablement moins sévère est généralement associée à des formes de l'adulte.

2) Mutations sur le gène HEXB

Les mutations sur le gène *HEXB* aboutissent à la maladie de Sandhoff. La prévalence de cette maladie est de 1 pour 384 000 (Meikle et al., 1999). Le gène *HEXB* codant la chaîne β se situe sur le chromosome 5 au niveau du bras long (5q13). Il présente une grande homologie avec le gène *HEXA*. Il s'étend sur 45 kb et se compose de 14 exons (Fox et al., 1984). A ce jour, environ 85 mutations différentes ont été décrites. Les mutations induisant la maladie de Sandhoff peuvent être de nature différente : mutations ponctuelles de type non-sens ou faux sens, insertions, délétions. La plus commune (pouvant atteindre 40% des cas) est une délétion de 16 kb allant du promoteur jusqu'à l'exon 5 (Neote et al., 1990). Les mutations induisant une instabilité ou une absence d'ARNm avec absence totale de la chaîne β sont responsables de formes sévères de la maladie (infantiles). Certaines mutations ponctuelles peuvent donner des formes phénotypiquement moins graves.

3) Mutations sur le gène GM2AP

Les mutations du gène *GM2A* sont responsables de la gangliosidose à GM2 par déficit en activateur. Il s'agit d'une maladie très rare (quelques cas décrits dans la littérature). Le gène *GM2A* code pour la protéine activatrice en GM2, nécessaire pour l'hydrolyse du GM2 par l'hexosaminidase A. Il s'étend sur moins de 16 kb et se compose de 4 exons. Il se situe sur le bras long du chromosome 5 (5q33.1). Quelques mutations ponctuelles de type faux sens ou non-sens ont été rapportées sur ce gène (Schröder et al., 1991)(Schröder et al., 1993)(Renaud and Brodsky, 2016), ainsi que des petites délétions intragéniques (Schepers et al., 1996). La plupart des cas ont été décrits dans des familles consanguines.

C) FORMES CLINIQUES DES GANGLIOSIDOSES A GM2

Le tableau clinique est assez proche entre les différentes formes de gangliosidoses à GM2. Dans tous les cas, il y a trois formes différentes de la maladie : infantile, juvénile et adulte et les symptômes touchent principalement le système nerveux central. La date d'apparition de la maladie, ainsi que sa gravité dépendent de la sévérité de la (des) mutation(s) présente(s) chez le patient.

1) Forme infantile

La forme infantile est la forme la plus fréquente de gangliosidoses à GM2. Les symptômes débutent à partir de 6 mois par une perte du maintien de la tête. Puis, l'état se dégrade progressivement, une tache rouge cerise apparaît au fond d'œil (figure 14). Il y a aussi des sursauts et une réaction excessive au bruit. Vers un an, apparaît une hypotonie musculaire, puis une épilepsie, une tétraparésie avec des spasmes, une démence et une cécité. Dans la maladie de Sandhoff spécifiquement, les symptômes s'accompagnent d'une macrocranie, ainsi que d'une hépatosplénomégalie (Sandhoff and Harzer, 2013). Plus récemment, il a été montré que certaines formes infantiles de la maladie de Sandhoff sont associées avec des anomalies au niveau du cœur, avec cardiomégalie et valvulopathie. Il est important de noter que ces symptômes au niveau du cœur arrivent au tout début de la maladie avant les signes neurologiques (Lee et al., 2017). Généralement, les patients décèdent entre 3 et 4 ans soit à cause de leur maladie, soit de pneumonie d'aspiration et parfois lors de crises d'épilepsie (Bley et al., 2011).



Figure 14 : Tache rouge cerise au fond d'œil chez un patient Tay-Sachs (Bley et al., 2011).

2) Forme juvénile

La forme juvénile est moins rapidement évolutive que la forme infantile. Les premiers signes de la maladie apparaissent entre 3 et 6 ans avec un trouble d'articulation de la parole (dysarthrie), une ataxie cérébelleuse, puis un retard psychomoteur et une détérioration mentale progressive. Parfois, les patients ont une tache rouge cerise au fond d'œil, ainsi que des crises d'épilepsie, une irritabilité et des signes psychiatriques. Le décès survient vers l'âge de 15 ans.

3) Forme adulte

La forme adulte est la forme la plus rare. Le début des signes peut survenir à tout âge à partir de l'adolescence. Il peut s'agir soit d'une atteinte musculaire avec une perte progressive de la force qui peut aussi être associée à une ataxie, soit d'une atteinte plutôt psychiatrique.

D) MODELES ANIMAUX

A ce jour, aucun traitement n'existe pour les gangliosidoses à GM2. Les modèles animaux sont primordiaux pour d'une part, permettre de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et d'autre part, pour le développement de nouvelles thérapies avant d'éventuels tests en clinique. Il existe des modèles naturels (chat, chien) et des modèles générés par l'homme (souris).

1) Modèles de grande taille

Les modèles de grande taille sont des modèles naturels. Le modèle disponible en laboratoire est le modèle félin, mais des modèles canin et ovin ont également été décrits.

a) Chien

Plusieurs chiens de races différentes ont été décrits comme possiblement atteints d'une forme de gangliosidose à GM2 (Lawson and Martin, 2016). C'est le cas notamment d'un chien golden retriever ayant succombé vers l'âge de 15 mois. L'activité des hexosaminidases mesurée chez ce chien était très faible, même si la mutation n'a pu être identifiée (Yamato et al., 2002). Il a été mis en évidence dans une autre race une mutation décalante sur le gène

HEXB provoquant le développement d'une maladie de Sandhoff (Rahman et al., 2012). Plus récemment, une faiblesse musculaire a été retrouvée chez un chien de race mixte à l'âge de 10 mois. Cette faiblesse a progressivement évolué jusqu'à 13 mois, âge auquel le chien était incapable de se tenir debout. Des dosages enzymatiques ont révélé chez ce chien une baisse significative de l'activité des hexosaminidases A et B, accompagnée d'une accumulation de GM2 confirmant le diagnostic de maladie de Sandhoff (Kohyama et al., 2015).

b) Chat

Plusieurs chats ayant des mutations sur le gène *HEXB* ont été décrits. Les différentes mutations trouvées à ce jour sont répertoriées dans le tableau 3. D'un point de vue clinique, les signes de la maladie commencent entre 4 et 7 semaines avec un tremblement de la tête accompagné d'une ataxie et de crises d'épilepsie. La mort survient vers 6 mois alors qu'un chat normal vit environ 14 ans (Lawson and Martin, 2016). A la différence du chien, le modèle chat a été conservé (maintien de la lignée atteinte en laboratoire vétérinaire). Ce modèle est particulièrement intéressant, car il est proche de la maladie de Sandhoff humaine d'un point de vue phénotypique, biochimique et génétique. L'évolution de la maladie a été décrite en détail. Il a ainsi été montré que les chats sont incapables de se tenir debout à partir de 4,5 mois environ (Bradbury et al., 2017; McCurdy et al., 2015). Le profil d'accumulation des gangliosides GM2/GA2 se rapproche de la maladie humaine (Baek et al., 2009). De manière plus générale, le modèle félin a un cerveau présentant une complexité et une organisation proche du cerveau humain à la différence des modèles murins qui sont présentés plus loin (Griffin, 2002). En revanche, la gestation est longue et il est compliqué d'obtenir un grand nombre d'animaux si l'on compare à la souris. De plus, comme le chat a une durée de vie plus élevée que la souris, les études sont très longues. Ce modèle est cependant indispensable pour la validation des approches thérapeutiques nouvelles développées dans la maladie de Sandhoff.

Race de chat	Mutations <i>HEXB</i>
Domestique poils courts (Martin et al., 2004)	Inversion de 25 paires de bases provoquant un codon stop
Korat (Neuwelt et al., 1985)	Délétion d'une paire de base résultant en un codon stop dans l'exon 1 (absence de la chaîne β)
Domestique Japonais (Kanae et al., 2007; Yamato et al., 2008)	Substitution nucléotidique causant un codon stop aboutissant à une chaîne β tronquée
Burmese européen (Zeng et al., 2008)	Délétion de 15 paires de bases sur l'intron 11 entraînant une altération de l'épissage

Tableau 3 : Description des mutations présentes dans différents modèles de chats atteints de gangliosidose à GM2 (Lawson and Martin, 2016).

Différentes mutations ont été décrites et sont présentées dans ce tableau. Chez les chats domestiques *short-haired*, l'activité des hexosaminidases est de moins de 3%.

c) Mouton

Un modèle ovin a aussi été décrit. Il s'agit d'un modèle de maladie de Tay-Sachs ayant des signes cliniques évidents, accompagnés d'une augmentation de taille du cerveau. La maladie est due à une substitution au niveau de l'exon 11 du gène *HEXA* ovin aboutissant à une réduction significative de l'hexosaminidase A (Torres et al., 2010). Il s'agit d'un bon modèle de maladie de Tay-Sachs, sachant que le modèle murin obtenu par *knock-out* est imparfait pour une utilisation en laboratoire (début très tardif).

2) Modèles murins

Dans les années 1995, des modèles *knock-out* de souris Tay-Sachs et Sandhoff ont été générés parallèlement par deux équipes (Richard Proia aux Etats-Unis et Roy Gravel au Canada). A l'inverse de la pathologie humaine, ces deux modèles ont un phénotype d'évolution différente (Yamanaka et al., 1994 ; Sango et al., 1995; Phaneuf et al., 1996).

a) **Modèle Tay-Sachs**

Le modèle murin Tay-Sachs fut le premier modèle de gangliosidose à GM2 obtenu. Yamanaka *et al.* ont généré ce modèle par introduction d'une cassette néo au niveau de l'exon 8 du gène *Hexa* sur un fond murin 129sv. Ils ont montré une absence d'activité de l'hexosaminidase A associée à une accumulation progressive de ganglioside GM2 entre 1 et 6 mois, uniquement dans le SNC. Une atteinte neuropathologique a été mise en évidence dans certaines régions du SNC, comme le cortex cérébral et l'hypothalamus. En revanche, aucune détérioration motrice n'a été observée et les souris survivent plus de 12 mois (Yamanaka *et al.*, 1994). Au même moment, Phaneuf *et al.* ont développé un modèle murin par insertion d'une cassette néo au niveau de l'exon 11 du gène *Hexa* et obtenu des résultats similaires. En effet, le dosage enzymatique a montré que l'activité de l'hexosaminidase A est complètement abolie. Néanmoins, après un an de vie, ces souris n'ont montré aucune différence de poids, de comportement ou de reproduction par rapport à des souris contrôles malgré une légère accumulation de GM2 et des inclusions périnucléaires au niveau des neurones. Au niveau périphérique, ces souris n'ont montré aucune pathologie et aucune accumulation d'autres glycolipides n'est présente. La durée de vie de ces souris est identique à celle d'une souris normale (Phaneuf *et al.*, 1996). Néanmoins, il a été montré que ces souris développent des troubles du comportement locomoteur et des troubles de la vision, mais tardivement vers environ 1 an (Miklyaeva *et al.*, 2004).

Ces deux modèles suggèrent que le niveau de GM2 dans ce modèle progresse très lentement et donc qu'il existe une limite d'accumulation du GM2 pour déclencher toute la cascade pathologique de la maladie. Cependant, ces résultats sont assez surprenants, car il n'y a aucune activité de l'hexosaminidase A chez les souris Tay-Sachs. Il semble que ceci puisse s'expliquer par la présence d'une voie parallèle absente chez l'homme. En effet, chez la souris, le GM2 peut être transformé en GA2 par une sialidase murine. Ce GA2 est ensuite hydrolysé par l'hexosaminidase B (qui est fonctionnelle dans ce modèle) et transformé en LacCer qui va ensuite suivre la voie de dégradation classique jusqu'au céramide (Sango *et al.*, 1995) (figure 15). Ceci explique pourquoi le GM2 s'accumule beaucoup moins dans ce modèle qui mime donc plutôt un modèle tardif (adulte) de la maladie (Miklyaeva *et al.*, 2004).

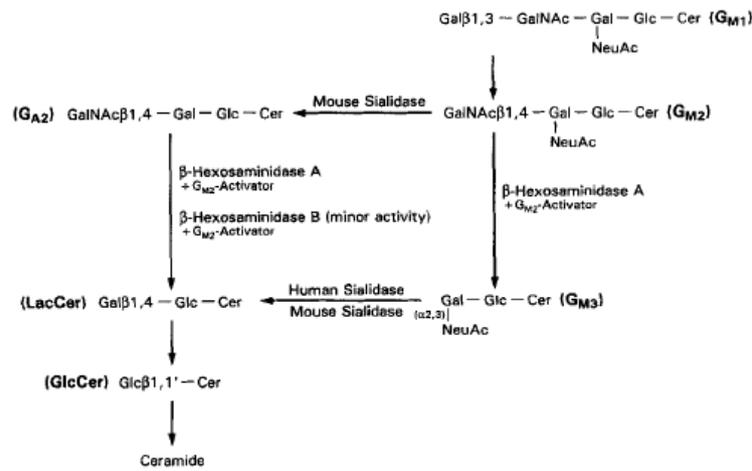


Figure 15 : Voie de dégradation des gangliosides illustrant les différences entre l'homme et la souris (Sango et al., 1995).

Chez la souris, la voie de dégradation principale du GM2 est l'hydrolyse en GA2 via la sialidase murine. Chez l'homme, tout le GM2 est dégradé par l'hexosaminidase A en GM3.

Par la suite, le rôle de la sialidase murine (aussi appelée neuraminidase 4) dans le catabolisme des gangliosides a été confirmé par la création d'un *knock out* Neu4 (Seyrantepe et al., 2008). De plus, la création d'un double *knock-out* Neu4/Hexa a abouti à une maladie beaucoup plus sévère que le *knock-out* Hexa. En revanche, la sévérité du phénotype n'est pas identique à celle du modèle Hexb^{-/-}, ce qui suggère que d'autres sialidases pourraient contribuer à cette voie parallèle (Seyrantepe et al., 2010).

b) Modèle Sandhoff

Deux modèles murins ont là encore été générés en parallèle par les équipes de Proia et Gravel. Phaneuf *et al.* ont développé un modèle Sandhoff grâce à l'insertion d'une cassette néo dans l'exon 2 du gène *Hexb* codant pour la chaîne β des hexosaminidases. Les souris homozygotes ont un comportement différent à partir de 10 semaines. L'activité enzymatique des hexosaminidases est effondrée. De plus, il y a une accumulation importante de GM2 au niveau du cerveau. Concernant le foie, il y a une forte accumulation de GA2 et en moindre quantité du GM2. Sur le plan neurologique, les souris sont faibles et moins réactives, elles présentent des tremblements et une ataxie. Environ 6 semaines après le début des symptômes, les souris perdent beaucoup de poids du fait de leur incapacité à s'alimenter et la mort survient peu après (Phaneuf et al., 1996). L'équipe de Proia a généré un modèle équivalent par insertion d'une cassette néo dans l'exon 13 du gène *Hexb*. Une détérioration progressive a été observée dès 3 mois après la naissance jusqu'à environ 5 mois, moment où leur état ne leur permet plus de survivre. D'un point de vue biochimique, une accumulation de GM2 est

observée dans le SNC, ainsi que dans les organes périphériques. Dans le SNC, une surcharge neuronale est observée (Sango et al., 1995). Ces deux modèles sont identiques et ils miment assez bien la maladie humaine (contrairement à la maladie de Tay-Sachs). Ils ont d'ailleurs été largement utilisés pour mieux comprendre les cascades pathogènes des gangliosidoses à GM2 (chapitre III), ainsi que pour le développement de traitements innovants (chapitre IV).

III. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE SANDHOFF

Comme nous l'avons évoqué précédemment (chapitre I), les mécanismes reliant l'accumulation d'un substrat et les cascades pathogènes aboutissant au phénotype clinique ne sont pas entièrement connus dans les maladies lysosomales, mais ils commencent à être décryptés. Il semble que plusieurs voies soient impliquées. L'accumulation de substrats au niveau du lysosome provoque, d'une part des dérégulations cellulaires et d'autre part, une surcharge secondaire. Ces événements auraient pour conséquence de modifier l'expression des gènes et d'altérer les tissus concernés, aboutissant à la mort cellulaire (figure 16). Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes conséquences de l'accumulation du GM2 connues à ce jour et pouvant expliquer la mort cellulaire.

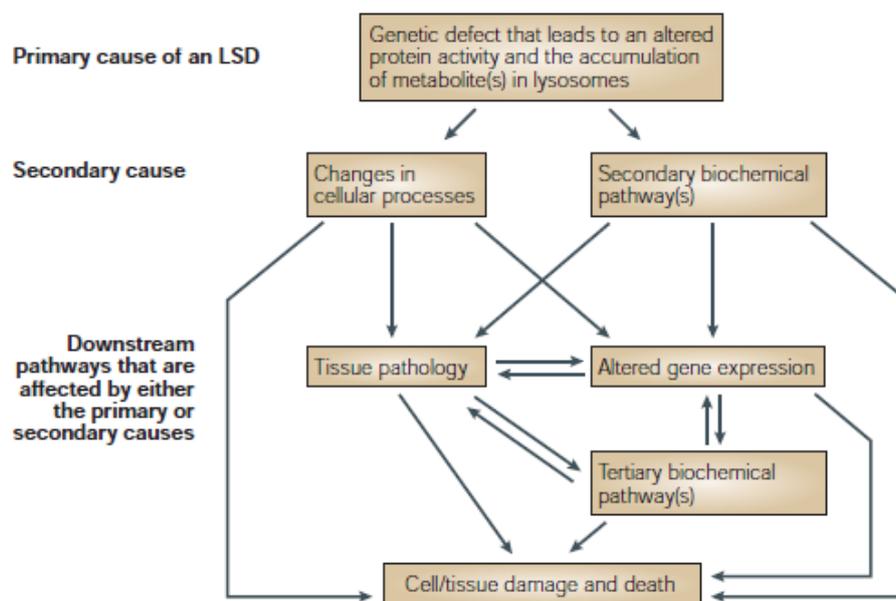


Figure 16 : Possibles mécanismes impliqués dans la pathogénèse des maladies lysosomales (Futerman and van Meer, 2004).

A) LA NEUROINFLAMMATION ET SES CONSEQUENCES

La maladie de Sandhoff est caractérisée par une neurodégénérescence sévère induite par une forte neuroinflammation (Jeyakumar et al., 2003; Myerowitz et al., 2002). Il s'agit d'un processus commun à plusieurs maladies lysosomales à atteinte neurologique. Il implique

la participation des cellules neuronales et gliales, ainsi que des médiateurs cellulaires qu'elles produisent. La figure 17 schématise les différentes étapes entre le lysosome défectueux et la mort neuronale. Tout d'abord, la neuroinflammation associée avec les maladies de surcharge lysosomale peut être initiée d'une part, par la perturbation d'une fonction du lysosome et d'autre part, par l'accumulation d'inclusions lysosomales. Cela déclenche l'activation et/ou la libération des DAMP (*damage-associated molecular pattern*). Les DAMP activent les cellules gliales avoisinantes résultant en une prolifération abondante, et une activation des voies de signalisation de l'inflammation. Les cellules gliales activées vont produire des chemokines, des cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation. La cytotoxicité de l'environnement va aboutir à une perte neuronale et à une nouvelle libération de DAMP, ce qui va amplifier et perpétuer le phénomène de neuroinflammation.

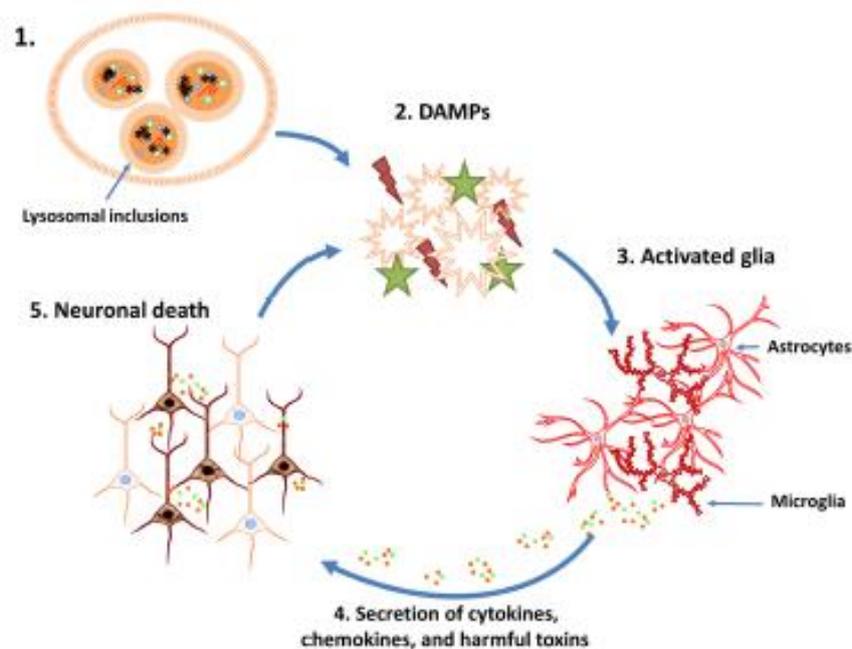


Figure 17 : Cycle potentiel provoquant la mort neuronale dans les MSL (Bosch and Kielian, 2015).

1) Activation microgliale

La principale composante de la neuroinflammation est l'activation microgliale. La microglie est composée de cellules dérivées de la moelle osseuse qui sont sensibles aux signaux de stress, aussi appelés DAMP via les récepteurs Toll-like (Heneka et al., 2015). Une fois activée, la microglie va libérer des cytokines et des chimiokines qui vont recruter et activer des cellules immunitaires provenant de la périphérie afin de protéger les cellules

touchées. Ces médiateurs ont des effets négatifs s'ils sont induits en trop grande quantité. Ils peuvent en effet altérer la fonction de leur cellule cible et donc provoquer une mort neuronale (Bosch and Kielian, 2015). Dans le cas des maladies lysosomales, les lysosomes altérés libèrent des hydrolases et des métabolites dans le cytoplasme qui peuvent être considérés comme des DAMP (Futerman and van Meer, 2004).

Concernant la maladie de Sandhoff, la mort neuronale par apoptose a été confirmée dans le modèle murin et chez les patients Sandhoff (Huang et al., 1997). Chez la souris, il a été montré que cette perte neuronale a lieu à partir de 3 mois et essentiellement dans la moelle épinière, le tronc cérébral et le thalamus. Par ailleurs, une activation microgliale a été mise en évidence autour des vaisseaux sanguins à partir de 2 mois, suivie d'une expansion vers le parenchyme, le tronc cérébral et la moelle épinière à 3 et 4 mois chez la souris *Hexb*^{-/-} (Wada et al., 2000). Une atténuation de cette activation microgliale, ainsi qu'une amélioration du phénotype clinique sont notées chez des souris ayant reçu une greffe de moelle osseuse saine. Ces résultats indiquent que l'hyperactivation de la microglie est une composante importante dans l'évolution de la maladie qui précède la mort neuronale.

Des recherches ont été effectuées sur le rôle des cellules mononucléées provenant de la circulation sanguine périphérique (PBMC) dans cette activation microgliale. Un récepteur de chimiokines appelé CCR2 est connu pour être impliqué dans l'infiltration des PBMC à l'intérieur du SNC (Izickson et al., 2000). De plus, son principal ligand, la protéine chimiotactique 1 (MCP-1) est surexprimée dans d'autres maladies neurodégénératives, comme dans la maladie d'Alzheimer (El Khoury et al., 2007). Afin de voir si CCR2 joue un rôle dans la progression de la maladie, Kyrkanides *et al.* ont créé un double *knock-out* *Hexb*^{-/-} x *Ccr2*^{-/-}. Ce nouveau modèle a montré une baisse de l'activation microgliale et une amélioration du phénotype clinique par rapport aux souris *Hexb*^{-/-}, même si l'apoptose n'a pas été atténuée. Ces résultats suggèrent que l'infiltration des cellules mononucléées amplifie l'activation microgliale et contribue donc à la physiopathologie de la maladie (Kyrkanides et al., 2008).

Par ailleurs, l'activation microgliale n'est pas la seule composante de la neuropathologie. En effet, des analyses faites chez des patients Sandhoff et des souris *Hexb*^{-/-} ont montré une élévation anormale de GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), un marqueur principal des astrocytes durant la progression de la maladie (Jeyakumar et al., 2003; Myerowitz et al., 2002). Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes dans le cerveau ;

elles permettent de synchroniser le métabolisme, la libération des neurotransmetteurs et régulent le milieu extracellulaire. Comme la microglie, les astrocytes une fois activés peuvent libérer des chimiokines. L'astrocytose est provoquée par une atteinte neuronale et elle permet de préserver les neurones. Cependant, une suractivation peut survenir dans les maladies neurodégénératives et elle est néfaste pour le SNC. En effet, en cas d'activation trop importante, des chimiokines sont libérées, ainsi que des ROS (*reactive oxygen species*) et d'autres molécules toxiques. Ceci va aboutir à une augmentation de la réaction neuroinflammatoire (Aschner, 1998; Bosch and Kielian, 2015).

Une lignée cellulaire d'astrocytes a été créée à partir de souris Sandhoff de manière à mieux analyser leur expansion anormale suite à une accumulation de GM2. Il a ainsi été montré que la voie de signalisation ERK (*extra-cellular signal-regulated kinase*) est suractivée dans ce modèle et que cette activation est dépendante du niveau d'accumulation de GM2 (Kawashima et al., 2009). Ceci pourrait effectivement s'expliquer par l'accumulation de GA2/GM2, car il semblerait que les gangliosides aient un impact sur les voies de signalisation induisant la neuritogénèse (Prinetti et al., 1999). Il a aussi été montré que la sphingosine-1-phosphate (SP1) est impliquée dans la prolifération gliale dans le modèle Sandhoff (Wu et al., 2008). En effet, les gènes impliqués dans cette voie seraient suractivés et une invalidation de ces gènes provoque une baisse de la prolifération gliale.

La microgliose et l'astrocytose participent donc clairement à la progression de la maladie. Un modèle mécanistique a été développé récemment, avec deux phases dans la maladie de Sandhoff. Chez la souris, il a été montré qu'il y a d'abord une activation microgliale initiale dès 60 jours suivie d'une activation astrogliale plus tardive, aboutissant à une mort neuronale caspase dépendante (Hooper and Igdoura, 2016).

2) Suractivation des marqueurs de l'inflammation

Certaines cytokines telles que TNF α (*tumor necrosis factor*), TGF β (*transforming growth factor*) et IL1 β (interleukine 1) sont impliquées dans l'induction de l'inflammation. Jeyakumar *et al.* ont mesuré leur expression à différents stades cliniques de la maladie dans des cerveaux de souris Sandhoff. Ils ont ainsi montré une surexpression commençant à la 8ème semaine pour IL1 β et TNF α et augmentant progressivement au fur et à mesure de

l'évolution de la maladie. En revanche, pour TGF β , il y a une élévation significative seulement à un stade tardif de la maladie (Jeyakumar et al., 2003; Wada et al., 2000). Ces cytokines sont produites par les cellules microgliales, les astrocytes, les cellules T et les macrophages. Elles sont le résultat d'une réaction inflammatoire induite par la microglie et contribuent à l'amplification de la réponse inflammatoire.

TGF β est une cytokine immunosuppressive. Elle agit de manière à inhiber l'action des autres cytokines, telles que IL1 β et TNF- α , ce qui pourrait expliquer pourquoi la suractivation de TGF β survient en dernier. Elle serait produite tardivement en réponse à la surexpression des autres cytokines, mais son action ne semble plus pouvoir être efficace à ce stade. A niveau trop élevé, toutes ces cytokines sont délétères pour les cellules. Ces dérégulations ont été décrites aussi dans d'autres maladies neurologiques, comme dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose en plaque (Martiney et al., 1998; McGeer and McGeer, 2002; Perry et al., 1998).

Dans le cas de la maladie de Sandhoff, Abo-Ouf *et al.* ont créé un double *knock-out* Hexb-/- x TNF α -/- de manière à déterminer le rôle de TNF α dans la neurodégénérescence et l'évolution de la maladie. Ils ont montré une amélioration des signes cliniques chez les souris double KO, ainsi qu'une diminution de l'astrogliose et de la mort neuronale, suggérant un effet délétère de TNF α sur l'évolution de la maladie. En revanche, TNF α ne semble pas avoir un rôle majeur sur la microglie, car aucun changement à ce niveau n'a été mis en évidence chez ces souris. TNF α aurait donc une action sur la neurodégénérescence probablement via l'activation de l'astrogliose. Abo-Ouf *et al.* ont exploré comment TNF α est impliqué dans l'astrogliose. Ils ont mis en évidence une augmentation du niveau de phosphorylation de STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) dans les astrocytes chez les souris Hexb-/- (Abo-Ouf et al., 2013). Sachant qu'il a été montré que le récepteur de TNF α , TNFR, peut s'associer avec JAK2 (Janus Kinase 2) de manière constitutive pour former un complexe capable d'activer des molécules dont STAT3 (Guo et al., 1998; Pincheira et al., 2008), ils en ont déduit que la phosphorylation de STAT3 dans les souris Sandhoff était due à l'élévation de TNF α . Par ailleurs, la diminution de la phosphorylation de STAT3 dans le double *knock-out* a confirmé ces résultats. Comme cette baisse de phosphorylation est associée à une baisse de la mort neuronale et de l'astrogliose, ils en ont conclu que l'activation astrogliale ne se faisait pas directement, mais qu'elle passerait par la voie JAK2-STAT3. D'autres investigations sont nécessaires pour savoir comment cette voie agit sur l'astrogliose et si d'autres voies sont impliquées.

Les cellules venant de la périphérie contribuent aussi à l'expansion de la microglie au niveau du SNC, ceci après leur migration vers le SNC. Ce phénomène impliquerait la chimiokine MIP-1 α (*macrophage inducer protein-1 α*) qui est connue pour jouer un rôle dans l'extravasation des leucocytes (Wu and Proia, 2004). Chez les souris Sandhoff, MIP-1 α est surexprimée au niveau du cerveau (Utz et al., 2015; Wu and Proia, 2004). De façon à identifier le rôle de MIP-1 α dans la progression de la maladie, un double *knock-out* Hexb^{-/-} x MIP-1 α ^{-/-} a été créé. Un allongement de la survie, ainsi qu'une amélioration du phénotype locomoteur ont été mis en évidence. On note également une baisse de la mort neuronale à 4 mois accompagnée d'une atténuation de l'expansion microgliale, expliquant ainsi l'augmentation de la survie et l'amélioration des fonctions neurologiques des souris. Ces résultats ont confirmé l'implication de MIP-1 α dans la progression de la maladie (Wu and Proia, 2004).

La figure 18 résume l'implication des cellules périphériques dans la neuroinflammation présente dans les maladies lysosomales et notamment la maladie de Sandhoff. Normalement, les monocytes passent la barrière hémato encéphalique (BHE) et vont directement au niveau du parenchyme. En cas de dommage, des cytokines et des chemokines sont générées par la microglie suractivée et elles vont induire une importante migration transendothéliale des monocytes du sang vers les régions périvasculaires. Ces cellules vont migrer du parenchyme vers les endroits où les dommages sont importants et comme ces cellules sont déficientes, elles vont à leur tour sécréter des cytokines proinflammatoires induisant un peu plus de neuroinflammation et donc de mort cellulaire.

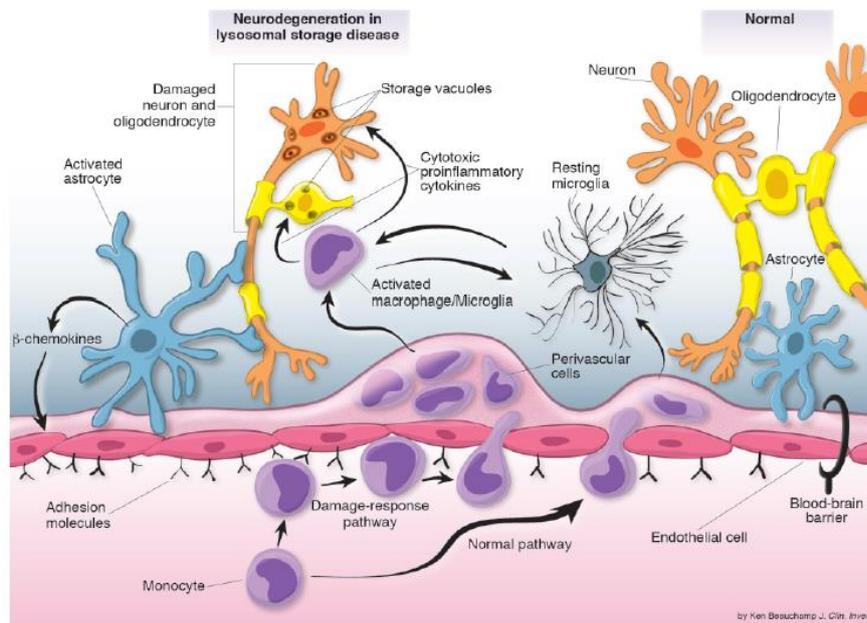


Figure 18 : Voies pathologiques induisant une neurodégénérescence dans les maladies lysosomales (Wu and Proia, 2004).

3) Altération de la sensibilité des neurones

Nous avons vu qu'il y a une forte augmentation de l'expression de $TNF\alpha$ chez les souris Sandhoff, due notamment à l'activation microgliale. $TNF\alpha$ n'est pas seulement connue pour son implication dans l'astrogliose, mais aussi dans l'excitotoxicité des neurones via la libération excessive de glutamate. Il s'agit d'un processus neurologique qui implique l'excès de stimulation des neurones induisant une forte toxicité des niveaux de Ca^{2+} au niveau intracellulaire (Takeuchi et al., 2006). Concernant l'implication de $TNF\alpha$, il a été démontré qu'il favorise le recrutement de récepteurs AMPA nommés GLUR1 au niveau de la membrane cellulaire (Wang and Qin, 2010). Chez des rats ayant une lésion hypoxique-ischémique, la mort neuronale est induite via les récepteurs GLUR1 et cette activation a lieu par le biais de la pentraxine neuronale (NP1) (Hossain, 2008). Compte tenu du lien entre NP1 et $TNF\alpha$ via le récepteur GLUR1, l'équipe de Hooper a testé si NP1 pouvait jouer un rôle dans la maladie, d'autant que GLUR1 est dérégulé négativement chez les souris Sandhoff (Hooper and Igdoura, 2016). Ils ont montré une augmentation de l'expression d'une forme de NP1 chez les souris *Hexb*^{-/-}. Un double *knock-out* *Hexb*^{-/-} x *NP1*^{-/-} présente une amélioration de la survie et du phénotype locomoteur suggérant l'implication de NP1 dans la progression de la maladie. L'excitotoxicité des neurones au niveau de l'hippocampe est normale pour le

double KO contrairement aux souris Sandhoff contrôles. En revanche, presque aucune amélioration n'a été trouvée au niveau de l'astrocytose et de la microglie. Ces résultats indiquent que NP1 favorise la mort neuronale et la progression de la maladie par le biais d'une dérégulation excitatrice des neurones et non par la neuroinflammation. Un modèle d'implication de NP1 dans la maladie de Sandhoff a été dressé par cette équipe. Il semblerait que dans des synapses normales, NP1 et NP2 (attaché à la membrane par NPR) se lient et forment un cluster avec AMPAR au niveau de la synapse. Dans la maladie de Sandhoff, NP1 est coupé au niveau C-terminal et ne peut plus lier AMPAR. Ceci provoque une diminution du nombre d'AMPA au niveau synaptique et une réduction dans les courants AMPA, provoquant un déclin neuronal. La portion clivée de NP1 chez les souris Sandhoff pourrait aussi agir comme antagoniste des multimères de NP1, réduisant encore plus le regroupement des AMPAR au niveau des synapses (figure 19) (Hooper et al., 2016).

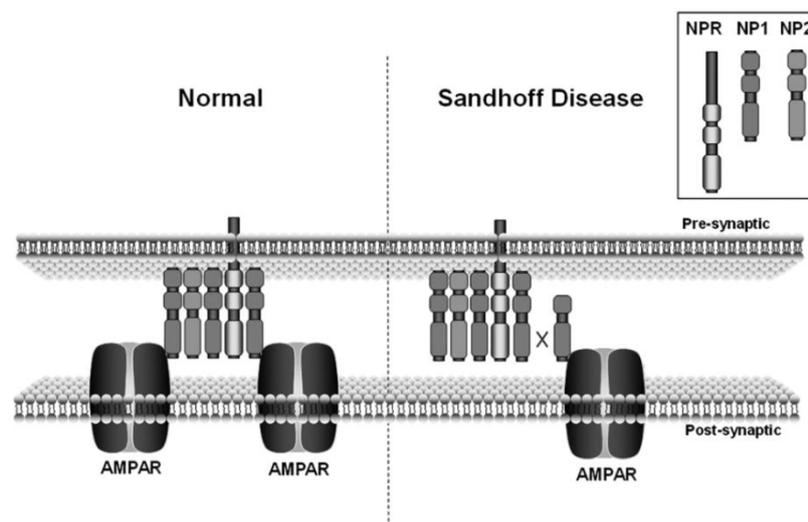


Figure 19 : Modèle d'action de la pentraxine neuronale dans la maladie de Sandhoff (Hooper et al., 2016).

B) ALTERATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Comme nous l'avons vu, la forte réaction inflammatoire chez les souris Sandhoff est due à l'activation microgliale. Selon Yamaguchi, il y aurait dans la maladie de Sandhoff une réponse autoimmune induite par l'accumulation de GA2 et de GM2 et augmentant encore plus l'activation microgliale (Yamaguchi et al., 2004). En effet, à un âge tardif, des anticorps anti-GA2 et anti-GM2 ont été retrouvés en grande quantité dans le sérum des souris Hexb^{-/-}. GA2

et GM2 serviraient d'antigènes sur lesquels les anticorps se fixeraient à la surface des neurones en vue d'induire l'activation microgliale via le récepteur du fragment Fc γ des immunoglobulines (FcR γ). Ainsi, ces complexes anticorps/gangliosides seraient importants pour l'induction de l'activation microgliale via le récepteur FcR γ chez les souris Sandhoff.

De plus, il a été montré chez les souris Sandhoff que GM2 et GA2 s'accumulent aussi au niveau du thymus. Ce phénomène est associé avec une altération de la sélection des NKT (*natural killer T*) (Zhou et al., 2004). Le thymus est un lieu de différenciation et de maturation des lymphocytes T et les NKT sont des lymphocytes T possédant un récepteur TCR particulier impliqué essentiellement dans l'autoimmunité. Leur différenciation a lieu dans le thymus à partir de thymocytes précurseurs. Zhou *et al.* ont ainsi montré une réduction très importante du nombre de variants NKT chez les souris Sandhoff causée par l'absence de présentation du glycosphingolipide iGb3 au thymocyte, nécessaire à la différenciation des NKT (Zhou et al., 2004). Les souris Sandhoff ont donc une altération au niveau du thymus du fait de la dérégulation du métabolisme des glycosphingolipides, mais l'impact sur la physiopathologie est toujours inconnu à ce jour.

Plus récemment, Kanzaki *et al.* ont exploré les altérations du thymus. Il a ainsi été montré une involution du thymus chez les souris Sandhoff à un stade tardif de la maladie (Kanzaki et al., 2010). Cette involution s'expliquerait par une mort massive des cellules dans le thymus à cause d'évènements apoptotiques et elle est probablement responsable de la réponse autoimmune (Matsuoka et al., 2011a). En revanche, la cause exacte de cette mort cellulaire n'est pas déterminée, puisque l'accumulation de GM2 est observée à des stades précoces de la maladie, alors que l'involution du thymus s'observe à des stades tardifs. D'autres facteurs doivent alors contribuer à l'involution du thymus. L'impact exact de ces altérations est encore méconnu, mais il est fort probable qu'ils soient impliqués dans la progression tardive de la maladie.

C) ALTERATION DE L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM ET STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Le calcium joue un rôle primordial dans le bon fonctionnement des neurones, car il permet la libération des neurotransmetteurs à court et long terme. La régulation de sa concentration au niveau du cytosol implique des pompes voltage ou ligand dépendantes qui sont présentes sur la membrane plasmique et permettent l'influx de Ca²⁺ externe. Il est

commun dans les maladies neurodégénératives qu'il y ait une altération de l'homéostasie du calcium. Son principal lieu de stockage au niveau des neurones est le réticulum endoplasmique (RE) (Henkart, 1980). Le Ca^{2+} est libéré du RE grâce à deux canaux ioniques présents sur la membrane du RE : le récepteur de la ryanodine RyaR et le récepteur de l'inositol triphosphate IP_3R (Ginzburg et al., 2004). A l'inverse, le Ca^{2+} peut être apporté à l'intérieur du RE grâce à la pompe SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*) (Misquitta et al., 1999).

Il a été montré une altération de l'homéostasie du calcium via la pompe SERCA chez les souris Sandhoff. En effet, même si la pompe SERCA est exprimée normalement au niveau ARNm et protéine, une baisse significative de son activité a été démontrée, probablement due à l'accumulation de GM2 (Pelled et al., 2003). En effet, le GM2 pourrait moduler la V_{max} (vitesse maximale) de la pompe. Ainsi, en cas d'accumulation de GM2, la pompe SERCA est moins efficace et empêche le calcium d'entrer dans le RE. En conséquence, le calcium reste à un niveau élevé dans le cytosol des neurones, ce qui engendre une sensibilité des neurones au stress, provoquant la mort neuronale par apoptose via la voie apoptotique mitochondriale (Ginzburg et al., 2004). Au niveau du RE, l'apport en Ca^{2+} est trop faible, ce qui de la même façon provoque un stress ayant comme effet possible une absence de la synthèse protéique aboutissant à la mort neuronale par apoptose via la caspase 12 (figure 20) (Ginzburg et al., 2004). Il est à noter que si l'accumulation du GM2 perturbe la pompe SERCA au niveau du RE, cela signifie qu'il y a une fuite de GM2 en dehors du lysosome dans les conditions pathologiques.

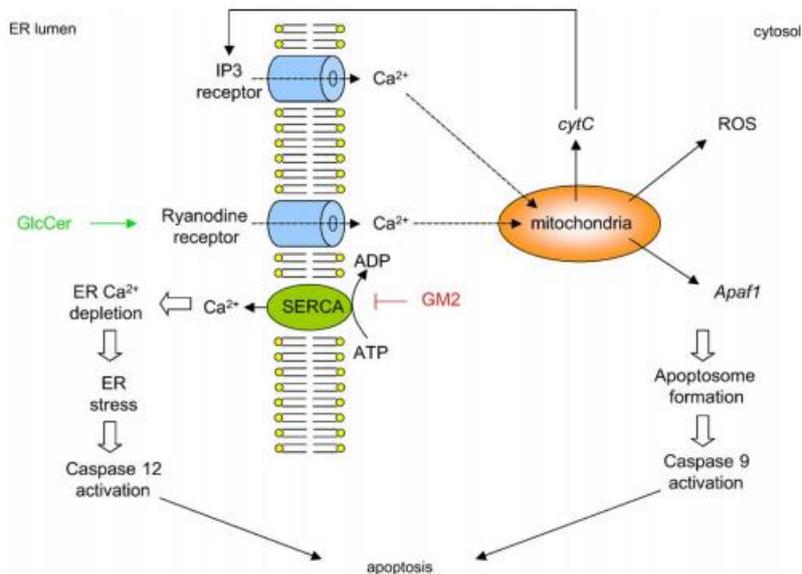


Figure 20 : Possible lien entre les sphingolipides et l'apoptose dans les gangliosidoses à GM2 et la maladie de Gaucher (Ginzburg et al., 2004).

Le ganglioside GM2 provoque une baisse d'activité de la pompe SERCA, induisant une diminution de Ca^{2+} au niveau du RE. Cette déplétion induit un stress qui provoque l'apoptose. Un autre sphingolipide, le GlcCer, connu pour s'accumuler dans la maladie de Gaucher, induit une activité trop importante du récepteur RyaR. Cela a pour conséquence d'augmenter la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol, ce qui induit une activation de l'apoptose par la voie mitochondriale.

D) ACCUMULATIONS SECONDAIRES ET AUTOPHAGIE

Dans les maladies lysosomales, il a été montré que lorsque des macromolécules non dégradées s'accumulent au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes, une accumulation secondaire de protéines et/ou de lipides a lieu. Ceci est dû à un dysfonctionnement généralisé du lysosome causé par l'accumulation primaire (Lamanna et al., 2011; Prinetti et al., 2011; Walkley and Vanier, 2009) et qui entraîne des altérations du réseau lysosome/autophagosome et lysosome/endosome favorisant une accumulation secondaire (Nixon, 2007; Nixon et al., 2008). Ces accumulations secondaires ont aussi été décrites récemment dans la maladie de Sandhoff.

1) Accumulations secondaires lipidiques

Des accumulations secondaires de lipides ont été mises en évidence dans diverses maladies lysosomales, comme la maladie de Gaucher, de Niemann-Pick de type C et les mucopolysaccharidoses où il y a une accumulation secondaire de gangliosides est observée (Futerman and van Meer, 2004). Dans le cas de la maladie de Sandhoff, il a été montré récemment qu'un lipide nommé bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP) s'accumule dans le cerveau humain, mais aussi dans les modèles murin et félin. Une accumulation similaire est présente dans la gangliosidose à GM1 (Akgoc et al., 2015). Le BMP est un glycérophospholipide chargé négativement présent essentiellement au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes. Sa conformation inhabituelle lui permet d'être résistant à de nombreuses phospholipases, favorisant sa stabilité dans les endosomes tardifs. De plus, il a été montré que le BMP stimule la dégradation des glycosphingolipides en coordination avec les saposines (Gallala et al., 2011).

Le mécanisme expliquant l'accumulation de BMP dans la maladie de Sandhoff n'est pas connu à ce jour. Akgoc *et al.* avait émis l'hypothèse que cette accumulation pourrait être liée à l'augmentation de taille des lysosomes dans la maladie de Sandhoff, mais l'accumulation de BMP n'est pas proportionnelle à l'augmentation des lysosomes et elle n'est pas présente dans toutes les maladies lysosomales. Une autre hypothèse était que l'accumulation secondaire pouvait être due à l'inflammation induite par la maladie, mais un double *knock-out* avec un marqueur de l'inflammation a démenti cette hypothèse. L'accumulation secondaire serait donc plus probablement liée à l'accumulation primaire de gangliosides (Akgoc et al., 2015). L'augmentation de BMP a été plus récemment confirmée au niveau du foie de souris Sandhoff et elle s'accompagne d'une élévation de cholestérol esters (CE) (Lecommandeur et al., 2017). Il a été suggéré que cette accumulation était due à une altération du système endosomal, telle qu'une anomalie au niveau de la fusion lysosome/endosome. Par ailleurs, Lecommandeur *et al.* ont montré une augmentation de lysophosphatidylcholine et de céramide au niveau du foie des souris Sandhoff. Il y a donc une dérégulation du métabolisme lipidique dans cet organe périphérique affecté dans la maladie de Sandhoff (hépatomégalie). L'impact de ces altérations du métabolisme lipidique au niveau physiologique chez les souris Sandhoff est mal connu et d'autres investigations sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques.

2) Accumulations secondaires similaires à d'autres maladies neurodégénératives

Keilani *et al.* ont analysé chez les souris Sandhoff des protéines neuropathogènes connues pour s'accumuler dans la maladie d'Alzheimer. Ils ont ainsi observé une accumulation d' α -synucléine et de plaques amyloïdes $\alpha\beta$ dans certaines régions du cerveau chez les souris Sandhoff (Keilani et al., 2012). Ils ont montré que ces accumulations avaient lieu au niveau du réseau endosome/lysosome/autophagosome suggérant une altération de la dégradation de ces protéines par les lysosomes provoquant un défaut de l'autophagie. Bien que le mécanisme exact de formation des plaques amyloïdes dans les processus de neurodégénérescence ne soit pas connu à ce jour, il a été montré à plusieurs reprises que cette accumulation était toxique pour les neurones dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Il a donc été suggéré que l'accumulation de gangliosides pouvait provoquer une accumulation secondaire de protéines neurotoxiques au niveau des neurones.

L'équipe de Suzuki a confirmé plus récemment que les patients et les souris Sandhoff avaient une accumulation d' α -synucléine dans le SNC (Suzuki et al., 2016). L' α -synucléine est un substrat dégradé lors de l'autophagie, qui est connu pour s'accumuler dans les neurones lorsque le processus d'autophagie est altéré (Menzies et al., 2015). Par la création d'un modèle murin double *knock-out* *Hexb*^{-/-} x *α -syn*^{-/-}, l'équipe de Suzuki a confirmé la forte implication de l' α -synucléine dans la physiopathologie de la maladie en montrant une diminution légère, mais significative de la perte neuronale chez les souris double KO, suggérant un effet délétère de l'accumulation d' α -synucléine. De plus, ils ont montré une augmentation du nombre d'autophagosomes chez les souris Sandhoff, associée à une altération du système d'ubiquitination du protéasome, ainsi qu'à un dysfonctionnement des mitochondries (Suzuki et al., 2016), des anomalies qui sont généralement associées à un défaut de l'autophagie (Osellame et al., 2013; de Pablo-Latorre et al., 2012). Ces résultats confirment qu'il existe un défaut d'autophagie chez les souris Sandhoff, aggravé par l'accumulation d' α -synucléine. Les mécanismes précis qui induisent des altérations lors du processus autophagique restent à découvrir, mais il en résulte des accumulations secondaires contribuant à la dérégulation des fonctions cellulaires.

E) ALTERATION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE EN FER

Le fer joue un rôle important dans les maladies à atteinte neurologique, telles que la maladie d'Alzheimer où il est présent en très grande quantité (Thomas and Jankovic, 2004). Même si les mécanismes ne sont pas clairs, l'excès de fer semble avoir un rôle sur la neurodégénérescence. De manière surprenante, chez des souris Sandhoff de 4 mois, il a été montré une baisse de 40% de la quantité de fer dans le cerveau, accompagnée d'une baisse de la concentration de la transferrine et d'une hausse du nombre des récepteurs CD71 de la transferrine (Jeyakumar et al., 2009a). Les mêmes observations ont été faites dans les organes périphériques et notamment au niveau du foie. Cette diminution du fer pourrait s'expliquer par un système endosome/lysosome dysfonctionnel. Une autre explication pourrait être que les souris Sandhoff s'alimentent moins à 4 mois (âge où leur maladie est très avancée), aboutissant à une teneur en fer plus faible. Ce changement de concentration en fer a une conséquence sur la source principale d'énergie des mitochondries. En effet, cette baisse du fer s'accompagne d'un défaut au niveau des mitochondries dans le cerveau des souris Sandhoff entraînant une augmentation du stress oxydatif au niveau cellulaire. Sachant que le fer est essentiel pour le transport d'oxygène, d'électrons et pour d'autres fonctions cellulaires, ceci pourrait expliquer le défaut d'activité des mitochondries. De plus, le fer est essentiel au niveau neuronal pour la biosynthèse des neurotransmetteurs, la formation de la myéline et pour le métabolisme oxydatif. C'est pourquoi un déficit en fer peut induire des dysfonctionnements cognitifs. La baisse du fer chez les souris Sandhoff n'est à ce jour pas expliquée, mais les conséquences en sont multiples au niveau de l'homéostasie cellulaire et elle pourrait donc avoir un rôle dans la physiopathologie de la maladie, notamment au niveau du SNC.

Au cours des dernières années, de nombreuses équipes ont donc étudié les altérations biochimiques et cellulaires impliquées dans la physiopathologie de la maladie de Sandhoff. A ce stade, les connaissances sont de plus en plus importantes, mais les mécanismes exacts des cascades pathogènes et leurs conséquences restent à déterminer avec plus de précision. Une meilleure connaissance des mécanismes de ces maladies peut clairement permettre, d'une part d'ouvrir la voie à des traitements innovants, et d'autre part, de trouver de nouveaux biomarqueurs facilitant le suivi de l'efficacité de ces traitements.

IV. APPROCHES THERAPEUTIQUES

Au cours des 25-30 dernières années, de nombreuses thérapies ont été développées pour les maladies lysosomales. Cependant, à ce jour, il n'y a pas de traitement réellement efficace pour les patients atteints d'affections touchant principalement le SNC, comme les gangliosidoses à GM2. Ceci est principalement dû à la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE) qui empêche les molécules thérapeutiques administrées par voie intraveineuse de pénétrer dans le cerveau. Cette barrière est à l'interface entre le sang et le cerveau et elle protège ce dernier de l'environnement extérieur. Elle est composée d'une couche de cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées. Du côté du parenchyme, différentes cellules s'associent à la BHE (Figure 21). Il s'agit d'une part des péricytes qui sont distribués de manière discontinue sur la longueur de la BHE et qui sont inclus dans la membrane basale et d'autre part, des pieds des astrocytes qui permettent de faire le lien entre la barrière et les neurones. Les cellules endothéliales possèdent un certain nombre de transporteurs permettant le passage de quelques molécules essentielles, comme le glucose et les acides aminés (Figure 21a). Il y a une communication bilatérale entre les pieds astrocytaires et les cellules endothéliales par le biais de récepteurs et transporteurs. La communication implique plusieurs voies de signalisation, qui sont essentielles pour le maintien de la BHE (Figure 21b) (Abbott et al., 2006, 2010).

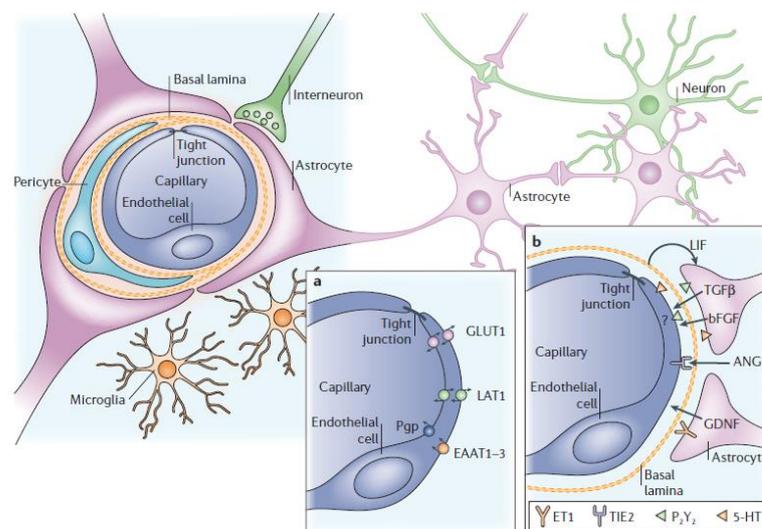


Figure 21 : Constituants cellulaires de la BHE (Abbott et al., 2006).

a) GLUT1 : transporteur du glucose, LAT1 : *large neutral amino acid transporter 1*, EAAT1-3 : transporteur d'acides aminés. b) ANG1 (*angiopoietin*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), ET1 (*endothelin 1*), GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic*), LIF (*leukaemia inhibitory factor*), TGF- β (*transforming growth factor*).

La BHE est une véritable barrière empêchant les agents pathogènes de pénétrer dans le cerveau tout en laissant passer quelques molécules essentielles pour le bon fonctionnement du SNC. Sa constitution rend le SNC difficile d'accès pour les protéines thérapeutiques. Dans cette partie, nous allons donc présenter les différentes stratégies thérapeutiques développées dans les maladies lysosomales et nous verrons pour chacune d'elles où en est la recherche concernant le traitement spécifique des gangliosidoses à GM2. La figure 22 résume les différentes approches envisageables. Les thérapies moléculaires ont jusqu'ici été les plus utilisées dans les maladies lysosomales. La plus connue est la thérapie substitutive qui consiste à apporter l'enzyme manquante. Une autre possibilité est l'utilisation d'inhibiteurs de la biosynthèse des substrats, qui bloquent la synthèse du composé qui s'accumule. Dans le cas où la mutation provoque une instabilité de l'enzyme, ce qui l'empêche d'atteindre le lysosome, une stratégie utilisant des molécules chaperonnes peut être utilisée. La thérapie cellulaire quant à elle consiste à apporter au sein de l'organisme des cellules saines qui vont permettre une synthèse in situ de l'enzyme manquante. Enfin, la thérapie génique, qui est largement explorée à l'heure actuelle dans des modèles animaux de maladies lysosomales, consiste à apporter un vecteur recombinant contenant la version normale du gène altéré, ceci afin d'infecter les cellules de l'organisme et de leur faire exprimer la protéine correspondante.

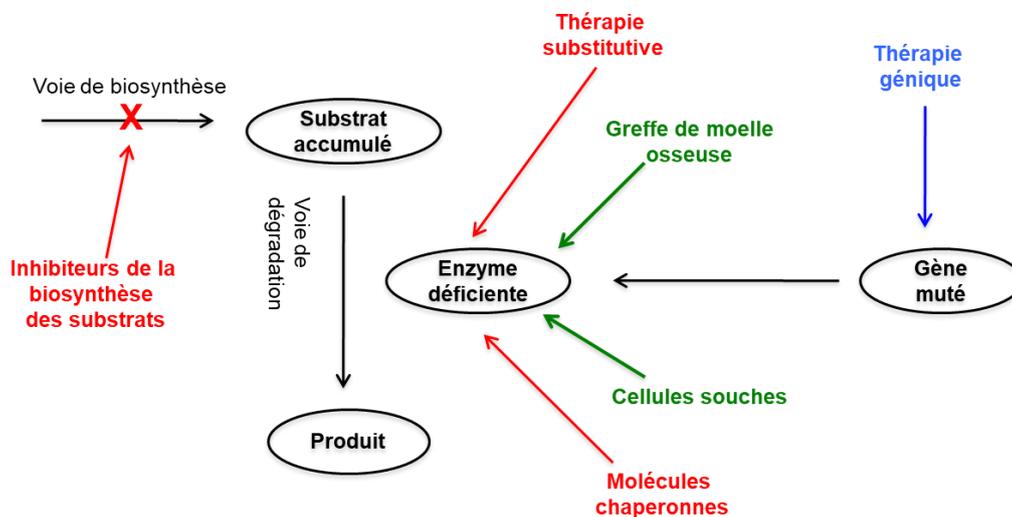


Figure 22 : Stratégies thérapeutiques pour les maladies lysosomales. Adapté à partir de (Futerman and van Meer, 2004).

A) THERAPIES MOLECULAIRES

1) Thérapie enzymatique de substitution

a) **Généralités**

Cette thérapie est actuellement la plus utilisée pour traiter les maladies lysosomales. Elle consiste à apporter de façon exogène l'enzyme qui est déficiente chez le patient. Il s'agit d'une enzyme recombinante obtenue par génie génétique qui va être recapté au niveau cellulaire par la voie de l'endocytose médiée notamment par le récepteur mannose-6-phosphate. Ce récepteur est présent sur de nombreux types cellulaires et il permet le recaptage des enzymes lysosomales possédant un résidu mannose-6-phosphate à leur surface (Kolter and Sandhoff, 2006). C'est au début des années 90 que cette stratégie thérapeutique a eu un premier succès dans la maladie de Gaucher de type 1. Pour cette première approche, la glucocérébrosidase avait été modifiée de façon à ce qu'elle expose des résidus mannose capables d'être recaptés par des récepteurs mannose présents au niveau des macrophages (qui sont les cellules cibles dans cette maladie). Cette approche basée sur l'administration intraveineuse hebdomadaire d'une enzyme modifiée (d'abord extractive, puis rapidement recombinante) a permis de réduire significativement les signes cliniques de la maladie (splénomégalie, thrombopénie, ...) chez les premiers patients traités (Barton et al., 1991). La mise sur le marché a eu lieu en 1991 par la firme Genzyme. Après cette réussite, la thérapie substitutive par perfusion intraveineuse a été testée dans d'autres maladies lysosomales. A ce jour, des thérapies sont en place pour les patients atteints de maladie de Fabry, de Pompe, de mucopolysaccharidose de type I, II, IV, VI et VII (Desnick and Schuchman, 2012). Cependant, plusieurs problématiques sont toujours à résoudre, notamment la réponse immunitaire qui peut limiter l'efficacité du traitement chez certains patients. Cette approche nécessite en effet des injections répétées et une dose importante d'enzyme recombinante. Le risque de réaction immunitaire est donc présent surtout chez les patients ayant une mutation aboutissant à une absence totale d'enzyme (exemple de la maladie de Pompe). Un point important est aussi le coût de cette thérapie qui génère une inégalité d'accès en fonction du pays où l'on vit. Enfin, une autre limite de cette approche est qu'elle ne permet pas de corriger le SNC (lorsque celui-ci est atteint) après une administration intraveineuse.

b) Essais dans la maladie de Sandhoff et dans d'autres maladies à atteinte neurologique

La thérapie substitutive a été essentiellement utilisée dans les maladies lysosomales non neurologiques, car les enzymes ne peuvent pas passer la BHE après administration intraveineuse. C'est pour cette raison que cette approche n'a pas été développée initialement dans les gangliosidoses à GM2. Cependant, des tests ont été effectués *in vitro* et *in vivo*. Une hexosaminidase recombinante a été produite dans des cellules CHO (*chinese hamster ovary*) et il a été montré qu'elle pouvait dégrader le GM2 dans une lignée de cellules de Schwann de souris Sandhoff et dans des fibroblastes de patients Sandhoff (Ohsawa et al., 2005). Plus récemment, Matsuoka *et al.* ont produit une enzyme Hex B génétiquement modifiée codant pour la chaîne β des hexosaminidases et contenant en plus une séquence appartenant à la sous-unité α . Cette enzyme recombinante hybride a été produite en cellules CHO, sa stabilité et sa capacité à dégrader le GM2 ont été confirmées *in vitro*. Son efficacité *in vivo* a été testée après administration intracérébroventriculaire (ICV) chez des souris Sandhoff. Une restauration de l'activité enzymatique a été montrée, associée à une réduction de l'accumulation du GM2 et du GA2 dans le parenchyme cérébral. Cette Hex B modifiée posséderait plus de résidus M6P (2 par chaîne β) que l'Hex A (2 sur la chaîne β et 1 sur la chaîne α) native, rendant le recaptage par les cellules avoisinantes plus facile (Matsuoka et al., 2011b). Cette thérapie pourrait être applicable en clinique avec des injections ICV répétées, mais elle n'a pas encore été testée à ce jour.

D'autres équipes ont tenté des thérapies substitutives par voie intraveineuse dans d'autres maladies lysosomales neurologiques. Ainsi, dans un modèle murin de céréoïde-lipofuscinose infantile tardive liée au gène CLN2, une tripeptidyl peptidase I (TPP1) recombinante a été coadministrée par voie intraveineuse avec un peptide appelé K16ApoE, composé de 16 lysines et de 20 acides aminés correspondant à la séquence de fixation au récepteur de l'Apo E. Ce peptide, qui avait déjà démontré sa capacité à faciliter le passage de protéines à l'intérieur du SNC, a permis d'augmenter la survie des souris déficientes et de réduire la surcharge lysosomale au niveau des neurones (Meng et al., 2014). Cette équipe a été la première à montrer l'efficacité d'une approche de thérapie substitutive enzymatique après administration intraveineuse et ciblage de la BHE.

Actuellement, un essai de thérapie substitutive par voie ICV est en cours dans la céréoïde-lipofuscinose au locus CLN2. Cet essai mené par la firme Biomarin consiste à administrer par

voie ICV une fois par semaine un TPP1 recombinante humaine (Cerliponase alfa). Les résultats sont très encourageants, 87% des patients traités ayant une stabilisation voire une amélioration de leurs signes cliniques.

2) Utilisation de molécules chaperonnes

a) **Généralités**

Chez certains patients porteurs de mutations faux sens, les enzymes lysosomales mal conformées peuvent être incapables de dégrader leur substrat, car elles sont rétentionnées dans le RE et ne peuvent atteindre le lysosome, qui est leur lieu d'action. Des petites molécules, appelées chaperons, peuvent être utilisées pour stabiliser ces enzymes défectueuses durant le processus d'adressage, aboutissant à une augmentation de l'activité enzymatique. Ce concept a été évoqué pour la première fois en 1999 (Fan et al., 1999). L'avantage de ces petites molécules chaperonnes est qu'elles peuvent passer la barrière hématoencéphalique (Desnick and Schuchman, 2002). En revanche, leur inconvénient est qu'elles ne sont applicables qu'à un petit nombre de patients ayant des mutations affectant la stabilité de l'enzyme. D'autre part, les premières molécules utilisées étaient des inhibiteurs d'enzymes qui pouvaient exercer un effet chaperon à certaines doses, mais qui se sont révélés difficiles d'utilisation in vivo, certains essais cliniques ayant dû être interrompus (exemple de la maladie de Pompe).

b) **Essais dans la maladie de Sandhoff**

L'efficacité de cette approche a été testée sur des fibroblastes de patients adultes Tay-Sachs et Sandhoff à l'aide d'inhibiteurs des hexosaminidases (Tropak et al., 2004). Ces molécules (utilisées à des doses non inhibitrices) ont permis d'augmenter l'activité enzymatique en améliorant la stabilité des enzymes et en facilitant leur trafic jusqu'au lysosome, jouant ainsi le rôle de chaperonne pharmacologique (Tropak et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que la pyriméthamine (qui est également un inhibiteur de l'hexosaminidase) pouvait avoir un effet chaperon sur des fibroblastes de patients adultes atteints de gangliosidoses à GM2 et porteurs de certaines mutations (Maegawa et al., 2007). Cette découverte a donné suite à un essai clinique chez des patients adultes Tay-Sachs et Sandhoff. Des résultats hétérogènes ont été observés en fonction des patients (mutations et pharmacocinétique différentes), mais chez certains, une augmentation de l'activité de 2 à 3

fois a été mise en évidence. Plus la dose de pyriméthamine était élevée, plus l'effet chaperon était important, mais des effets secondaires sont apparus à dose très élevée (Clarke et al., 2011). Ce composé a par ailleurs été testé sur les fibroblastes d'un patient Sandhoff porteur d'une forme infantile atypique, mais aucune réduction de l'accumulation du GM2 n'a été observée (Chiricozzi et al., 2014). Le groupe de Tropak a étudié l'efficacité in vitro de modifications de structure de la pyriméthamine qui pourraient permettre d'augmenter son effet chaperon et ainsi faciliter son application en clinique (Tropak et al., 2015).

3) Inhibiteurs de la biosynthèse des substrats

a) **Généralités**

Une autre approche consiste à diminuer la biosynthèse des substrats qui s'accumulent dans les maladies lysosomales (et notamment dans les sphingolipidoses) afin de réduire l'effet pathogène. Les iminosucres de type nojirimycine ont été utilisés comme inhibiteurs de biosynthèse de substrats, car ils ont montré leur capacité à diminuer l'influx des substrats au niveau du lysosome (Platt and Jeyakumar, 2008). Le N-butyldeoxynojirimycine (Miglustat ou NB-DNJ) a été testé et approuvé chez des patients Gaucher de type 1 chez qui la thérapie substitutive n'était pas une option thérapeutique. L'hépatosplénomégalie présente chez ces patients a diminué de près de 30% sous miglustat (Lachmann and Platt, 2001). Un autre composé utilisé plus récemment dans la maladie de Gaucher est l'eliglustat tartrate (Genz-112638). Il a été testé chez des patients Gaucher de type 1 par voie orale (2 fois par jour). Après un an de traitement, les résultats obtenus ont été très encourageants, car presque tous les patients ont eu une réduction de leur hépatosplénomégalie ainsi qu'une amélioration de leur thrombopénie et de leurs manifestations squelettiques (Lukina et al., 2010). L'avantage d'Eliglustat par rapport au Miglustat est que les effets secondaires sont mineurs et un plus grand nombre de patients peuvent ainsi être traités. La seule petite limite de cette molécule est qu'elle est métabolisée au niveau hépatique par le cytochrome P450 2D6 et qu'un génotypage des patients doit être réalisé avant la mise sous traitement afin de connaître leur profil métabolique. Seuls, les patients ayant un métabolisme ultrarapide ne pourront pas être traités par cette molécule. Actuellement, Eliglustat peut être prescrit en France à tous les patients Gaucher éligibles qui souhaitent en bénéficier.

b) Essais dans la maladie de Sandhoff

Un double *knock-out* Hexb $-/-$ x GalNAcT (une enzyme responsable de la biosynthèse des gangliosides de type GM2/GD2) a montré qu'en cas d'absence de biosynthèse, les souris ont une amélioration de leurs fonctions neurologiques et une augmentation de leur survie, mais elles développent un modèle tardif de la maladie dû à l'accumulation d'oligosaccharides (Liu et al., 1999). Cette étude a été la première dans la maladie à Sandhoff à montrer la potentielle efficacité d'une inhibition de la synthèse de GM2/GD2. Un inhibiteur de la céramide glucosyltransférase nommé N-butyldeoxynojirimycine (Miglustat ou NB-DNJ) a été testé dans le modèle murin de la maladie de Tay-Sachs. Une prévention de l'accumulation du GM2 a été obtenue, associée à une diminution du nombre de neurones surchargés (Platt et al., 1997). Par ailleurs, le traitement par Miglustat des souris Sandhoff a permis d'allonger significativement la durée de vie des souris (170 jours). Cependant, il a été montré qu'à forte dose, le Miglustat peut être toxique (Jeyakumar et al., 2004). Une meilleure efficacité a été obtenue avec du N-butyldeoxygalactonojirimycine (NB-DGJ) qui pour une même dose n'induit pas d'effets secondaires. Ce composé permet donc d'augmenter la dose et donc l'efficacité (Andersson et al., 2004; Baek et al., 2008).

Chez des patients ayant une forme juvénile de maladie de Sandhoff, le Miglustat a permis de ralentir la progression de la maladie (Tallaksen and Berg, 2009; Wortmann et al., 2009). Cette approche a aussi été testée chez un patient ayant une forme chronique de la maladie et un suivi sur 3 ans a montré des améliorations mineures (Masciullo et al., 2010). Plus récemment, le Miglustat a été testé en association avec un régime cétogène et a montré des résultats encourageants chez des souris Sandhoff et chez un patient (Denny et al., 2010; Villamizar-Schiller et al., 2015). Une autre étude utilisant un autre composé censé être plus efficace (250 fois plus que le Miglustat), appelé Genz-529468, a montré des améliorations phénotypiques chez les souris Sandhoff comparables au miglustat. Une diminution de l'accumulation de lipides a été mise en évidence au niveau du foie, mais sans baisse du GM2 dans le cerveau. Ceci laisse sous-entendre que l'efficacité du traitement n'est pas due à une baisse d'accumulation. Une des hypothèses est que ce composé aurait des effets anti-inflammatoires (Ashe et al., 2011).

Cette approche basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de biosynthèse des substrats serait intéressante pour les patients ayant des formes moins sévères de la maladie avec une activité enzymatique résiduelle. Cependant, pour les formes sévères, une telle approche n'aura pas

d'effet bénéfique, car l'augmentation de la dose risque de générer des effets secondaires inacceptables.

4) Anti-inflammatoires

a) Anti-inflammatoires dans d'autres maladies neurologiques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, la neuroinflammation est une composante importante des gangliosidoses à GM2 et elle est en partie responsable de la progression de la maladie. Réduire la neuroinflammation pourrait donc possiblement retarder la progression de la maladie. Ce type d'approche a été utilisé dans d'autres maladies neurologiques telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, où l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) comme l'aspirine, l'ibuprofène et l'indométhacine a permis une diminution de la réponse microgliale et une amélioration du phénotype chez les souris (Lim et al., 2000, 2001; Netland et al., 1998). Dans les maladies lysosomales à atteinte neurologique, la simvastatine, un autre NSAID, a été testé dans un modèle murin de leucodystrophie métachromatique. Grâce à ce traitement, la perte de myéline a été réduite de 50% et les marqueurs de la neuroinflammation ont été largement diminués (Stein et al., 2015). L'administration d'ibuprofène dans un modèle murin de maladie de Niemann-Pick de type C a permis une augmentation de la durée de vie lorsque le traitement commence au tout début des symptômes. L'association en synergie avec du Miglustat a permis une amélioration des fonctions motrices (Smith et al., 2009).

b) Utilisation d'anti-inflammatoires dans le modèle murin Sandhoff

Des anti-inflammatoires non stéroïdiens (aspirine, ibuprofène, indométhacine), ainsi que des composés anti-oxydants ont été testés dans les gangliosidoses à GM2. Ces médicaments ont été administrés à des souris à un stade symptomatique de la maladie afin de mimer mieux la maladie humaine (Jeyakumar et al., 2004). Ils ont permis une diminution de la neuroinflammation, notamment de l'activation microgliale et une amélioration clinique. Ces composés ont aussi été administrés en association avec un inhibiteur de la biosynthèse des substrats (NB-DNJ). Une synergie entre les deux traitements a été observée avec un

allongement de la survie des souris, qui reste cependant très inférieure à celle des souris normales (Jeyakumar et al., 2004).

B) THERAPIE CELLULAIRE

Cette stratégie thérapeutique consiste à apporter des cellules saines afin de remplacer la population cellulaire défaillante. Dans le cas des maladies lysosomales, l'idée est que les cellules puissent servir d'usine de production de la protéine manquante. Les cellules vont synthétiser et sécréter l'enzyme qui grâce aux récepteurs M6P va pouvoir être recaptée par les cellules avoisinantes par un phénomène de « *cross-correction* ». Cette thérapie a déjà été testée par deux approches basées sur une transplantation de moelle osseuse ou de précurseurs neuronaux.

La transplantation de moelle osseuse (BMT) est particulièrement intéressante pour les maladies lysosomales à atteinte neurologique. En effet, elle consiste à utiliser la faculté des cellules de la lignée monomacrophagique à migrer vers le SNC via la BHE, pour former la microglie. Les cellules microgliales vont pouvoir libérer des enzymes lysosomales qui seront recaptées par les cellules avoisinantes grâce aux récepteurs M6P. De nombreux patients souffrant d'une maladie lysosomale à atteinte neurologique ont bénéficié de cette thérapie. C'est notamment le cas des patients atteints de leucodystrophie métachromatique. Le succès de ce traitement est très variable d'un patient à l'autre, tout particulièrement en fonction de la sévérité de la maladie (formes infantiles versus formes plus tardives, moins rapidement évolutives) et en fonction du moment de l'intervention par rapport au stade d'évolution de la maladie (meilleurs résultats si le traitement est précoce) (Krivit, 2004).

Chez les souris Sandhoff, cette thérapie a été testée seule (Norflus et al., 1998) ou en combinaison avec le NB-DNJ (Jeyakumar et al., 2001). Dans les deux cas, la survie des souris a été prolongée avec une amélioration des signes cliniques, mais le cerveau reste insuffisamment traité. D'autre part, cette stratégie met du temps à se mettre en place et la maladie continue à progresser entre le début du traitement et son efficacité optimale. Le traitement combiné a montré une action synergique entre la greffe de moelle osseuse et le NB-DNJ, induisant une augmentation de la durée de vie encore plus importante (239 versus 196 jours sans NB-DNJ).

L'autre approche a consisté en une transplantation intracrânienne de cellules souches neuronales murines. Ceci a été fait dans un modèle de souris Sandhoff en période néonatale (Lee et al., 2007) et à l'âge adulte (Jeyakumar et al., 2009b). Dans les deux cas, les cellules neuronales ont migré vers les endroits les plus touchés par la maladie. Un allongement de la survie a été obtenu (40 jours environ pour le traitement en période néonatale et 15 jours pour le traitement à l'âge adulte), accompagné d'une baisse de la neuroinflammation et d'une restauration de l'activité enzymatique de l'ordre de 6% de la normale. Une approche combinée avec du NB-DNJ a été testée toujours chez des souris Sandhoff en période néonatale. Il a été montré 15 jours après ce double traitement que la réduction de la surcharge était due à l'inhibiteur et non aux cellules souches neuronales suggérant que le traitement via les cellules souches met du temps à se mettre en place (Arthur et al., 2012).

C) THERAPIE GENIQUE

La thérapie génique est une approche thérapeutique qui permet d'apporter un gène normal à l'intérieur des cellules afin de se substituer au gène endogène non fonctionnel. Elle est particulièrement intéressante pour les maladies monogéniques où le dysfonctionnement d'un gène spécifique aboutit à l'absence ou à l'insuffisance d'une protéine entraînant un phénotype pathologique. L'idée est donc d'introduire une ou plusieurs copies de la version saine du gène afin de corriger le défaut génétique. Deux principales méthodes de thérapie génique sont possibles : soit ex vivo, soit in vivo (figure 23). La procédure ex vivo consiste à isoler les cellules d'intérêt de l'organisme atteint et de les modifier génétiquement in vitro à l'aide d'un vecteur viral. Les cellules transduites expriment alors le gène thérapeutique à des niveaux normaux ou supérieurs à la normale. Elles sont ensuite réintroduites chez le patient afin de restaurer un phénotype sain. La procédure in vivo consiste quant à elle à délivrer directement chez le patient le vecteur viral (ou non viral) contenant le gène d'intérêt, ceci par voie intraveineuse, intramusculaire (ou autres) ou bien dans le parenchyme cérébral.

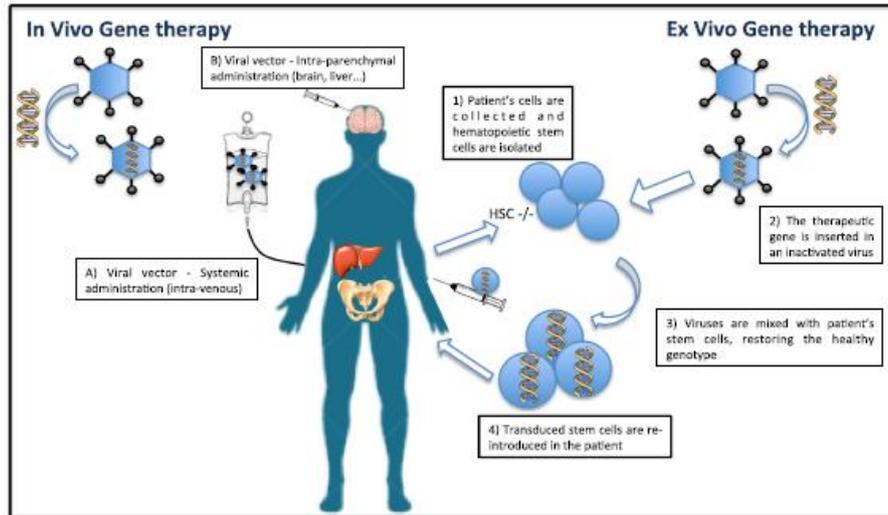


Figure 23 : Thérapie génique ex vivo et in vivo (Penati et al., 2017)

Le succès de la thérapie génique dépend de l'efficacité de la délivrance du gène médicament à la cellule. Durant ces vingt dernières années, la recherche a beaucoup avancé et de nombreux outils ont vu le jour. Différents types de vecteurs soit d'origine virale, soit d'origine non virale ont été évalués. La délivrance d'un gène par un vecteur non viral peut être basée sur l'utilisation d'ARN, d'ADN nu, de nanoparticules ou de liposomes (Elsabahy et al., 2011). Cette approche est intéressante, car le coût en serait probablement plus faible et il s'agit d'une méthode plus sûre. Cependant, l'expression des gènes est modeste avec cette technique et une efficacité à long terme n'est pas envisageable pour l'instant. A ce jour, la plupart des vecteurs utilisés à des fins thérapeutiques sont donc principalement d'origine virale (Simonato et al., 2013). Nous présenterons dans ce chapitre les vecteurs viraux utilisables en nous focalisant plus particulièrement sur les vecteurs AAV qui sont actuellement les plus utilisés dans les maladies touchant le SNC et notamment la maladie de Sandhoff.

1) Vecteurs viraux non AAV

Le vecteur viral est important dans le transfert de gène, car c'est l'outil indispensable pour permettre au gène médicament d'être transporté, puis exprimé au niveau des cellules. Le vecteur viral est issu d'un virus original dont on a retiré les séquences pathogènes pour les remplacer par un gène médicament. Plusieurs types de vecteur viraux peuvent être utilisés. Ils

proviennent de virus différents et diffèrent par leur mode d'intégration, d'expression et de multiplication.

a) Adénovirus

Les adénovirus appartiennent à une famille de virus à ADN qui se composent d'un ADN double brin de 36 kb contenu dans une capsid. La transduction de la cellule hôte, commence par l'interaction du virus avec la cellule grâce à un récepteur nommé CAR via le domaine knob présent au niveau de la capsid. Ensuite, une interaction entre la base du virus et les intégrines présentes à la surface cellulaire vont résulter dans l'internalisation du virus via une endocytose médiée par récepteurs. Une fois dans les cellules, le virion s'échappe des endosomes et la particule virale est désassemblée. Le génome viral est quant à lui transloqué dans le noyau, puis il va être répliqué sous la forme d'un épisome (Chira et al., 2015). Ce virus a l'avantage d'avoir une très bonne efficacité de transduction et il est non intégratif, ce qui évite les risques de mutagénèse insertionnelle. Néanmoins, sa production est difficile, la durée d'expression du transgène est transitoire (notamment dans les cellules qui se divisent) et la réponse immunitaire/inflammatoire est importante (Chira et al., 2015; Simonato et al., 2013). Son génome naturel et modifié (transfert de gène) est schématisé en figure 24.

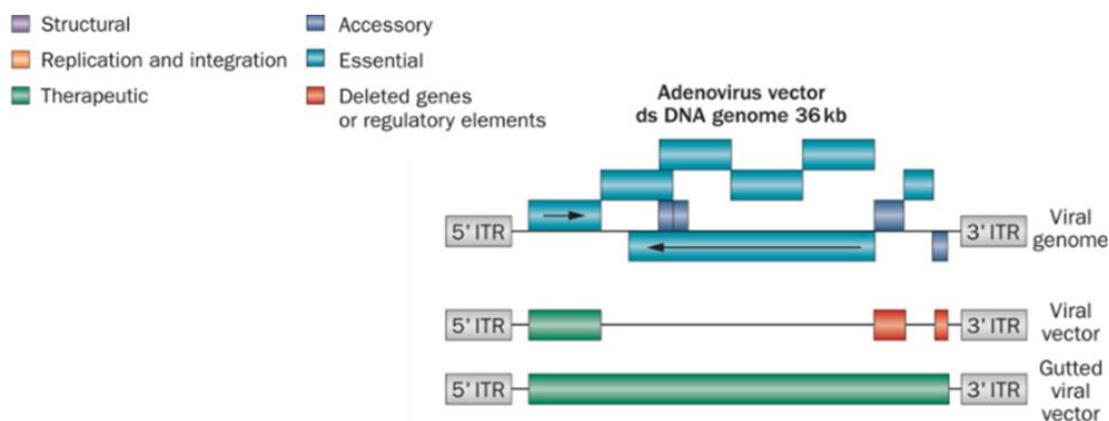


Figure 24 : Génome général d'un adénovirus (Simonato et al., 2013).

ITR : *Inverted terminal repeats* : ce sont les séquences qui constituent l'origine de réplication virale. Les gènes viraux qui sont transcrits de 5' vers 3' sont représentés par une flèche vers la droite. La flèche est inversée pour les gènes transcrits de 3' vers 5'. Dans le vecteur viral, le gène thérapeutique remplace les séquences du virus classique.

b) Rétrovirus

Une autre classe importante est celle des vecteurs dérivés des rétrovirus. Un rétrovirus se compose d'un ARN diploïde qui est rétrotranscrit en un ADN intermédiaire après l'infection. Cet ADN va ensuite s'intégrer au génome de la cellule hôte. La plupart des rétrovirus présentent quatre gènes nécessaires à leur réplication. Les virus plus complexes tels que les lentivirus possèdent d'autres gènes accessoires. Le taux de transduction est élevé pour les rétrovirus. L'infection des cellules se fait par le biais des récepteurs CD4+ et l'expression du transgène est stable à long terme (plusieurs mois/années). Le point négatif est qu'il s'agit de virus intégratifs, donc possiblement associés à des effets délétères tels que la mutagenèse insertionnelle. L'avantage des lentivirus par rapport aux rétrovirus plus simples est qu'ils peuvent infecter des cellules quiescentes et des cellules en cours de division, alors que les autres rétrovirus peuvent seulement infecter des cellules en division (Chira et al., 2015; Simonato et al., 2013). Les génomes naturel et modifié (transfert de gène) du rétrovirus basique et du lentivirus sont schématisés en figure 25.

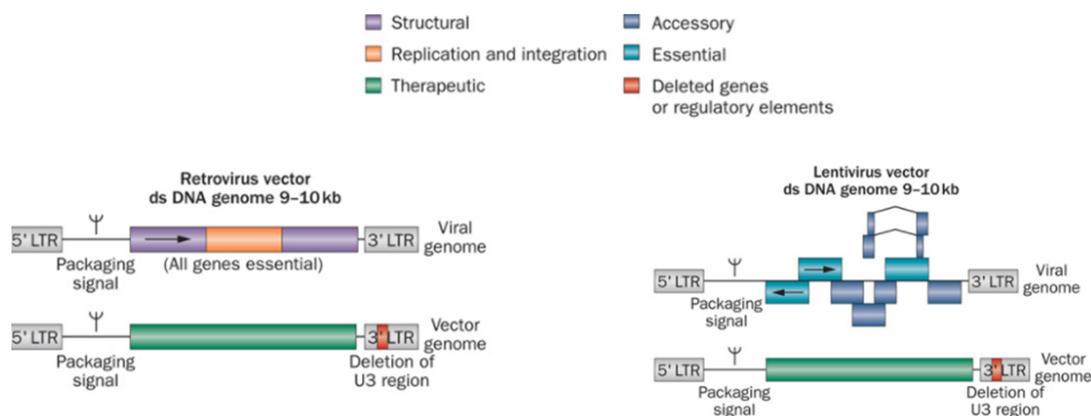


Figure 25 : Génome général des rétrovirus (Simonato et al., 2013)

LTR : *Long terminal repeats*, il s'agit de séquences permettant la transcription et l'insertion du génome viral dans la cellule hôte. La flèche correspond au sens de la transcription. Le *packaging signal* permet la régulation du processus d'encapsulation du génome d'ARN rétroviral durant la réplication.

2) Vecteurs viraux adéno-associés (AAV)

Au cours des dernières années, les AAV ont été testés dans de nombreuses approches de thérapie génique. En effet, malgré leur faible capacité de stockage (environ 4 kb), les vecteurs viraux recombinants construits à partir d'AAV sont sûrs, car ils ne sont pas

intégratifs. De plus, leur forme naturelle est non pathogène et ils permettent une bonne expression du transgène à long terme (Berns and Muzyczka, 2017; Simonato et al., 2013). Ils sont donc devenus des outils de choix pour le transfert de gène ciblant notamment le SNC (Saraiva et al., 2016).

a) Anatomie

Les AAV naturels sont des virus non enveloppés appartenant à la famille des parvoviridae. Ils ont besoin d'un autre virus (adénovirus) pour terminer leur cycle de réplication (Atchison et al., 1965). Le génome des AAV fait 4,7 kb. Il comprend deux phases ouvertes de lecture (ORF), rep et cap délimitées par des séquences répétées inversées (ITR) en 3' et 5'. Rep code pour quatre protéines nommées en fonction de leur poids moléculaire qui servent pour la réplication, la transcription, l'intégration et l'encapsidation du virus. Cap permet la production de trois protéines structurales (VP1, VP2 et VP3) qui une fois assemblées vont produire une capsidie icosaédrale d'environ 25 nm de diamètre. L'ORF cap permet aussi la production d'une protéine qui assure l'assemblage des protéines structurales entre elles. La structure précise de son génome est schématisée en figure 26.

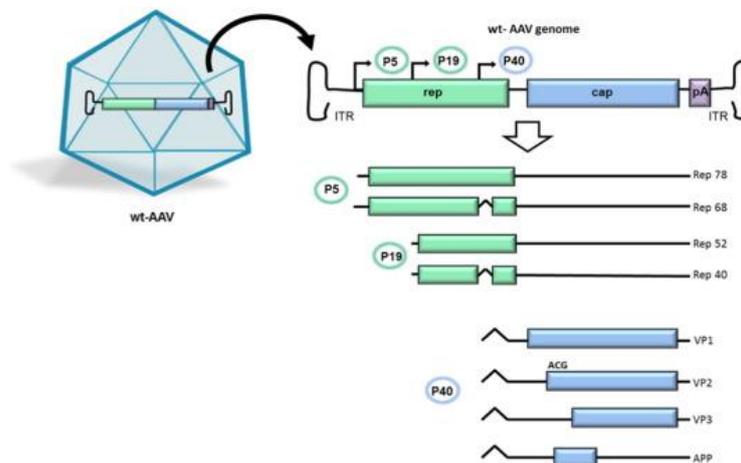


Figure 26 : Représentation du génome d'un virus adéno-associé sauvage (*wild-type*, WT) (Saraiva et al., 2016).

P5, P19 et P40 correspondent aux trois promoteurs régulant la transcription des gènes rep. P5 régule aussi l'épissage des transcrits rep 78 et rep 68 et P19 régule l'épissage des transcrits rep 40 et rep 52. P40 permet l'initiation de la transcription des gènes cap. VP1 est un variant non épissé, VP2 vient d'un variant épissé dont la transcription a débuté à partir d'un codon alternatif (ACG). VP3 est un variant épissé. Une autre ORF code pour la protéine activant l'assemblage (AAP).

b) Transduction

La transduction par les AAV commence par la liaison entre un récepteur à la surface des cellules cibles et la capside de l'AAV. Ensuite, plusieurs étapes ont lieu, la première étant l'internalisation du virus par endocytose. Ensuite, le virus va quitter la voie endosomale et rejoindre le noyau. Le virus va ensuite être déshabillé, son génome simple brin va être libéré, puis le second brin va être synthétisé et ensuite vient la transcription (Murlidharan et al., 2014). Après l'infection, il va y avoir deux voies possibles (Balakrishnan and R. Jayandharan, 2014) :

- En présence d'un virus « helper » (adénovirus ou herpes virus), l'AAV sera rapidement répliqué dans la cellule et de nouvelles particules seront libérées dans l'environnement extracellulaire.
- Dans le cas contraire, l'AAV entre en « latence », le génome peut persister sous forme extra-chromosomique ou bien s'intégrer dans le génome. Ce phénomène est rare et a lieu sur le bras long du chromosome 19.

La figure 27 schématise la transduction des AAVs.

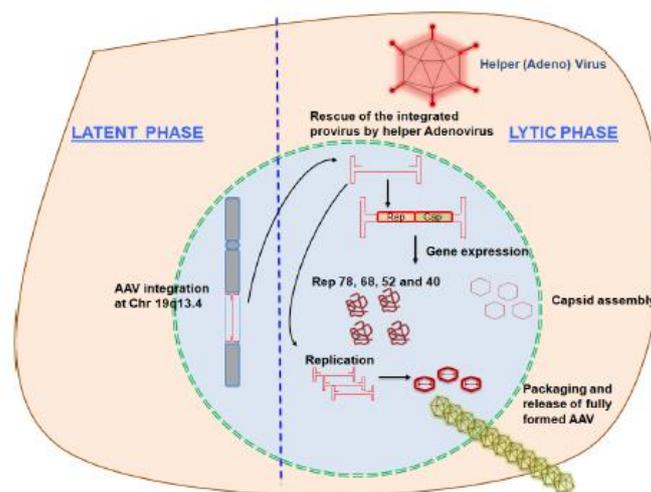


Figure 27 : Cycle de vie de l'AAV (Balakrishnan and R. Jayandharan, 2014).

c) Production pour la thérapie génique

L'utilisation de ce virus comme vecteur d'un ADN thérapeutique en vue d'un transfert de gène implique la construction d'un vecteur recombinant, c'est-à-dire d'un virus AAV dans

lequel on a remplacé une partie du génome viral par un transgène contenant le gène médicament. La production de ce vecteur s'effectue en général par triple transfection de cellules HEK293 (voir figure 28).

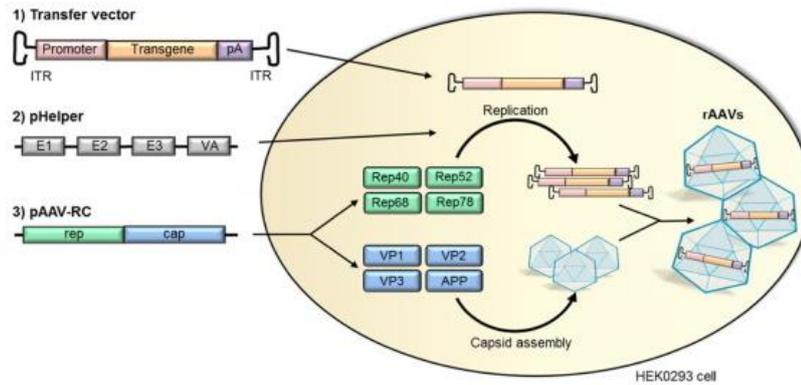


Figure 28 : Processus de production d'un rAAV par triple transfection (Saraiva et al., 2016).

Les plasmides nécessaires pour la triple transfection sont les suivants :

- Un plasmide contient des ITR à chaque extrémité, avec entre les deux un promoteur (à choisir en fonction de la nature des cellules cibles pour la thérapie), le transgène et une séquence de polyadénylation (poly A) ou cinq thymidines pour terminer la transcription. La réplication et l'assemblage du vecteur durant la production sont régulés par les éléments ITR (Xiao et al., 1997).
- Le plasmide helper (pHelper) contient les séquences adénovirales E1, E2, E3 et VA qui contribuent à la réplication du génome (Collaco et al., 1999).
- pAAV-RC est le plasmide contenant les gènes rep et cap qui permettent respectivement la réplication du génome et l'assemblage de la capside.

Le transgène est alors encapsidé dans un AAV conduisant à la production d'AAV recombinant (rAAV). Après purification, il peut être utilisé pour le transfert de gènes. L'AAV naturel et l'AAV recombinant classique se composent d'un ADN simple brin. Il est possible de créer un AAV recombinant double brin (*self complementary, sc*) qui permet d'avoir une expression plus rapide du transgène, car l'étape de réplication n'est plus nécessaire (McCarty, 2008; McCarty et al., 2003).

d) Tropisme

A cours des dernières années, 12 sérotypes naturels d'AAV ont été découverts et plus d'une centaine de variants d'AAV ont été isolés chez l'homme et chez d'autres primates (Gao et al., 2004). Les différents sérotypes sont définis en fonction des motifs présents sur la capsidie qui ont été identifiés grâce à des anticorps distincts. Les sérotypes des AAV constituent un point important, car ils déterminent les interactions capsidie/récepteurs, donc capsidie/cellules cibles. En général, les récepteurs des AAV sont des glycanes. Par exemple, l'AAV de sérotype 2 va lier des protéoglycanes de type héparane sulfate, tandis que l'AAV9 se fixe sur des résidus galactose N-terminaux. Ces différences de capsidie aboutissant à des affinités pour certains récepteurs déterminent le tropisme tissulaire des AAV, c'est-à-dire qu'en fonction de leur capsidie, ils vont cibler plus ou moins bien certains types cellulaires. Le choix du sérotype est donc primordial pour infecter un tissu spécifique. Le tableau 4 résume le tropisme tissulaire de chaque sérotype d'AAV, ainsi que le niveau de transduction et les récepteurs permettant le ciblage de tel ou tel type cellulaire (Lisowski et al., 2015; Saraiva et al., 2016).

Sérotype	Origine Naturelle	Récepteurs et corécepteurs	Tropisme	Cinétique	Niveau de transduction
AAV1	PNH	SA	SNC, cœur poumon, rétine, pancréas, muscle	Rapide	Modérée
AAV2	Homme	HSPG, FGFR, HGFR, LamR	Rein, muscle, SNC, foie, rétine	Lente	Faible
AAV3	PNH	HSPG, FGFR, HGFR, LamR	Muscle	Lente	Faible
AAV4	PNH	α 2-3 SA O-lié	SNC, rétine	Lente	Faible

AAV5	Homme	α 2-3 SA N-lié PDGFR	SNC, poumon, rétine, muscle	Lente	Faible
AAV6	Homme	α 2-3 / α 2-6 SA N-lié / HSPG/EGFR	Muscle (IV), cœur, poumon	Rapide	Modérée
AAV7	PNH	?	Muscle, œil, SNC, rétine	Rapide	Elevée
AAV8	PNH	LamR	Foie, muscle, SNC, rétine, pancréas, cœur	Rapide	Modérée
AAV9	Homme	Glycanes N-liés, LamR	Foie, muscle (IV), cœur (IV), SNC (IV), pancréas, rétine, rein (IV)	Rapide	Elevée
AAVrh10	Macaque	LamR	Foie, cœur, muscle, poumon, pancréas, SNC, rétine, rein	?	?

Tableau 4 : Caractéristiques des différents vecteurs AAV. Adapté à partir de (Lisowski et al., 2015; Saraiva et al., 2016).

PNH : *non-human primate* SA : acide sialique, HSPH : protéoglycane de type héparane sulfate, FGFR : récepteur du *fibroblast growth factor*, HGFR : récepteur de l'*hepatocyte growth factor*, LamR : récepteur laminine, PDGFR : récepteur du *platelet derived growth factor*. IV : expression dans le tissu concerné possible aussi après injection intraveineuse.

Afin d'améliorer le tropisme et donc l'efficacité du vecteur, il est possible de modifier les propriétés des capsides. Ceci a été beaucoup étudié ces dernières années. Différentes approches sont possibles : la modification chimique, la création d'une mosaïque de capsides consistant à mélanger deux capsides provenant de sérotypes différents, l'insertion peptidique

et la modification ciblée d'acides aminés de la capsid (Castle et al., 2016). La modification de la capsid peut avoir plusieurs conséquences sur la transduction du vecteur :

- L'amélioration de la transduction d'un type cellulaire précis, par exemple la création d'un double hybride AAV1/2, a permis une transduction plus robuste au niveau du poumon et du muscle (Hauck et al., 2003). Au niveau du cerveau, ce mélange de sérotypes permet de combiner le tropisme spécifique de l'AAV2 pour les neurones dopaminergiques et la capacité de l'AAV1 à mieux diffuser dans le SNC (Koprach et al., 2010).
- L'insertion d'un gène codant un petit peptide se fait au niveau des gènes VP1 et VP2 et elle permet l'insertion d'un petit peptide au niveau des capsides. Sur l'AAV2, ces insertions peptidiques ont généralement lieu au niveau de la région qui médie la liaison HSPG. De cette façon, le tropisme de base est modifié et l'AAV2 va alors cibler d'autres cellules, par exemple des cellules de la rétine (Dalkara et al., 2013).
- Une meilleure compréhension de la structure des AAV a permis de générer des vecteurs modifiés spécifiquement à un endroit de façon à améliorer leur fonction. Le changement d'un petit nombre d'acides aminés peut suffire à modifier leur tropisme. Par exemple, un AAV6.2 a été créé à partir d'un AAV6 dans lequel seulement un acide aminé a été modifié de façon à mieux cibler les voies respiratoires (Limberis et al., 2009). Par ailleurs, ce type de vecteur a l'avantage de ne pas être reconnu par des anticorps anti-AAV qui pourraient faire échouer la thérapie.
- Des modifications ciblées d'acides aminés peuvent permettre aussi d'améliorer l'efficacité de la transduction. C'est le cas par exemple de mutations sur les résidus tyrosine et thréonine des AAV2, AAV5 et AAV8. Ces nouveaux vecteurs ont l'avantage d'avoir une meilleure transduction pour une même dose utilisée. Au niveau thérapeutique, ils permettent de baisser la dose du vecteur administré (Zhong et al., 2008).

3) Voies d'administration possibles pour cibler le SNC

Un point important en thérapie génique est le choix de la voie d'administration. Celle-ci va varier en fonction de l'organe cible et du vecteur choisi. Comme nous l'avons vu dans le tableau 4, les AAV ont des tropismes tissulaires différents, c'est-à-dire qu'ils vont être plus ou moins aptes à transduire les cellules d'un type tissulaire donné. Pour cibler le SNC, la présence de la BHE complique les choses, car la plupart des vecteurs ne peuvent pas passer la

barrière. Certains vecteurs sont sur le principe capable de transduire les cellules du SNC, mais ils ne peuvent pas les atteindre. C'est pourquoi les injections par voie intracérébrale directe (utilisant la stéréotaxie) (figure 29) ont été jusqu'ici les plus fréquemment utilisées pour cibler le SNC. Le problème est que ce type d'injection est très ciblé (nombre limité de points d'injection) et que le vecteur ne diffuse pas forcément à l'ensemble du parenchyme cérébral (Vite et al., 2003). Ceci pose problème dans le cas des maladies neurodégénératives qui touchent souvent de larges régions du parenchyme. De plus, cette approche reste relativement invasive, même si l'injection intracérébrale directe peut être parfaitement bien maîtrisée par un neurochirurgien aguerri.

Une autre approche moins invasive afin de cibler le cerveau est l'injection au niveau du liquide céphalorachidien (LCR). Trois types d'injections sont réalisables (figure 29) :

- L'injection intracérébroventriculaire (ICV) consiste en une administration au niveau des ventricules latéraux qui sont les ventricules les plus gros. Cette voie a plusieurs avantages : elle est facile d'accès et permet au vecteur de diffuser dans le SNC et vers la moelle épinière.
- L'injection intracisternale (ICM) consiste en une injection au niveau de la grande citerne (*cisterna magna*), qui se situe entre le cervelet et la moelle épinière. L'avantage est qu'elle ne nécessite pas de chirurgie au niveau du crâne. En effet, elle est accessible par voie sous occipitale.
- L'injection intrathécale lombaire (IT) est réalisée au niveau de la moelle épinière dans l'espace subarachnoïdien par ponction entre les vertèbres lombaires.

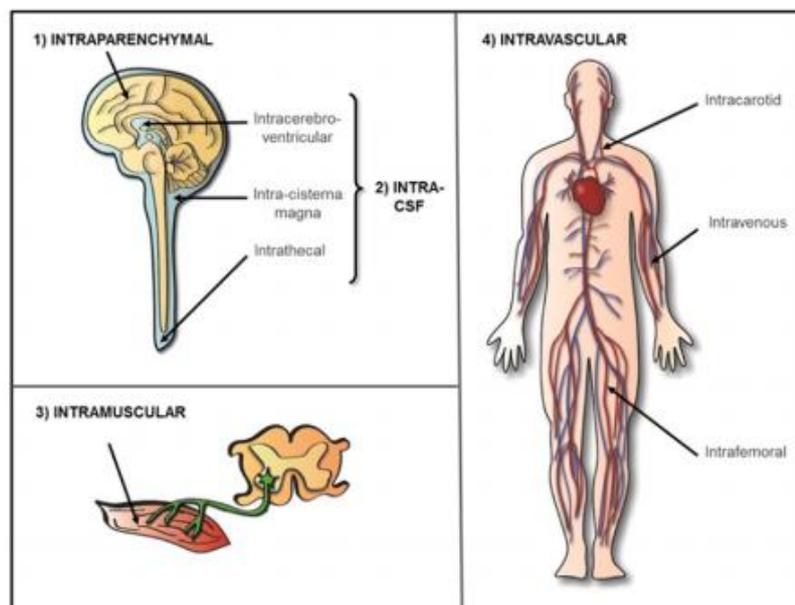


Figure 29 : Voies possibles pour l'administration d'un vecteur AAV recombinant (Saraiva et al., 2016).

1) Injections dans le parenchyme 2) injections dans le liquide céphalorachidien 3) injections intramusculaires 4) injections intravasculaires

Les injections intramusculaires donnent aussi des bons résultats pour les maladies touchant les motoneurones. En effet, certains AAV peuvent suivre une voie rétrograde à partir des nerfs jusqu'aux motoneurones de la moelle épinière (Benkhelifa-Ziyyat et al., 2013).

Enfin, l'approche la moins invasive est l'injection intraveineuse (IV) qui permet de cibler l'organisme dans son entier et parfois le CNS (avec certains vecteurs). Elle est particulièrement intéressante pour les maladies lysosomales à prédominance neurologique dans lesquelles une atteinte périphérique est malgré tout associée (enzyme ubiquitaire), même si elle apparait au second plan. Certains AAV sont en effet connus pour passer la BHE après une injection IV sans avoir recours à l'utilisation de méthodes permettant une ouverture transitoire de la BHE (mannitol, ...). L'AAV9 est le vecteur connu comme étant le plus efficace pour passer la BHE (Duque et al., 2009; Foust et al., 2009). En effet, après l'injection IV d'un AAV9-GFP chez la souris, il a été montré une forte expression de ce gène marqueur au niveau du SNC. L'équipe de Foust a montré que le moment de l'injection est primordial. En effet, si l'injection a lieu en période néonatale, l'AAV9 va avoir tendance à transduire les neurones, alors que si les injections sont faites chez l'adulte, il va plutôt cibler les astrocytes

(Foust et al., 2009). Plus récemment, un nouveau sérotype d'AAV, l'AAVrh10, a montré sa capacité à passer également la BHE après injection intraveineuse. Il a même été montré qu'il était plus efficace que l'AAV9 (Tanguy et al., 2015). Néanmoins, pour l'instant, l'AAV9 reste le plus utilisé dans les études précliniques ciblant le SNC par voie IV.

4) Utilisation de l'AAV9 dans des maladies à atteinte neurologique

a) Passage de l'AAV9 au niveau de la BHE

La façon dont l'AAV9 passe la BHE a été étudiée. L'utilisation de mannitol, qui est connu pour ouvrir la BHE, ne permet pas d'augmenter la quantité d'AAV9 dans le SNC, ce qui suggère qu'il passe la barrière non pas de manière passive par les jonctions serrées entre les cellules endothéliales, mais bien de manière active via un transporteur (Gray et al., 2011). Ceci confirme l'hypothèse de Manfredsson, qui a montré que l'AAV9 passe la BHE non seulement via les galactoses N-liés et les récepteurs à la laminine LamR, mais aussi par le biais de transporteurs responsables du passage d'autres molécules au niveau du SNC, comme le transporteur du glucose et le transporteur MCT1 (*monocarboxylate transporter 1 for lactate*) (Manfredsson et al., 2009). En revanche, les acides aminés de la capsid de l'AAV9 impliqués dans ce transport ne sont toujours pas connus à ce jour. Des candidats probables ont été trouvés au niveau des régions variables de la capsid (DiMattia et al., 2012).

b) Essais précliniques utilisant l'AAV9

L'AAV9 est donc un vecteur de choix pour traiter les maladies à atteinte neurologique. Beaucoup d'essais précliniques ont été réalisés dans des modèles souris, chat, chien et singe. Ce sont dans les maladies du motoneurone que les premiers essais ont été effectués. Dans l'amyotrophie spinale (SMA), l'injection par voie intraveineuse du vecteur codant le gène SMN1 en période néonatale a permis d'augmenter la survie et d'améliorer du phénotype (Foust et al., 2010; Glascock et al., 2012; Valori et al., 2010). Il est à noter que de meilleurs résultats (durée de vie) ont été obtenus lorsque les injections ont été faites par voie ICV (Glascock et al., 2012) et par voie combinée IV et ICV (Armbruster et al., 2016). De bons résultats ont aussi été obtenus dans un modèle murin de sclérose latérale amyotrophique due à des mutations du gène SOD1. En effet, l'administration par voie IV à différentes périodes

d'un AAV9 codant SOD1 a permis de retarder l'apparition des signes et la mort des motoneurones. La période de l'injection est importante, car plus le vecteur est injecté tardivement, moins il est efficace (Foust et al., 2013; Thomsen et al., 2014).

Concernant les maladies de surcharge lysosomale à atteinte neurologique, des études ont été effectuées dans différentes maladies.

- Dans la mucopolysaccharidose de type I (MPS I), un AAV9 codant l' α L iduronidase a été administré chez des chats par voie ICM à 4 mois. Malgré la présence d'une réponse immunitaire accrue, cette approche a permis d'améliorer les manifestations neurologiques des animaux (Hinderer et al., 2014).
- Dans la mucopolysaccharidose de type IIIA, un AAV9 codant la SGSH injecté à l'âge adulte par voie IV (Ruzo et al., 2012) et par voie ICM (Haurigot et al., 2013) a permis d'obtenir dans les deux cas une baisse de l'accumulation de GAG (glycosaminoglycanes) et une réduction de la neuroinflammation. Ceci s'associe avec une augmentation de la durée de vie et à une amélioration du phénotype comportemental.
- La mucopolysaccharidose de type IIIB a aussi fait l'objet d'une étude préclinique basée sur l'utilisation d'un AAV9 codant la NAGLU par voie IV chez la souris à l'âge adulte (Fu et al., 2011). Cette approche a permis une correction du déficit enzymatique, accompagnée d'une amélioration de l'astrocytose et de la neuroinflammation, ainsi qu'une amélioration de la durée de vie. Des souris adultes ont été traitées avec le même vecteur, mais cette fois par voie ICM, et des résultats similaires ont été obtenus (Ribera et al., 2015).
- Dans la leucodystrophie métachromatique, un vecteur AAV9 codant le gène ARSA administré par voie IV en période néonatale a permis une correction des signes neurologiques et biochimiques (Miyake et al., 2014).
- Dans le déficit multiple en sulfatases dû à une mutation du gène SUMF1, le vecteur codant ce gène a été administré en période néonatale, soit par voie IV, soit par voie ICV ou de manière combinée. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une approche combinée (activation globale des sulfatases et baisse de la neuroinflammation) (Spampanato et al., 2011).

- Dans la gangliosidose à GM1, l'administration systémique d'un vecteur AAV9 codant la β -galactosidase chez la souris adulte a permis une amélioration du phénotype et une extension de la durée de vie (Weismann et al., 2015).

Ces résultats montrent que l'AAV9 est un bon outil pour traiter des maladies génétiques à atteinte neurologique, ceci après une injection intraveineuse. Ce type d'injection est intéressant, car il s'agit d'une approche peu invasive. De plus, dans le cas des MSL, l'atteinte neurologique est souvent associée avec une atteinte périphérique, et l'administration systémique permet de cibler à la fois le SNC et les organes périphériques. Il est à noter que les injections d'un AAV9 au niveau du LCR (ICV et ICM) permettent aussi d'atteindre à la fois le SNC et les organes périphériques, comme cela a été montré par plusieurs équipes (Armbruster et al., 2016; Haurigot et al., 2013; Ribera et al., 2015; Spampanato et al., 2011)

5) Essais précliniques pour les gangliosidoses à GM2

Concernant les gangliosidoses à GM2, de nombreux essais ont été réalisés sur différents modèles animaux au cours des dernières années pouvant possiblement ouvrir la voie à un essai clinique futur.

a) **Modèle murin Sandhoff**

Dans le modèle Hexb^{-/-}, un transfert de gène utilisant un adénovirus codant la chaîne β des hexosaminidases a été testé par voie intraveineuse (Guidotti et al., 1999). Cette approche a permis la production d'une enzyme fonctionnelle au niveau des organes périphériques, et notamment du foie. Cependant, elle n'a pas apporté d'amélioration au niveau neurologique, car ni les adénovirus, ni les hexosaminidases secrétées à partir des cellules hépatiques transduites n'ont pu traverser la BHE.

Les AAV ont également été utilisés dans ce modèle, car ces vecteurs permettent une expression stable à long terme et engendrent peu de réaction inflammatoire. L'injection par voie intracérébrale (stéréotaxie) a été largement étudiée, notamment par l'équipe de Tim Cox. Les différents tests sont répertoriés dans le tableau 5. Ces approches étaient basées sur une co-injection de deux AAV1/2 contenant les cDNA humains codant les chaînes α et β des hexosaminidases afin de permettre la dimérisation des deux chaînes en intracellulaire. Après différents tests, il a été montré que des injections intracérébrales simultanées au niveau du striatum et du cervelet étaient nécessaires pour arriver à une survie presque identique aux

contrôles, accompagnée d'une absence de neuroinflammation. Ils ont également mis en évidence l'importance du moment de l'injection. Les meilleurs résultats sont obtenus quand les injections ont lieu à 1 mois. A partir de 12 semaines (phase symptomatique), il devient impossible de réverser le phénotype. Cependant, cette voie d'administration ne permet pas de cibler les organes périphériques, tels que le foie, connu pour être également touché dans la maladie de Sandhoff. A long terme, l'accumulation du GM2 et d'autres glycolipides progresse en périphérie et de nouveaux types cellulaires sont touchés, aboutissant à l'apparition d'une maladie sévère provoquant la mort de la moitié des souris traitées. Par ailleurs, cette méthode reste relativement invasive, car les injections intracrâniennes par stéréotaxie sont basées sur une approche chirurgicale. De plus, le mannitol a été utilisé pour permettre une meilleure diffusion du vecteur augmentant aussi les risques de la procédure (Cachón-González et al., 2006, 2012, 2014; Guidotti et al., 1999; Sargeant et al., 2011).

C'est pourquoi la voie intraveineuse a également été étudiée de manière à avoir un traitement par une voie d'abord moins invasive. L'AAV de sérotype 9 étant connu pour permettre une bonne expression dans le SNC après une injection IV, un AAV9 codant la chaîne β des hexosaminidases a été récemment testé. Les injections réalisées à l'âge adulte ne permettent pas d'améliorer le phénotype, mais des injections en période néonatale permettent d'augmenter la survie des souris. Cependant, la dose d'AAV9 utilisée était très élevée et la plupart des souris traitées ont développé des hépatocarcinomes (Walia et al., 2015). En prenant comme hypothèse que ces carcinomes hépatiques s'expliquaient par une trop forte transduction du foie par l'AAV9, la même équipe a testé une variante d'AAV9 (AAV9.47) connue pour moins cibler le foie et ainsi mieux cibler le cerveau. Ils ont de plus utilisé un scAAV connu pour avoir une transduction plus rapide. Par ailleurs, le transgène utilisé était cette fois un nouveau transgène synthétique codant la sous-unité μ , aussi appelé HEXM. Cette sous unité μ est un mélange des deux sous-unités α et β où seules les séquences utiles pour leur activité ont été conservées. Il a été montré que l'HEXM peut s'associer à la protéine activatrice (GM2AP) et hydrolyser le GM2. L'avantage est que ce gène prend moins de place que l'addition des deux cDNA codant les chaînes α et β . Ceci est un point important, car le scAAV a une capacité restreinte (Tropak et al., 2015). Ce transgène est sous le contrôle d'un promoteur synthétique connu pour être moins oncogénique. Avec cette approche, une survie moyenne de 41 semaines a été obtenue, accompagnée d'un retard d'apparition de la neuroinflammation. Cependant, à partir de 32 semaines, un déclin survient, probablement dû à une accumulation du GM2 sur le long terme (Osmon et al., 2016). A priori, ces souris ne

présentaient pas d'anomalies au niveau périphérique, mais aucune analyse n'a été effectuée pour voir s'il y avait une restauration de l'activité enzymatique et une réduction de la surcharge au niveau du foie. Ces différentes approches par voie intraveineuse sont répertoriées dans le tableau 6.

Protocole						Résultats					Référence
Injection	Vecteur	Transgène	Promoteur	Age injection	Dose	Survie	Activité enzymatique et GM2	Phénotype neurologique	Organes périphériques	Inconvénients / effets secondaires	
Intracérébrale au niveau du striatum Co-injection des 2 chaînes + mannitol	AAV1/2 et AAV2/2	cDNA des chaînes α et β humaines	CAG + WPRE	1 mois	$2-5 \times 10^{12}$ vg/souris	20% de survie à 1 an	Activité enzymatique > normale Réduction du GM2 incomplète	Prévention de la neuroinflammation Ataxie et paralysie apparaissent beaucoup plus tardivement	Non, possible explication de la détérioration tardive des souris traitées	Réaction inflammatoire localisée aux sites d'injections	(Cachón-González et al., 2006; Sargeant et al., 2011)
Intracérébrale (striatum / cervelet ou hippocampe/ cervelet) Co-injection des 2 chaînes + mannitol	AAV1/2 et AAV2/2	cDNA des chaînes α et β humaines	CAG + WPRE	1 mois	$9-13 \times 10^{13}$ vg/souris	100% de survie à 1 an 50% de survie à 2 ans	Activité enzymatique élevée Absence de GM2 dans le cervelet et la moelle épinière	Fonction neurologique intacte tout au long de la vie	Non, accumulation GM2 persiste et progresse dans les viscères	Certaines ont développé une maladie sévère en périphérie	(Cachón-González et al., 2012)
Intracérébrale (striatum / cervelet ou hippocampe/ cervelet) Co-injection des 2 chaînes + mannitol	AAV1/2	cDNA des chaînes α et β humaines	CAG + WPRE	1, 2, 2,5 et 3 mois	$3,2-4,7 \times 10^{10}$ vg/souris	615 jours (si traitées à 1 mois), 233 (2 mois), 292 (2,5 mois), 126 (3 mois)	NC	Prévention de la neuroinflammation et de la mort neuronale pour les injections faites avant 12 semaines.	NC	NC	(Cachón-González et al., 2014)

Tableau 5 : Description des essais précliniques par voie intracérébrale.

Protocole						Résultats					Référence
Injection	Vecteur	Transgène	Promoteur	Age injection	Dose	Survie	Activité enzymatique et niveau GM2	Phénotype neurologique	Organes périphériques	Effets secondaires	
IV	AAV9	cDNA de la chaîne β murine	CMV	Néonatale	$2,5 \times 10^{14}$ vg/kg	Plus de 43 semaines	Cerveau : 25% des contrôles Accumulation du GM2 réduite, mais incomplète	Pas de crise d'épilepsie ou de paralysie jusqu'au sacrifice. Présence d'un léger tremblement. Neuroinflammation toujours présente	Expression du vecteur au niveau du foie	Apparition de tumeurs (foie et poumon)	(Walia et al., 2015)
IV	AAV9	cDNA de la chaîne β murine	CMV	6 semaines	$3,5 \times 10^{13}$ vg/kg	Moins de 35 semaines, hétérogène. Moyenne à 19 semaines	Cerveau : aucune différence d'activité par rapport aux souris SD non traitées. Aucune amélioration concernant l'accumulation du GM2	Activité motrice identique aux contrôles non traités, mais progression plus lente de la maladie.	Forte expression du vecteur au niveau du foie	Aucun	(Walia et al., 2015)
IV	scAAV9.47	cDNA HEXM chaîne mixte $\alpha + \beta$	UsP	Néonatale	5×10^{13} vg/kg	Moyenne de 41 semaines	Activité très faible au niveau du cerveau. Accumulation du GM2 diminue mais réaugmente au cours du temps	Bonne coordination motrice et force musculaire jusqu'à la semaine 32 où un déclin apparait	Présence du vecteur au niveau du foie	Aucun	(Osmon et al., 2016)

Tableau 6 : Description des essais précliniques par voie intraveineuse.

b) Modèle félin

Afin d'avancer vers une possible application en clinique, des essais de transfert de gènes ont également été réalisés dans un modèle de chat Sandhoff qui est plus proche de l'homme que le modèle murin. Le premier test sur le modèle félin a été fait avec un AAV1 codant les chaînes α et β félines et a mis en évidence une forte réaction immunitaire liée à l'injection. Ils ont alors testé un autre AAV connu pour engendrer une réponse immunitaire moins importante. Il s'agissait d'un AAVrh8 codant les chaînes α et β qui, après des injections directes au niveau du thalamus et des noyaux profonds du cervelet (DCN, *deep cerebellar nuclei*) à 1,5 mois, a permis une amélioration significative de la survie (10 mois au lieu de 4) (Bradbury et al., 2013; McCurdy et al., 2015). Une analyse biochimique plus poussée a montré que l'enzyme était largement distribuée dans le cerveau et que l'accumulation de GM2 était absente dans le thalamus et très modeste dans le cervelet et le cortex cérébral (McCurdy et al., 2015).

De manière à cibler entièrement le cervelet et la moelle épinière, ce même vecteur a été testé mais en faisant à la fois des injections intracrâniennes et intracérébroventriculaires (ICV). Cette voie d'administration a été choisie, car elle semblait moins invasive que celle ciblant directement les DCN et donc probablement plus sûre. Ce traitement a permis d'obtenir une activité enzymatique de l'hexosaminidase supérieure à la normale et des niveaux de GM2 comparables à ceux des contrôles au niveau du cervelet. Malgré une hétérogénéité assez importante entre les chats traités, une amélioration générale de leurs signes cliniques a été observée (McCurdy et al., 2015a; Rockwell et al., 2015). Plus récemment, après avoir traité des chats en utilisant le même vecteur et le même protocole que précédemment, une analyse à 4 mois post-traitement a été réalisée, montrant une absence totale de neuroinflammation au niveau du cerveau des chats traités (Bradbury et al., 2017).

Toutes ces approches sont très encourageantes pour une application en clinique humaine, mais des analyses à plus long terme sont en cours afin de confirmer l'efficacité du traitement.

OBJECTIFS DE LA THESE

La thérapie génique semble être l'approche la plus appropriée pour la maladie de Sandhoff, car elle permet d'envisager une production de l'enzyme dans le SNC, tissu cible de la maladie, ceci à long terme. Comme nous venons de le voir, de nombreux essais précliniques ont vu le jour dans les modèles animaux murins et félins de la maladie de Sandhoff. Les approches ayant permis d'obtenir la meilleure survie dans le modèle murin sont basées sur l'administration intracrânienne par stéréotaxie d'AAV2 codant les chaînes β et α . Cependant, ces injections sont relativement invasives, car elles nécessitent une procédure chirurgicale. D'autre part, le SNC est normalisé par ce type de traitement, mais les organes périphériques comme le foie (également affectés dans la maladie de Sandhoff) ne sont pas corrigés. Ils pourraient probablement être le lieu d'une accumulation de ganglioside GM2, si les souris vivaient plus de deux ans.

C'est pourquoi notre laboratoire a décidé d'explorer une stratégie permettant une correction à la fois centrale et systémique par un traitement relativement peu invasif, basé sur l'utilisation d'un vecteur AAV9 recombinant capable de passer la BHE et de transduire le SNC après administration intraveineuse. Un scAAV9 codant la chaîne β des hexosaminidases a été construit (en collaboration avec l'équipe de Martine Barkats) et administré par voie intraveineuse chez des souris Sandhoff en période néonatale. A court terme, il a permis une restauration partielle des activités enzymatiques dans le cerveau et le foie, accompagnée d'une absence d'accumulation de GM2 au niveau du cerveau. Suite à ces premiers résultats, les objectifs de ma thèse consistaient à poursuivre ce travail de recherche préclinique en me focalisant sur trois points principaux :

1- Analyser à long terme les souris traitées par voie intraveineuse en période néonatale en réalisant des tests de comportement chez les souris injectées, ceci pendant la seconde année de leur survie, ainsi qu'une analyse des tissus 24 mois après l'injection thérapeutique. Les résultats très significatifs obtenus sont présentés dans l'Article 1 (Niemir et al.) qui va être soumis pour publication en septembre 2017.

2- Tester une double administration IV et ICV (intracérébroventriculaire) du vecteur scAAV9-Hexb utilisant la même dose finale que précédemment de façon à améliorer le traitement au niveau du cervelet. En effet, lors du 1er travail, nous avons montré qu'il

n'existait pas d'accumulation de GM2 dans le cerveau avec notre traitement, mais que la correction dans le cervelet était peut-être incomplète (légère différence entre les souris traitées et les souris contrôles). Ceci n'avait aucune conséquence délétère chez les souris traitées âgées de 2 ans, mais pourrait éventuellement en avoir, si l'on se projetait à l'échelle humaine (l'espérance de vie d'un enfant normal étant très supérieure à celle d'une souris). Plusieurs groupes de souris ont donc été injectés avec des doses variables dans chaque compartiment et des analyses à court (activité enzymatique, accumulation de GM2, biomarqueurs) et à long-terme (survie, comportement), ont été réalisées. Elles sont rapportées et discutées dans l'Article 2 (Rouvière et al.) qui sera soumis pour publication fin octobre 2017.

3- Chercher de nouveaux biomarqueurs en lien avec les désordres générés par la pathologie au niveau cellulaire, notamment en rapport avec la voie de signalisation mTOR et l'autophagie. Compte tenu des compétences de mon laboratoire d'accueil (Mario Pendé et Ganna Panasyuk), j'ai pu explorer ces nouveaux aspects par des études in vitro à la fois sur des fibroblastes de patients et des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) Sandhoff, mais aussi par des études in vivo dans le modèle murin Hexb^{-/-}. Ces données non publiées sont présentées dans le Chapitre III.

RESULTATS

I. ARTICLE 1

A) AVANT-PROPOS

Un scAAV9 codant la chaîne β des hexosaminidases a été construit et administré par voie intraveineuse chez des souris Sandhoff en période néonatale. Ce vecteur a été choisi compte tenu de sa capacité à passer la BHE après injection IV. Différents groupes de souris ont été constitués pour les différentes analyses à court et à long terme (figure 30).

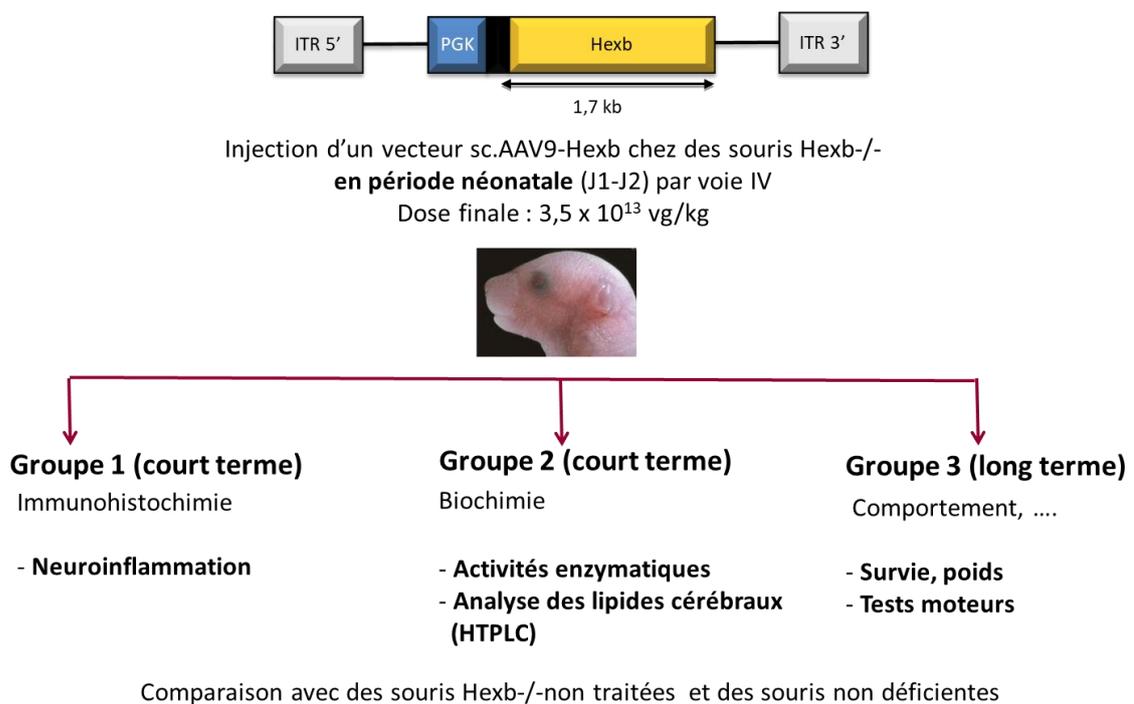


Figure 30 : Présentation du schéma de l'étude avec les différents sous-groupes et les analyses prévues pour chacun d'entre eux.

A court terme, il a été montré une restauration partielle des activités enzymatiques dans le cerveau et le foie, accompagnée d'une absence complète d'accumulation de GM2 au niveau des hémisphères cérébraux. La neuroinflammation, une composante importante de la maladie, est complètement absente chez les souris Sandhoff traitées à 2 mois (phase pré-symptomatique) et 4 mois (phase symptomatique). Par ailleurs, le traitement a permis une prévention totale de la perte neuronale. La seule petite limite de cette approche est que l'analyse lipidique par HPTLC au niveau du cervelet a montré une baisse spectaculaire, mais incomplète de l'accumulation du GM2, surtout à 4 mois. Sur le long terme, le traitement a

permis une survie des souris jusqu'à plus de 2 ans, identique à la survie des souris contrôles. Contrairement aux essais précliniques par injections intracrâniennes (Cachón-González et al., 2012), nos souris n'ont pas souffert d'atteinte périphérique, ceci probablement grâce à l'approche systémique que nous avons choisie.

Cette partie du travail était très avancée lors de mon arrivée dans l'équipe et j'ai pour ma part réalisé l'analyse à long terme des animaux traités. J'ai notamment effectué tous les tests de comportement chez les animaux Hexb^{-/-} traités et les contrôles Hexb^{+/+} (sachant que tous les contrôles Hexb^{-/-} étaient décédés à 4 mois). Le statut locomoteur (coordination, force, activité et démarche) des souris a ainsi été évalué jusqu'à l'âge de 2 ans, ceci grâce aux tests suivants : rotarod et *inverted screen test* réalisés chaque semaine, actimètre et empreintes de pattes faits tous les 4 mois. Pour l'ensemble de ces tests, aucune différence n'a été observée entre les souris traitées et les souris contrôles du même âge. Les souris traitées n'avaient aucun signe de la maladie : pas de tremblement, ni d'ataxie, pas de perte de poids et leur survie était identique à celle des souris contrôles. Il était important pour nous de garder ces souris jusqu'à l'âge de 2 ans (survie habituelle d'une souris) pour pouvoir montrer que notre approche était efficace à très long terme. Ainsi, ces résultats nous ont permis de montrer :

- 1- que la chaîne β apportée grâce au vecteur scAAV9-Hexb a continué à s'exprimer et à exercer son activité jusqu'à l'âge de 2 ans chez les souris traitées
- 2- que les souris n'ont pas présenté d'atteinte périphérique, ce qui confirme l'efficacité à long terme de l'approche intraveineuse au niveau des organes périphériques et notamment du foie
- 3- que le ganglioside GM2 ne s'est pas accumulé dans le SNC expliquant l'absence de phénotype à l'âge de 2 ans
- 4- que la modeste accumulation de ganglioside GM2 dans le cervelet observée à court terme (test fait à 4 mois) ne semble pas avoir eu d'incidence sur le comportement des souris à long terme.

B) ARTICLE

Single intravenous administration of scAAV9 normalizes lifespan and prevents pathology in Sandhoff murine model

Natalia Niemir^{1,2,*}, Laura Rouvière^{1,2,*}, Aurore Besse³, Marie Vanier⁴, Jasmine Dmytrus⁵, Thibaut Marais³, Stéphanie Astord³, Jean-Philippe Puech⁶, Mario Pendé^{1,2}, Ganna Panasyuk^{1,2}, Jonathan D. Cooper⁵, Martine Barkats^{3,#} and Catherine Caillaud^{1,2,6,#}

¹ INSERM U1151, Institut Necker Enfants Malades, Paris 75014, France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³ Centre of Research in Myology, Institut de Myologie, Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, Inserm UMRS974, GH Pitié Salpêtrière, Paris 75013, France

⁴ INSERM U820, Lyon 69372, France

⁵ Department of Pediatrics, Los Angeles Biomedical Research Institute, David Geffen School of Medicine, UCLA, Torrance, CA 90502, USA

⁶ Service de Biochimie, Métabolomique et Protéomique, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris 75015, France

* These authors contributed equally to this work

Co-senior authors

Correspondence should be addressed to:

Dr Catherine CAILLAUD, INSERM U1151, Institut Necker-Enfants Malades, 14 rue Maria Helena Vieira da Silva, 75993 PARIS Cedex 14, France. Phone : +33 1 71 39 69 74, Fax : +33 1 44 49 51 30, E-mail: catherine.caillaud@inserm.fr

Short title: Efficient gene therapy in Sandhoff disease

ABSTRACT (200 words)

Sandhoff disease (SD) is a rare inherited disorder caused by a deficiency of β -hexosaminidases activity for which no effective treatment is available. Mouse model of *Hexb* deletion faithfully reproduces key pathognomonic symptoms of SD patients with severe neuroinflammation and neurodegeneration, ubiquitous lysosomal dysfunction and pathologic GM2 accumulation culminating in death at 4 months. Here, we show that a single intravenous administration of a self-complementary adeno-associated virus 9 vector (scAAV9) expressing the *Hexb* cDNA in SD neonatal mice is safe and sufficient to prevent disease development. Importantly, it is for the first time that normal survival (over 700 days) and motor function assessed by a battery of behavioral tests was attained with scAAV9-treated SD mice being indistinguishable from wild-type littermates. Biochemical analyses in different tissues showed a significant restoration of hexosaminidase A activity reaching 10-15% of normal levels. Furthermore, AAV9 treatment was sufficient to completely prevent GM2 and GA2 storage as well as thalamic reactive gliosis and thalamocortical neuron loss in brain of *Hexb*^{-/-} mice. In sum, this study demonstrated a widespread protective effect throughout the entire CNS as well as liver upon single intravenous administration of scAAV9-*Hexb* vector in neonatal SD mice.

INTRODUCTION

Sandhoff disease (SD) is one of fifty lysosomal storage disorders (LSDs) that are common inborn errors of metabolism. It is due to mutations in the *HEXB* gene and results in deficiency of β -hexosaminidases A and B activity and abnormal catabolism of GM2 gangliosides leading to storage of GM2 and other glycosphingolipids in brain and other organs.¹ Clinically, patients affected by SD present developmental regression, neurological and motor deterioration, blindness, seizures and a cherry-red spot in the retina.^{2,3} SD is a severe disease culminating in death before the age of 2 years urging the development of long-lasting beneficial therapies. The *Hexb*^{-/-} mouse model mimicks the biochemical defect of SD with a widespread accumulation of GM2 gangliosides and GA2 glycolipids in the central nervous system (CNS).^{4,5} Symptomatically, mice develop a severe neurological phenotype including motor abnormalities and seizures, and a peripheral storage with marked liver hypertrophy resulting in death around 4 months. The neurodegenerative phenotype of *Hexb*^{-/-} mice is evidenced by severe brain alterations such as profound neuroinflammation and neuronal apoptosis.⁶⁻⁸

Different therapeutic approaches including bone marrow transplantation, enzyme replacement, substrate reduction and chaperone-mediated stabilization of the mutant enzyme were tested in SD, but they showed a limited success.^{7,9-11} Gene therapy would be a therapeutic option in this monogenic genetic disease. Direct brain delivery of recombinant adeno-associated virus (AAV) was efficient in GM2 storage correction and permitted long survival, but the effect was altered by the expression of cryptic disease in peripheral organs.^{12,13} Therefore, the development of vectors efficient for CNS and systemic targeting is a current challenge in SD. Recombinant AAV9 vectors are promising tools due to their capacity to deliver a transgene into brain after intravenous administration.^{14,15} Moreover, their high neuronal tropism and long-term gene expression are particularly attractive. Indeed, their

efficacy in reverting the neurological phenotype has already been reported in mouse model of spinal muscular atrophy,^{16–18} as well as in different LSDs.^{19–22} Additionally, AAV9 vectors delivered into the bloodstream efficiently transduce several peripheral tissues, such as liver and heart, demonstrating a broad distribution profile.^{14,23} Recent reports using AAV9-based gene therapy in the SD mouse model have provided the evidence that intravenous administration could be an option, but only partial restoration of the storage and limited lifespan extension were achieved.^{24,25}

Here, we demonstrate the long-term therapeutic efficacy of a specific self-complementary AAV9 (scAAV9-Hexb) vector via single intravenous injection in the SD murine model. We provide a complete pathophysiological assessment including multiple behavioral tests performed weekly over a 2 year period, biochemical analyses of lysosomal function and GM2 storage, histological analyses of brain tissue, all showing a remarkable therapeutic efficiency of restored Hex B enzymatic activity. In conclusion, our work provides a strong rationale for single intravenous administration of scAAV9 being an efficient, safe and non-invasive approach for treatment of GM2 gangliosidoses and potentially other neurodegenerative diseases.

RESULTS

scAAV9-Hexb treatment partially restores β -hexosaminidase activity in SD mice

First, a recombinant scAAV9 vector expressing a cDNA of mouse β -hexosaminidase β -subunit under the control of the constitutive phosphoglycerate kinase (PGK) promoter (scAAV9-Hexb) was generated. Purified scAAV9-Hexb viral vectors were injected intravenously in *Hexb*^{-/-} mice at neonatal period (D1-D2) at the dose of 3.5×10^{13} vector genomes (vg)/kg. The restored total Hex A+B and specific Hex A activities were analysed in brain, brainstem and liver of treated mice by comparison with naive SD mice and wild-type

(WT) mice at two (early symptomatic stage) and four (terminal phase) months using MUG and MUGS artificial substrates, respectively. A single intravenous administration of scAAV9-Hexb vector led to a significant increase in Hex A+B and specific Hex A activities by comparison with naive SD mice (**Figure 1A-F**). Notably, in cerebrum, activity of hexosaminidase A reached a level around 15% of normal (**Figure 1B**). Similar results were obtained in brainstem and liver (**Figure 1C-F**).

Normalization of lysosomal function in SD mice by scAAV9-Hexb treatment

Secondary increase in lysosomal enzyme activity is commonly observed in different cell types in LSDs including SD. To determine if administration of scAAV9-Hexb vector normalises lysosomal function, activities of lysosomal enzymes β -glucuronidase, α -fucosidase and β -galactosidase were tested using specific fluorogenic substrates in brain, brainstem and liver tissues collected at two different ages (**Figure 2A-C**). These enzymatic activities (expressed as % of WT) were highly elevated reaching up to ten times the normal level in the brain (**Figure 2A**). Importantly, treatment with scAAV9-Hexb led to a significant decrease of the lysosomal enzyme activities in all tissues analysed. At 4 months, significant correction of all tested enzymes was observed in the cerebrum and brainstem of scAAV9-Hexb treated mice (**Figure 2A,B**). Similarly, in liver, activities of both β -glucuronidase and α -fucosidase were reduced albeit the differences did not reach a statistical significance, but β -galactosidase activity was significantly decreased in both ages analysed (**Figure 2C**).

Neuron morphology and lysosomal mass is normal in treated SD mutants

As lipid storage is a major hallmark of SD, we therefore investigated the effect of scAAV9-Hexb treatment on this aspect of the disease pathophysiology. First, Nissl staining revealed that in 4-month old *Hexb*^{-/-} mice neuron morphology was abnormal including enlarged and

filled with storage material cells present in all areas of the brain analysed (**Figure 2D**). Conversely, scAAV9-Hexb-treated animals showed complete correction of pathological accumulation throughout the brain (**Figure 2D**). In addition, immunohistological analyses of lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1) were used to indirectly evaluate the storage and general lysosomal dysfunction in SD mutants. Evident accumulation of LAMP-1 within numerous regions such as hypothalamus, cortex and hippocampus was observed in brain of 4-month old *Hexb*^{-/-} animals (**Supplementary Figure S1**). Furthermore, higher magnification revealed cell bodies with dark staining throughout the entire sections (**Figure 2E**). Importantly, the pathologic upregulation of LAMP-1 was completely normalized with scAAV9-Hexb treatment to the level observed in control littermates.

GM2/GA2 storage in SD mutants is prevented by β -hexosaminidase expression

To further evaluate specific accumulation of gangliosides, lipid extraction, ganglioside purification and high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) analyses were performed on cerebral and cerebellar tissue of treated mice. Untreated SD mice exhibited a huge increase in GM2 already at 2 months both in cerebrum and cerebellum (**Figure 3A,B**). Importantly, those corresponded to 35% and further increased to mean 40% of total gangliosides in the cerebrum of 2- and 4-month old SD mice, respectively (**Figure 3B**). Similarly, accumulation of GM2 from mean 40% of total gangliosides in 2-month old up to 48% measured in 4-month old SD mice was observed in the cerebellum. Hex B re-expression was sufficient to prevent to a large extent this pathological accumulation of GM2 ganglioside in age-matched scAAV9-Hexb treated mice. As a result, GM2 was nearly normal in the cerebrum of scAAV9-Hexb treated animals at 4 months (mean 4.3% \pm 0.3) when compared to WT (mean 1.6 % \pm 0.2). In cerebellum, scAAV9-Hexb treatment was effective in decreasing 4 times the GM2 accumulation compared to untreated SD mutants, even if still higher

compared to age-matched WT controls (**Figure 3B**). In parallel, GA2 glycolipids were vastly reduced in cerebellum and a complete absence of GA2 was observed in the cerebrum of scAAV9-treated Sandhoff mice at 2- and 4-months post-injection (**Figure 3C**).

Lack of thalamocortical system neuroinflammation in scAAV9-injected SD mice

Important pathological consequence of ganglioside accumulation is prominent neuroinflammation observed in *Hexb*^{-/-} mice occurring in the thalamocortical system with the earliest neuron loss in the feedback neurons of lamina VI, subsequently progressing to the thalamus and lamina IV cortical neurons (Pressey S, *unpublished data*). In order to evaluate the impact of scAAV9-*Hexb* treatment on the onset and progression of the pathology, histopathological analyses were conducted on the thalamus and the somatosensory barrelfield cortex (S1BF) tissues (**Figure 4A**). First, immunostaining for the astrocytic marker GFAP (glial fibrillary acidic protein) revealed an intense astrocyte immunoreactivity in *Hexb*^{-/-} mice within the thalamic regions (**Figure 4B-E**). The ventral posterior nucleus (VPM/VPL) region of the thalamus showed the highest reactive astrocytosis, which was already visible at 2 months and progressed as mice aged (**Figure 4B,C; dotted area 2 and 3 on Figure 4A**). Importantly, GFAP staining within VPM/VPL in scAAV9-treated mice was comparable to age-matched WT animals. In *Hexb*^{-/-} mice at 4 months of age, dorsal lateral geniculate nucleus (LGNd) also had significant GFAP staining while nearly no staining was present in two other groups (**Supplementary Figure S2A**). Similarly, 2-month old *Hexb*^{-/-} animals also presented marked GFAP immunohistochemical staining in S1BF region (**Figure 4D,E; dotted area 1 on Figure 4A**), which progressively increased with disease development. Remarkably, the dense astrocytosis evident within all lamina of the S1BF region in 4-month old *Hexb*^{-/-} mice was completely absent in scAAV9-treated mice (**Figure 4D,E**).

Next, microglial activation was quantified by CD68 immunostaining in the thalamus and cortex of control and scAAV9-treated SD mice and a progressive microglial activation was observed in SD mice. However, the distribution of microglial cells was more localized compared to astrocytosis (**Figure 5A and 4B**). Remarkably, scAAV9-treated *Hexb*^{-/-} mice were completely comparable to WT animals at both ages analysed (**Figure 5A,B**). Furthermore, in the cortex of Sandhoff mice, activated microglia was uniformly distributed at both ages and similarly to thalamus, scAAV9-treated mice showed no CD68 staining (**Figure 5C,D**). Finally, in order to assess if scAAV9-*Hexb* treatment can protect neurons from apoptosis, neuron number was evaluated in thalamus VPM/VPL region. It was drastically decreased in untreated SD animals compared to WT mice (**Figure 5E**). Significantly, neuron number in scAAV9-treated mice was comparable to WT suggesting a protective effect of the therapeutic vector on neuronal cells of the thalamocortical system.

Absence of neuroinflammation in other CNS regions in scAAV9-treated SD mice

To further extend the pathophysiological analyses, the astrocytic and microglial immunoreactivity was evaluated in brainstem and cerebellum, two brain regions profoundly affected by SD. For the brainstem, reticular formation (RF) and spinal trigeminal nucleus V (SPV) regions were analysed (**Figure 6A; dotted area 2 and 3**). For the cerebellum, the study was focused on the deep cerebral nuclei (DCN) region, molecular and granular layers of the cerebellar cortex and white matter (**Figure 6A; dotted area 1 and inset 4**). GFAP-immunohistochemical staining in *Hexb*^{-/-} mice revealed that as disease progressed the astrocytosis became more intense in all the brainstem regions analysed (SPV, RF), as well as in cerebellar regions (DCN, molecular layer, granular layer and white matter) (**Figure 6; Supplementary Figure S3**). Significantly, no astrocyte activation in SPV and RF nuclei was observed in AAV9-treated SD mice neither at 2- nor at 4-months (**Figure 6B-D**).

Interestingly, changes in morphology and staining intensity of activated astrocytes were observed in hindbrain nuclei of *Hexb*^{-/-} mice. Astrocytes were hypotrophied and had darkly stained thickened processes. These differences were already observed in 2-month old *Hexb*^{-/-} mice and became more pronounced at 4 months. These pathological changes were completely prevented by treatment of SD mutants with scAAV9-*Hexb* vector. Furthermore, analyses performed in cerebellar regions revealed absence of elevated GFAP expression in DCN, molecular layer, granular layer and white matter of 2- and 4-month old treated *Hexb*^{-/-} mice compared to age-matched *Hexb*^{-/-} mice (**Supplementary Figure S3A,B,E,F**). This was also confirmed by quantitative threshold image analysis (**Supplementary Figure S3C-D,G-H**).

An increased CD68 immunoreactivity was also found in brainstem and cerebellar regions of 2- and 4-month old *Hexb*^{-/-} mice (**Figure 7A,B; Supplementary Figure S4A,B,E,F**). Notably, activated CD68-positive microglial cells were bigger, more intensely stained and had short thickened processes in SPV, RF, DCN, in the molecular and granular layers of the cerebellar cortex and in the white matter brain regions of *Hexb*^{-/-} mice. These morphological changes were already evident in 2-month old *Hexb*^{-/-} mice, becoming more apparent in 4-month old mutants. Importantly, scAAV9-treated animals were comparable to age-matched WT mice. These observations were further confirmed by quantifications performed on both age groups in SPV, RF, DCN and in all cortical layers tested (**Figure 7C,D and Supplementary Figure S4C,D,G,H**).

Finally, to measure the impact of treatment on neuron survival, neuron counts were performed at 4 months of age in one brainstem (SPV) and one cerebellar region (DCN). Neuron counts in both regions showed that significant loss of Nissl-stained neurons in *Hexb*^{-/-} mice was prevented by scAAV9-treatment (**Figure 7E,F**).

scAAV9-Hexb treated SD mice have normal lifespan and locomotor function

Given the positive effect of scAAV9-Hexb treatment on GM2 accumulation, lysosomal dysfunction providing a striking protection from neuroinflammation and neuronal death, long-term life expectancy was evaluated in AAV9-treated SD mice by comparison with SD and WT mice. Mean survival of untreated *Hexb*^{-/-} and WT control mice was on average 117 and 750 days, respectively (**Figure 8A**). Notably, survival of SD mutants treated with scAAV9-Hexb was completely comparable to WT mice (mean >750 days). Importantly, scAAV9-injected SD mice were phenotypically undistinguishable from control WT mice (no tremor) (**Supplementary Video S1**). Furthermore, the body weight curves revealed that while the weight of SD mutants rapidly decreased about 40% between 14-16 weeks coinciding with aggravation of pathological symptoms, the weight in the AAV9-treated SD mice remained stable reflecting maintenance of feeding activity comparable to WT mice (**Figure 8B**).

To evaluate locomotor skills in scAAV9-treated SD mice, different behavioral tests were performed on each animal on a weekly basis. Mice were first submitted to the inverted screen test and the latency to fall from the returned metal grid was recorded. At the beginning of the testing period (from 8 to 12 weeks), mice from three groups were undistinguishable in their ability to stay on the grid (**Figure 8C**). However, starting from 12 weeks of age *Hexb*^{-/-} mice developed a progressive loss of muscular strength and time on the grid decreased finally reaching zero due to complete paralysis (16 weeks) (**Figure 8C**). Remarkably, scAAV9-treated SD mice were identical to WT group throughout the entire duration of the experiment (>750 days). In addition, physical endurance and coordination were assessed using a rotarod. Mean time on rotating rod at accelerating speed was dramatically reduced in untreated Sandhoff mice while scAAV9-treated SD mice were completely comparable to normal (**Figure 8D**). In addition, similar observations were obtained for mean speed (not shown). Mice gait was also evaluated using the footprint test (**Supplementary Figure S5**). *Hexb*^{-/-}

mice showed significant paralysis and characteristic dragged pattern due to reduced muscular strength and impaired neurological function at 4 months (**Supplementary Figure S5**). Importantly, scAAV9-treated SD animals behaved similarly to WT at 4, 12, 16 and 20 months with no gait aberrations. Finally, animals were tested using an activimeter, a behavioral test performed in the home-cage environment. The test was conducted at 2, 4, 8, 12, 16 and 20 months in treated SD and WT mice, and at 2 and 4 months in naive Sandhoff mice. Global movement (time in movement and distance covered) in scAAV9-treated *Hexb*^{-/-} mice was not significantly different from control WT mice (**Supplementary Figure S6A,B**).

DISCUSSION

Here we report for the first time a systemic gene therapy approach allowing to achieve normal lifespan and physical activity in a preclinical murine model of Sandhoff disease. A single intravenous administration of scAAV9-*Hexb* vector in neonatal mice was sufficient to obtain a global transduction pattern and a widespread therapeutic effect throughout the entire CNS as well as liver. Targeting those organs enabled therapeutic correction of SD key pathognomonic symptoms including *Hexb* enzymatic deficiency, lysosomal dysfunction, GM2 storage all contributing to neuroinflammation and neuronal loss observed in patients and reproduced in the murine model.

Our protocol of using scAAV9-based vector in neonates is based on several considerations. *Hexb*^{-/-} mice after a latent phase undergo a rapid decline culminating in death around 16 weeks of age.⁵ However, GM2 storage has already been detected in some parts of the CNS of 2-3-week old *Hexb* mutants. Furthermore, low level of astrocytosis and microglial activation was evident in 1-month old SD mice (unpublished data). As behavioural symptoms of the disease, like head tremor, are visible around 10 weeks, development of early intervention is crucial. For this purpose, the scAAV9 therapeutic vector was administered 1-2 days after

birth. scAAV9 vector was specifically used, as this serotype is able to cross the blood-brain barrier (BBB) and self-complementary vector allows rapid maximal transgene expression. Interestingly, a differential targeting has been previously observed in the CNS after intravenous delivery of scAAV9 vectors. In neonates, systemic injection resulted in widespread transduction with an apparent tropism toward neurons while a predominant astrocyte transduction was seen in adult animals.¹⁵ Importantly, correction of SD symptoms in multiple brain regions that we report here, strongly suggest that scAAV9-Hexb vector efficiently crossed BBB and transduced neurons that are mainly involved in Sandhoff disease preventing their degeneration. In addition, secretion of active β -hexosaminidase by transduced neurons with subsequent recapture by distant cells might contribute to a widespread correction observed in SD mice.²⁶ Notably, treatment in mice at postnatal day 1-2 corresponds to a second trimester of human embryonic growth.^{27,28} Therefore, to translate these encouraging results to clinic, a feasibility and tolerability of our approach has now to be tested in adult symptomatic mice.

We show here for the first time a long-term rescue of GM2 gangliosidosis in the forebrain, but also in the hind parts of the brain (cerebellum and brainstem) after scAAV9-mediated gene transfer in the acute Sandhoff mouse model. Of note, residual accumulation of GA2 and GM2 lipids was still observed in cerebellum of scAAV9-HexB treated mice suggesting that this region is targeted to a less extent. The future works will need to address the nature of the differential transduction efficiency in different brain regions to optimise the therapy. It was stated that the dose of scAAV9 required to achieve effective transduction via systemic vascular delivery in mice was approximately 1.0×10^{13} vg/kg.^{29,30} In our study, the dose of scAAV9-Hexb vector 3.5×10^{13} vg/kg induced prolonged expression of β -hexosaminidase transgene without cytotoxicity and therapeutic vector expression was stable at long-term. Extraordinarily, treated mice survived beyond 2 years of age (mean survival >700 days)

without manifesting any disease symptoms. Recently, long-term survival of SD mice following intravenous delivery of AAV9-Hexb in neonates was achieved.²⁴ However, at the age of 43 weeks 8 of 10 treated SD mutants developed liver and lung tumors likely due to the high dose of AAV used (2.5×10^{14} vg/kg). In our study, macroscopic examination that was performed at the experimental end-point on 2-year old animals did not reveal any malignancies neither in WT nor in injected SD mice (data not shown). Those suggest that the choice of the vector, time and administration route all contribute to the long-term outcomes of treatment.

It has previously been shown in adult SD mice that intrastriatal delivery of recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV2/2) expressing either human β -subunit alone or both α and β subunits delayed the disease.¹² Furthermore, infusion of 1-month-old Hexb^{-/-} mice with rAAV2/1 $\alpha + \beta$ (human transgenes) into the striatum enabled an abundant expression of Hex A and Hex B, but the single rAAV2/1 β infusion led only to Hex B expression.¹³ In our study, both β -hexosaminidase isozymes Hex A and Hex B were generated as a result of a single systemic injection of a scAAV9-Hexb vector (murine transgene). Clearance of GA2 degraded by Hex B and of GM2 metabolized by Hex A suggests that synthesized β -subunit was functional and formed $\alpha\beta$ heterodimer with endogenous α -monomers. Although hexosaminidases were not restored to normal, Hex A specifically required for GM2 ganglioside metabolism was increased to around 15% of WT within cerebrum and almost 10% within liver after the therapeutic vector administration. Importantly, given the lifespan achieved and physical activity of treated SD mice, the level restored is likely therapeutic. In fact, the production of a small percentage of wild-type activity probably reached a threshold level sufficient for normal GM2 degradation.³¹

A secondary elevation of lysosomal enzymes has been observed in tissues from LSD patients and in some animal models,^{32,33} providing biochemical markers of pathology and therapeutic

response. In the Sandhoff model, a dramatic increase of some lysosomal enzymes was noted as well as a drastic reduction after scAAV9 vector administration confirming the effectiveness of our approach. In LSD, accumulation of undegraded material can increase number and size of lysosomes as evidenced by overexpression of structural lysosomal proteins.³⁴ scAAV9-Hexb treatment was efficient in preventing LAMP-1 accumulation and storage in the brain in SD mutants. Hexb^{-/-} mice display significant pathology within the forebrain,⁷ including the thalamocortical system (unpublished data). Moreover, neuronal apoptosis and microglial activation was also observed within spinal cord and brainstem of Sandhoff mice, but no detailed analysis of this pathology was reported. Here, glial activation was described in several pathological sites within these hindbrain regions. A profound degeneration of neurons was found within SPV and DCN nuclei in Hexb^{-/-} mice, resulting from astrogliosis and glial activation. Neuroinflammation can therefore be considered as an indicator of specific neuron population loss. Of most importance, we show here that a single intravenous administration was sufficient to prevent severe neuroinflammation within cerebellum and brainstem, two critical brain regions affected in SD. In sum, we demonstrate in a preclinical model that a single intravenous administration of scAAV9-Hexb vector in newborn Hexb^{-/-} mice is effective and sufficient to prevent GM2 ganglioside accumulation in CNS and peripheral organs having a long-lasting effect on physical activity, behavior and survival of treated mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals

All animal experiments were carried out in accordance with European guidelines for the care and use of experimental animals. The Sandhoff mouse model was generated by targeted disruption of the *Hexb* gene in the C57BL/6J strain (*Hexb*^{-/-} mice).⁵ Wild-type (+/+) C57BL/6J littermates were used as controls in the study. The *Hexb*^{-/-} strain was maintained

by two types of breeding: heterozygous females with affected males, and affected females with affected males. To determine the status of newborn mice, total β -hexosaminidase activity was measured from clipped toes using a standard enzymatic assay protocol. Briefly, biopsies were mechanically homogenized in sterile water, incubated on ice for 20 minutes for cell lysis. β -hexosaminidases and β -galactosidase (control enzyme) activities were then measured using the artificial β -*N*-acetylglucosaminide (MUG) and 4-MU- β -D-galactopyranoside, respectively. The genotype was double-checked by polymerase chain reaction (PCR), as described previously.⁵ Briefly, samples were incubated at 37°C overnight in urea buffer containing proteinase K (10 mg/ml). Next, phenol was added, followed by 5 minutes centrifugation in order to separate the aqueous phase from the organic phase which was discarded. Furthermore, glycogen (20 mg/ml), ammonium acetate (7.5 M) and pure ethanol were added to the aqueous phase and the solution was incubated at -80°C for 1 hour for DNA precipitation, and DNA was recovered by centrifugation (13000 rpm for 30 min at 4°C). After supernatant removal, 3 washes with 70% ethanol were performed and DNA was resuspended in sterile TE 10:1. The final DNA concentration was evaluated on a Nanodrop (Thermo Scientific). PCR genotyping was performed using three previously described primers.⁵ PCR samples (50 μ l total volume) were preheated at 95°C for 5 min. Forty PCR cycles were performed, composed of 30 s denaturation at 95°C, 30 s annealing at 55°C, and 1 min extension at 72°C. Products were analysed on a 2% agarose gel.

scAAV vector production and in vivo administration

Self-complementary genome-containing plasmids were constructed by deleting the D sequence and the terminal resolution site from one of the inverted terminal repeats. The production of serotype 9 AAV has been described elsewhere.¹⁴ Briefly, AAV9 vectors were generated by packaging AAV2-based recombinant self-complementary (sc) genomes into the

AAV9 capsids. Virions were produced by transfecting HEK293 cells with (i) the adenovirus helper plasmid (pXX6-80), (ii) the AAV packaging plasmid encoding the rep2 and the cap2 or the cap9 genes, and (iii) the AAV2 shuttle plasmid containing the gene encoding mouse Hexb under the control of the phosphoglycerate kinase promoter in the sc genome. Recombinant vectors (rAAV) were purified by double-CsCl ultracentrifugation followed by dialysis against the formulation buffer of the vector stocks, namely phosphate-buffered saline containing 0.5 mM MgCl₂ and 1.25 mM KCl (PBS-MK; five buffer changes, 3 hours per round of dialysis). Physical particles were quantified by real-time PCR. Vector titers are expressed as viral genomes per milliliter (vg/ml).

Injections were performed in newborn Hexb^{-/-} mice (at day one or two after birth). Injections of scAAV9-Hexb were made through the temporal vein (3.5×10^{13} vg/kg in each mouse, $n = 8$ for survival, $n = 4$ for each other subgroup: enzymatic assays, ganglioside analysis, histology).

Behavioral tests

Animals were housed at 25°C during a 12h light/dark cycle, with food and water made available *ad libitum* throughout the experiments. They were first evaluated on physical criteria: weight, general health and tremor. Tests were carried out on a weekly basis between 11 a.m. and 5 p.m. (except Activmeter). Studies were performed using scAAV9-Hexb treated Hexb^{-/-} mice, wild-type and homozygous Sandhoff littermates or age-matched progeny. Rotarod test was used to evaluate the possible influence of motor paralysis on mouse activity. The rotarod (Bioseb) comprises a rotating drum, which speed rises from 4 to 40 rpm over 2 min. The animals (up to 5) were placed on the rotating cylinder to test balance and coordination. The time at which each animal fell from the rod was noted. Each animal did three consecutive trials, the first one was treated as a test and therefore was not considered in

the final results. The inverted screen test was used for grip strength acquisition. Single animal was placed on a clean cage metal grid screen. After placement, the animal was allowed to grip the grid before it was inverted 180° over a plastic cage containing fresh bedding. The latency to fall from the grid was recorded during 10 seconds after which mice were returned to the home cage.

The righting reflex was analysed to evaluate the mice muscular abilities. The time necessary for animals to right themselves after laid-back position within a 10 seconds period was measured. For Activmeter test, single housed animals were recorded over a 10 hour night period (8 p.m. - 6 a.m.) in ages indicated. The cage was placed on an Activmeter platform system (Bioseb) which uses balance system and vibrations within the cage to measure locomotion parameters i.e. distance (cm) and global movement (s). Footprint test was performed for a qualitative analysis of gait. Front and hind mice paws were painted with red and blue ink, respectively and mice were allowed to walk in a tunnel of transparent plexiglas placed on a white sheet of paper (40 cm long) and the footprint was digitalised.

Sample collection and neuropathological analyses

Mice were sacrificed with a lethal dose of 10 mg.kg⁻¹ xylazine and 100 mg.kg⁻¹ ketamine by intraperitoneal injection and tissues were collected and for different analyses. Samples for enzymatic assays and ganglioside analyses were weighted, snap frozen and stored at -80°C until use. Brain tissue used for immunohistochemical analyses was placed in a freshly prepared and filtered solution of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 and maintained in PFA for 24h at 4°C. Fixed in PFA brain tissue was bisected along the midline. Single hemispheres were cryoprotected in 30% sucrose, 0.5% sodium azide in 50 mM tris buffered saline (TBS), pH 7.6 prior to sectioning on frozen microtome. 40 µm coronal sections through the rostrocaudal extent of the cortical mantle were collected one per well in 96 well plates containing a cryoprotective solution (30% ethylene glycol (Sigma-

Aldrich), 15% sucrose, 0.05% sodium azide in TBS.³⁵ All subsequent histological analyses were performed blind to genotype.

For direct visualization of neuronal morphology, a series of every sixth section through each brain was slide mounted and Nissl stained with cresyl violet.³⁵ Briefly, slides were incubated in 0.05% cresyl fast violet (Merck), 0.05% acetic acid in water for 30 min at 60°C, rinsed in deionised water, and then differentiated through an ascending series of alcohols before clearing in xylene and coverslipped using DPX mounting medium (VWR).

For immunohistochemistry, a standard protocol was used to examine the distribution of markers of interest,^{35,36} using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) for visualisation. Endogenous peroxidase activity was quenched in 1% hydrogen peroxidase (VWR) in TBS for 15 min. Sections were then rinsed in TBS and blocked in 15% normal serum in TBS with 0.3% Triton-X (TBS-T), before incubation in the appropriate primary antibody; polyclonal rabbit anti-GFAP (Dako, 1:4000), rat anti-CD68 (Serotec, 1:2000), polyclonal rabbit anti-LAMP-1 (Abcam, 1:1000), diluted in 10% normal serum in TBS-T overnight at 4°C. Sections were rinsed in TBS and incubated with the appropriate biotinylated secondary antibodies: swine anti-rabbit (Dako, 1:1000), rabbit anti-rat (Vector, 1:1000) for 2h at room temperature and subsequently rinsed in TBS. They are then incubated in avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector, 1:1000) in TBS for 2h, and rinsed in TBS. To visualize immunoreactivity, sections were incubated in 0.05% DAB containing 0.001% hydrogen peroxide in TBS for up to 25 min, depending on antigen. Finally, sections were rinsed in ice-cold TBS and then mounted on gelatine-chrome-coated microscope slides (VWR), air-dried overnight, cleared in xylene and coverslipped with DPX (VWR). The quantification of immunohistochemical images was performed using semi-automated thresholding image analysis, as previously described.^{36,37} Using a 40x objective, a number of non-overlapping images representing the entire region of interest (30 images for

VPM/VPL region and 18 for LGNd) were taken from 3 consecutive sections starting from defined anatomical landmarks.³⁸ Image Pro Plus image analysis software (Media Cybernetics), was used to determine the area of immunoreactivity for each antigen in each region by applying a threshold that discriminated staining from background in each image. Data were plotted as the mean percentage area of immunoreactivity per field \pm SEM for each region.

For neuron cell number estimation, the optical fractionator probe was used,³⁹ in Nissl stained sections of brain regions of interest as described.^{40,41} Briefly, Nissl stained cells were counted as neurons if they had clearly identifiable nucleus without considering astrocytes and microglia (cells with small soma). A line was traced around the boundary of the region of interest, a grid was superimposed and cells were counted within a series of dissector frames placed according to the sampling grid size. Different grid and dissector sizes were used in each brain region using a coefficient of error value of less than 0.1 to indicate sampling efficiency.⁴² For thalamic VPM/VPL region, a 1:6 series was sampled using grid 175 x 175 μm and frame 74 x 42 μm ; for lamina IV of S1BF cortical region a 1:12 series was sampled with grid 150 x 150 μm and frame 41 x 26 μm ; for brainstem regions 1:6 periodicity was used, and the dimensions for the optical fractionator were as follow: DCN - grid: 140 x 140 μm , frame: 70 x 40 μm ; SPV - grid: 270 x 270 μm , frame 70 x 40 μm .

Enzymatic assays

Sample (50 mg) was ground in 300 μL of 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 4.5 and homogenates were lysed by 3 cycles of rapid freezing and thawing, followed by centrifugation at 4°C for 5 min at 10,000 g. The protein content of each supernatant was determined using the BCA kit (Assay Protein Quantitation Bicinchoninic acid, Pierce) according to the manufacturer's recommendations. The enzyme activities (β -galactosidase, β -glucuronidase, α -fucosidase, total β -hexosaminidases and β -hexosaminidase A) were

measured using supernatants (1/10 dilution). In a black 96-well plate with clear bottom: 10 μ L of diluted supernatant was added to 50 μ L of the fluorimetric corresponding substrate. The samples were incubated for 1 h at 37°C with gentle agitation and enzymatic reactions were stopped by adding 200 μ l of a 1M glycine buffer, pH 10. The released fluorescence was read on a CytoFluor 4000 fluorimeter (PerSeptive Biosystems), excitation: 360 \pm 40 nm, emission: 460 \pm 40 nm. The data obtained were compared with the fluorescence of a 4-methyl-umbelliferone standard (10 nmol/well). Enzyme activities were expressed as nmol/h/mg cell protein. Substrates used were: 4-methyl-umbelliferyl- β -D-galactopyranoside (Sigma) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer at pH 4.5 for β -galactosidase, 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide (Sigma) 1 mM in a 0.1M citrate phosphate buffer at pH 5 for β -glucuronidase, 4-methyl-umbelliferyl- α -L-fucopyranoside (Sigma) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer at pH 4.5 for α -fucosidase, 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (Sigma) (MUG) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer at pH 4.5 for total β -hexosaminidases, 4-methyl-umbelliferyl-7-(6-Sulfo-2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside or MUGS (Calbiochem) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer at pH 4.5 for β -hexosaminidase A, 4-methyl-umbelliferone (Sigma) 1mM in deionized water for standard.

Biochemical analysis of gangliosides and other glycosphingolipids

Analyses were performed on frozen cerebral hemispheres and dissected cerebella which have been stored at -80°C prior to use. Total lipid extraction, separation and purification of main lipid fractions were done using previously described procedures.^{43,44} Briefly, total lipids were extracted from 20% tissue homogenates in water using chloroform-methanol 1:2 (v/v). For gangliosides studies, part of the extract (corresponding to 20-50 mg tissue) was desalted and separated into two fractions on reverse-phase 100 mg Bond Elut C18 columns (Varian) using a downscaling of a published procedure.⁴⁵ The methanol-water 12:1 (v/v) eluate containing all the gangliosides was used without further purification. An aliquot corresponding to 1.5 or 3

mg of tissue was spotted (Linomat 5 device, Camag) on silica gel 60 high-performance thin layer chromatography (HPTLC) plates (Merck). Plates were developed in chloroform–methanol–0.2% CaCl₂ 55:45:10 (v/v/v) and sprayed with resorcinol-HCl reagent to visualize the sialic acid moiety of individual gangliosides. Densitometric quantification was performed at 580 nm (Camag TLCII scanner, Cats software). The data were normalized to the number of sialic acids per individual ganglioside and expressed as % of total gangliosides. For gangliosidylceramide (GA2) studies, part of the total lipid extract was saponified, desalted by phase partition, and suitable aliquots were spotted on HPTLC plates. After development in chloroform–methanol–water 65:25:4 (v/v/v), hexose-containing compounds were visualized by orcinol-sulphuric acid reagent and densitometric quantification was performed.

Statistical analysis

Microsoft Excel (Redmond) was used for data collection and for statistical analysis and graph representation was conducted using GraphPad Prism Version 6 for Mac (GraphPad Software). To test for significance between groups, the Student's t-test or ANOVA test with *post hoc* Bonferroni analysis were used as appropriate. All graphs are plotted as the mean ± the standard error of the mean (SEM).

Acknowledgements

We are grateful to the members of INSERM-U1151 for support. We thank personnel of SFR Animal Facility for excellent technical support. We thank the Vector Core of the University Hospital of Nantes supported by the *Association Française contre les Myopathies* (AFM) for providing the AAV vectors. N.N. received a doctoral fellowship from the *Association Française contre les Myopathies* (AFM) and the association *Vaincre les Maladies Lysosomales* (VML). L.R. received a doctoral fellowship from the association *Vaincre les Maladies Lysosomales* (VML). The work was supported by a grant from the *Association*

Française contre les Myopathies (AFM) and the association Vaincre les Maladies Lysosomales (VML) to C.C.

Author Contributions

M.B. and C.C. conceived the study, directed the work and wrote the manuscript. J.D.C. directed neuropathological studies and M.T.V. brain lipid analyses. N.N. and L.R. designed and conducted most of the experiments, and analyzed the data. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest.

References

1. Sandhoff, K, Harzer, K, Wässle, W and Jatzkewitz, H (1971). Enzyme Alterations and Lipid Storage in Three Variants of Tay-Sachs Disease. *J. Neurochem.* **18**: 2469–2489.
2. Gravel, RA, Kaback, MM, Proia, RL, Sandhoff, K, Suzuki, K and Suzuki, K (2001). The GM2 gangliosidosis. *Metab. Mol. Bases Inherit. Dis.* **III**, New York: McGraw-Hill (pub.): pp 3827–3876.
3. Neufeld, EF (1989). Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **264**: 10927–10930.
4. Sango, K, Yamanaka, S, Hoffmann, A, Okuda, Y, Grinberg, A, Westphal, H, *et al.* (1995). Mouse models of Tay–Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat. Genet.* **11**: 170–176.
5. Phaneuf, D, Wakamatsu, N, Huang, J-Q, Borowski, A, Peterson, AC, Fortunato, SR, *et al.* (1996). Dramatically Different Phenotypes in Mouse Models of Human Tay-Sachs and Sandhoff Diseases. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 1–14.
6. Huang, J-Q, Trasler, JM, Igdoura, S, Michaud, J, Hanai, N and Gravel, RA (1997). Apoptotic Cell Death in Mouse Models of GM2 Gangliosidosis and Observations on Human Tay-Sachs and Sandhoff Diseases. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 1879–1885.
7. Wada, R, Tifft, CJ and Proia, RL (2000). Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 10954–10959.
8. Jeyakumar, M, Thomas, R, Elliot-Smith, E, Smith, DA, Spoel, VD, C, A, *et al.* (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* **126**: 974–987.

9. Matsuoka, K, Tamura, T, Tsuji, D, Dohzono, Y, Kitakaze, K, Ohno, K, *et al.* (2011). Therapeutic Potential of Intracerebroventricular Replacement of Modified Human β -Hexosaminidase B for GM2 Gangliosidosis. *Mol. Ther.* **19**: 1017–1024.
10. Maegawa, GHB, Tropak, M, Butner, J, Stockley, T, Kok, F, Clarke, JTR, *et al.* (2007). Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of gm2 gangliosidosis. *J. Biol. Chem.* **282**: 9150–9161.
11. Jeyakumar, M, Smith, DA, Williams, IM, Borja, MC, Neville, DCA, Butters, TD, *et al.* (2004). NSAIDs increase survival in the Sandhoff disease mouse: Synergy with N-butyldeoxynojirimycin. *Ann. Neurol.* **56**: 642–649.
12. Cachón-González, MB, Wang, SZ, Lynch, A, Ziegler, R, Cheng, SH and Cox, TM (2006). Effective gene therapy in an authentic model of Tay-Sachs-related diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 10373–10378.
13. Cachón-González, MB, Wang, SZ, McNair, R, Bradley, J, Lunn, D, Ziegler, R, *et al.* (2012). Gene Transfer Corrects Acute GM2 Gangliosidosis—Potential Therapeutic Contribution of Perivascular Enzyme Flow. *Mol. Ther.* **20**: 1489–1500.
14. Duque, S, Joussemet, B, Riviere, C, Marais, T, Dubreil, L, Douar, A-M, *et al.* (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **17**: 1187–1196.
15. Foust, KD, Nurre, E, Montgomery, CL, Hernandez, A, Chan, CM and Kaspar, BK (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal-neurons and adult-astrocytes in CNS. *Nat. Biotechnol.* **27**: 59–65.
16. Valori, CF, Ning, K, Wyles, M, Mead, RJ, Grierson, AJ, Shaw, PJ, *et al.* (2010). Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci. Transl. Med.* **2**: 35ra42.
17. Foust, KD, Wang, X, McGovern, VL, Braun, L, Bevan, AK, Haidet, AM, *et al.* (2010). Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotechnol.* **28**: 271–274.
18. Dominguez, E, Marais, T, Chatauret, N, Benkhelifa-Ziyyat, S, Duque, S, Ravassard, P, *et al.* (2011). Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 681–693.
19. Fu, H, Dirosario, J, Killedar, S, Zaraspe, K and McCarty, DM (2011). Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19**: 1025–1033.
20. Haurigot, V, Marcó, S, Ribera, A, Garcia, M, Ruzo, A, Villacampa, P, *et al.* (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J. Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI66778.
21. Ruzo, A, Marcó, S, García, M, Villacampa, P, Ribera, A, Ayuso, E, *et al.* (2012). Correction of Pathological Accumulation of Glycosaminoglycans in Central Nervous System and Peripheral Tissues of MPSIIIA Mice Through Systemic AAV9 Gene Transfer. *Hum. Gene Ther.* **23**: 1237–1246.
22. Weismann, CM, Ferreira, J, Keeler, AM, Su, Q, Qui, L, Shaffer, SA, *et al.* (2015). Systemic AAV9 gene transfer in adult GM1 gangliosidosis mice reduces lysosomal storage in CNS and extends lifespan. *Hum. Mol. Genet.* **24**: 4353–4364.
23. Inagaki, K, Fuess, S, Storm, TA, Gibson, GA, Mctiernan, CF, Kay, MA, *et al.* (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **14**: 45–53.
24. Walia, JS, Altaleb, N, Bello, A, Kruck, C, LaFave, MC, Varshney, GK, *et al.* (2015). Long-Term Correction of Sandhoff Disease Following Intravenous Delivery of rAAV9 to Mouse Neonates. *Mol. Ther.* **23**: 414.

25. Osmon, KJL, Woodley, E, Thompson, P, Ong, K, Karumuthil-Melethil, S, Keimel, JG, *et al.* (2016). Systemic Gene Transfer of a Hexosaminidase Variant Using an scAAV9.47 Vector Corrects GM2 Gangliosidosis in Sandhoff Mice. *Hum. Gene Ther.* **27**: 497–508.
26. Sands, MS and Davidson, BL (2006). Gene therapy for lysosomal storage diseases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **13**: 839–849.
27. Clancy, B, Finlay, BL, Darlington, RB and Anand, KJS (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *NeuroToxicology* **28**: 931–937.
28. Workman, AD, Charvet, CJ, Clancy, B, Darlington, RB and Finlay, BL (2013). Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**: 7368–7383.
29. Gray, SJ, Matagne, V, Bachaboina, L, Yadav, S, Ojeda, SR and Samulski, RJ (2011). Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19**: 1058–1069.
30. Forsayeth, JR and Bankiewicz, KS (2011). AAV9: over the fence and into the woods . . . *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19**: 1006–1007.
31. Conzelmann, E, Kytzia, HJ, Navon, R and Sandhoff, K (1983). Ganglioside GM2 N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity in cultured fibroblasts of late-infantile and adult GM2 gangliosidosis patients and of healthy probands with low hexosaminidase level. *Am. J. Hum. Genet.* **35**: 900–913.
32. Sands, MS, Vogler, C, Torrey, A, Levy, B, Gwynn, B, Grubb, J, *et al.* (1997). Murine mucopolysaccharidosis type VII: long term therapeutic effects of enzyme replacement and enzyme replacement followed by bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* **99**: 1596–1605.
33. Vogler, C, Galvin, N, Levy, B, Grubb, J, Jiang, J, Zhou, XY, *et al.* (2003). Transgene produces massive overexpression of human β -glucuronidase in mice, lysosomal storage of enzyme, and strain-dependent tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 2669–2673.
34. Meikle, PJ, Brooks, DA, Ravenscroft, EM, Yan, M, Williams, RE, Jaunzems, AE, *et al.* (1997). Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin. Chem.* **43**: 1325–1335.
35. Bible, E, Gupta, P, Hofmann, SL and Cooper, JD (2004). Regional and cellular neuropathology in the palmitoyl protein thioesterase-1 null mutant mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol. Dis.* **16**: 346–359.
36. Pontikis, CC, Cella, CV, Parihar, N, Lim, MJ, Chakrabarti, S, Mitchison, HM, *et al.* (2004). Late onset neurodegeneration in the Cln3^{-/-} mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis is preceded by low level glial activation. *Brain Res.* **1023**: 231–242.
37. Pontikis, CC, Cotman, SL, MacDonald, ME and Cooper, JD (2005). Thalamocortical neuron loss and localized astrocytosis in the Cln3Deltaex7/8 knock-in mouse model of Batten disease. *Neurobiol. Dis.* **20**: 823–836.
38. Paxinos, G and Franklin, B (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, San Diego. CA Academic press.
39. West, MJ, Slomianka, L and Gundersen, HJ (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* **231**: 482–497.
40. Kielar, C, Maddox, L, Bible, E, Pontikis, CC, Macauley, SL, Griffey, MA, *et al.* (2007). Successive neuron loss in the thalamus and cortex in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol. Dis.* **25**: 150–162.
41. Pressey, SNR, O'Donnell, KJ, Stauber, T, Fuhrmann, JC, Tyynelä, J, Jentsch, TJ, *et al.* (2010). Distinct neuropathologic phenotypes after disrupting the chloride transport proteins CIC-6 or CIC-7/Ostm1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**: 1228–1246.

42. Gundersen, HJ, Jensen, EB, Kiêu, K and Nielsen J, null (1999). The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J. Microsc.* **193**: 199–211.
43. Fujita, N, Suzuki, K, Vanier, MT, Popko, B, Maeda, N, Klein, A, *et al.* (1996). Targeted Disruption of the Mouse Sphingolipid Activator Protein Gene: A Complex Phenotype, Including Severe Leukodystrophy and Wide-Spread Storage of Multiple Sphingolipids. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 711–725.
44. Reid, PC, Lin, S, Vanier, MT, Ohno-Iwashita, Y, Harwood, HJ, Hickey, WF, *et al.* (2008). Partial blockage of sterol biosynthesis with a squalene synthase inhibitor in early postnatal Niemann-Pick type C npcnih null mice brains reduces neuronal cholesterol accumulation, abrogates astrogliosis, but may inhibit myelin maturation. *J. Neurosci. Methods* **168**: 15–25.
45. Kyrklund, T (1987). Two procedures to remove polar contaminants from a crude brain lipid extract by using preppacked reversed-phase columns. *Lipids* **22**: 274–277.

Figure Legends

Figure 1: Partial restoration of hexosaminidases activities in brain, brainstem and liver of scAAV9-treated animals at 2 and 4 months

Enzymatic assays were performed by using the synthetic substrates MUG and MUGS permitting to measure either total hexosaminidases activity (A,C,E) or hexosaminidase A specific activity (B,D,F). Results are presented as percentage of wild-type (WT). Error bars show SEM, $n=3-4$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ using one way ANOVA.

Figure 2: Reduction of secondary elevation of lysosomal enzymes and storage after the scAAV9-Hexb treatment

Cerebrum (A), brainstem (B) and liver (C) of WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated mice at 2 and 4 months were tested for β -glucuronidase, α -fucosidase and β -galactosidase activities. Results are presented as percentage of WT activities for each enzyme. Error bars show SEM, $n=3-4$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ using one way ANOVA. (D) Cerebrum sections were stained with Nissl solution. An abnormal swollen morphology of neuron cell bodies (arrows) can be observed in the thalamus of 4 months old *Hexb*^{-/-} mice. The scAAV9-treated animals are similar to WT and do not show such pattern. Scale bars: 50 μm . (E) Brain sections of 4 month-old *Hexb*^{-/-} animals show a huge accumulation of LAMP-1 within hypothalamus, cortex, and hippocampus. No upregulation can be observed in WT or in scAAV9-treated samples. (F) The higher magnification of S1BF lamina IV shows homogeneous distribution of Lamp-1 in untreated mice and absence of staining in WT and scAAV9-treated animals. Scale bars: full sections (E) 500 μm ; higher magnification (F) 100 μm .

Figure 3: HPTLC analysis of gangliosides and glycosphingolipids within cerebrum and cerebellum of 2 and 4 month-old WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated mice

Gangliosides (A,B) and other glycosphingolipids (C) were studied in cerebrum and cerebellum of 2 and 4 month-old wild type, naive *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated mice. (A) Chromatographic profiles of total gangliosides (resorcinol-HCl staining), showing a drastic and selective reduction of the GM2 ganglioside accumulation in scAAV9-treated mice, compared to the massive storage observed in age-matched untreated SD mice. Each lane corresponds to 3 mg wet weight tissue. (B) Quantitative data for GM2 ganglioside (expressed as percentage of total gangliosides) in cerebrum and cerebellum. (C) Other glycosphingolipids (2 mg tissue/lane), separated on HPTLC plates and visualized by orcinol-sulfuric reagent. A huge accumulation of GA2 is noticeable in SD mice by comparison with WT and scAAV9-treated mice. Gal-Cer, galactosylceramide; GA2, gangliotriaosylceramide.

Figure 4: Correction of astrocytosis in the thalamocortical system following the IV administration of scAAV9-*Hexb* vector

(A) Nissl stained section highlighting the brain regions of interest: 1-somatosensory barrelfield cortex (S1BF), 2-dorsal lateral geniculate nucleus (LGNd) 3-ventral posteromedial/posterolateral nuclei (VPM/VPL). (B,D) GFAP immunostaining was performed on thalamus (B) and cortex (D) sections of WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated animals at 2 and 4 months. Astrocytosis was already present at 2 months and it increased with time in thalamus (B) and cortex (D). It was absent in WT and scAAV9 mice in both regions (B,D). Quantification of GFAP immunoreactivity shows a significant reduction of astrocytosis in 4 months scAAV9-treated mice in thalamus and cortex (C,E). Error bars show SEM, $n = 3-4$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using one way ANOVA.

Figure 5: Clearance of microgliosis and neuronal loss prevention in the thalamocortical system after scAAV9-Hexb treatment

CD68 immunostaining was done on sections of cerebrum of WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated animals at 2 and 4 months. Thalamus (A) and cortex (C) of WT controls and scAAV9 treated animals show very rare activated microglia whereas the *Hexb*^{-/-} mice present a time-dependent microgliosis throughout cerebrum (A,C), and especially in the VPM/VPL thalamic region. The quantification of CD68 immunoreactivity (B,D) shows the significant reduction of microgliosis already at 2 months in scAAV9-treated animals and the treatment has a long-term effect (4 months) both in thalamus and cortex. (E) Neuron number estimation in the thalamocortical system of 4 months old scAAV9 treated mice revealed no significant loss of Nissl-stained neurons, neither in VPM/VPL. Error bars show SEM, $n = 3-4$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using one way ANOVA. Scale bar: thalamus 500 μm , insert 50 μm ; cortex 100 μm , insert 50 μm .

Figure 6: Significant correction of astrocytosis in brainstem after scAAV9-Hexb treatment

(A) Nissl stained section highlighting brain regions of interest : Cb-Cerebellum; Bs-Brainstem; RF-reticular formation; SPV-spinal trigeminal nucleus V; DCN-deep cerebral nuclei. Higher magnification: cerebellar layers: ML-Molecular Layer; GL-Granular Layer; WM-White Matter. (B,D) GFAP immunostaining was performed on brainstem sections of WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated animals at 2 and 4 months. (C,E) Quantitative thresholding image analysis of GFAP immunoreactivity in brainstem of *Hexb*^{-/-} mice show consistent upregulation of this marker at 2 and 4 months compared to age-matched controls. ScAAV9-treated mice show absence of astrocytosis in every region of brainstem, SPV (C) and RF (E). This expression is comparable to WT littermates. Error bars show SEM, $n = 3-4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$,

**** $p < 0.0001$ using one-way ANOVA. Scale bar: 50 μm .

Figure 7: Significant correction of microglial activation and neuronal loss prevention in brainstem and cerebellum of treated mice

Brainstem (A, B) sections of WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated mice at 2 and 4 months were stained with CD68 antibody. Correction of microgliosis was seen in scAAV9 treated animals by comparison to *Hexb*^{-/-} mice at 2 and 4 months (A,B). Quantitative thresholding image analysis of CD68 expression within SPV (C) and RF (D) revealed increased CD68 expression in *Hexb*^{-/-} mice and no significant microgliosis in WT and scAAV9-treated mice. (E,F) Unbiased optical fractionator estimates of the number of Nissl-stained neurons in brainstem and cerebellum of *Hexb*^{-/-}, WT and scAAV9-treated mice revealed a significant loss of neurons within spinal nucleus of the trigeminal nerve SPV (E) and deep cerebellar nuclei DCN (F) compared to WT mice. At the age of 4 months, no significant loss of neurons was found in the corresponding regions of scAAV9-*Hexb* samples. Error bars show SEM, $n = 3-4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using one-way ANOVA. Scale bar: 50 μm .

Figure 8: Life expectancy was prolonged, body weight maintained and behavioral performance improved in AAV9-treated mice

(A) Kaplan-Meier survival curve is shown for WT ($n = 7$), low dose scAAV9 ($n = 6$), high dose scAAV9 ($n = 8$) and *Hexb*^{-/-} ($n = 8$) mice. Animals injected with the lowest dose of therapeutic vector had a maximal lifespan of 230 days. Animals treated with 3.5×10^{13} vg/kg reached > 700 days while untreated Sandhoff mice died around 120 days. (B) Weight was evaluated each week in the different groups of mice. The body weight was only maintained in the group with the highest scAAV9-*Hexb* dose (curve comparable to WT group). (C) WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-*Hexb* mice receiving either low dose (1.34×10^{13}) or high dose (3.5×10^{13}) were tested using a

rotarod. They were put on the accelerating cylinder and the length of time mice stayed on the rod before falling was recorded in the four groups. (D) Mice were subjected to inverted screen test. Latency to fall from metal grid within 10 s test decreases progressively in *Hexb*^{-/-} mice, whereas animals treated with 3.5×10^{13} vg/kg obtain results identical to WT controls throughout entire experience.

Supplemental Information

Video S1: This video shows a scAAV9-*Hexb* treated mouse and a WT mouse (aged 23 months) in their home-cage environment. Mice were active; they had no neurological sign and were undistinguishable.

Figure S1: Prevention of lysosomal storage in hypothalamus, cortex, and hippocampus

Brain sections of 4 months-old *Hexb*^{-/-} animals show a huge accumulation of LAMP-1 within hypothalamus, cortex, and hippocampus. No upregulation of this marker can be observed in WT or in scAAV9-treated samples. Scale bars: 500 μ m.

Figure S2: Reduction of neuroinflammation in LGNd thalamic region in scAAV9-treated mice

(A) Astrocytosis was prevented in scAAV9-treated animals by comparison with *Hexb*^{-/-} mice showing a significant increase of immunoreactivity at 4 months. (B) Microgliosis was dramatically reduced in scAAV9-treated mice at 4 months by comparison with *Hexb*^{-/-} mice showing a huge immunoreactivity at 4 months. Error bars show SEM, $n = 3-4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using one way ANOVA.

Figure S3: Correction of astrocytosis in the cerebellum following IV administration of scAAV9-Hexb vector

GFAP-immunostaining was performed on cerebellum sections from WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated animals at 2 and 4 months. (A) DCN (B) molecular layer (E) granular layer (F) white matter. In the different regions and at both ages, astrocytosis was prevented/reduced in scAAV9-treated mice by comparison with untreated mice. Results were confirmed by the quantitative thresholding image analyses (C-D, G-H). Error bars show SEM, $n = 3-4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using one way ANOVA. Scale bar: 50 μm .

Figure S4: Significant correction of microglial activation in cerebellum in treated mice

CD68-immunostaining was performed on cerebellum sections from WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated animals at 2 and 4 months. (A) DCN (B) molecular layer (E) granular layer (F) white matter. Microglial activation was nearly absent in scAAV9-treated mice by comparison with untreated mice. Results were confirmed by the quantitative thresholding image analyses (C-D, G-H). SEM, $n = 3-4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ using one way ANOVA. Scale bar: 50 μm .

Figure S5: Qualitative gait analysis reveals absence of ataxic or paralysed pattern in scAAV9-treated mice

Footprint test was performed in WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated mice (4, 12, 16 and 20 months). While *Hexb*^{-/-} mice were paralysed at 4 months, scAAV9-Hexb animals showed no gait aberrations even at 20 months.

Figure S6: Correction of behavioral deficits following intravenous scAAV9-Hexb delivery

(A) Actimeter acquisition on a 10h night period at different time points (2, 4, 8, 12, 16, 20 months) showed hyperactivity of *Hexb*^{-/-} mice compared to WT at 2 months, and subsequent drastic decline at 4 months. Global movement was not significantly different between scAAV9-treated and WT mice during months, except during the late period (mean \pm SEM of $n = 3$ per group). (B) No significant difference was found for the total distance covered between scAAV9-treated and WT mice at 12 months (error bars show SEM, $n = 3-4$, $p > 0.5$, t-test).

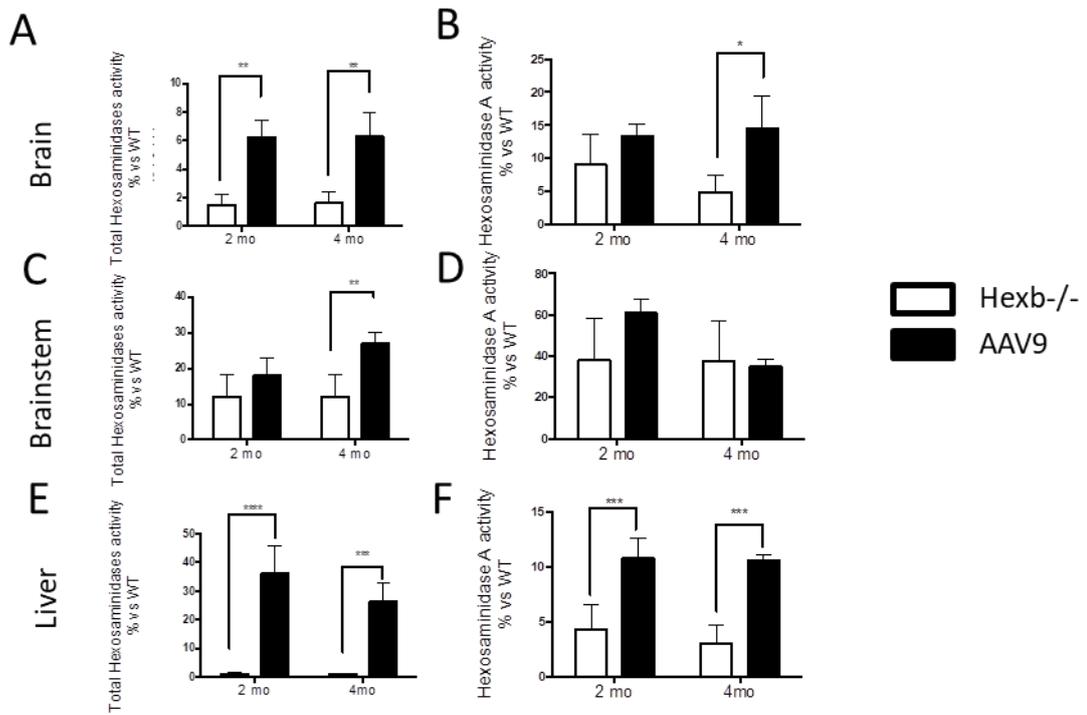


Figure 1: Partial restoration of hexosaminidases activities in brain, brainstem and liver of scAAV9-treated animals at 2 and 4 months

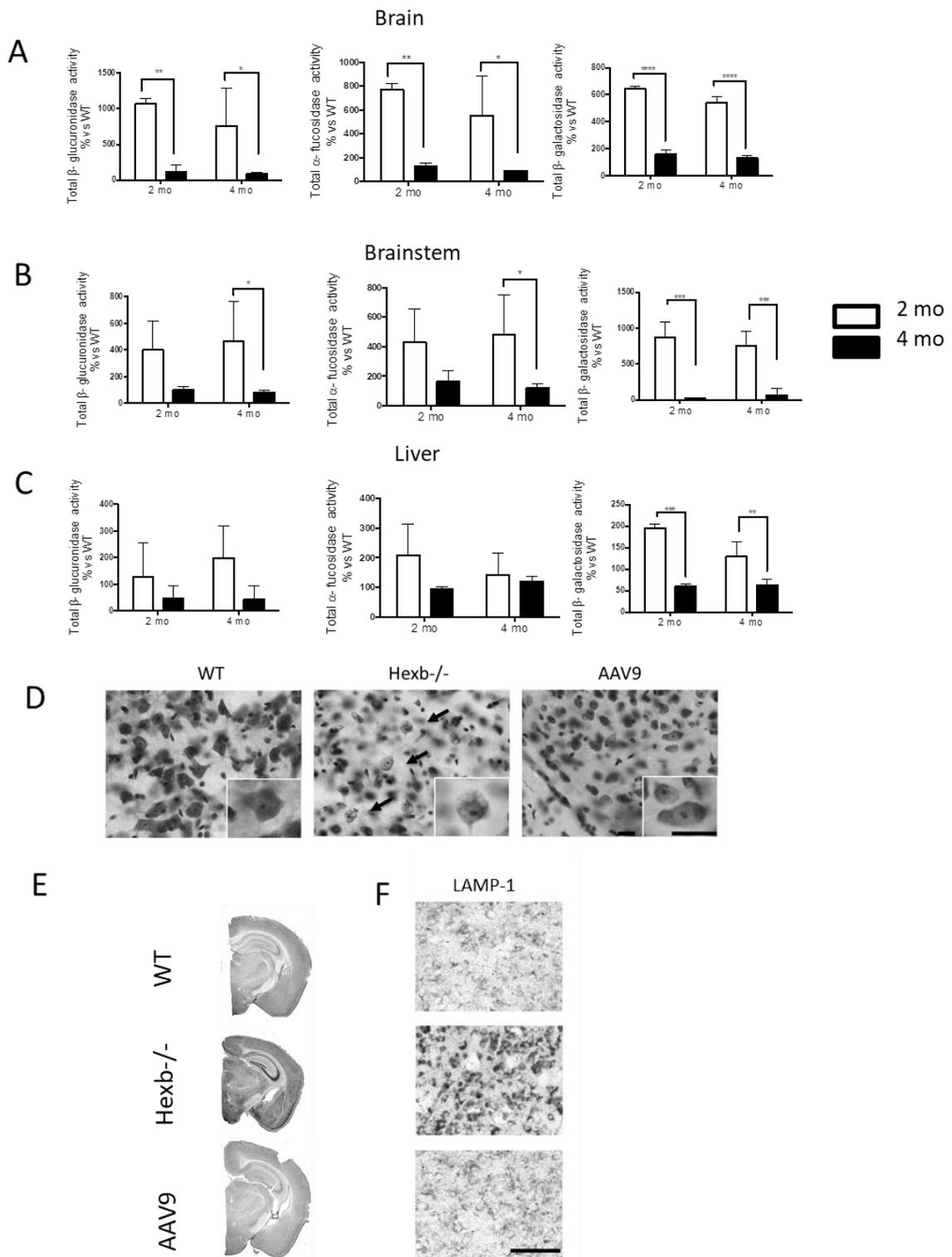


Figure 2: Reduction of secondary elevation of lysosomal enzymes and storage after the scAAV9-Hexb treatment

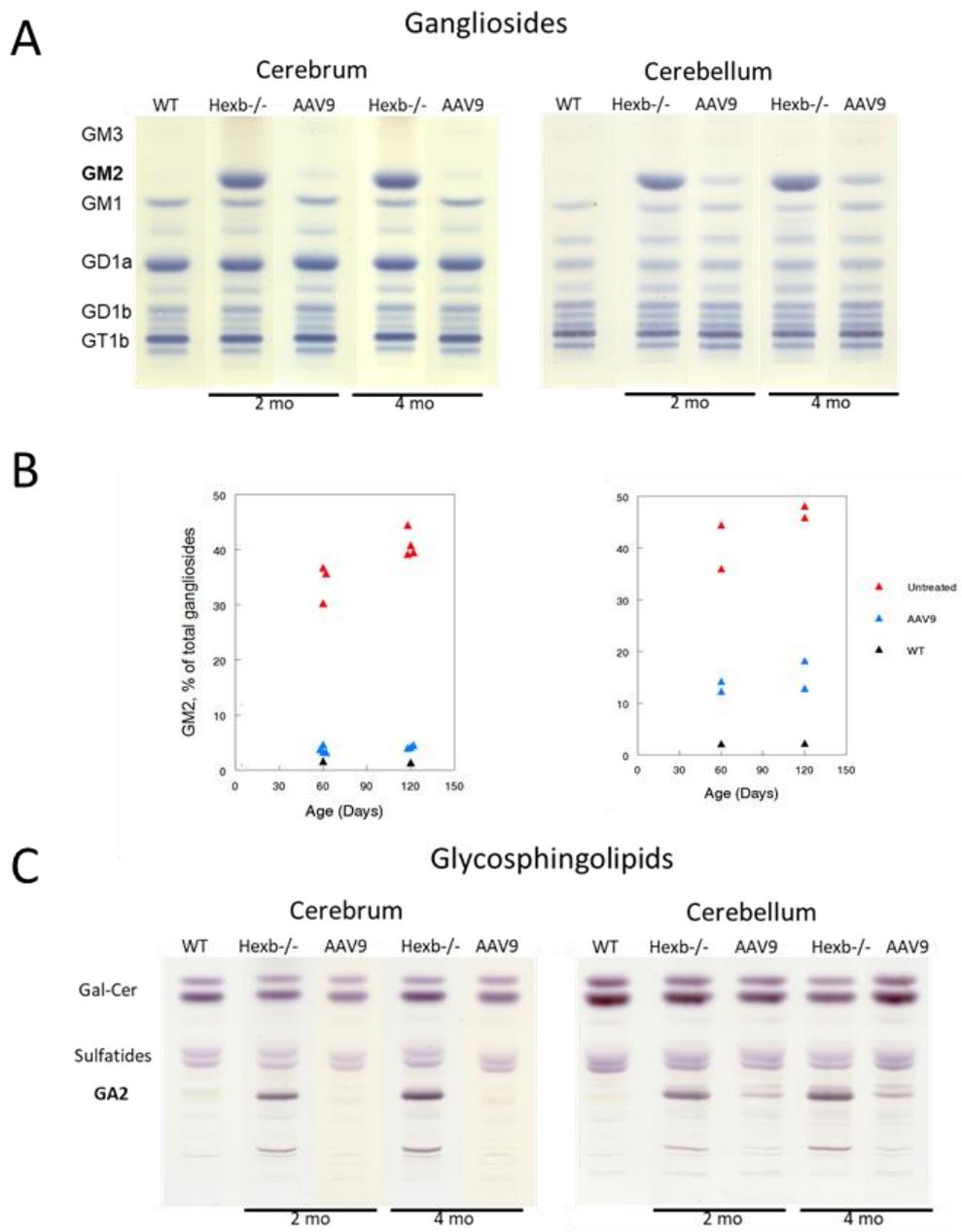


Figure 3: HPTLC analysis of gangliosides and glycosphingolipids within cerebrum and cerebellum of 2 and 4 month-old WT, *Hexb*^{-/-} and scAAV9-treated mice

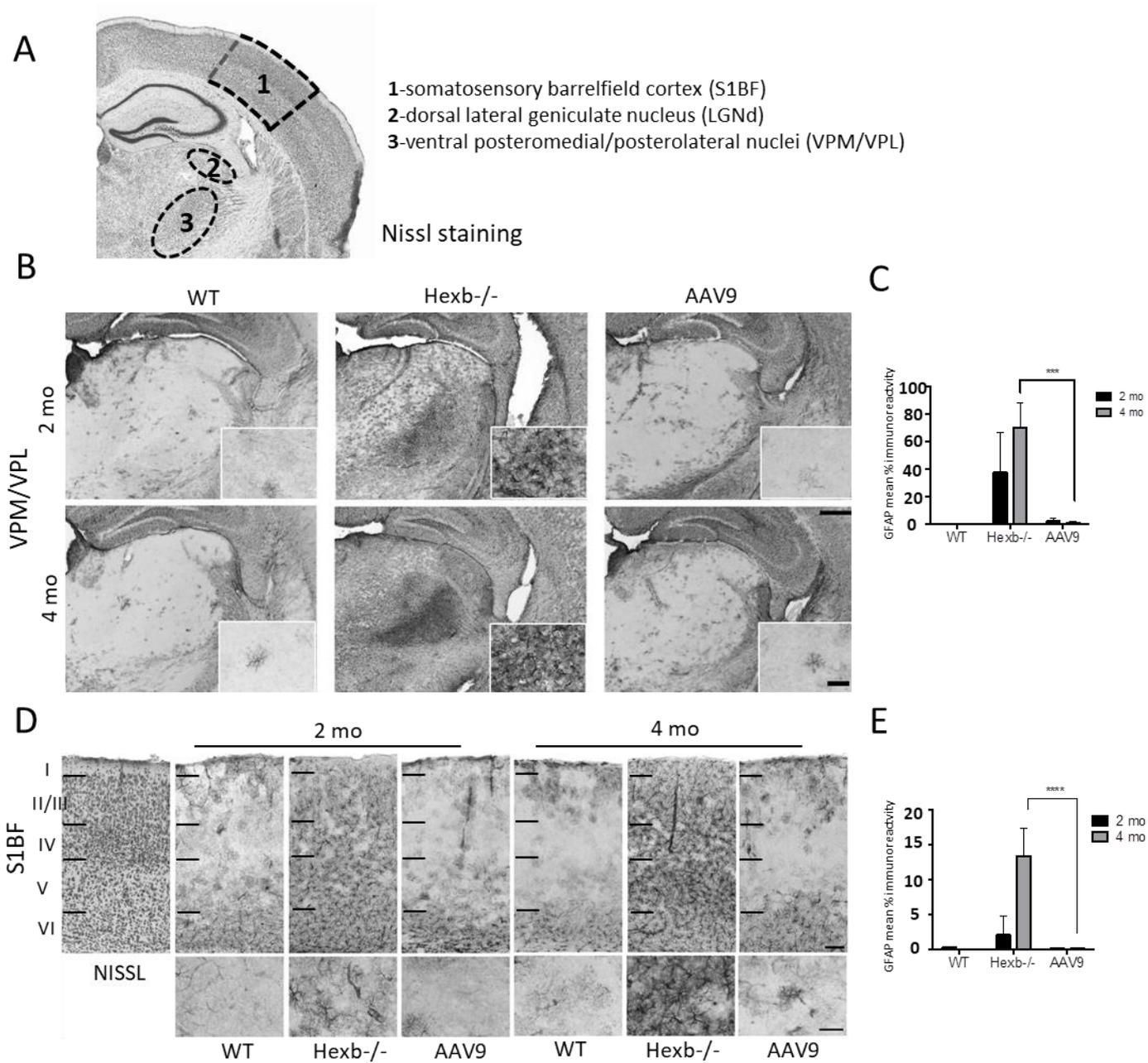


Figure 4: Correction of astrocytosis in the thalamocortical system following the IV administration of scAAV9-Hexb vector

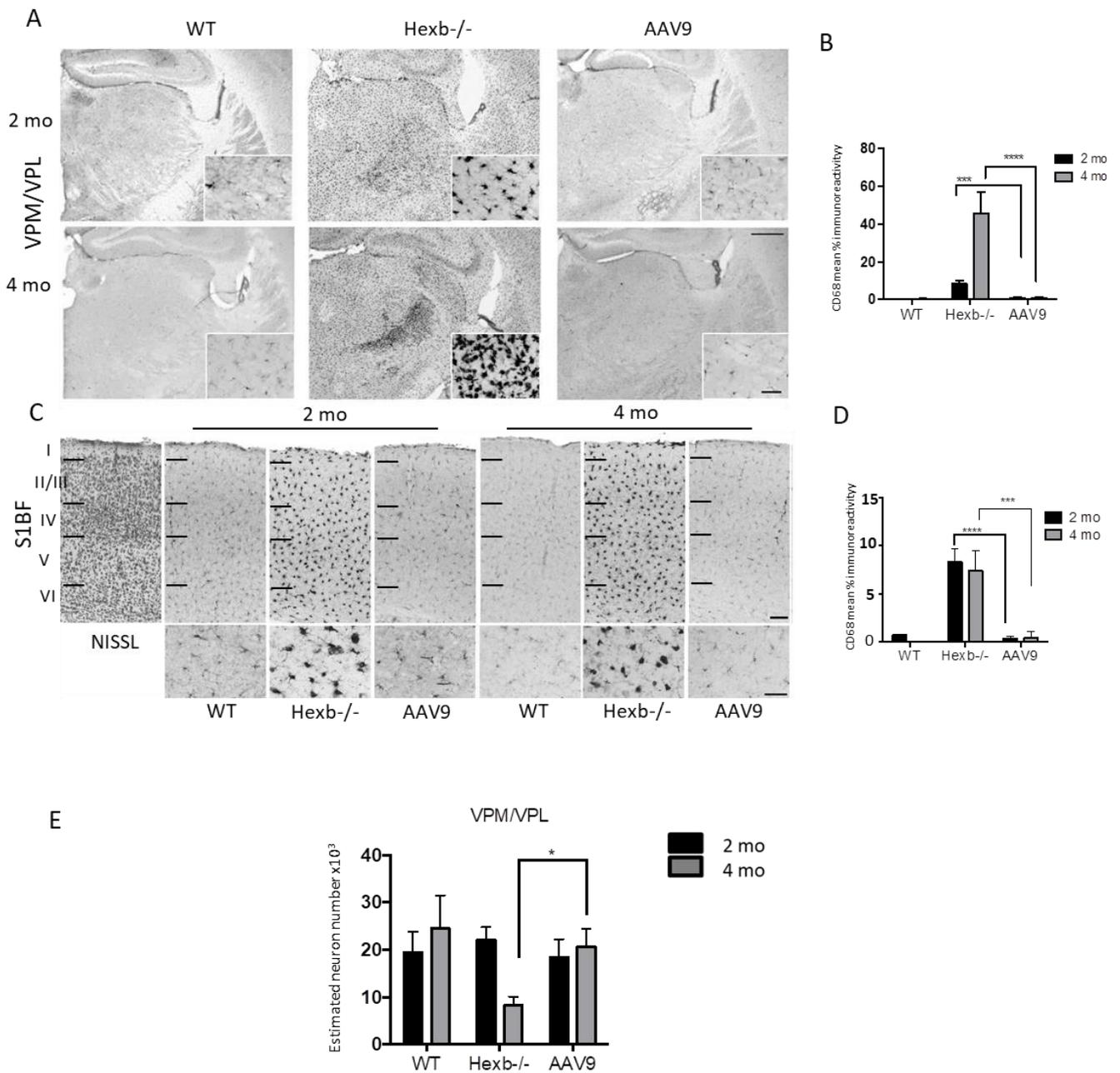


Figure 5: Clearance of microgliosis and neuronal loss prevention in the thalamocortical system after scAAV9-Hexb treatment

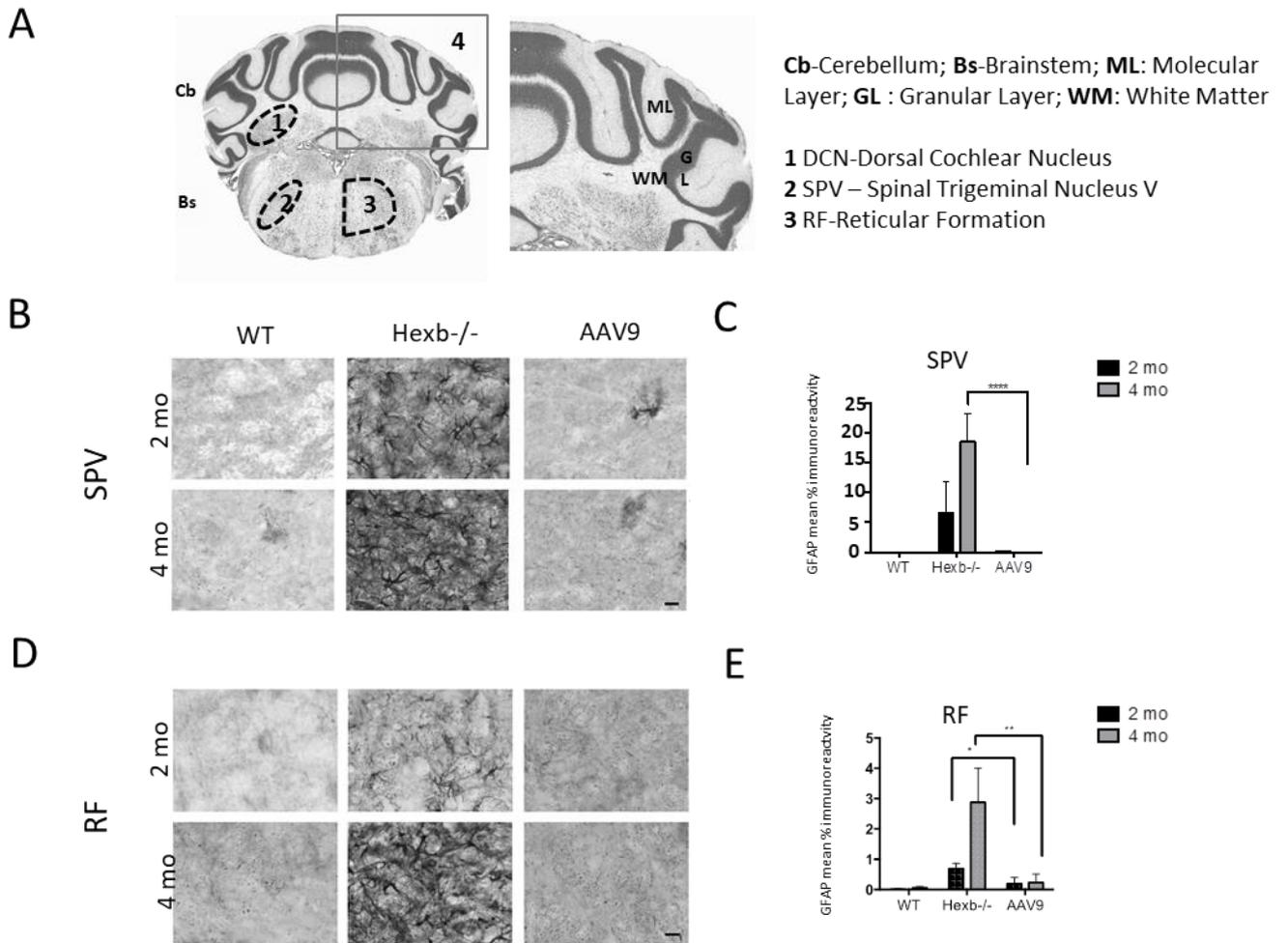


Figure 6: Significant correction of astrocytosis in brainstem after scAAV9-Hexb treatment

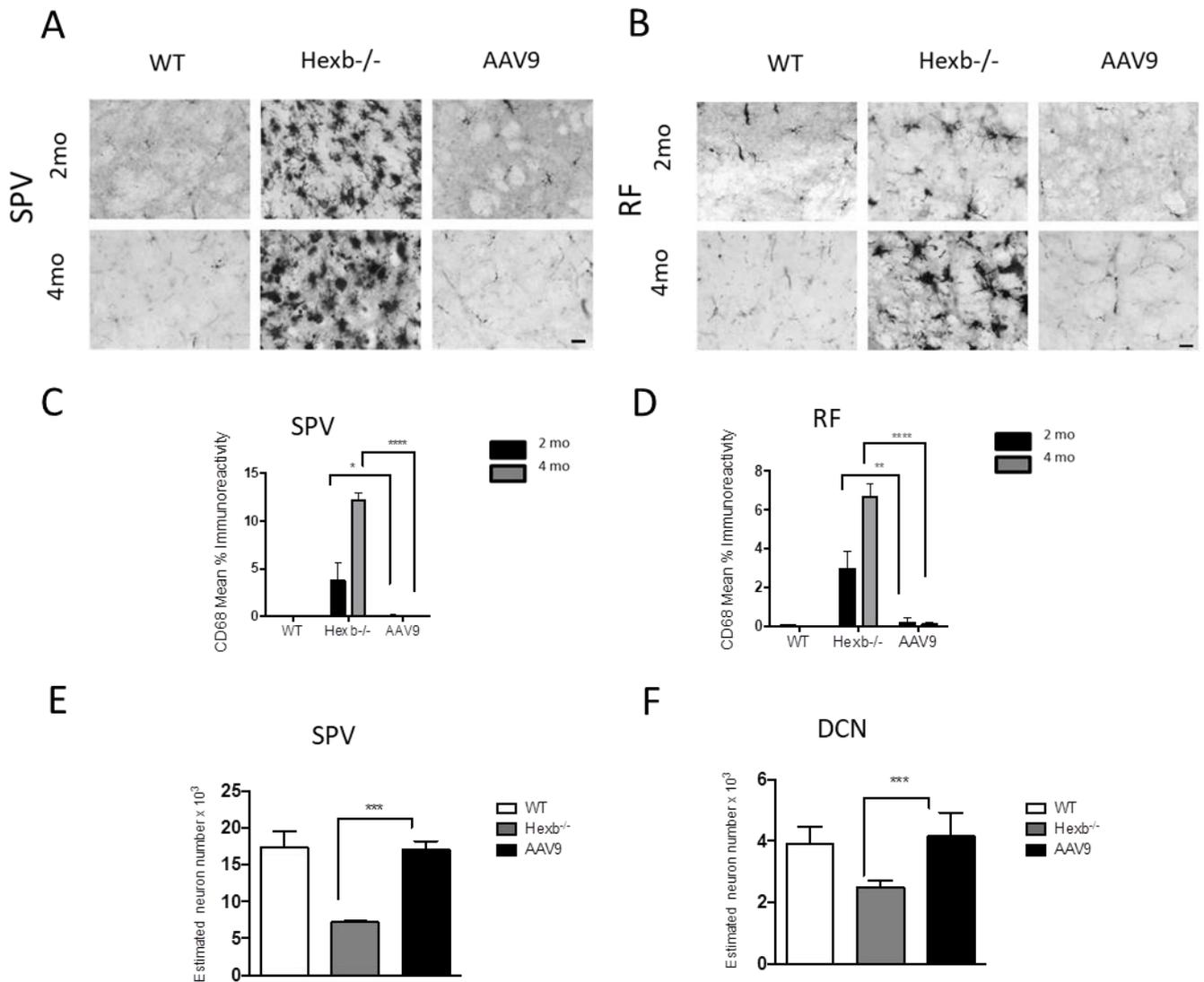


Figure 7: Significant correction of microglial activation and neuronal loss prevention in brainstem and cerebellum of treated mice

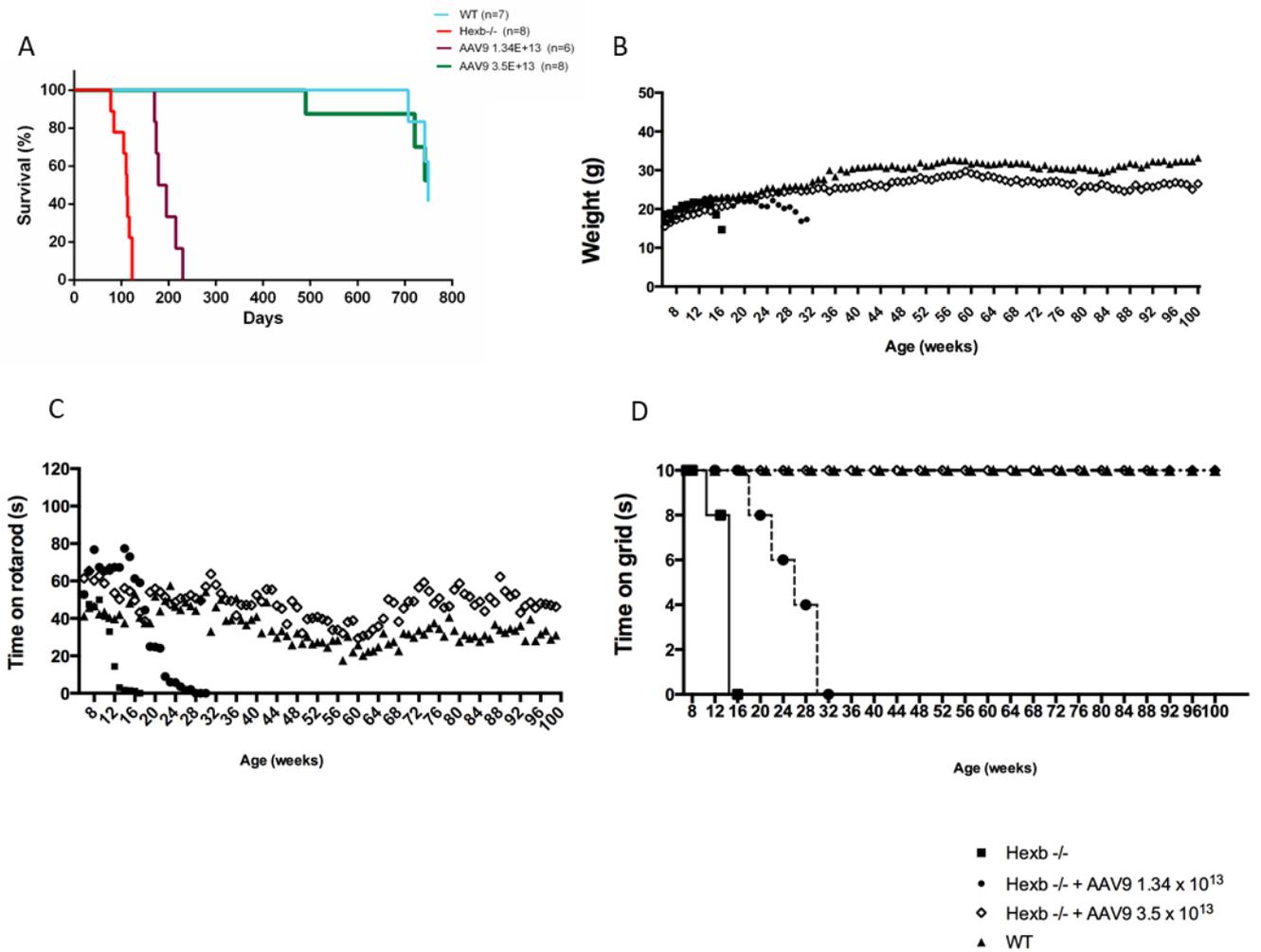


Figure 8: Life expectancy was prolonged, body weight maintained and behavioral performance improved in AAV9-treated mice

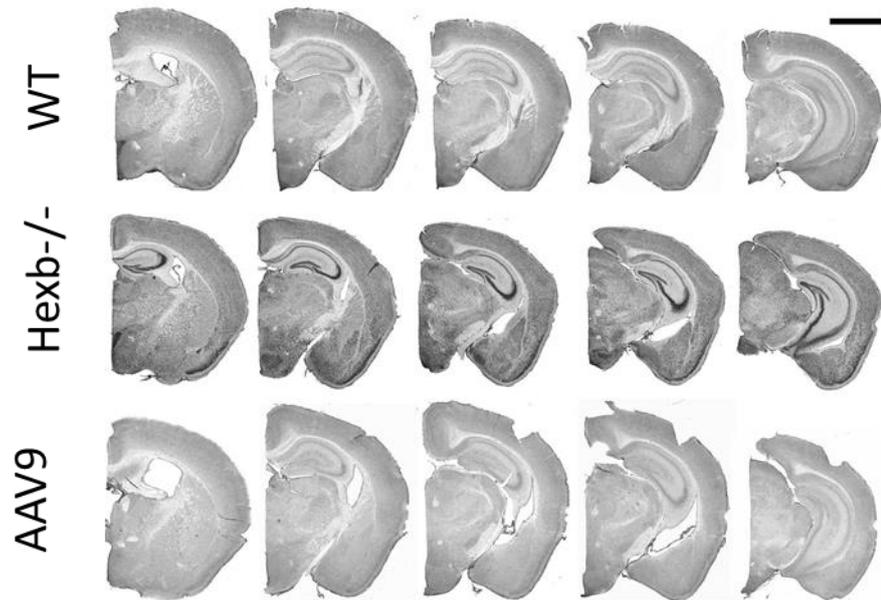


Figure S1: Prevention of lysosomal storage in hypothalamus, cortex, and hippocampus

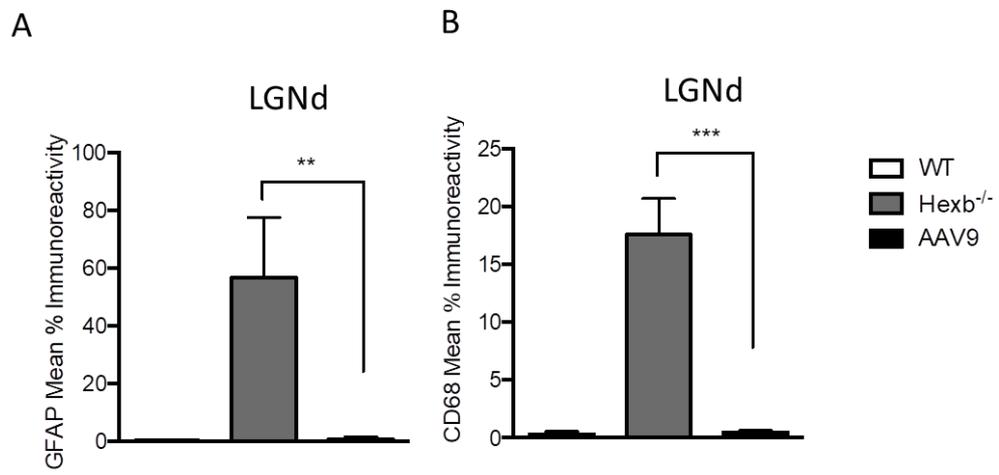


Figure S2: Reduction of neuroinflammation in LGNd thalamic region in scAAV9-treated mice

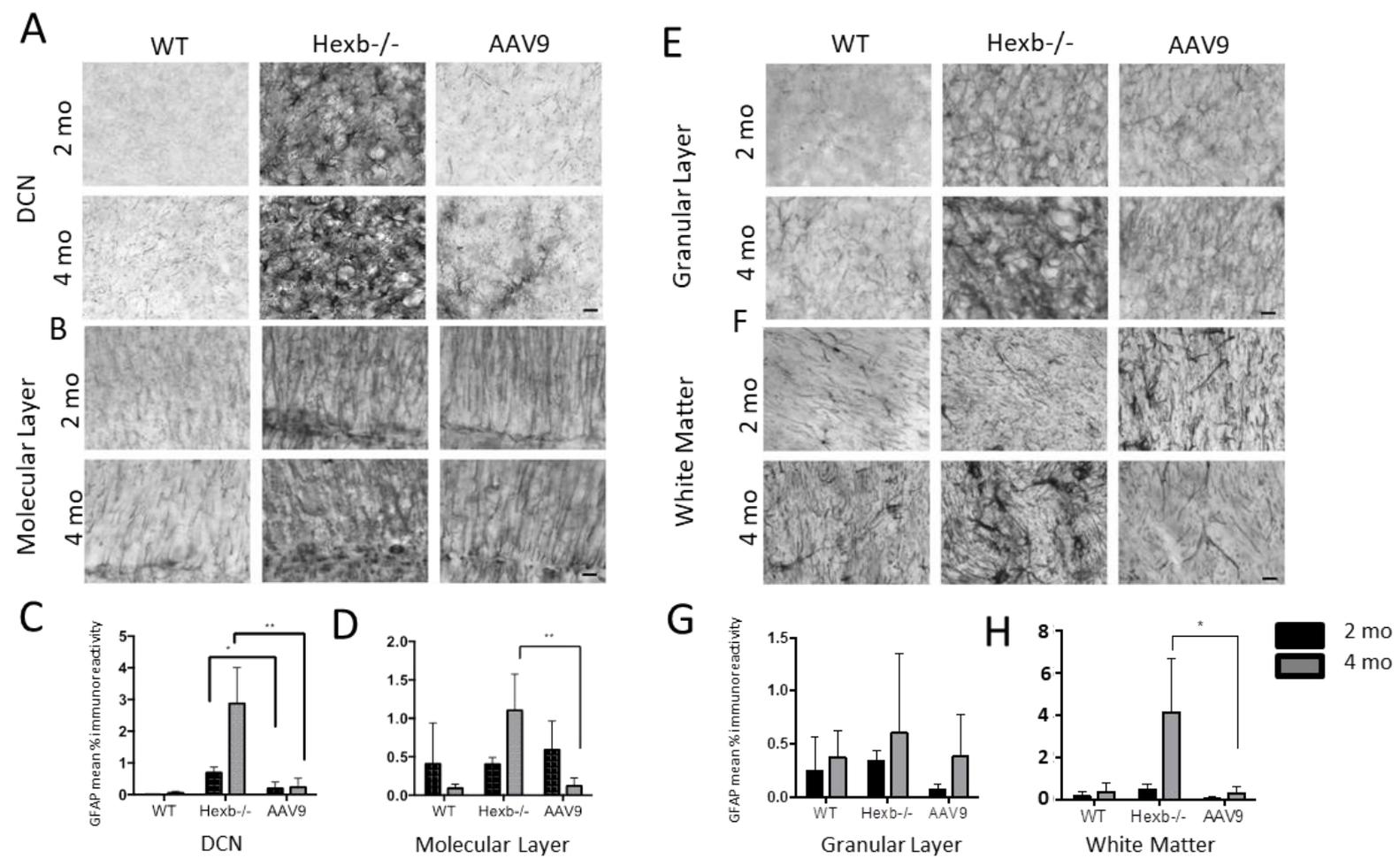


Figure S3: Correction of astrocytosis in the cerebellum following IV administration of scAAV9-Hexb vector

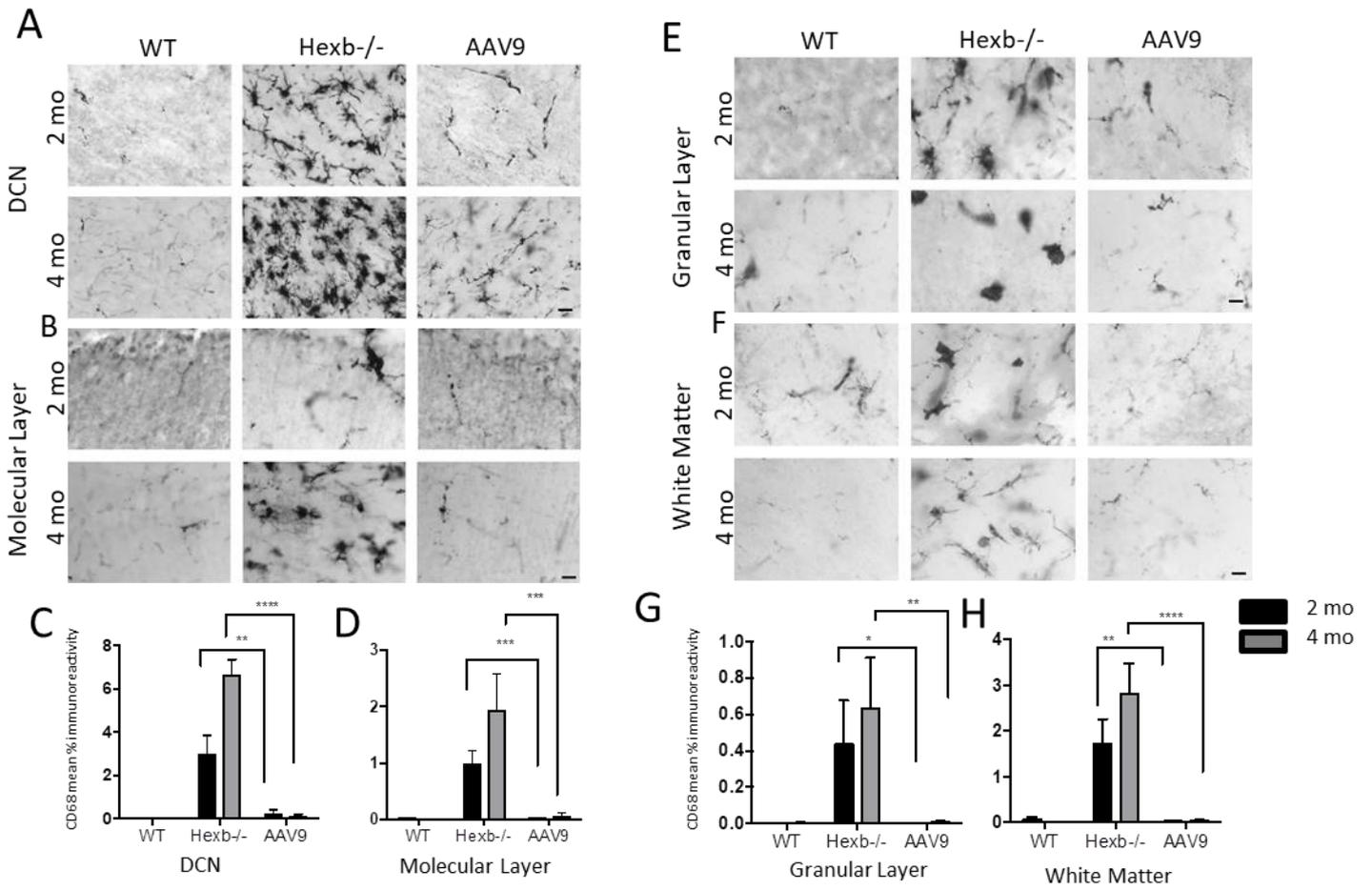


Figure S4: Significant correction of microglial activation in cerebellum in treated mice

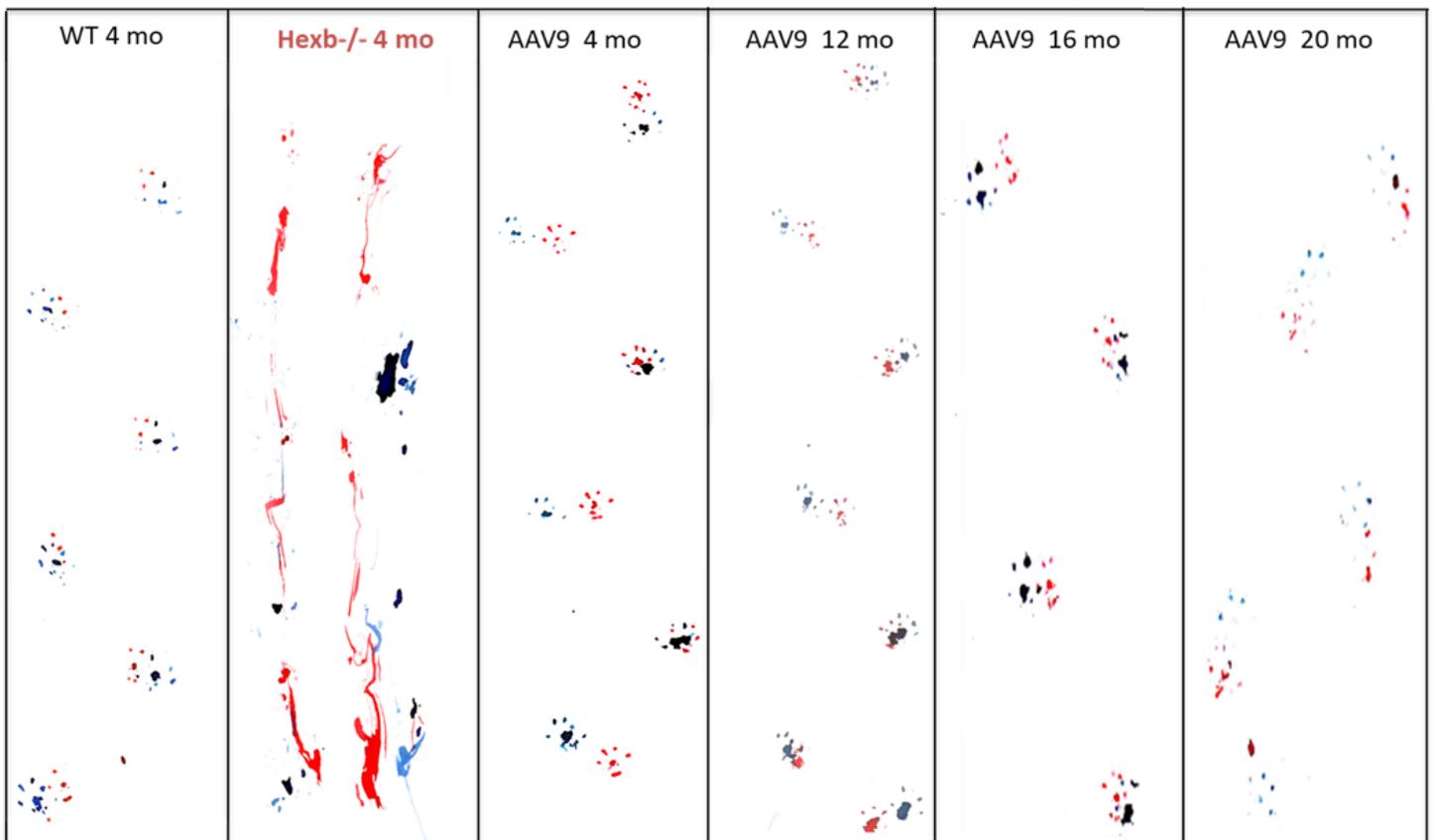


Figure S5: Qualitative gait analysis reveals absence of ataxic or paralysed pattern in scAAV9-treated mice

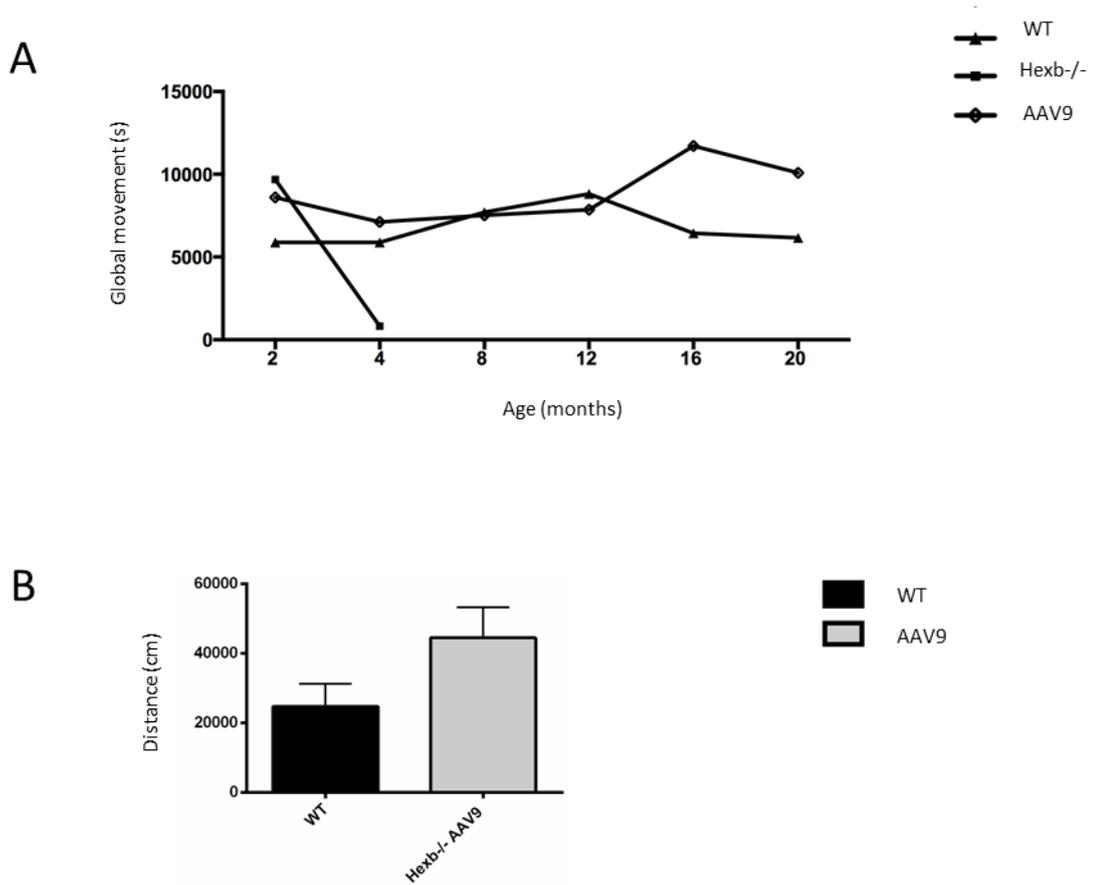


Figure S6: Correction of behavioral deficits following intravenous scAAV9-Hexb delivery

C) RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Afin d'avoir des informations plus précises sur les animaux traités, nous avons décidé de sacrifier les souris survivantes à long terme (2 ans et quelques semaines) de manière à pouvoir analyser leurs tissus. Des analyses par dosage enzymatique ont été effectuées au niveau du cerveau, du tronc cérébral et du foie (deux souris traitées et deux contrôles). Le protocole utilisé était identique à celui des analyses à court terme incluses dans l'article. Compte tenu du décès des souris Hexb^{-/-} à 4 mois, les souris Hexb^{-/-} traitées survivant à 24 mois n'ont pu être comparées qu'avec les contrôles Sandhoff, et les traités utilisés précédemment pour les analyses à court terme (2 et 4 mois). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 31.

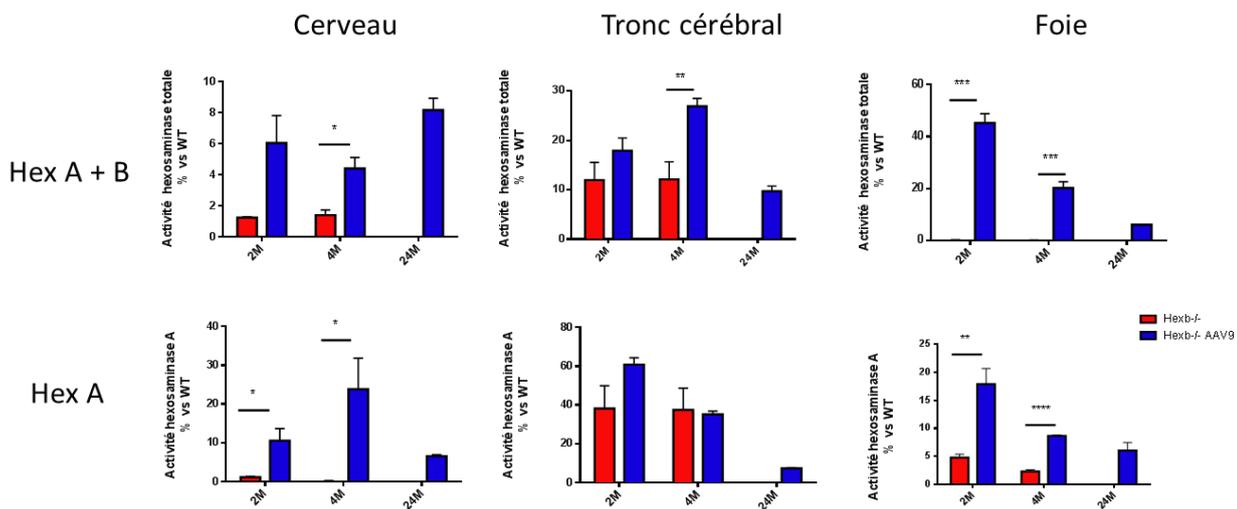


Figure 31 : Activités des hexosaminidases chez les souris traitées à 24 mois (par comparaison avec les souris de 2 et 4 mois).

Les dosages enzymatiques ont été réalisés avec les substrats synthétiques fluorescents MUG et MUGS permettant de tester d'une part, les hexosaminidases A et B et d'autre part, l'hexosaminidase A. Les résultats sont présentés en % de la moyenne des contrôles. Les barres d'erreurs montrent l'écart-type moyen. n=3 à 2 et 4 mois et n=2 à 24 mois pour les souris Hexb^{+/+}, n=3 pour les souris Hexb^{-/-} à 2 et 4 mois et n=4 pour les souris Hexb^{-/-} traitées par l'AAV9-Hexb à 2 et 4 mois et n=2 à 24 mois, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Au niveau des hémisphères cérébraux et du tronc cérébral, l'activité des hexosaminidases à 24 mois est inférieure à 10%, ce qui est relativement modeste. Concernant le foie, l'activité enzymatique a nettement diminué par rapport aux résultats à court terme, mais elle est toujours présente. Il est à noter que les résultats des activités à court terme diffèrent de ceux obtenus dans l'article. Ces variations peuvent s'expliquer par le fait que ces

échantillons étaient anciens et qu'ils avaient déjà été utilisés pour les analyses précédentes. Afin d'avoir d'autres éléments permettant d'évaluer le niveau de correction résiduelle des animaux traités, nous avons analysé les autres enzymes lysosomales connues pour être surelevées chez les souris Sandhoff et pouvant servir de marqueurs de la maladie (figure 32).

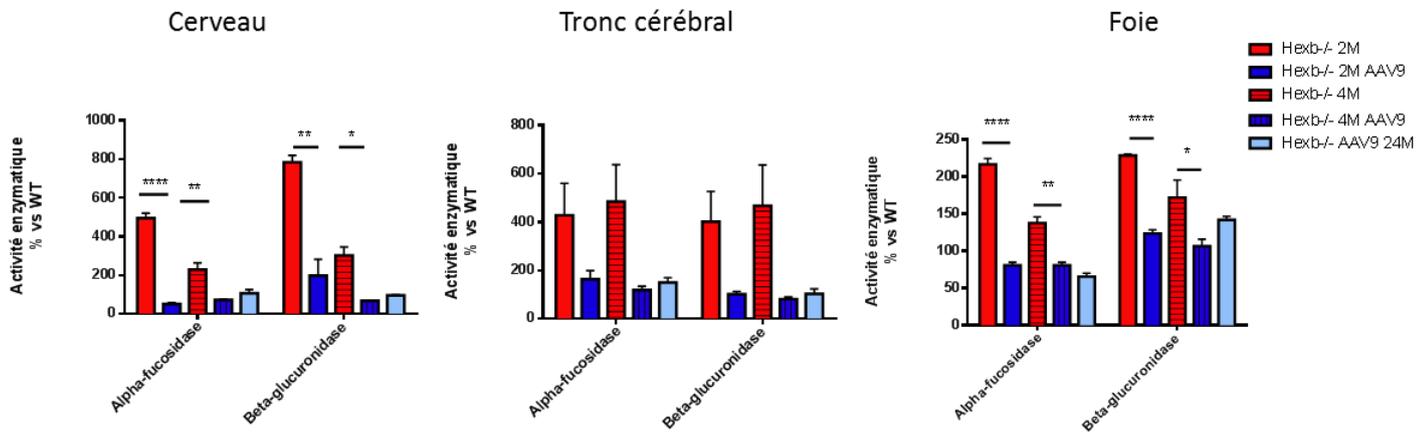


Figure 32: Activités enzymatiques de l'α-fucosidase et de la β-glucuronidase dans le cerveau, le tronc cérébral et le foie.

Les dosages enzymatiques ont été faits avec les substrats synthétiques fluorescents spécifiques de chacune des enzymes. Les résultats sont présentés en % des contrôles. Les barres d'erreurs montrent l'écart-type moyen. n=3 à 2 et 4 mois et n=2 à 24 mois pour les souris Hexb+/+, n=3 pour les souris Hexb-/- à 2 et 4 mois et n=4 pour les souris Hexb-/- traitées par l'AAV9-Hexb à 2 et 4 mois et n=2 à 24 mois, *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001, **** p<0.0001.

Comme attendu, les activités enzymatiques de l'α-fucosidase et de la β-glucuronidase sont au moins deux fois plus élevées chez les souris Sandhoff à 2 et 4 mois, et nous avons une restauration complète pour les souris traitées du même âge. Concernant les souris traitées âgées de 24 mois, nous n'avons pas de souris déficientes du même âge permettant la comparaison, mais l'activité de ces enzymes est identique à celle des contrôles (100% d'activité). Ces résultats suggèrent que le lysosome est fonctionnel à 24 mois, et donc que le niveau d'activité de l'hexosaminidase A est suffisant pour le bon fonctionnement du lysosome.

Par ailleurs, de façon à savoir si une surcharge lysosomale est présente à 24 mois, nous avons étudié la quantité de LAMP-1 au niveau du cerveau. LAMP-1 est une protéine présente sur la membrane lysosomale. Dans les maladies de surcharge, LAMP-1 est connu pour être surexprimé du fait de l'hypertrophie lysosomale. La quantité de LAMP-1 a été analysée par western blot à partir d'extraits tissulaires de cerveau (figure 33).

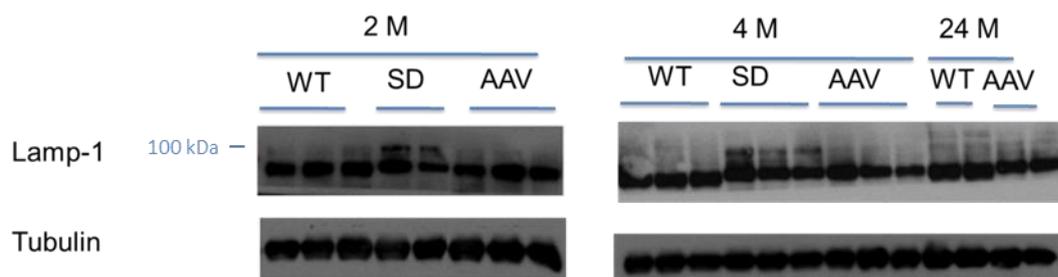


Figure 33 : Niveau de LAMP-1 dans le cerveau

Les protéines ont été extraites à partir de 30 mg de tissu cérébral dans du tampon NP40. (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5% glycérol, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1% NP40, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 30 ml de *complete protease inhibitor cocktail* (1 tablette dans 1 ml) (Roche) et 30 ml de *phosphatase inhibitor (PhosStop)* (1 tablette dans 1 ml). De façon à enlever les débris cellulaires, les échantillons ont été centrifugés à 13000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel SDS-Page avant le transfert sur une membrane PVDF. Après blocage avec du lait 3% dans du TBST, les membranes ont été incubées à 4°C toute la nuit avec les anticorps primaires anti LAMP-1 (ab24170), anti-tubuline (Sigma, T9026). Après 3 rinçages avec du TBST, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires couplés avec la HRP, anti-souris (CST 7076) et anti-lapin (CST 7074) à température ambiante pendant 1 h. Après 3 rinçages, les membranes ont été incubées pendant un temps variable suivant l'anticorps avec de l'ECL (Millipore). La révélation a été réalisée à l'aide d'un Chemidoc (Biorad). 2 M : 2 mois, 4 M : 4 mois, 24 M : 24 mois. La tubuline est utilisée comme contrôle.

Ces résultats montrent une accumulation de LAMP-1 (bande à 100 kDa) chez les souris Sandhoff à 2 et 4 mois. A 24 mois, les résultats sont identiques entre les souris traitées et les souris contrôles, ce qui suggère qu'il n'y a pas de surcharge lysosomale à 24 mois chez les souris traitées par l'AAV9-Hexb. Ces données confirment que le traitement reste efficace 24 mois après l'injection.

En conclusion, cette approche a permis d'obtenir une restauration complète du phénotype malgré une correction partielle de l'activité des hexosaminidases, et ceci même à très long terme. L'accumulation de gangliosides GM2 au niveau du cervelet à 4 mois ne semble pas avoir de conséquences. Cependant, à l'échelle humaine, cette accumulation pourrait ne pas être totalement anodine, sachant que la maladie de Sandhoff est une maladie de surcharge et que dans ces affections, l'accumulation est très progressive. Une souris ne vivant guère que deux ans, on ne peut préjuger de l'évolution en cas de survie plus longue (homme). Aussi, nous avons décidé de tester une nouvelle approche combinant deux voies d'administration de façon à atteindre le cervelet avec plus d'efficacité sans élever la dose du vecteur (**article 2**).

II. ARTICLE 2

A) AVANT-PROPOS

Malgré les résultats très significatifs du précédent projet, nous avons cependant voulu tester une autre voie d'administration de façon à pouvoir cibler plus efficacement le cervelet. Notre choix s'est porté sur l'injection intracérébroventriculaire (ICV) afin d'avoir une bonne diffusion du vecteur au niveau du liquide céphalorachidien (LCR) et donc du cerveau dans sa globalité. L'administration d'un AAV9 par voie ICV permet une expression rapide et à long terme du transgène au niveau du SNC. Ainsi, une seule injection ICV d'un AAV9 codant le gène *SMN1* à une dose d'environ 3×10^{13} vg/kg a permis d'augmenter drastiquement la durée de vie du modèle murin d'amyotrophie spinale (SMA) (environ 300 jours au lieu de 15 jours) (Armbruster et al., 2016). Il a également été montré qu'en utilisant une dose 10 fois moins importante en ICV qu'en IV du même vecteur, la durée de vie des souris était augmentée, suggérant une meilleure efficacité de la voie ICV par rapport à l'IV dans cette maladie du motoneurone (Meyer et al., 2015). Les injections de vecteurs AAV au niveau du LCR ont aussi montré leur efficacité dans des maladies de surcharge lysosomale à atteinte neurologique, telles que la mucopolysaccharidose de type IIIA et le déficit multiple en sulfatases (Haurigot et al., 2013; Spampanato et al., 2011). Par ailleurs, la voie ICV permet aussi d'atteindre la périphérie, contrairement à la voie intracérébrale qui cible seulement le parenchyme. Armbruster *et al.* ont étudié différentes doses en ICV combinées ou non avec l'IV dans le modèle SMA et montré que l'approche IV reste cependant la plus efficace pour traiter les organes périphériques, notamment le foie.

Afin d'atteindre le cervelet de façon optimale tout en traitant la périphérie, nous avons donc choisi de tester une double voie d'administration combinant la voie IV et la voie ICV. Compte tenu des bons résultats avec la dose injectée par voie IV seule et afin de ne pas augmenter les risques, nous avons décidé initialement de conserver cette dose globale, mais de tester deux rapports de doses entre les voies IV et ICV, soit 80/20 et 90/10 (en % de la dose globale). Le rapport 80/20 a été notamment choisi, car il avait été utilisé avec succès par l'équipe de Martine Barkats à l'Institut de Myologie avec qui nous collaborons (Armbruster et al., 2016). Pour évaluer l'efficacité du traitement, nous avons constitué des groupes similaires

à ceux du premier projet. Un groupe de souris (femelles) a été dédié à l'analyse à long terme (survie, comportement). Un groupe (femelles) a été utilisé pour les études biochimiques à court terme (2 et 4 mois) : dosages enzymatiques, analyse des lipides par HPTLC, western blot pour l'étude de la surcharge lysosomale et qPCR pour l'analyse de la neuroinflammation. Enfin, un groupe de mâles a été utilisé pour l'analyse neuropathologique et l'étude immunohistochimique (IHC) des organes périphériques à court terme (2 et 4 mois). Pour ces différents groupes, nous avons utilisé des souris contrôles Sandhoff non traitées et des souris contrôles non déficientes Hexb^{+/+} ou Hexb^{+/-} (ce dernier génotype n'a bien sûr pas été utilisé dans le groupe contrôle pour les dosages enzymatiques).

Les premiers éléments d'information concernant l'efficacité de ces approches ont été obtenus par les dosages enzymatiques. Dans le groupe 80/20, nous avons mis en évidence une restauration importante de l'activité des hexosaminidases au niveau des hémisphères cérébraux et du cervelet, suggérant une bonne efficacité des injections ICV. Par contre, dans le foie, la correction enzymatique chez les souris traitées était moins efficace, alors qu'elle était très bonne au niveau du cœur. Le traitement a été efficace sur l'accumulation du GM2, la surcharge lysosomale et la neuroinflammation au niveau du SNC. Bien qu'aucune diminution du GA2 dans le foie n'ait été observée, la surcharge lysosomale a fortement diminué suggérant un effet positif du traitement, malgré la faible activité enzymatique obtenue dans cet organe. Dans le groupe 90/10, l'activité enzymatique a été augmentée dans le foie, sans pour autant permettre une diminution du GA2. Par ailleurs, une très faible activité enzymatique a été trouvée au niveau du cervelet. L'analyse lipidique a confirmé le peu d'effet sur le cervelet, puisqu'une accumulation du GM2 a été trouvée à 2 et surtout à 4 mois.

En ce qui concerne les études à long terme, les souris traitées avec la dose 80/20 ont maintenant 1 an et 8 mois, et aucune différence n'a été observée avec les souris normales. Au vu des résultats faibles sur le foie, nous avons peur que ces souris ne développent une atteinte périphérique comme cela fut le cas pour l'équipe ayant traité les souris uniquement par voie intracérébrale (Cachón-González et al., 2012), mais il n'en est rien pour l'instant. En revanche, les souris traitées avec la dose 90/10 ont commencé à développer les signes de la maladie à moins d'un an, ce qui confirme nos résultats à court terme suggérant que la faible dose en ICV n'est pas suffisante pour bien traiter le SNC sur le long terme et que la légère baisse de dose au niveau IV (par rapport au premier projet) réduit l'efficacité de notre approche.

A ce stade, même si les souris les mieux traitées ne souffrent pas pour l'instant d'atteinte périphérique, il semble clair que la dose minimale pour bien traiter le foie en IV est de $3,5 \times 10^{13}$ vg/kg (dose globale du 1er projet) et que pour cibler de manière globale le cerveau incluant le cervelet (particulièrement atteint dans la maladie de Sandhoff), une dose ICV minimale de l'ordre de $0,7 \times 10^{13}$ vg/kg (soit 20% de la dose globale précédente) est nécessaire. Pour confirmer nos dires, nous avons donc traité un dernier groupe de souris Hexb-/- avec une dose globale de $4,2 \times 10^{13}$ vg/kg répartie comme indiqué entre les deux compartiments. Les souris ont seulement été analysées à 2 mois. Au niveau du foie, une réduction de GA2 importante a été observée, bien qu'incomplète, ce qui confirme une amélioration par rapport aux groupes 80/20 et 90/10. Au niveau du cervelet, des résultats similaires au groupe 80/20 ont été observés.

Les résultats des différents groupes sont présentés plus en détail dans l'article 2. Ils confirment que notre approche utilisant une double voie d'administration IV + ICV permet de mieux traiter le cervelet par rapport au projet précédent, ce qui était le but de ce travail. Nos résultats ont montré aussi que l'effet de dose est important, car entre les deux principaux groupes ayant reçu des doses différentes en ICV et IV tout en gardant la même dose globale, de grandes différences ont été observées en terme d'efficacité. Les analyses neuropathologiques des animaux à 2 et à 4 mois n'ont pas encore été réalisées, mais elles viendront prochainement compléter ces résultats. En effet, elles vont être effectuées en septembre dans le laboratoire du Pr Jonathan Cooper aux USA avec qui nous collaborons. Ces données devraient être disponibles en octobre, ce qui nous permettra de soumettre rapidement l'article. D'autre part, ces résultats pourront être présentés le jour de la soutenance de cette thèse.

B) ARTICLE 2

L'article présenté ici est une version préliminaire, qui sera complétée ultérieurement avec les résultats de l'étude neuropathologique.

Correction of brain and cerebellum using a combined way of administration of a scAAV9-Hexb in Sandhoff mice

Laura Rouvière¹, Hemanth R. Nelvagal², Aurore Besse³, Marie Vanier⁴, Salimata Magassa¹, Mario Pendé¹, Martine Barkats³, Jonathan D. Cooper², Ganna Panasyuk¹, Catherine Caillaud^{1,5}

¹ INSERM U1151, Institut Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris 75014, France.

² Department of Pediatrics, Los Angeles Biomedical Research Institute, Harbor-UCLA Medical Center, University of California, Los Angeles, Torrance, CA, USA

³ INSERM U974, Institut de Myologie, Paris 75013, France.

⁴ INSERM U820, Lyon 69372, France.

⁵ Service de Biochimie, Métabolomique et Protéomique, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris 75015, France.

Corresponding author :

* Dr Catherine CAILLAUD, INSERM U1151, Institut Necker-Enfants Malades, 14 rue Maria Helena Vieira da Silva, 75993 PARIS Cedex 14, France. Phone : +33 1 71 39 69 74, Fax : +33 1 44 49 51 30, E-mail : catherine.caillaud@inserm.fr

Abstract

Sandhoff disease (SD) is a rare autosomal recessive disease caused by mutation in the *HEXB* gene. It is characterized by a double Hex A ($\alpha\beta$) and B ($\beta\beta$) deficiency, responsible for a GM2 accumulation, mainly in the central nervous system (CNS) leading to severe neurodegeneration. We previously demonstrated that a single intravenous injection (IV) of self-complementary adeno-associated virus-9 carrying the murine *Hexb* cDNA (scAAV9-*Hexb*) in neonatal *Hexb*^{-/-} mice resulted in transgene expression in cerebral hemisphere and peripheral organs leading to complete rescue of the disease phenotype. Here, we evaluated a combined IV and intracerebroventricular (ICV) administration, in order to obtain a transgene expression in the CNS, including cerebellum. Our treatment leads to partial restoration of hexosaminidases, permitting widespread correction into the CNS, clearance of GM2 accumulation, correction of lysosomal function and prevention of neuroinflammation. Behavioral tests confirmed long-term efficacy of the treatment. Furthermore, dose studies allowed to determine the optimal dose required in the cerebral spinal fluid to have a CNS widespread correction, as well as the minimal dose needed in intravenous compartment to get optimal correction in visceral organs.

INTRODUCTION

Sandhoff disease (SD) is a genetic disorder due to mutations in the *HEXB* gene encoding the β -subunit of β -hexosaminidases A et B. It is characterized by a double Hex A ($\alpha\beta$) and B ($\beta\beta$) deficiency in SD responsible for a GM2 accumulation, mainly in the central nervous system (CNS) (Sandhoff et al., 1971). Clinically, in the most common infantile form, SD begins in the first month of life and follows a rapid neurodegenerative process that culminates in death around 3 years of age (Bley et al., 2011; Sandhoff and Harzer, 2013). Up to date, no specific treatment is available for Sandhoff disease. Several natural and knock-out animal models has been described, but the murine model obtained by invalidation of the *Hexb* gene is a useful tool for the development of therapeutic approaches, as it exhibits a phenotype quite close to the human disease (Phaneuf et al., 1996; Sango et al., 1995). Biochemically, GM2 and other glycolipids accumulate mainly in CNS and liver. Symptomatically, deficient mice develop a severe neurological phenotype with tremor, motor abnormalities and seizures beginning at about 10 weeks with death 5-7 weeks after (Phaneuf et al., 1996). This phenotype is due to critical neuroinflammation leading to neuronal loss by apoptosis (Jeyakumar et al., 2003; Myerowitz et al., 2002; Sango et al., 2002; Wada et al., 2000).

Bone-marrow transplantation and inhibitors of glycosphingolipid catabolism delay the onset of neurological signs in Sandhoff mice, but treated mice did not reach normal survival (Fan, 2003; Jeyakumar et al., 2001; Norflus et al., 1998; Wada et al., 2000). Enzyme replacement therapy has already been tested in SD mice (Matsuoka et al., 2011), but its use is restricted by the blood-brain barrier (BBB) which prevents recombinant enzymes to reach brain after intravenous administration. Gene transfer using coadministration of two adeno-associated virus (AAV) serotype 2 encoding the hexosaminidase α and β chains in Sandhoff mice by stereotaxic injection showed that half of treated mice were alive at 2 years (Cachón-González

et al., 2012). However, this successful approach is invasive and permits a correction only in the CNS, leaving a cryptic disease on peripheral organs. Other teams have tested gene transfer approaches based on the IV administration of recombinant AAV9 vectors, but mice survival was around 40 weeks due to some limits of the vectors used (Osmon et al., 2016; Walia et al., 2015).

scAAV9 is a vector known to cross the BBB after intravenous administration and to permit a rapid and efficient transduction into brain as well as peripheral organs such liver and heart (Duque et al., 2009; Foust et al., 2009). A long-term survival has previously been obtained by our team using a scAAV9 encoding the hexosaminidase murine β chain after intravenous injection in neonatal mice. No neurological sign was present in Sandhoff mice at 2 years and mice did not suffer from peripheral organs, even if hexosaminidase activity was only partially restored. No GM2 accumulation was present in cerebral hemispheres, but GM2 ganglioside was only decreased in the cerebellum (manuscript in submission). Even if no symptom was associated with this residual storage in mice at 2 years, we wondered if it could possibly be pathogenic at long-term if extrapolated to patients. Therefore, we decided to test intracerebroventricular (ICV) injection, a way of delivery that has demonstrated its capacity to permit a widespread diffusion of AAV9 in different brain regions in other lysosomal storage diseases (Haurigot et al., 2013; Spampanato et al., 2011) and neurological disorders (Armbruster et al., 2016; Meyer et al., 2015). In the present study, a combined way of administration of the same vector was evaluated in order to efficiently target the cerebellum using the previously used final dose (Niemir et al., submitted) and different ratios between IV and ICV. Short- and long-term analyses based on hexosaminidase assays, GM2 accumulation, neuroinflammation, survival and behavioral tests showed beneficial effects of the combined way of administration. Moreover, our results demonstrated that a minimal dose is required in ICV to obtain a prevention of GM2 accumulation in cerebellum, and in IV to correct liver.

RESULTS

High dose in ICV is needed to significantly increase hexosaminidases in cerebellum using a combined way of administration.

Mice (D1-D2) received both intravenous (IV) and intracerebroventricular (ICV) injections of scAAV9-Hexb vector encoding the hexosaminidases β -chain at a final dose of 3.5×10^{13} vg/kg. Two cohorts were treated with a different ratio between IV and ICV compartments (Table 1). Hexosaminidases activities were tested in the brain of treated mice by comparison with naïve Sandhoff mice and wild-type mice at early (2 months) and late stage of the disease (4 months). Assays were performed using the artificial substrates in order to analyse either the total Hex (A+B) or the specific Hex A activities. Cerebrum and cerebellum were tested separately. Concerning cerebrum, a partial but significant restoration of hexosaminidase A and total hexosaminidases was observed in both AAV9-treated groups by comparison with naïve animals (**Figure 1a-d**). Results are similar between 2 months and 4 months showing the stability of hexosaminidases activity. For cerebellum, no significant increase was observed in treated mice by comparison with untreated littermates when low dose of vector is used for ICV injections (**Figure 1e,f**). However, higher dose used in group 2 permitted to significantly increase hexosaminidases activity (**Figure 1g,h**).

scAAV9-Hexb treatment normalizes activity of other lysosomal enzymes in brain

Other lysosomal enzyme activities were used as markers of the global lysosomal dysfunction present in Sandhoff mice. Here, β -glucuronidase, α -fucosidase and β -galactosidase activities were analysed with specific synthetic fluorescent substrates, in order to know if AAV9-treatment can modify their activity. For both groups, a significant increase was observed for these three lysosomal enzymes (more than 4 fold increase) in the cerebrum and cerebellum of

Sandhoff mice compared to WT at 2 and 4 months (**Figure 1i,j**). In the cerebrum, normal activity was found in both treated groups (**Figure 1i**). In the cerebellum, results were similar to cerebrum only in group 2 (**Figure 1j right**), whereas significant but incomplete decrease was observed in group 1 (**Figure 1j left**). These results confirm that the highest dose of vector in ICV compartment is required to treat efficiently the cerebellum.

AAV9 treatment prevents ganglioside storage in cerebrum and cerebellum

Specific accumulation of gangliosides resulting from hexosaminidase A deficiency was evaluated in cerebral tissues from Sandhoff mice in order to determine if hexosaminidase A present in AAV9-Hexb-treated mice is functional. Extraction, purification and separation by HPTLC of gangliosides were performed to analyse GM2 storage at 2 and 4 months. In both groups, a strong GM2 accumulation (evaluated as percentage of total gangliosides) was observed in Sandhoff mice brain compared to WT, and it increased between 2 and 4 months (40% at 2 months and 50% at 4 months) (**Figure 2 a-d**). By comparison, the level of GM2 in AAV9-treated mice was comparable to WT mice at 2 months for both groups (**Figure 2 a-d**). At 4 months, an almost complete decrease (10 %) was observed in treated mice from group 1 while results were identical between WT and treated animals from group 2.

Accumulation of GM2 gangliosides was specifically evaluated in cerebellar tissues. In both groups, a strong GM2 accumulation (evaluated as percentage of total gangliosides) was found in non-treated Sandhoff mice compared to WT (45% at 2 months and 60% at 4 months), and it increased between 2 and 4 months (**Figure 3 a-d**). Concerning treated mice from group 1 receiving low dose in the ventricle, GM2 is strongly decreased at 2 months (20%), but at 4 months, no significant change between non-treated and treated mice was observed (45%) (**Figure 3 a,b**). For group 2 based on a higher vector dose in the ICV compartment, a

dramatic decrease of GM2 content was observed in the cerebellum of treated mice (difference with WT was not significant at 4 months) (**Figure 3 c,d**).

Hexosaminidase activity remained low and GA2/GM2 high in the liver of AAV9-treated mice

Total hexosaminidases and hexosaminidase A were tested in order to see if scAAV9-Hexb treatment permits to restore enzymatic activity in peripheral organs, such as liver which is particularly affected by the disease. Surprisingly, restoration of hexosaminidases in liver is not important in treated mice (**Figure 4 a-d**). Indeed, in group 2, no increase was observed for hexosaminidases activity in AAV9-treated mice compared to Hexb^{-/-} (**Figure 4 c,d**). In group 1, a significant increase of both total hexosaminidases and hexosaminidase A was noticed, but activity remained around 10% (**Figure 4 a,b**).

GM2 accumulation was also analysed in liver using HPTLC, as previously (**Figure S1 a,b**). Even if GM2 is observed in WT mice, it is slightly higher in Sandhoff mice. In both treated groups, GM2 accumulation is comparable between Sandhoff and treated mice (**Figure S1 a**). As the GA2 glycolipid is also known to accumulate in Sandhoff mice, GA2 analyses (HPTLC) were also performed in liver. In WT mice, GA2 is completely absent whereas huge increase is observed in non-treated Sandhoff mice (**Figure 4e,f**). In AAV9-treated mice, no difference was observed between group 1 (**Figure 4e**) and group 2 (**Figure 4f**) and no reduction of GA2 accumulation was found in treated mice compared to Sandhoff mice.

Total prevention of neuroinflammation in the cerebrum of AAV9-treated mice

Neuroinflammation is known to be strongly involved in Sandhoff disease progression. In order to know if scAAV9-Hexb treatment allows a prevention of neuroinflammation, mRNA level expression of neuroinflammatory markers was tested in the cerebrum of treated mice

by comparison with non-treated mice and WT mice at 4 months (late stage of disease). The CD-68 marker of microgliosis and GFAP marker of astrocytosis were strongly increased in non-treated Sandhoff mice compared to WT (4 fold increase) (**Figure 5a**). Mice from group 2, receiving the highest dose in the ICV compartment, had results similar to normal mice. Moreover, MAG (myelin associated glycoprotein) is known to be decreased in Sandhoff brain, as a consequence of strong neuroinflammation (Cachón-González et al., 2014). Indeed, MAG mRNA level was found decreased in non-treated mice compared with normal mice, and treated mice have MAG expression similar to WT mice (**Figure 5b**). For the first group, similar results were obtained (**Fig S2a,b**). Expression of general inflammatory markers was also tested in AAV9-treated mice. mRNA level of MIP-1 α (macrophage inducer protein 1 α), TNF- α (tumor necrotic factor α), and interleukin IL6 and IL-1 β were strongly increased in Sandhoff mice, whereas they were similar AAV9-treated mice from group 2 and WT mice (**Figure 5c,d**). Concerning group 1 (lower dose in ICV compartment), results were similar for MIP-1 α and TNF- α whereas IL-1 β is still high in treated mice (**Figure S2c,d**). These results indicate that combined route of administration of scAAV9-Hexb can completely remove neuroinflammation into cerebrum, especially in group 2 in which high dose was injected in ICV.

AAV9 treatment permits cellular clearance and normal autophagic activity in cerebrum

LAMP-1 is used as a marker of lysosomal storage in Sandhoff mice. Immunoblot of LAMP-1 in cerebrum at 2 and 4 months showed increase of LAMP-1 level in Sandhoff mice (**Figure 6a,b**). At early symptomatic and late stage of the disease, a strong decrease of LAMP-1 accumulation was observed in treated mice from group 2 (**Figure 6a,b**) and similar results were obtained for group 1 (**Figure S3a**).

In order to analyse the autophagic process in the brain of Sandhoff and AAV9-treated mice, immunoblot of LC3 were also performed. LC3-II level was increased at 2 months, and particularly at 4 months (**Figure 6a,c**), suggesting an increase of the autophagic stress. Treatment with high dose in ICV compartment permitted restoration of LC3-II level both at 2 and 4 months (**Figure 6 a,c**). In group 1, a slight increase of LC3-II level was found in Sandhoff mice at 4 months, but AAV9-treated mice were similar to WT (**Figure S3a**).

Treatment permits to decrease lysosomal storage and inflammation in liver

Histological analysis of LAMP-2 at 2 and 4 months was performed in liver. LAMP-2 staining is strongly increased in naïve Sandhoff mice suggesting a strong lysosomal storage while LAMP-2 is strongly decreased in treated mice from group 2 at 2 and 4 months (**Figure 6e**). Similar results were obtained in group 1 (**Figure S3b**). LAMP-2 was also analysed in heart using histological analysis. Increase of lysosomal storage was observed at 4 months (**Figure S4**), but differences with WT were more important at 2 months. For both treated groups, staining of LAMP-2 was similar with WT, suggesting a prevention of lysosomal storage in heart after treatment whatever the dose used in IV compartment (**Figure S4**).

In order to analyse liver hypertrophy in Sandhoff mice, liver weight was evaluated and compare to mice total weight. A significant increase (20 %) was observed in Sandhoff mice at 2 and 4 months. For both groups, not significant decrease was observed suggesting a partial correction of liver hypertrophy after AAV9-treatment (**Figure S5a,b**). mRNA level of MIP-1 α was also tested in liver in order to analyse the inflammation level. A strong increase of MIP-1 α expression was observed in Sandhoff mice (4-6 fold increase) compared to WT. Even if it is not significant, a decrease of MIP-1 α was observed in both treated groups by comparison with non-treated mice (**Figure S5c,d**).

Analysis of long-term survival and motor capacity after scAAV9 treatment

Survival of injected mice was analysed in order to determine the long-term therapeutic effect of combined IV + ICV administration of scAAV9-Hexb (**Figure 7a**). Non-treated Sandhoff mice died around 120 days, whereas 100% of treated mice of group 2 are still alive 600 days post-treatment. They did not develop any feature of the disease, except one mouse which had a little tremor around 500 days, possibly due to less successful injection. Weight analysis showed no significant differences between AAV9-treated and normal mice. Weight was lower in treated mice compared with WT, but their weight was stable, whereas Sandhoff mice lost weight before death (**Figure 7b**). Rotarod and inverted screen test were performed to evaluate motor coordination and muscular strength, respectively (**Figure 7c,d**). Latency to fall from rotarod dramatically decreased in non-treated Sandhoff mice before death, while results are similar between AAV9-treated and WT mice (**Figure 7c**). Concerning muscle strength, non-treated mice rapidly lost their capacity whereas after 1 year and a half, AAV9-mice still obtained results similar to WT (**Figure 7d**). These results confirm that treated mice from group 2 are healthy and comparable to WT mice.

Treated mice from group 1 have now around 340 days (**Figure S6a**). Five mice developed clear signs of the disease (tremor) around 38-42 weeks. Two mice died at 45-47 weeks after loss of weight comparable to Sandhoff mice (**Figure S6b**). Concerning locomotion, a decrease of motor abilities was observed in 4 treated mice that are sick, while results are stable for WT mice (**Figure S6c**). Same results were obtained for muscular strength (**Figure S6d**). These results confirm that the dose used in ICV compartment in group 1 is not optimal for long-term treatment and that a slight dose difference can change dramatically the efficiency of treatment.

Higher final dose permit a better prevention of disease in cerebrum, cerebellum and liver

Due to the limitation of our treatment for liver in both groups, we decided to increase the global dose in order to have the optimal doses for both compartments. 3.5×10^{13} vg/kg were injected in IV to efficiently treat liver (dose determined in our previous study) (Niemir et al., submitted) and 0.7×10^{13} vg/kg were injected in ICV in order to target cerebellum. This group n°3 received a final dose of 4.2×10^{13} vg/kg and was analyzed in particular for liver and cerebellum at 2 months. Enzymatic activities were measured (as previously) in cerebellum (**Figure 8a,b**) and liver (**Figure 8e**). A huge increase of hexosaminidase A and total hexosaminidases was observed in cerebellum in AAV9-treated mice compared with Sandhoff mice (**Figure 8a**). Moreover, a strong significant decrease was found for other lysosomal enzymes usually increased in Sandhoff mice (**Figure 8b**). Concerning liver, a significant increase was observed in AAV9-treated mice compared to naive Sandhoff mice (**Figure 8e**). Lipid analysis was performed as previously in cerebellum and liver. For cerebellum, GM2 content was analyzed by HPTLC (**Figure 8c**) and quantified (**Figure 8d**). As expected, a strong increase was observed in Sandhoff mice (around 50% GM2 on total gangliosides). For AAV9-treated mice, no GM2 accumulation was found and quantification showed not significant differences between treated and WT mice. In liver, GA2 content was analyzed. A strong GA2 accumulation was present in Sandhoff mice (**Figure 8f**). For treated mice, a decrease of GA2 was observed in the liver of all treated animals (homogeneous results between mice) (**Figure 8f**). The results of this group confirm that a minimal dose is needed in IV to optimally target liver, as well as in ICV compartment in order to cure cerebellum.

DISCUSSION

This study was focused on the evaluation of a combined IV and ICV way of administration at neonatal age in order to have a widespread delivery of the scAAV9-Hexb in Sandhoff mice. The first goal was to completely treat cerebellum without increasing the final dose of vector (3.5×10^{13} vg/kg) that has previously shown excellent results (Niemir et al., submitted). Therefore, two different ratios between IV and ICV were used. The first group was injected with 90% of the final dose in IV and 10% in ICV, and the second group with 80% (IV) and 20% (ICV).

Mice survival was optimal with the highest dose in the ICV compartment (0.7×10^{13} vg/kg, group 2). Indeed, mice reached 1 year and 6 months without clinical signs, while mice from group 1 (treated with a lower dose in ICV) began tremor and ataxia around 9-10 months. Furthermore, short-term study showed differences between these groups especially at 4 months. Accumulation of GM2 is absent from total brain in group 2 whereas it is present in group 1, especially in the cerebellum. It is important to note that neuroinflammation and lysosomal storage are prevented in the cerebrum of the two cohorts at 4 months. However, long-term analyses confirmed the critical differences of treatment efficacy between both groups treated with the same final dose. Optimal therapeutic dose is clearly in a small window. Indeed, in our previous work using scAAV9-Hexb IV injection of 3.5×10^{13} vg/kg, mice had a survival comparable to wild-type. By comparison, 90% of this IV dose is not sufficient to prevent disease in Sandhoff mice after 1 year, even with a complementary dose in ICV.

Moreover, the way of administration is determinant for treatment efficacy. Indeed, in this study, combined IC + ICV injection permitted to obtain around 30% of hexosaminidases activity in cerebrum and 15% in cerebellum in group 2 using the highest ICV dose. This enzymatic activity permitted to prevent GM2 accumulation in cerebrum and also in

cerebellum. Therefore, ICV administration clearly allows a better diffusion of the scAAV9-Hexb vector into the CNS. It has been shown that ICV administration had a number of advantages. First, this type of injection is less invasive than intraparenchymal administration using stereotactic procedure (Crystal et al., 2004). Moreover, it permits diffuse delivery of the vector and transduction of ependymal cells leading to subsequent production of therapeutic enzyme which will then be uptaken by cells in all brain regions (Meyer et al., 2015; Spampinato et al., 2011). Moreover, ICV administration allows transduction of peripheral organs. Indeed, it has been shown that AAV9 can be found in serum after injection into CSF (Armbruster et al., 2016; Haurigot et al., 2013), but transduction level is less important in peripheral organs with ICV compared to IV injections which permit a more efficient liver transduction.

In our study, liver transduction was not optimal in group 2, as enzymatic activity was quite low and GA2 remained in liver after treatment. The third group (using a higher global dose) confirmed that a minimal dose is required in IV compartment (3.5×10^{13} vg/kg) in order to reduce GA2 accumulation in liver. This dose needed for liver may be explained by the fact that AAV9 vector is diluted in the general circulation. After 1 year and 8 months, treated mice from group 2 did not have issue with peripheral organs, as previously reported after intraparenchymal administration (Cachón-González et al., 2012). Our IV + ICV combined strategy permitted to treat liver and cerebellum without significant increase of the vector dose, even in group 3. This point is important as Walia *et al.* reported occurrence of hepatocarcinoma around 40 weeks after intravenous injection of recombinant AAV9 with a dose of 2.5×10^{14} vg/kg in neonatal Sandhoff mice. This high dose did not allow optimal transduction in brain as neuroinflammation is still present, and mice have tremor around 40 weeks (Walia et al., 2015). In another study based on an AAV9 variant known to less transduce liver, a lower dose (5×10^{13} vg/kg) was tested. This approach did not induce

hepatocarcinoma, but it was not highly efficient for brain transduction as mice exhibited clinical signs around 32 weeks (Osmon et al., 2016). These results are contrasting with our previous study using IV administration and our present work based on combined IC + ICV permitting, with a lower dose, to increase lifespan of mice until 1-2 years without any sign of the disease. Another advantage of our combined approach is the immune response. It is known in human that anti-AAV titers are lower in CSF than in serum (Haurigot et al., 2013). Our strategy using ICV injection could possibly decrease the immune response, leading to a reduced need of steroid treatment or immune suppression as required in previous human studies (Mingozzi and High, 2013; Nathwani et al., 2011).

Finally, our treatment based on a combined IV + ICV way of administration of a scAAV9-Hexb vector in neonatal Sandhoff mice showed its efficacy and additionally, permitted to define the optimal doses needed in each compartment to have a widespread transduction in the whole brain and also in liver. These data will now allow us to evaluate our strategy in Sandhoff adult mice in order to have a widespread delivery and efficient treatment at different periods.

MATERIAL AND METHODS

Animals

All animal experiments were carried out in accordance with European guidelines for the care and use of experimental animals. The Sandhoff mouse model used was generated by targeted disruption of the *Hexb* gene (Hexb^{-/-} mice) (Phaneuf et al., 1996). Hexb^{+/+} littermates were used as controls in the study. Hexb^{-/-} strain was maintained by two types of breeding: heterozygous females with affected males, and affected females with affected males. To determine the status of newborn mice, total β -hexosaminidase activity was measured from clipped toes using a standard enzymatic assay protocol. Briefly, biopsies were mechanically

homogenized in sterile water, incubated on ice for 20 minutes for cell lysis. β -hexosaminidases and β -galactosidase (control enzyme) activities were then measured using the artificial β -*N*-acetylglucosaminide (MUG) and 4-MU- β -D-galactopyranoside, respectively. 10 μ l of supernatant were incubated with artificial substrates for 20 min, and then 150 μ l of 1M glycine pH 10 were added to stop reaction before reading on fluorimeter Fluostar optima (BMG LabTech).

Production of scAAV vectors

Self-complementary genome-containing plasmids were constructed and scAAV9 vectors were produced as previously described (Duque et al., 2009). Briefly, AAV9 vectors were generated by packaging AAV2-based recombinant self-complementary (sc) genomes into the AAV9 capsids. Virions were produced by transfecting HEK293 cells with (i) the adenovirus helper plasmid (pXX6-80), (ii) the AAV packaging plasmid encoding the rep2 and the cap2 or the cap9 genes, and (iii) the AAV2 shuttle plasmid containing the mouse *Hexb* cDNA under the control of the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter in the sc genome. Recombinant vectors (rAAV) were purified by double-CsCl ultracentrifugation. Physical particles were quantified by real-time PCR. Vector titers were expressed as viral genomes per millilitre (vg/ml).

In vivo scAAV9-Hexb injections

The study was performed with one scAAV9-Hexb production batch with a titer of 6.1×10^{12} vg/ml. Vectors were diluted with saline according to the treatment group and injections were performed at day 1-2 after genotyping. Injections were performed with Hamilton glass micropipette. Vector was first injected into the temporal vein (for IV injection) and then slowly injected (2 seconds) into the lateral ventricle of the right cerebral hemisphere (for

ICV injection). Different doses used can be found in Table 1. Wild-type (WT) and Hexb^{-/-} littermates were used as controls.

Survival and behavioral tests

Only female were used for behavioral tests. scAAV9-treated Hexb^{-/-} mice, wild-type and homozygous Hexb^{-/-} littermates were compared. They were first evaluated on physical criteria: weight, general health and tremor. Tests were performed each week between 3 pm and 5 pm. Rotarod test was used to analyse balance and motor coordination. The rotarod (Bioseb) comprised a rotating drum which speed was risen from 4 to 40 rpm over 2 min. Mice were placed on the rotating cylinder and time at which each animal fell from the rod was noted. Each animal acclimated to the rotarod and then two consecutive tests were performed (average of the two tests). Inverted screen test was used to evaluate mice muscular strength. Single animal was placed on a clean cage metal grid. This grid was turned over 180°, and the latency to fall from the grid was noted during 10 seconds.

Sample collection

In order to analyse the efficacy of the scAAV9 treatment in Hexb^{-/-} mice, organs of treated Hexb^{-/-} animals and age-matched controls (3 or 4 per group) were examined at two time points representing early-symptomatic (2 months) and late-symptomatic (4 months) stages of the disease. Female mice were used for the biochemistry analysis (enzymatic assays, lipid analysis, protein and mRNA analyses). Mice were sacrificed by cervical dislocation and tissues were weighed, snap frozen and stored at -80°C until use. Male were used for histological analyses. Tissues were placed in a freshly prepared and filtered 4% paraformaldehyde (PFA) solution in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 and maintained in PFA for 24h at 4°C.

Peripheral organs immunostaining

Liver and heart mouse tissues were embedded in paraffin and cut at 4 μm . Sections were deparaffinized and hydrated before incubation in sub-boiling citrate buffer (pH 6) for 10 min. Sections were blocked in 3% goat normal serum, 1% BSA and 0.1% Triton X-100 for 1 h, and then incubated with anti-LAMP-2 (ab13524) primary antibody overnight at 4°C. Sections were rinsed in TBST and incubated with an anti-rat biotinylated secondary IgG (H+L) antibody (Vector) for 30 min at room temperature and subsequently rinsed in TBST. They were then incubated in avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector) in TBS for 45 min, and rinsed in TBS. To visualize immunoreactivity, sections were incubated in DAB containing hydrogen peroxide in TBS for less than 30 s. Sections were then colored with hematoxylin, and dehydrated in successive ethanol and xylene baths. Next, slides were mounted with Eukitt. 40x scan were performed with Nanozoomer 2.0, Hamamatsu.

Enzymatic assays

Each sample (50 mg for liver and cerebrum, 30 mg for cerebellum) was ground in 300 μl of 0.1 M citrate phosphate buffer pH 4.5 and homogenates were lysed by 3 cycles of rapid freezing and thawing, followed by centrifugation at 4°C for 5 min at 10,000 g. The protein content was determined in each supernatant using the BCA kit (Assay Protein Quantitation Bicinchoninic acid, Pierce) according to the manufacturer's recommendations. Enzymatic activities (β -galactosidase, β -glucuronidase, α -fucosidase, total β -hexosaminidases and β -hexosaminidase A) were measured using supernatants (1/10 dilution for cerebrum and liver, no dilution for cerebellum). In a black 96-well plate with clear bottom, 10 μl of supernatant was added to 50 μl of the fluorimetric corresponding substrate. Samples were incubated for 1 h at 37°C with gentle agitation and enzymatic reactions were stopped by adding 200 μl of 1M glycine buffer pH 10 for all enzymatic assays, except for cerebellum (5 min of incubation

with MUG and 20 min with MUGS). The released fluorescence was read on a fluorimeter Fluostar optima (BMG LabTech), excitation: 360+/-40 nm, emission: 460+/-40 nm. Data obtained were compared with the fluorescence of a 4-methyl-umbelliferone standard (10 nmol/well). Enzyme activities were expressed as nmol/h/mg cell protein. Substrates used were: 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (Sigma) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer pH 4.5 for β -galactosidase, 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (Sigma) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer pH 5 for β -glucuronidase, 4-methylumbelliferyl- α -L-fucopyranoside (Sigma) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer pH 4.5 for α -fucosidase, 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (Sigma) (MUG) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer pH 4.5 for total β -hexosaminidases, 4-methylumbelliferyl-7-(6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy- β -Dglucopyranoside (Calbiochem) (MUGS) 1 mM in 0.1M citrate phosphate buffer pH 4.5 for β -hexosaminidase A, 4-methylumbelliferone (Sigma) 1mM in deionized water for standard.

Biochemical analysis of gangliosides and other glycosphingolipids

Analyses were performed on frozen cerebral hemispheres, cerebellum and liver which have been stored at -80°C prior to use. Total lipid extraction, separation and purification of main lipid fractions were performed using previously described procedures (Fujita et al., 1996; Reid et al., 2008). Briefly, total lipids were extracted from 20% tissue homogenates in water using chloroform-methanol 1:2 (v/v). For ganglioside studies, part of the extract (corresponding to 20-50 mg tissue) was desalted and separated in two fractions on reverse-phase 100 mg Bond Elut C18 columns (Varian) using a downscaling of a published procedure (Kyrklund, 1987). The methanol-water 12:1 (v/v) eluate containing all the gangliosides was used without further purification. An aliquot corresponding to 3 mg of tissue was spotted (Linomat 5 device, Camag) on silica gel 60 high-performance thin layer chromatography

(HPTLC) plates (Merck). Plates were developed in chloroform-methanol-0.2% CaCl_2 55:45:10 (v/v/v) and sprayed (HPTLC sprayer, Camag) with resorcinol-HCl reagent to visualize the sialic acid moiety of individual gangliosides. Densitometric quantification was performed with image J after scan (Epson). Data were normalized to the number of sialic acids per individual ganglioside and expressed as % of total gangliosides. For ganglioside studies in liver, the chloroform:methanol eluate (1:2) from column was saponified, desalted by phase partition, and suitable aliquots were spotted on HPTLC plates (5 mg). After development in hexane-ether-acetic acid 90/10/1 for 1h and chloroform-methanol-water 65:25:4 (v/v/v) for 30 min, hexose-containing compounds were visualized by orcinol-sulphuric acid reagent.

Protein extraction and Immunoblotting

Cerebrum hemisphere and liver were homogenized (20 mg) in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5% glycerol, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1% NP40, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, complete protease inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitor (phosSTOP) followed by centrifugation at 13000 rpm for 10 min at 4 °C. Samples were resolved by SDS-PAGE before transfer on PVDF membrane. After blocking with 3% milk, membrane was blotted with primary antibody, anti-LAMP 1 (ab24170), anti-actin (A5441) and anti-LC3 (Novus), overnight at 4°C. Then, membranes were incubated 1h at room temperature with horseradish peroxidase linked secondary antibody, anti-mouse (CST 7076) and anti-rabbit (CST 7074). Membrane was then processed by incubation with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) for detection. Signal was then revealed in Chemidoc (Biorad), and quantification was performed using Biorad software.

RT-qPCR

Total RNA was extracted from cerebral hemisphere and liver (30 mg) using lipid RNeasy mini kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. Single-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA with SuperScript II (Invitrogen) and 125 ng random hexamer primers. Real-time quantitative PCR was then performed on MX3005P instrument (Agilent) using a Brilliant III SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent) according to manufacturer's instructions. Relative amounts of the indicated mRNAs were determined by mean of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method, normalizing with pinin levels. Primers used are the following :

CD-68	F : 5'-TGTCTGATCTTGCTAGGACCG-3' R : 5-GAGAGTAACGGCCTTTTTGTGA-3
GFAP	F : 5' -AGTAACATGCAAGAGACAGAG-3' R : 5' -TAGTCGTTAGCTTCGTGCTTG-3'
IL-1 β	F : 5'-CTCC ATGAGCTTTGTACAAGG-3' R : 5'-TGCTGATGTACCAGTTGGGG- 3'
IL-6	F : 5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTC-3' R : 5'-TTGGT CCTTAGCCACTCCTTC-3'
MAG	F : 5' -TACAACCAGTACA CCTTCTCGG-3' R: 5'ATACA ACTGACCTCCACTTCCG-3'
MIP-1 α	F : 5'-TCTGTACCATGACACTCTGC-3' R : 5' AATTGGCGTGGAATCTTCCG 3'
Pinin	F : 5'-ACCTGGAAGGGGCAGTCAGTA-3' R : 5'-ATCATCGTCTTCTGGGTCGCT-3'
TGF- β	F : 5'-AACAAGCCACAGTAACATGACACC-3' R : 5'-ACCAACTATTGCTTCAGCTCCAC-3'
TNF α	F : 5'-CTGTGAAGGGAATGGGTGTT 3 R : 5'-CAGGGAAGAATCTGGAAAGGTC-3'

Statistical analyses

Microsoft Excel (Redmond) was used for data collection and for statistical analysis. Graph representation was conducted using GraphPad Prism Version 6 and 7 for windows (GraphPad Software). For significance between groups, Student's t-test or ANOVA test with tukey's multiple comparison analysis were used as appropriate. All graphs are plotted as the mean \pm the standard error of the mean (SEM).

REFERENCES

- Armbruster, N., Lattanzi, A., Jeavons, M., Van Wittenberghe, L., Gjata, B., Marais, T., Martin, S., Vignaud, A., Voit, T., Mavilio, F., et al. (2016). Efficacy and biodistribution analysis of intracerebroventricular administration of an optimized scAAV9-SMN1 vector in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* *3*, 16060.
- Bley, A.E., Giannikopoulos, O.A., Hayden, D., Kubilus, K., Tifft, C.J., and Eichler, F.S. (2011). Natural History of Infantile GM2 Gangliosidosis. *Pediatrics* *128*, e1233–e1241.
- Cachón-González, M.B., Wang, S.Z., McNair, R., Bradley, J., Lunn, D., Ziegler, R., Cheng, S.H., and Cox, T.M. (2012). Gene Transfer Corrects Acute GM2 Gangliosidosis-Potential Therapeutic Contribution of Perivascular Enzyme Flow. *Mol. Ther.* *20*, 1489–1500.
- Cachón-González, M.-B., Wang, S.Z., Ziegler, R., Cheng, S.H., and Cox, T.M. (2014). Reversibility of neuropathology in Tay–Sachs-related diseases. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 730–748.
- Crystal, R.G., Sondhi, D., Hackett, N.R., Kaminsky, S.M., Worgall, S., Stieg, P., Souweidane, M., Hosain, S., Heier, L., Ballon, D., et al. (2004). Clinical protocol. Administration of a replication-deficient adeno-associated virus gene transfer vector expressing the human CLN2 cDNA to the brain of children with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum. Gene Ther.* *15*, 1131–1154.
- Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.-M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.-A., and Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 1187–1196.
- Fan, J.-Q. (2003). A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends Pharmacol. Sci.* *24*, 355–360.
- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal-neurons and adult-astrocytes in CNS. *Nat. Biotechnol.* *27*, 59–65.
- Fujita, N., Suzuki, K., Vanier, M.T., Popko, B., Maeda, N., Klein, A., Henseler, M., Sandhoff, K., Nakayasu, H., and Suzuki, K. (1996). Targeted Disruption of the Mouse Sphingolipid Activator Protein Gene: A Complex Phenotype, Including Severe Leukodystrophy and Wide-Spread Storage of Multiple Sphingolipids. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 711–725.
- Haurigot, V., Marcó, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Añor, S., Andaluz, A., Pineda, M., et al. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J. Clin. Invest.* *123*, 3254–3271.
- Jeyakumar, M., Norflus, F., Tifft, C.J., Cortina-Borja, M., Butters, T.D., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A., and Platt, F.M. (2001). Enhanced survival in Sandhoff disease mice receiving a combination of substrate deprivation therapy and bone marrow transplantation. *Blood* *97*, 327–329.
- Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D.A., Spoel, V.D., C, A., d’Azzo, A., Hugh Perry, V., Butters, T.D., Dwek, R.A., et al. (2003). Central nervous system

inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126, 974–987.

Kyrklund, T. (1987). Two procedures to remove polar contaminants from a crude brain lipid extract by using prepacked reversed-phase columns. *Lipids* 22, 274–277.

Matsuoka, K., Tamura, T., Tsuji, D., Dohzono, Y., Kitakaze, K., Ohno, K., Saito, S., Sakuraba, H., and Itoh, K. (2011). Therapeutic potential of intracerebroventricular replacement of modified human β -hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 1017–1024.

Meyer, K., Ferraiuolo, L., Schmelzer, L., Braun, L., McGovern, V., Likhite, S., Michels, O., Govoni, A., Fitzgerald, J., Morales, P., et al. (2015). Improving Single Injection CSF Delivery of AAV9-mediated Gene Therapy for SMA: A Dose–response Study in Mice and Nonhuman Primates. *Mol. Ther.* 23, 477–487.

Mingozzi, F., and High, K.A. (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 122, 23–36.

Myerowitz, R., Lawson, D., Mizukami, H., Mi, Y., Tiffit, C.J., and Proia, R.L. (2002). Molecular pathophysiology in Tay–Sachs and Sandhoff diseases as revealed by gene expression profiling. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1343–1351.

Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G.D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdhary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011). Adenovirus-Associated Virus Vector–Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365, 2357–2365.

Norflus, F., Tiffit, C.J., McDonald, M.P., Goldstein, G., Crawley, J.N., Hoffmann, A., Sandhoff, K., Suzuki, K., and Proia, R.L. (1998). Bone marrow transplantation prolongs life span and ameliorates neurologic manifestations in Sandhoff disease mice. *J. Clin. Invest.* 101, 1881–1888.

Osmon, K.J.L., Woodley, E., Thompson, P., Ong, K., Karumuthil-Melethil, S., Keimel, J.G., Mark, B.L., Mahuran, D., Gray, S.J., and Walia, J.S. (2016). Systemic Gene Transfer of a Hexosaminidase Variant Using an scAAV9.47 Vector Corrects GM2 Gangliosidosis in Sandhoff Mice. *Hum. Gene Ther.* 27, 497–508.

Phaneuf, D., Wakamatsu, N., Huang, J.-Q., Borowski, A., Peterson, A.C., Fortunato, S.R., Ritter, G., Igdoura, S.A., Morales, C.R., Benoit, G., et al. (1996). Dramatically Different Phenotypes in Mouse Models of Human Tay-Sachs and Sandhoff Diseases. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1–14.

Reid, P.C., Lin, S., Vanier, M.T., Ohno-Iwashita, Y., Harwood, H.J., Hickey, W.F., Chang, C.C.Y., and Chang, T.-Y. (2008). Partial blockage of sterol biosynthesis with a squalene synthase inhibitor in early postnatal Niemann-Pick type C npcnih null mice brains reduces neuronal cholesterol accumulation, abrogates astrogliosis, but may inhibit myelin maturation. *J. Neurosci. Methods* 168, 15–25.

Sandhoff, K., and Harzer, K. (2013). Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *J. Neurosci.* 33, 10195–10208.

Sandhoff, K., Harzer, K., Wässle, W., and Jatzkewitz, H. (1971). Enzyme Alterations and Lipid Storage in Three Variants of Tay-Sachs Disease. *J. Neurochem.* *18*, 2469–2489.

Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Sandhoff, K., Suzuki, K., et al. (1995). Mouse models of Tay–Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat. Genet.* *11*, 170–176.

Sango, K., Yamanaka, S., Ajiki, K., Tokashiki, A., and Watabe, K. (2002). Lysosomal storage results in impaired survival but normal neurite outgrowth in dorsal root ganglion neurones from a mouse model of Sandhoff disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *28*, 23–34.

Spampanato, C., De Leonibus, E., Dama, P., Gargiulo, A., Fraldi, A., Sorrentino, N.C., Russo, F., Nusco, E., Auricchio, A., Surace, E.M., et al. (2011). Efficacy of a Combined Intracerebral and Systemic Gene Delivery Approach for the Treatment of a Severe Lysosomal Storage Disorder. *Mol. Ther.* *19*, 860–869.

Wada, R., Tiffit, C.J., and Proia, R.L. (2000). Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 10954–10959.

Walia, J.S., Altaleb, N., Bello, A., Kruck, C., LaFave, M.C., Varshney, G.K., Burgess, S.M., Chowdhury, B., Hurlbut, D., Hemming, R., et al. (2015). Long-Term Correction of Sandhoff Disease Following Intravenous Delivery of rAAV9 to Mouse Neonates. *Mol. Ther.* *23*, 414.

Group	Dose per compartment	Global dose	Ratio IV versus ICV
Group 1	IV: 3.15×10^{13} vg/kg ICV: 0.35×10^{13} vg/kg	3.5×10^{13} vg/kg	90/10
Group 2	IV: 2.8×10^{13} vg/kg ICV: 0.7×10^{13} vg/kg	3.5×10^{13} vg/kg	80/20
Group 3	IV: 3.5×10^{13} vg/kg ICV: 0.7×10^{13} vg/kg	4.2×10^{13} vg/kg	100/20

Table 1: scAAV9-Hexb doses used in each compartment in the different groups. The dose used as reference is 3.5×10^{13} vg/kg (Niemir et al., submitted).

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Enzymatic activities in brain after scAAV9-Hexb treatment

a-h Hexosaminidases enzymatic tests were performed using the synthetic substrates MUG and MUGS. Results are presented as percentage of Hexb^{+/+} activities for total hexosaminidases and hexosaminidase A specific activities. **a,b,c,d** Hexosaminidases activity in the cerebrum in the first (a,b) and second group (c,d). **e,f,g,h** Hexosaminidases activity in the cerebellum in the first (e,f) and second group (g,h). **i,j** Enzymatic assays were performed to test β -glucuronidase, α -fucosidase and β -galactosidase activities using synthetic fluorescent substrates. Results are presented as percentage of Hexb^{+/+} activities for each enzyme. Threshold bar shows 100% of activity. **i**: Results for first (left) and second group (right) in cerebrum. **j** Results for first (left) and second group (right) in cerebellum. Error bars show SEM, n=3 for Hexb^{+/+} and Hexb^{-/-} mice and n=4 for Hexb^{-/-} AAV9-Hexb, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Figure 2: GM2 ganglioside analysis in cerebrum

Study of GM2 gangliosides (HPTLC) in cerebrum of 2 and 4 month-old wild-type, untreated Hexb^{-/-} and scAAV9-Hexb treated mice. **a,c** Chromatographic profiles of total gangliosides (resorcinol-HCl revelation) in group 1 (a) and group 2 (c). Each lane corresponds to 3 mg wet weight tissue. **b,d** Quantitative data for GM2 ganglioside (expressed as percentage of total gangliosides) for group 1 (b) and group 1 (d). Error bars show SEM, n=3 for Hexb^{+/+} and Hexb^{-/-} mice and n= 4 for Hexb^{-/-} AAV9-Hexb mice ** p<0.001, **** p<0.0001.

Figure 3: GM2 ganglioside analysis in cerebellum

Study of gangliosides (HPTLC) in cerebellum of 2 and 4 month-old wild type, untreated Hexb^{-/-} and scAAV9-Hexb treated mice. **a,c** Chromatographic profiles of total gangliosides

(resorcinol-HCl revelation), for group 1 (a) and for group 2 (c). Each lane corresponds to 3 mg wet weight tissue. **b,d** Quantitative data for GM2 ganglioside (expressed as percentage of total gangliosides) for group 1 (b) and group 2 (d). Error bars show SEM, n=3 for Hexb^{+/+} and Hexb^{-/-} mice and n= 4 for Hexb^{-/-} AAV9-Hexb mice, **p<0.01, **** p<0.0001.

Figure 4: Enzymatic activities and GA2 accumulation in liver after scAAV9-Hexb treatment

a,b,c,d Enzymatic assays were performed using synthetic substrates MUG and MUGS. Results are presented as percentage of WT for total hexosaminidases activity (**a,c**) and hexosaminidase A specific activity (**b,d**) in liver. **a,b** Results for group 1. **c,d** Results for group 2. **e,f**, Glycosphingolipids (5 mg tissue/lane) were separated on HPTLC plates and visualized by orcinol-sulfuric reagent. They were analysed at 2 and 4 months for group 1 (e) and group 2 (f). Error bars show SEM, n=3 for Hexb^{+/+} and Hexb^{-/-} mice and n= 4 for Hexb^{-/-} AAV9-Hexb mice, *p<0.05.

Figure 5: Analysis of neuroinflammation in AAV9-treated Sandhoff mice

RT-qPCR was performed on cerebrum RNA extracts at 4 months in Hexb^{+/+} (n=3), Hexb^{-/-} (n=3) and treated mice from group 2 (n=4). **a,b** mRNA relative level of neuroinflammatory genes was normalized to pinin. **c,d** mRNA relative level of inflammatory genes was normalized to pinin. Error bars show SEM, *p<0.05, **p<0.01,*** p<0.001.

Figure 6: Analysis of lysosomal storage and autophagic impairment

a Cerebrum protein extracts from Hexb^{+/+} (n=3), Hexb^{-/-} (n=3) and treated Hexb^{-/-} (n=4) (group 2) at 2 and 4 months were examined for β -actin, LAMP-1 and LC3 using immunoblotting. **b** Quantification of LAMP-1 immunoblotting. **c**, Quantification of LC3-II

immunoblotting. **d** Immunohistochemistry was performed for LAMP-2. AAV9-treated mice from group 2 were compared with Hexb^{-/-} and Hexb^{+/+} mice. Error bars show SEM, *p<0.05 **p<0.01, *** p<0.001.

Figure 7: Long-term analysis in mice treated with scAAV9-Hexb (group 2)

a Body weight was measured each week in AAV9-treated mice from group 2 (n=5), by comparison with Hexb^{-/-} (n=6) and Hexb^{+/+} mice (n=6). **b** Kaplan-Meier survival curve is shown for Hexb^{+/+}, Hexb^{-/-} and treated Hexb^{-/-} mice. Hexb^{-/-} died around 120 days, whereas treated mice are still alive. **c** Hexb^{+/+}, Hexb^{-/-} and treated mice were tested by rotarod. Time at which mice fell from accelerating rod was recorded. **d** Hexb^{+/+}, Hexb^{-/-}, and treated mice were tested by inverted screen test. Latency to fall from metal grid within 10 s decreased progressively in Hexb^{-/-} mice, whereas animals treated have results similar to Hexb^{+/+}.

Figure 8: Hexosaminidase and lipid analysis in cerebellum and liver in group 3

a,e Enzymatic assays were performed using synthetic substrates MUG and MUGS in cerebellum (**a**) and liver (**e**) at 2 months. Results are presented as percentage of WT for total hexosaminidases activity and hexosaminidase A specific activity. **b** Enzymatic assays were performed by using synthetic fluorescent substrates to test β -glucuronidase, α -fucosidase and β -galactosidase activities in cerebellum. **c,d** Study of gangliosides (HPTLC) in cerebellum of 2 month-old Hexb^{+/+}, untreated Hexb^{-/-} and scAAV9-treated mice. **c** Chromatographic profiles of total gangliosides (resorcinol-HCl revelation). Each lane corresponds to 3 mg wet weight tissue. **d** Quantitative data for GM2 gangliosides (expressed as percentage of total gangliosides). **f** Glycosphingolipids (5 mg tissue/lane), separated on HPTLC plates and visualized by orcinol-sulfuric reagent, were analysed at 2 months in liver. Error bars show

SEM, n=3 for Hexb^{+/+} and Hexb^{-/-} mice and n= 4 for AAV9-Hexb-treated mice, *p<0.05
p<0.01, ** p<0.0001.

Supplementary figures

Figure S1: GM2 still present in liver after scAAV9-Hexb treatment

a,b Study of gangliosides (HPTLC) in liver of 2 and 4 month-old Hexb^{+/+}, untreated Hexb^{-/-} and scAAV9-treated mice. Chromatographic profiles of total gangliosides (resorcinol-HCl revelation) for the group 1 (a) and for the group 2 (b). Each lane corresponds to 3 mg wet weight tissue.

Figure S2 : Neuroinflammation and inflammation in cerebrum (group 1)

RT-qPCR was performed on cerebrum RNA extracts from 4 month old Hexb^{+/+} (n=3), Hexb^{-/-} (n=3) and treated- Hexb^{-/-} from group 1 (n=4). **a,b** mRNA relative level of neuroinflammatory genes was normalized to pinin. **c,d** mRNA relative level of inflammatory genes was normalized to pinin. Error bars show SEM, *p<0.05, **p<0.01, **** p<0.0001.

Figure S3: Lysosomal storage and autophagy in cerebrum and liver

a Cerebrum protein extracts from Hexb^{+/+} (n=3), Hexb^{-/-} (n=3) and treated-Hexb^{-/-} (n=4) from group 1 were examined at 2 and 4 months for β -actin, LAMP-1 and LC3 using immunoblotting. **b** Immunohistochemistry was performed for LAMP-2 in liver of AAV9-treated mice (group 1) and compared to Hexb^{-/-} and Hexb^{+/+} mice.

Figure S4: Lysosomal storage in heart after scAAV9-Hexb treatment

Immunohistochemistry was performed for LAMP-2 in heart of AAV9-treated mice from group 1 and group 2 and compared to Hexb^{-/-} and Hexb^{+/+} mice.

Figure S5: Liver hypertrophy and inflammation after scAAV9-Hexb treatment

a,b Liver weight/global weight ratio was measured after sacrifice at 2 and 4 months in AAV9-treated mice from group 1 (a) and group 2 (b). **c,d** RT-qPCR was performed for MIP-1 α on liver RNA extracts in Hexb $^{+/+}$ (n=3), Hexb $^{-/-}$ (n=3) and AAV9-treated Hexb $^{-/-}$ (n=4) at 4 months. MIP-1 α mRNA level was normalized to pinin in group 1 (c) and group 2 (d). Error bars show SEM, *p<0.05, **p<0.01.

Figure S6 : Long-term analysis in scAAV9-Hexb treated mice (group 1)

a Body weight was measured each week in AAV9-treated mice from group 1 (n=8) by comparison with Hexb $^{-/-}$ (n=5) and Hexb $^{+/+}$ mice (n=5). **b** Kaplan-Meier survival curve is shown for Hexb $^{+/+}$, Hexb $^{-/-}$ and AAV9-treated mice. Hexb $^{-/-}$ died around 120 days whereas treated mice had a longer survival. **c** Hexb $^{+/+}$, Hexb $^{-/-}$ and AAV9-treated were tested using rotarod. Time at which mice fell from accelerating rod was recorded **d** Hexb $^{+/+}$, Hexb $^{-/-}$, and AAV9-treated were tested by inverted screen test. Latency to fall from metal grid within 10 s decreased progressively in Hexb $^{-/-}$ mice whereas treated animals maintained results similar to Hexb $^{+/+}$ during a longer period.

FIGURES

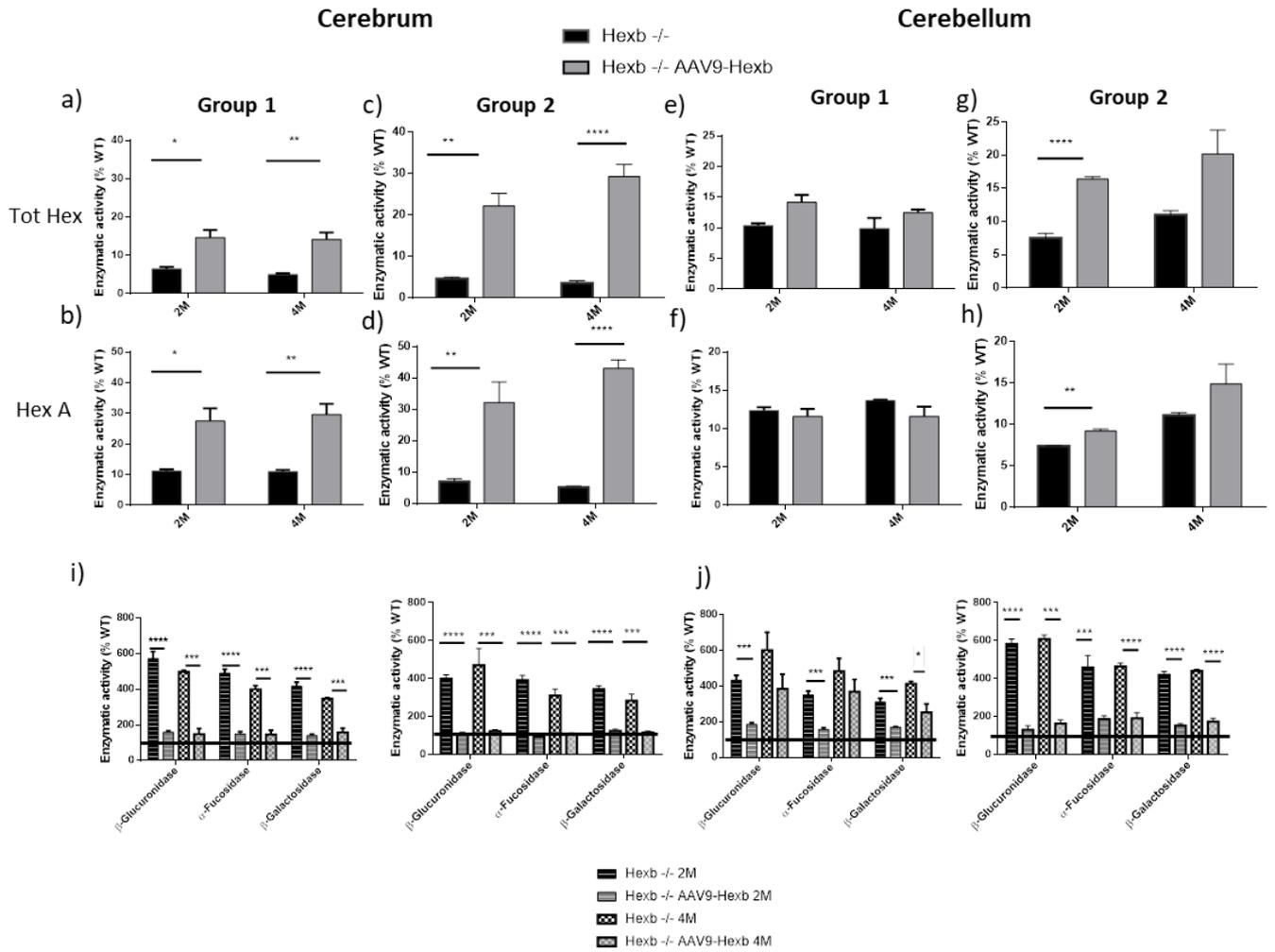


Figure 1: Enzymatic activities in brain after scAAV9-Hexb treatment

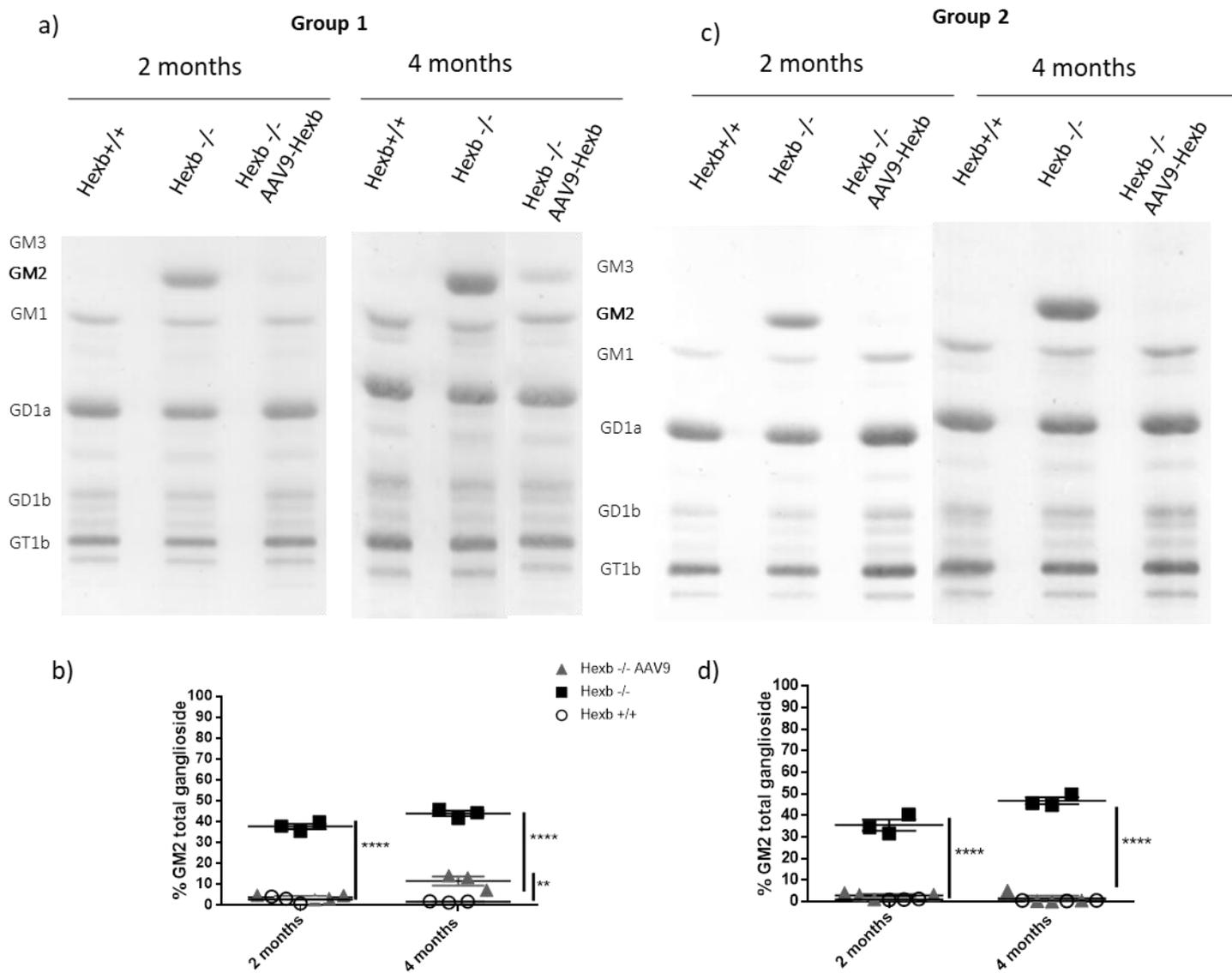


Figure 2: GM2 ganglioside analysis in cerebrum

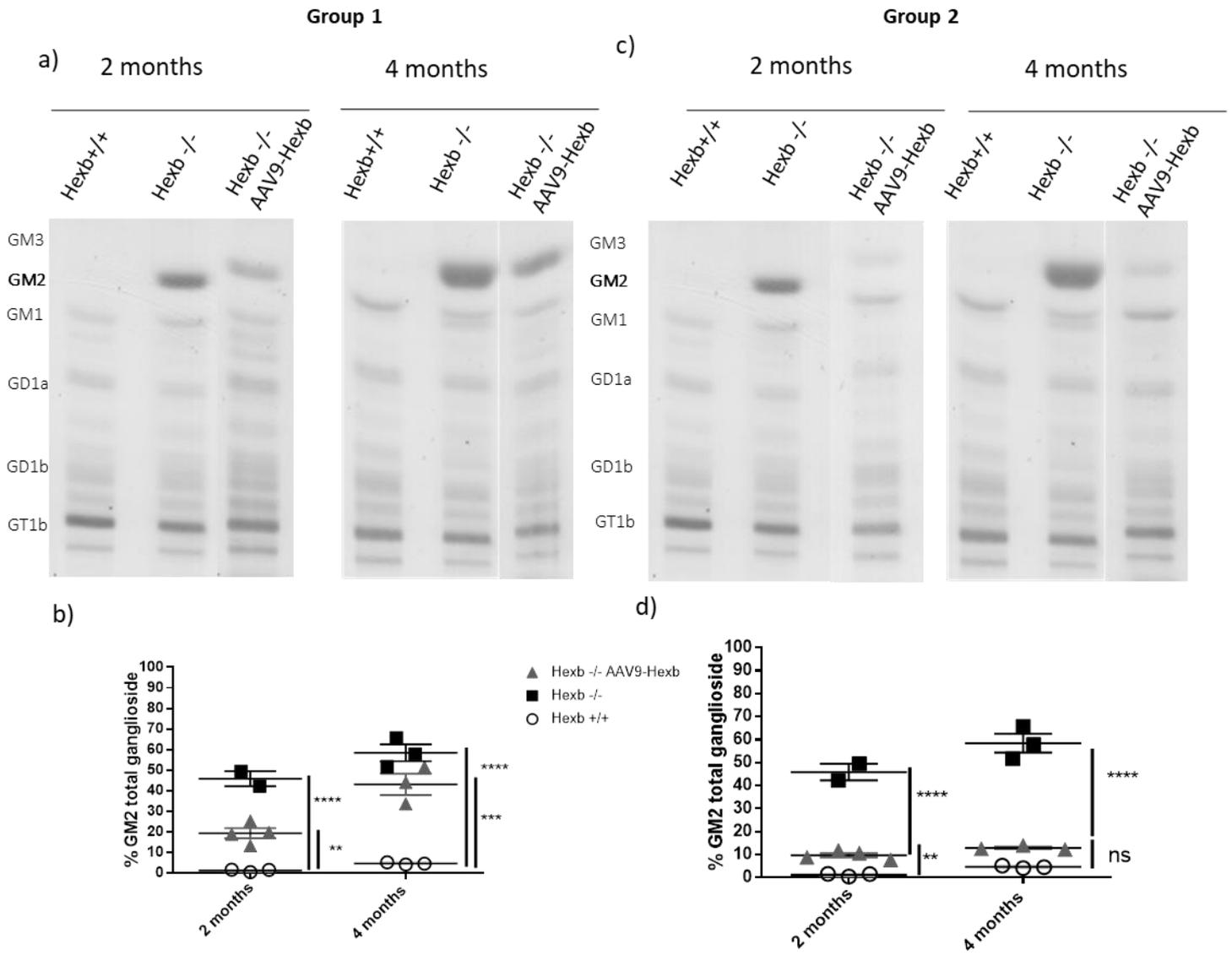


Figure 3: GM2 ganglioside analysis in cerebellum

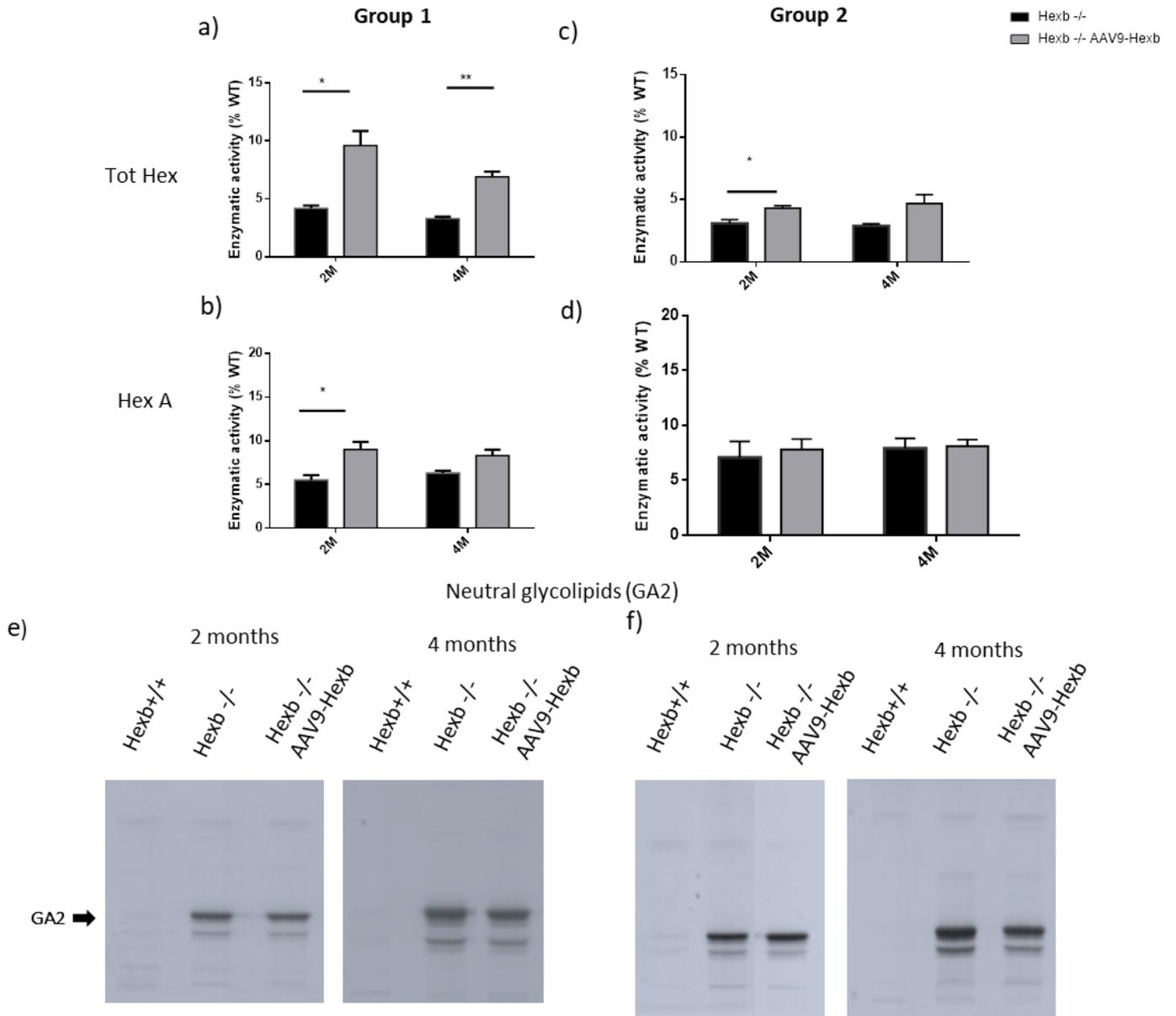


Figure 4: Enzymatic activities and GA2 accumulation in liver after scAAV9-Hexb treatment

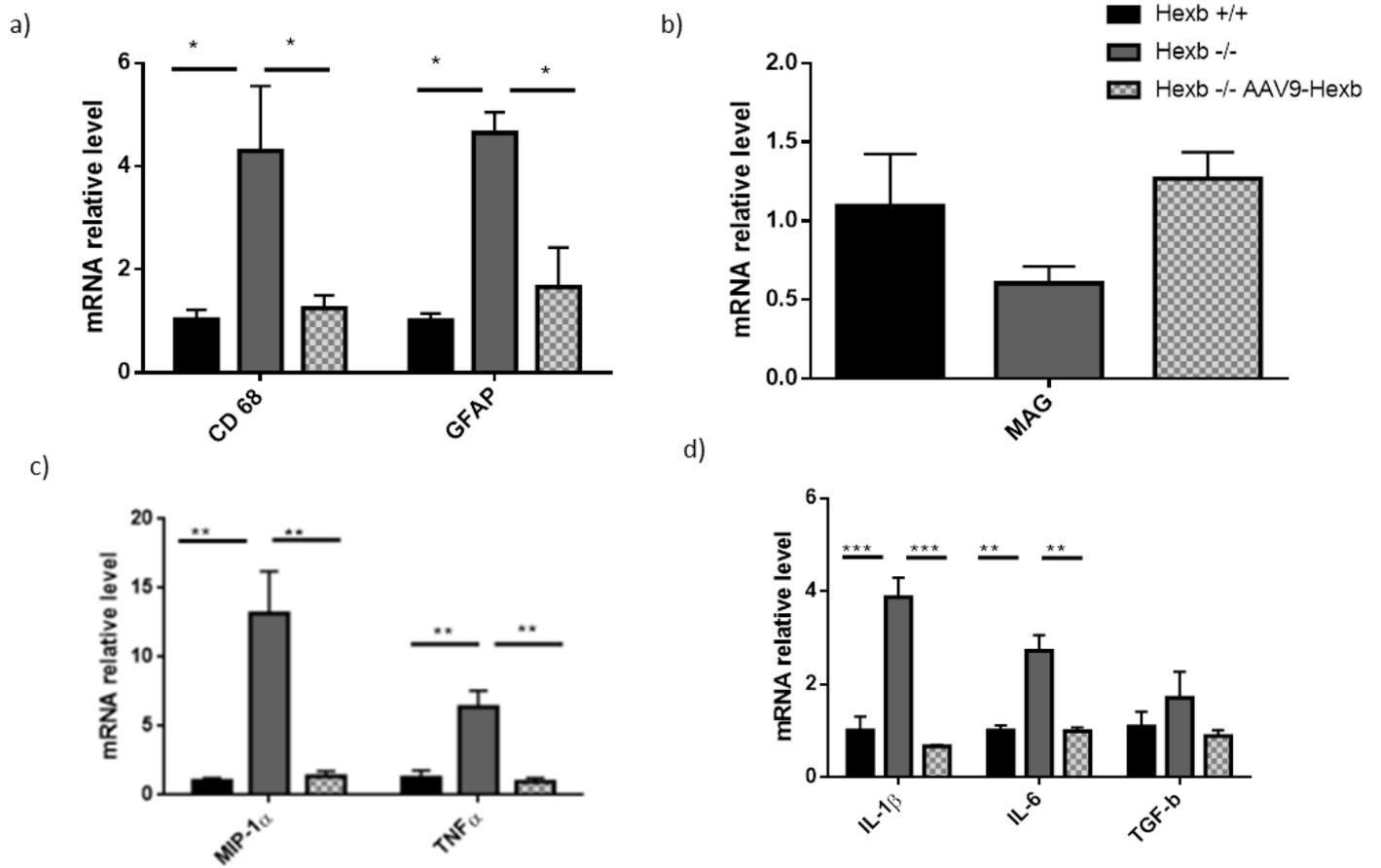


Figure 5: Analysis of neuroinflammation in AAV9-treated Sandhoff mice

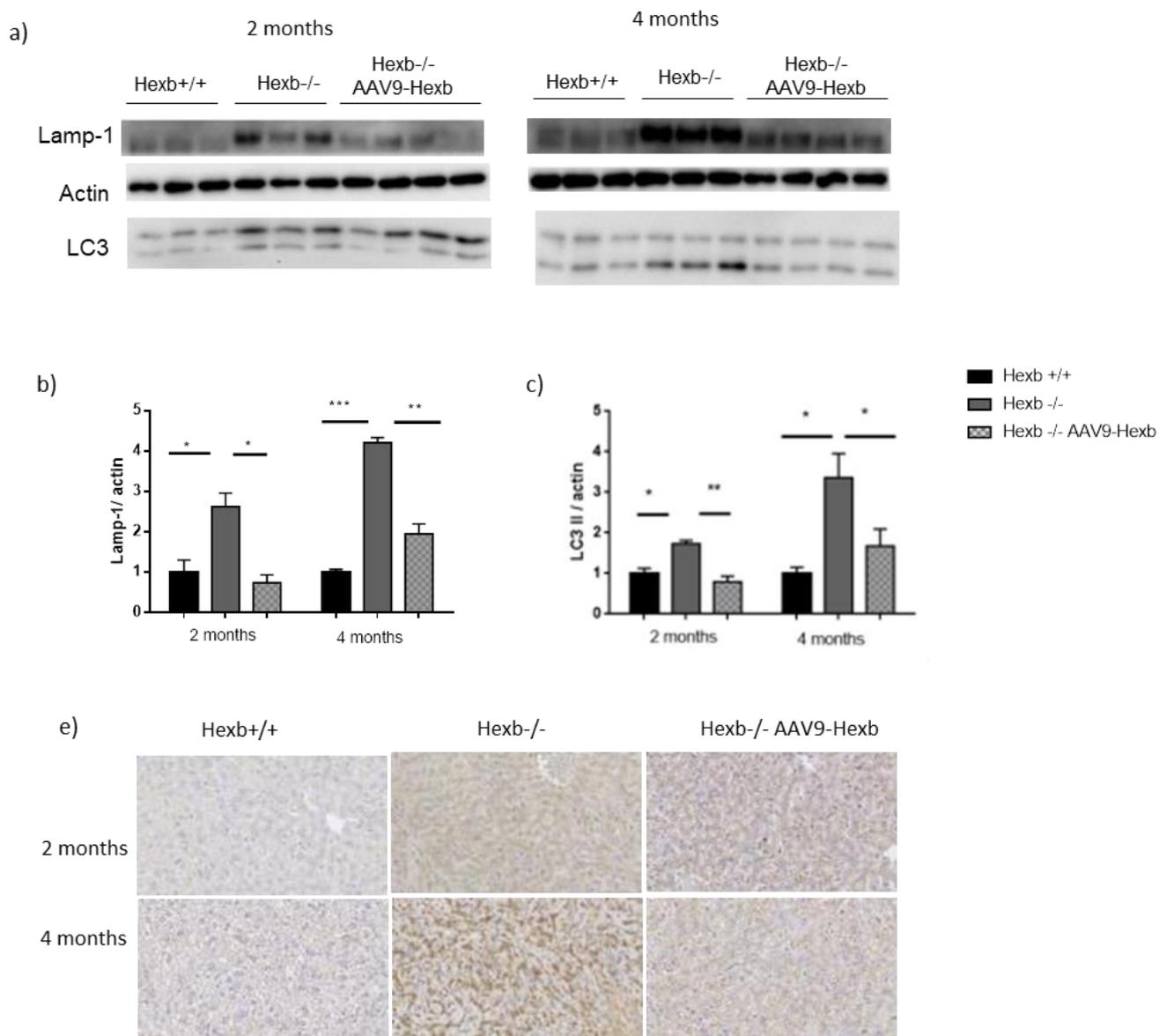


Figure 6: Analysis of lysosomal storage and autophagic impairment

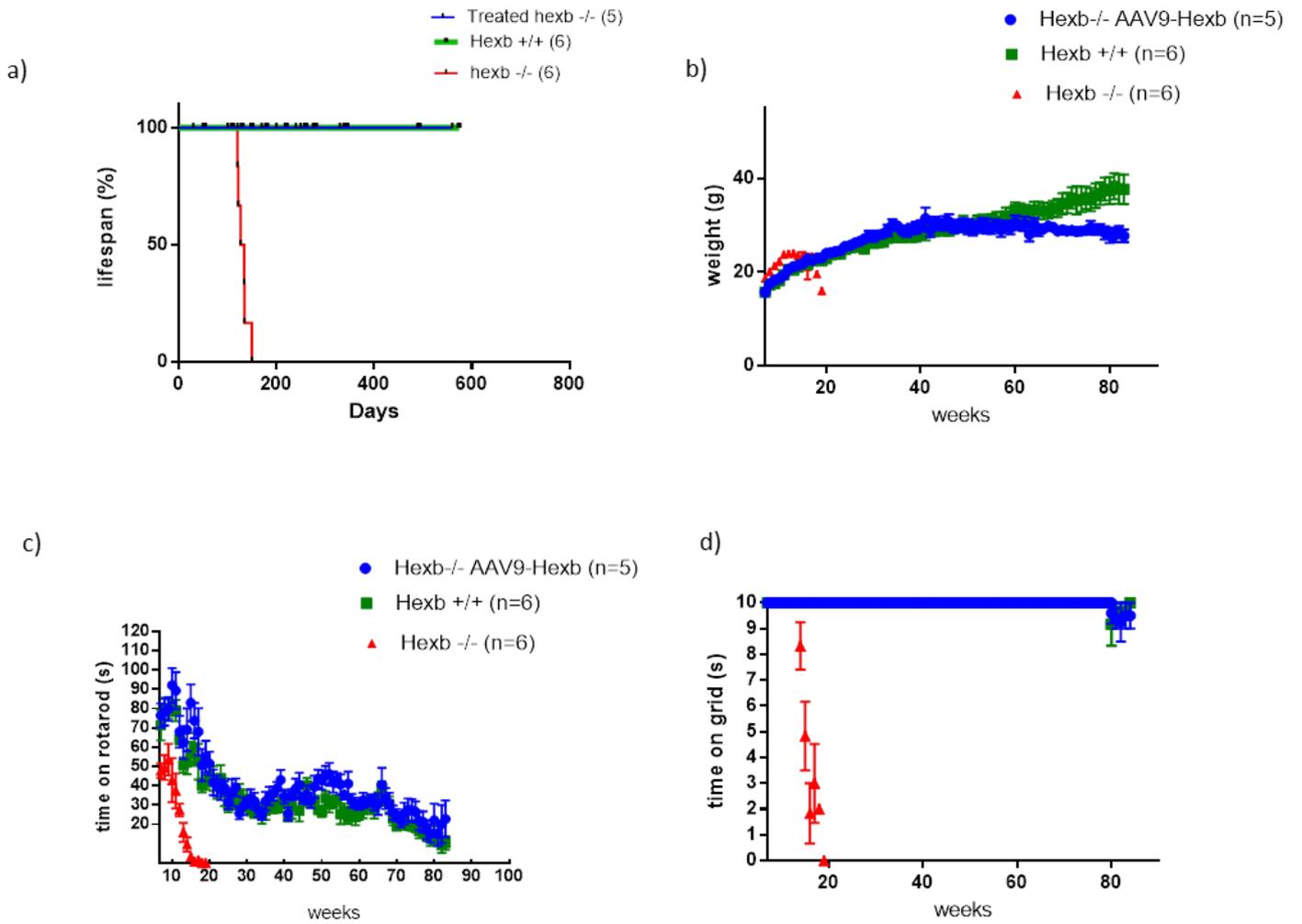


Figure 7: Long-term analysis in mice treated with scAAV9-Hexb (group 2)

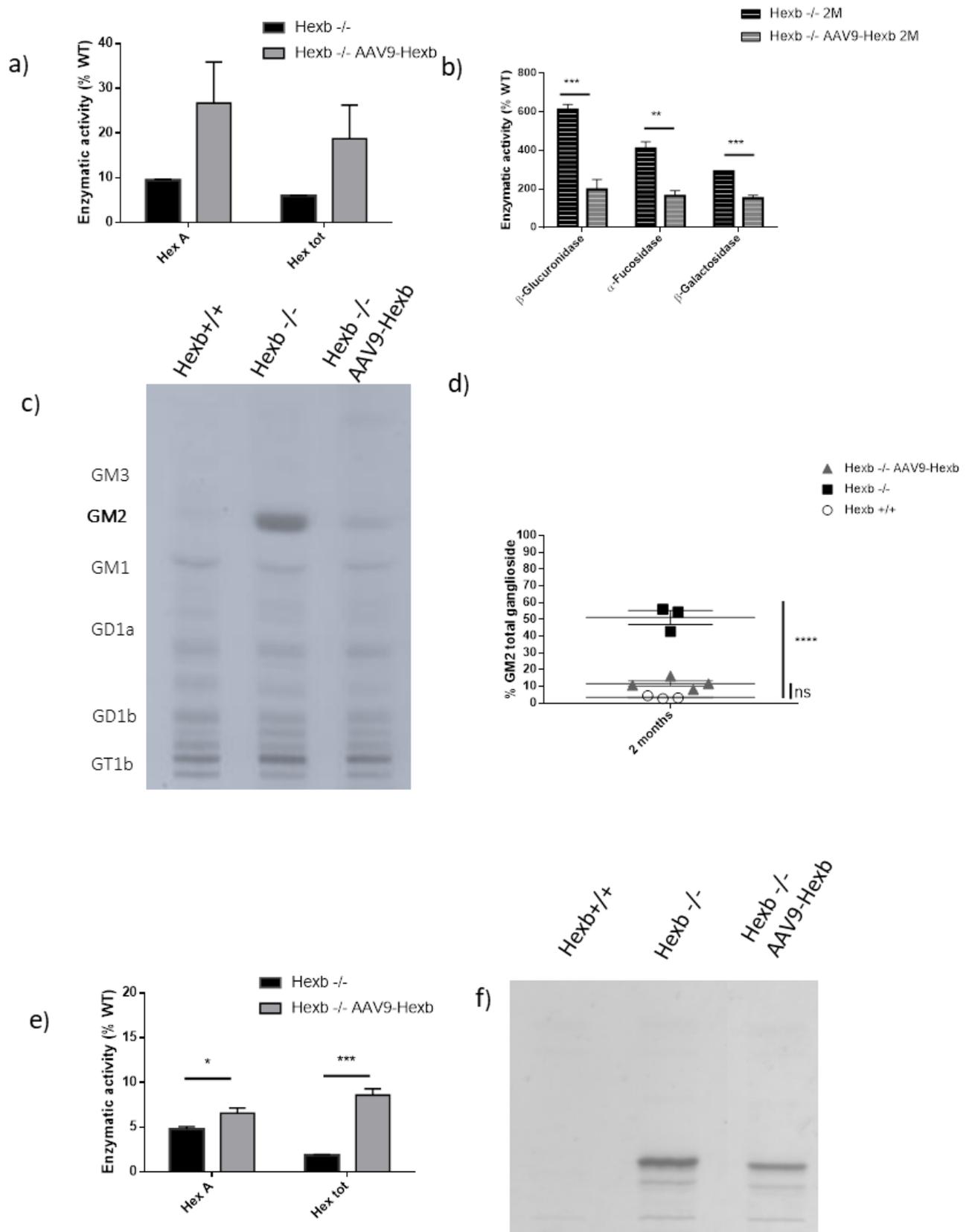


Figure 8: Hexosaminidase and lipid analysis in cerebellum and liver in group 3

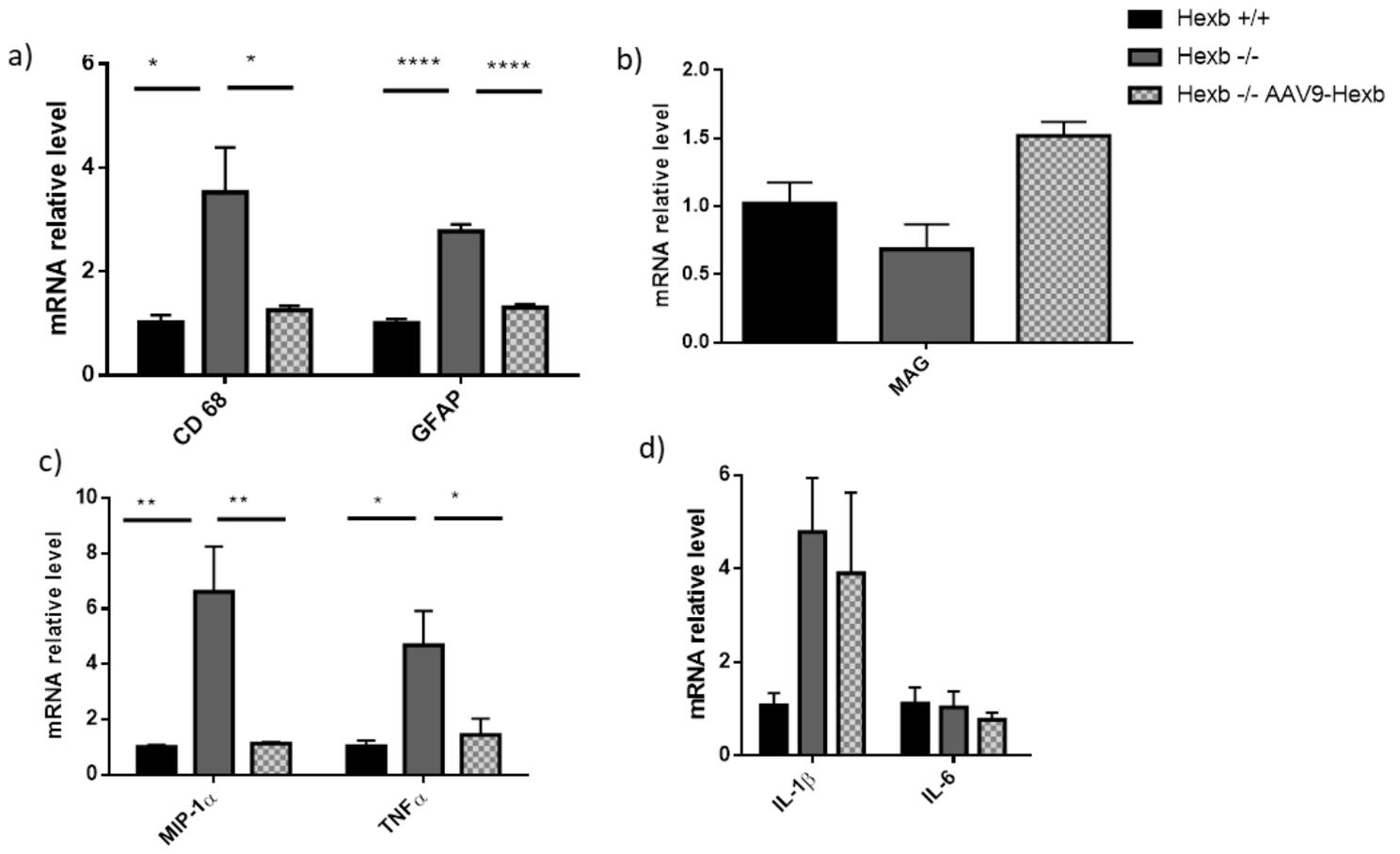


Figure S2 : Neuroinflammation and inflammation in cerebrum (group 1)

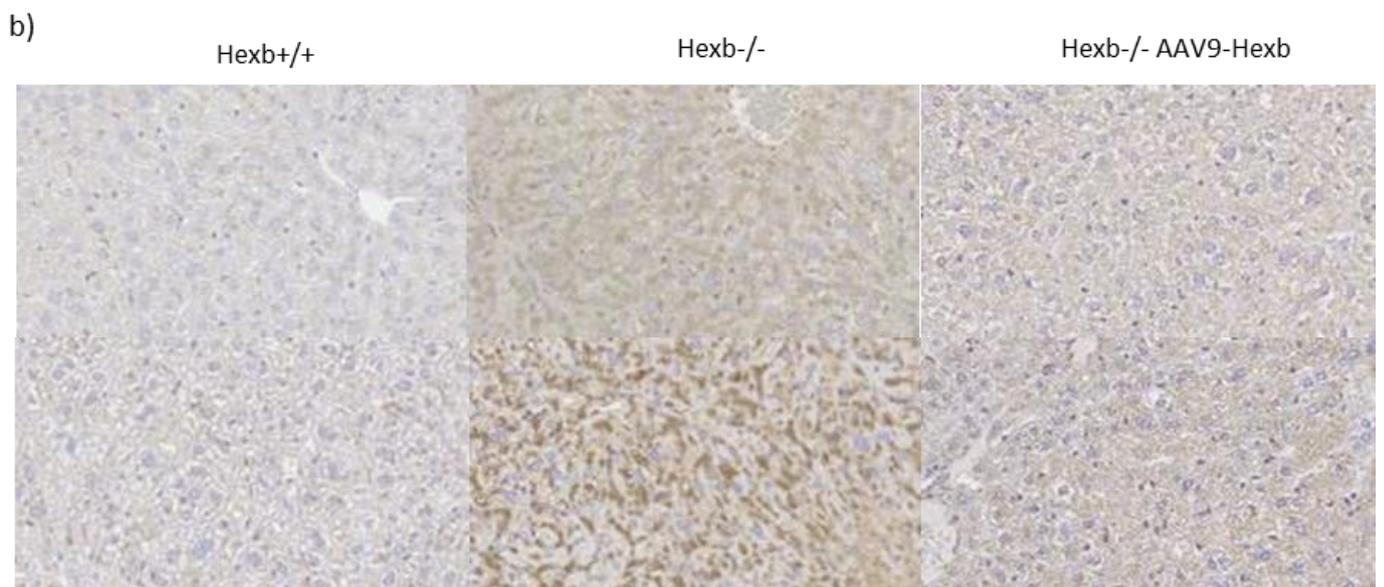
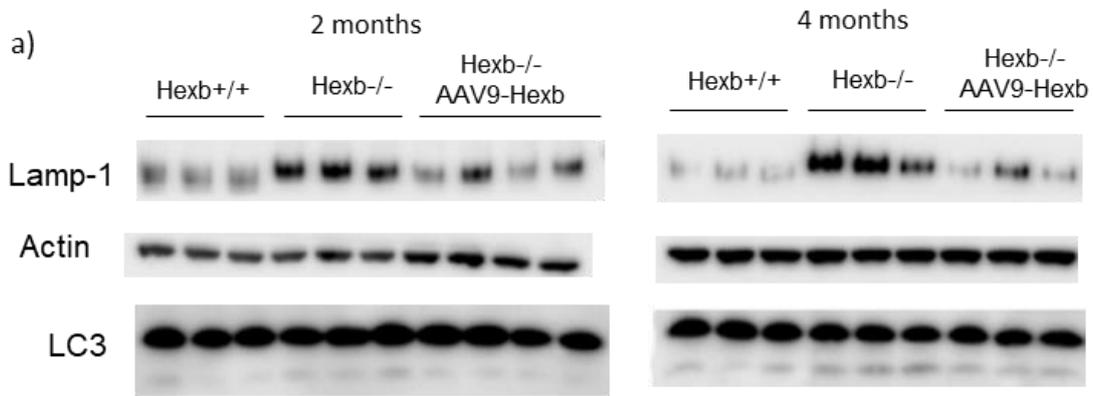


Figure S3: Lysosomal storage and autophagy in cerebrum and liver

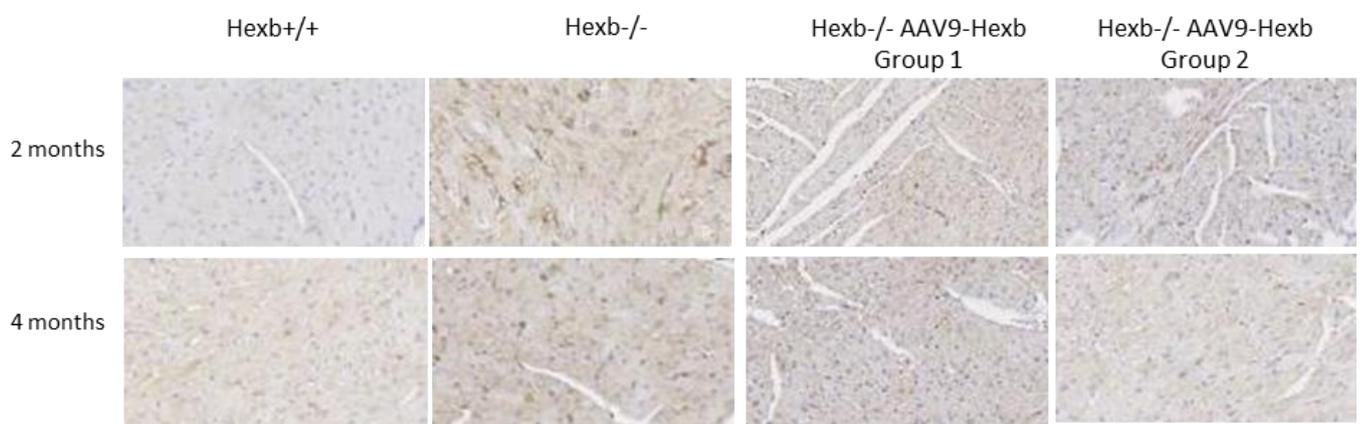


Figure S4: Lysosomal storage in heart after scAAV9-Hexb treatment

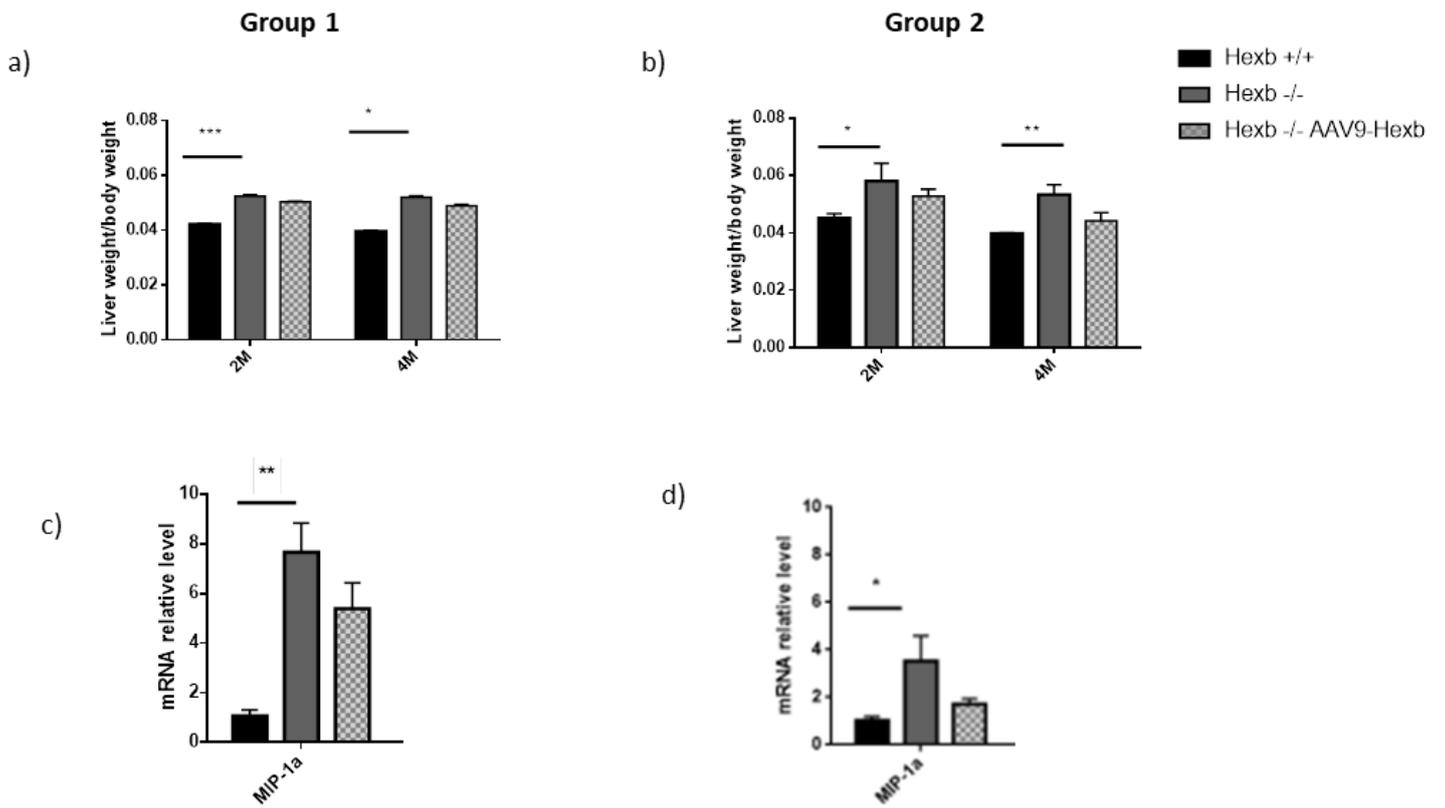


Figure S5: Liver hypertrophy and inflammation after scAAV9-Hexb treatment

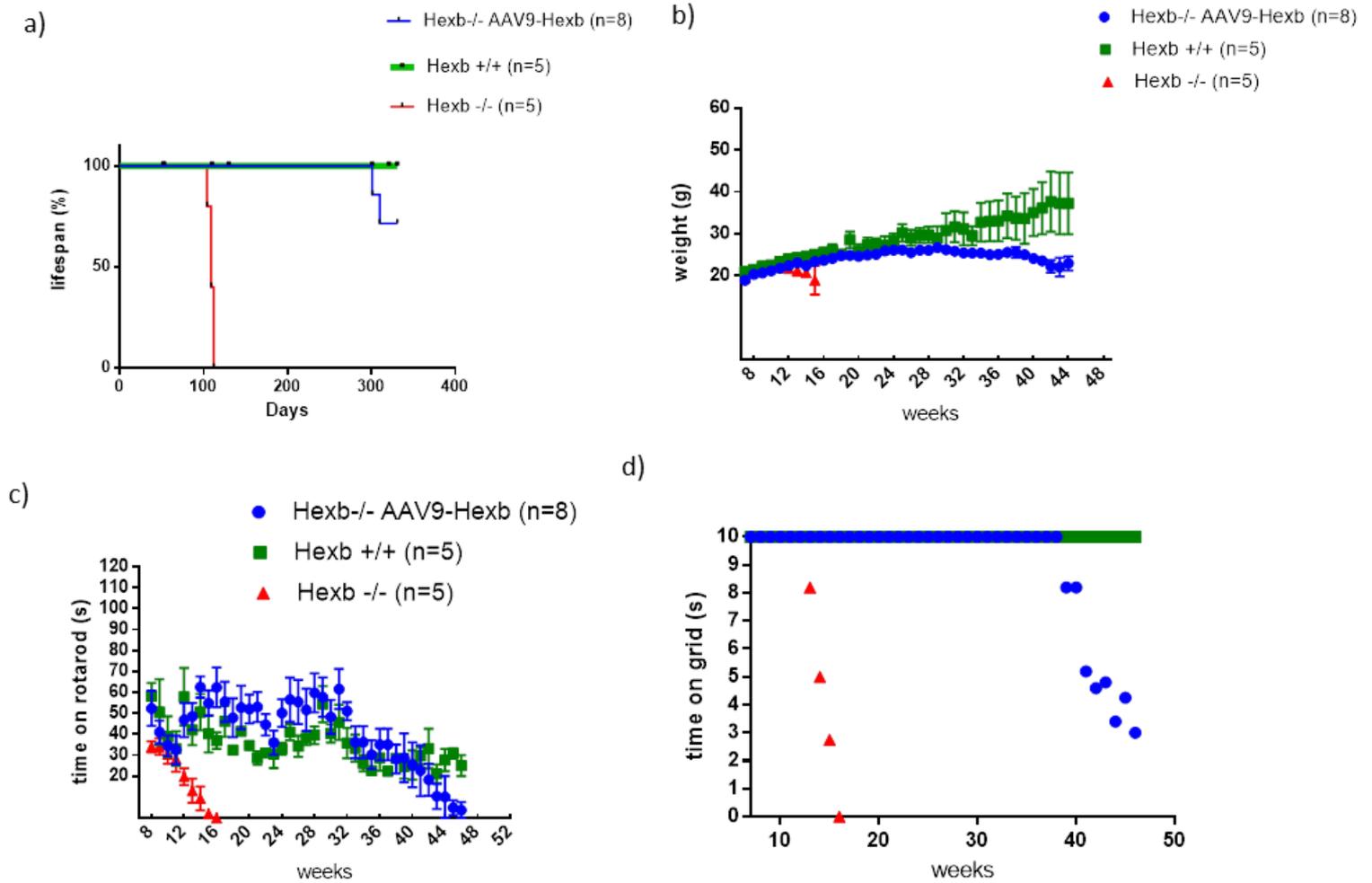


Figure S6: Long-term analysis in scAAV9-Hexb treated mice (group 1)

III. ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION MTOR ET DU PROCESSUS AUTOPHAGIQUE DANS LES GANGLIOSIDOSES A GM2

A) INTRODUCTION

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le lysosome n'est pas seulement responsable de la dégradation de macromolécules en vue de leur recyclage, mais il est aussi impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire. Dans les maladies lysosomales, le lysosome est dysfonctionnel, ce qui a des conséquences néfastes sur l'homéostasie cellulaire. Analyser ces dérégulations peut permettre de mieux comprendre la progression de la maladie et peut également aboutir à la découverte de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques.

1) Voie mTOR

L'implication du lysosome dans l'homéostasie cellulaire a été démontrée suite à la découverte du complexe mTORC1, qui est connu pour exercer son activité au niveau de la membrane du lysosome. Lorsque mTORC1 est actif (en présence de nutriments, d'acide aminés, d'hormone, etc.), il permet la croissance cellulaire en augmentant la synthèse protéique et en inhibant l'autophagie. Récemment, il a été montré que le niveau d'acides aminés à l'intérieur du lysosome permet le positionnement du complexe mTOR à la surface du lysosome, via une cascade de signalisation impliquant l'ATPase vacuolaire, Ragulator et des Rag GTPases. mTORC1 est ensuite activée par Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), une petite GTPase présente à la surface du lysosome (Zoncu et al., 2011). Ensuite, une cascade de signalisation est déclenchée. La croissance cellulaire est induite via l'activation de la kinase S6 qui permet l'augmentation de la synthèse protéique et lipidique. En revanche, elle va inhiber les processus autophagiques, via l'inhibition d'ULK empêchant l'initiation de l'autophagie, et aussi via l'inhibition de TFEB empêchant la biogénèse des lysosomes (figure 34).

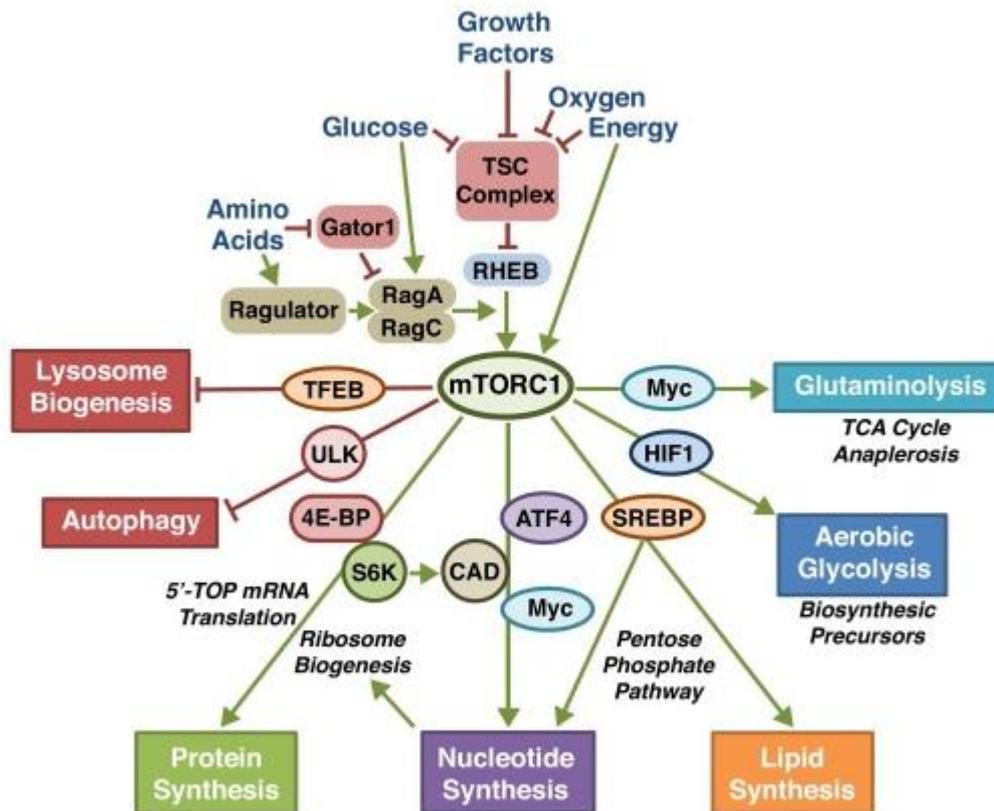


Figure 34 : mTORC1 est un régulateur de la croissance cellulaire en reliant l'information aux processus métaboliques (Ben-Sahra and Manning, 2017).

L'état d'activation de mTORC1 en réponse à l'apport en nutriments dépend de l'action des GTPases, de RHEB et de la famille des Rag. mTORC1 une fois activé va réguler positivement la glycolyse aérobie via HIF1 (*hypoxia inducible factor 1*), la synthèse lipidique grâce à son action sur SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*), la synthèse nucléotidique grâce à l'activation d'ATF4 (*activating transcription factor 4*), de CAD et Myc, la synthèse protéique via l'activation de S6K et 4E-BP (*translation initiation factor 4E-binding protein*). Par contre, mTORC1 va inhiber le processus de l'autophagie via la kinase ULK et la biogénèse du lysosome via TFEB.

Dans le cas des maladies lysosomales, il y a une augmentation du nombre de lysosomes, mais aussi une augmentation de leur taille. Ce phénomène pourrait influencer l'activité de mTOR au niveau de la membrane du lysosome. C'est pourquoi, dans cette partie du travail, nous avons décidé d'analyser l'activité de mTOR d'une part au niveau cellulaire dans des fibroblastes de patients Sandhoff et Tay-Sachs et dans des cellules MEF (*mouse embryonic fibroblast*) provenant de souris Sandhoff et d'autre part, au niveau tissulaire, dans des cerveaux des souris Sandhoff.

2) Autophagie

Dans les maladies lysosomales, il a été montré que lorsque des macromolécules non dégradées s'accumulent au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes, une accumulation secondaire de protéines et/ou de lipides a lieu. Ceci est dû au dysfonctionnement généralisé du lysosome causé par l'accumulation primaire (Lamanna et al., 2011; Prinetti et al., 2011; Walkley and Vanier, 2009) et il en résulte des altérations du réseau lysosome/autophagosome et lysosome/endosome favorisant une accumulation secondaire (Nixon, 2007; Nixon et al., 2008).

Une altération et/ou une dérégulation du processus autophagique, et notamment une accumulation d'autophagosomes, ont été mises en évidence dans les maladies lysosomales, surtout dans les formes avec atteinte neurologique. Ces anomalies pourraient participer aux cascades pathogéniques induisant la neurodégénérescence :

- Dans la mucopolysaccharidose de type IIIA due au déficit de l'héparane sulfamidase, il a été montré une fusion lysosome/autophagosome altérée, induisant une accumulation des substrats de l'autophagie, tel que l' α -synucléine (Settembre et al., 2008).
- Dans la gangliosidose à GM1 (déficit de la β -galactosidase), il existe une augmentation du nombre d'autophagosomes due à une dérégulation de l'induction de l'autophagie, associée à des altérations au niveau des mitochondries (Takamura et al., 2008)
- La mucopolipidose de type IV est une maladie due à des mutations du gène *MCOLN1* qui code un récepteur impliqué dans la signalisation et le transport du calcium. L'autophagie est donc touchée, car *MCOLN1* a un rôle direct dans l'acidification du lysosome et la formation des autophagosomes. Il a ainsi été montré sur des fibroblastes de patients un flux autophagique altéré se caractérisant par une augmentation du nombre d'autophagosomes (Vergarajauregui et al., 2008). Des résultats similaires ont été rapportés dans le modèle murin de la maladie (Curcio-Morelli et al., 2010).
- Dans les céroïde-lipofuscinoses neuronales caractérisées par une accumulation de lipofuscine (notamment dans la forme liée au gène *CLN3*), il a été montré que le processus autophagique est là encore altéré au moment de la formation des vacuoles autophagiques, entraînant une suractivation de l'induction autophagique (Cao et al., 2006).

- La maladie de Niemann-Pick de type C, dans sa forme NPC1 qui est la plus fréquente, est due à des anomalies de protéines impliquées dans le transport du cholestérol au niveau des lysosomes et des endosomes tardifs, entraînant une accumulation de cholestérol au niveau de ces compartiments. Il a été montré à la fois sur des fibroblastes de patients et dans le cerveau d'un modèle murin de la maladie, une accumulation d'autophagosomes et de LC3II due à une perturbation de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, aboutissant à une altération du flux autophagique (Liao et al., 2007).

Les mécanismes précis qui induisent des défauts lors du processus autophagique restent à découvrir, mais il en résulte des accumulations secondaires contribuant à la dérégulation des fonctions cellulaires. Ces accumulations secondaires ont aussi été décrites récemment dans la maladie de Sandhoff. Ainsi, l' α -synucléine, un substrat bien connu de l'autophagie, s'accumule dans le cerveau des souris Sandhoff (Keilani et al., 2012; Suzuki et al., 2016). Une altération de l'autophagie pourrait expliquer ces résultats.

Dans ce chapitre, nous évoquerons donc également les études que nous avons réalisées sur le flux autophagique à la fois sur des fibroblastes de patients Sandhoff, dans des cellules MEF Hexb^{-/-} et dans le cerveau de souris Sandhoff.

3) Activité de TFEB

TFEB est connu pour réguler transcriptionnellement la plupart des gènes intervenant dans la biogénèse et l'activité du lysosome. En condition normale, TFEB se localise au niveau du cytoplasme, il est inactif. En revanche, en cas de manque de nutriments ou bien de stress, TFEB va être transloqué au niveau du noyau, pour pouvoir induire l'expression de ses gènes cibles (Settembre et al., 2013b). Cette translocation vers le noyau est régulée par des phosphorylations : la forme phosphorylée va rester dans le cytoplasme, tandis que la forme déphosphorylée va rentrer dans le noyau. A ce jour, plusieurs kinases impliquées dans cette régulation ont été identifiées, dont mTORC1 (Settembre et al., 2012). Dans les conditions normales, le complexe mTORC1 est actif à la surface du lysosome. Il provoque la phosphorylation de TFEB qui est ainsi séquestré dans le cytoplasme. La forme phosphorylée va aussi se lier à la protéine 14-3-3, ce qui va provoquer sa dégradation. A l'inverse, en cas de stress, le complexe mTORC1 ne sera plus présent sur la membrane du lysosome et sera

inactif. TFEB ne sera plus phosphorylé et va être transloqué dans le noyau. Il va alors se positionner sur la séquence CLEAR et activer la transcription de ses gènes cibles, et aussi sa propre expression. MCOLN1, un canal lysosomal régulant le calcium au niveau du lysosome et dont l'expression est régulée par TFEB permet aussi un rétrocontrôle positif de TFEB. En effet, ce canal peut provoquer à la surface du lysosome un microdomaine contenant une forte concentration en Ca^{2+} activant la calcineurine phosphatase. Cette calcineurine peut déphosphoryler TFEB ce qui induit son activation (figure 35).

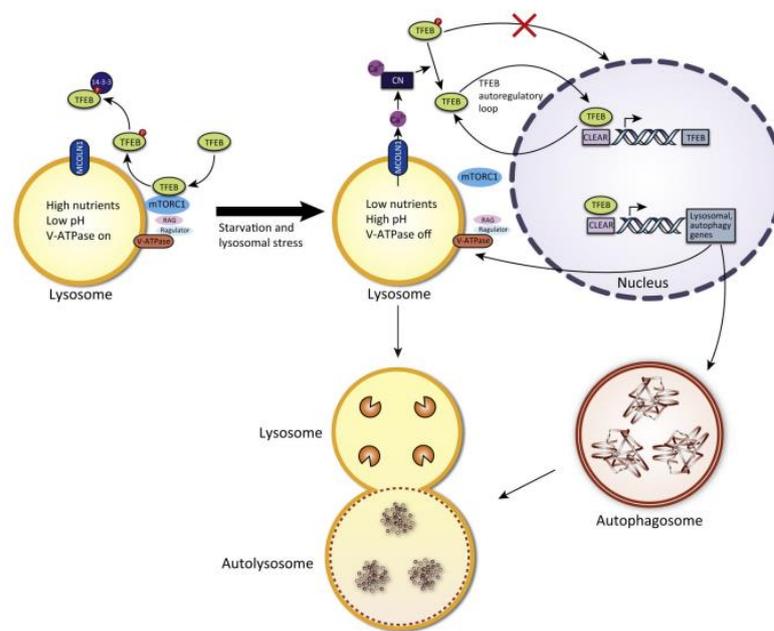


Figure 35 : Régulation de l'activité de TFEB (Martini-Stoica et al., 2016)

CN (calcineurine phosphatase), MCOLN1 (mucopolipine 1)

Il a été montré ces dernières années que TFEB était altéré dans des maladies neurodégénératives telles que les maladies de Huntington (Tsunemi et al., 2012) et de Parkinson (Chu et al., 2009), une diminution de son activité semblant en effet contribuer à la progression de ces maladies. Compte tenu de l'implication de TFEB dans l'activité lysosomale, de sa dérégulation dans certaines maladies neurodégénératives, ainsi que de sa régulation par le complexe mTOR, nous avons souhaité étudier la fonction de TFEB afin de voir si elle était également altérée dans les gangliosidoses à GM2.

B) MATERIEL ET METHODES

1) Souris Sandhoff

Le modèle Sandhoff à notre disposition est celui obtenu par l'équipe de Roy Gravel. Il s'agit d'un modèle *knock-out* par insertion d'une cassette néo au niveau du gène *Hexb*, aboutissant à une absence de production de la chaîne β (souris C57BL/6J) (Phaneuf et al., 1996). Les souris sont stabulées dans une animalerie où la température est de 25°C avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. Des croisements entre mâles *Hexb*^{-/-} et femelles *Hexb*^{+/-} et entre animaux *Hexb*^{+/-} ont été effectués pour obtenir les souris nécessaires aux expériences. Pour les analyses, les souris ont été sacrifiées par dislocation cérébrale lors de la phase tardive de la maladie, soit vers 3,5 mois. Un hémisphère, le cervelet et le tronc cérébral ont été récupérés individuellement et congelés directement dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C. Les échantillons ont ensuite été broyés dans de l'azote liquide de manière à obtenir une poudre homogène pour l'analyse des protéines. L'autre hémisphère a été fixé en paraformaldéhyde (PFA) 4% toute la nuit, puis rincé au PBS et déshydraté avant inclusion en paraffine.

2) Fibroblastes de patients

Des fibroblastes de patients Tay-Sachs (TS) et Sandhoff (SD) ont été mis en culture et amplifiés dans du milieu DMEM (Gibco) en présence de sérum de veau (10%) et d'antibiotiques. Ces lignées provenaient de patients atteints de formes sévères (infantiles) de TS ou SD. Pour les expériences, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits (150 000 par puits). Une fois arrivées à 70 % de confluence, les cellules ont d'abord été privées de sérum toute une nuit, puis le lendemain, le milieu a été remplacé par de l'EBSS (*Earle's balanced salt solution*, Gibco) pendant 2h en privant en plus les cellules d'acides aminés. Ensuite, quelques puits ont été stimulés avec des acides aminés (mélange d'acides aminés essentiels 200 μ l par puits d'une solution 10x + glycine 10 μ l d'une solution 100x) pendant 20 minutes, puis tous les puits ont été lavés avec du PBS (Gibco) deux fois et les plaques ont été congelées à -80 °C. De façon à procéder à l'extraction protéique, les plaques 6 puits ont été mises sur de la glace et 150 μ l de tampon de lyse a été ajouté dans chaque puits (20 mM Tris-HCl (pH 8), 5% glycérol, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1% NP40, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 30 μ l de *complete protease inhibitor cocktail* (1 tablette dans 1 ml) (Roche) et 30 μ l de *phosphatase inhibitor (PhosStop)* (1 tablette dans 1 ml). Ensuite, les cellules ont été grattées et récupérées dans un tube Eppendorf. Afin d'éliminer les débris cellulaires, les échantillons ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.

3) Génération des MEF (*mouse embryonic fibroblasts*)

Des croisements contrôlés entre souris Hexb+/- ont été mis en place. 13,5 jours après la date du croisement supposé (après vérification des plugs), les femelles gestantes ont été sacrifiées. Après dissection, les sacs embryonnaires ont été récupérés et mis dans du PBS. Sous une hotte de culture et avec des ustensiles stériles, les sacs embryonnaires ont été ouverts délicatement. Chaque embryon a été nettoyé et récupéré individuellement dans du PBS propre. Un morceau de la tête a été récupéré pour le génotypage. Rapidement, chaque embryon a été disséqué (organes rouges retirés), puis découpé à l'aide d'un scalpel. Tous les tissus ont ensuite été récupérés et homogénéisés dans 2 ml de trypsine/EDTA (Gibco). Chaque embryon a été mis dans un Falcon de 15 ml dans un incubateur à 37°C. Toutes les 5 minutes, les tubes ont été secoués par inversion. Au bout de 30 minutes, la digestion étant terminée, l'action de la trypsine a été arrêtée par l'ajout de 4 ml de milieu DMEM (10% sérum de veau + antibiotiques). Par la suite, les cellules ont été filtrées avec un *cell strainer* 70 µm (Sigma). De manière à récupérer le culot cellulaire, les cellules ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans du milieu, puis mises dans des boîtes de 10 cm de diamètre (1 par embryon). Au 3ème passage, une partie des cellules ont été utilisées pour l'analyse du niveau de protéines (ensemencement de 150 000 cellules par puits, dans des plaques 6 puits). De la même façon que pour les fibroblastes humains, les cellules ont été privées de nutriments, puis stimulées avec des acides aminés. Pour l'analyse du flux autophagique, de la rapamycine a été ajoutée dans certains puits en même temps que la stimulation (20 mM). Ensuite, le même protocole que pour les fibroblastes a été utilisé pour la préparation des échantillons analysés par immunoblot. Certaines cellules (3ème passage également) ont été utilisées pour les analyses d'immunofluorescence. Les cellules ont été déposées dans des plaques 24 puits sur des lamelles à raison de 75 000 cellules par puits. De la même façon que précédemment, les cellules ont été privées de nutriments et restimulées. Ensuite, elles ont été fixées avec de la PFA 4%, puis rincées avec du PBS. Elles ont ensuite été perméabilisées avec du triton 0,3%, puis bloquées avec du sérum de chèvre et de la BSA.

4) Immunoblots

Concernant les analyses protéiques par Western blot, les protéines ont été séparées sur un gel SDS-Page avant transfert sur une membrane PVDF. Après blocage avec du lait 3% dans du TBST, les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires à 4°C toute la nuit : anti-S6P ph235/236 (Ozyme 2211), anti-actine (A5441-2ml), anti-LAMP-1 (Ab 24170), anti-LC3 (Novus), anti-P62 (Abnova 8878-M01), anti-S6K P T389 (Ozyme 9234). Après 3 rinçages avec du TBST, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires anti-souris (CST 7076) et anti-lapin (CST 7074) couplés avec la HRP (*horseradish peroxidase*) pendant 1 h à température ambiante. Après trois rinçages, les membranes ont été incubées avec de l'ECL (Millipore) pendant un temps variable (selon l'anticorps). La révélation a été réalisée à l'aide d'un Chemidoc (Biorad).

5) Immunofluorescence

Pour les analyses d'immunofluorescence sur cellules MEF, les lamelles comportant les cellules fixées ont été incubées toute une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-LAMP-2 (ab13524) et anti-TFEB (Santa Cruz). Après rinçage avec du PBS, les lamelles ont été incubées avec les anticorps secondaires couplés Alexa Fluor (488 et 546). Ensuite, les lamelles ont été montées sur des lames utilisant un milieu couplé au DAPI (Vectashield). Les lames ont ensuite été analysées sur un microscope à illumination structurée ZEISS ApoTome2.

6) Analyse histologique par immunohistochimie

Pour les analyses d'immunohistochimie sur coupes de cerveau (4 µm), les lames ont d'abord été déparaffinées et hydratées avant le chauffage avec le tampon citrate (pH 6) pendant 10 min. Les sections ont ensuite été bloquées avec 3% de sérum de chèvre, 1% de BSA et 0,1% de triton X-100 pendant 1h, puis incubées avec l'anti LAMP-1 (ab24170) à 4°C pendant une nuit. Après rinçage avec du TBST, les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire biotinylé anti-lapin IgG (H+L) (Vector) pendant 30 min à température ambiante. Elles ont ensuite été rincées avec du TBST et incubées avec le complexe avidine-biotine-peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, Vector) pendant 45 minutes. Après rinçage, l'immunoréaction a été visualisée en incubant la section avec du DAB contenant du peroxyde. Les coupes ont ensuite été colorées à l'hématoxyline et déshydratées avec des bains d'éthanol

et de xylène, puis montées avec de la colle Eukitt. Un scan a été effectué grâce à un Nanozoomer 2.0.

C) RESULTATS

1) Voie mTOR et dérégulation

La voie mTOR et ses éventuelles dérégulations au niveau cellulaire ont été analysées sur des fibroblastes de patients et des cellules MEF issues de souris Sandhoff, mais aussi in vivo. Sur les fibroblastes de patients (figure 36), nous avons étudié un des substrats de cette voie, S6K (*ribosomal protein S6 kinase*) dans sa forme p70, par des expériences de privation de sérum et d'acides aminés. En absence de nutriments, S6K (principale kinase activée par mTOR) est inactive et un de ses substrats S6P n'est donc plus phosphorylé. L'analyse de la phosphorylation de S6P (sur les sérines 235 et 236) par western blot nous permet d'avoir une idée sur le statut de S6K (difficile à voir sur fibroblastes humains). Une quantification à partir des immunoblots a été réalisée en utilisant l'actine comme protéine de référence. Comme attendu, dans tous les cas, l'absence de nutriments induit une diminution de la phosphorylation de S6P par S6K et l'ajout de nutriments permet la réactivation de S6K. En revanche, chez les patients Tay-Sachs (Figure 36a) et les patients Sandhoff (Figure 36b) en condition de privation, l'activation de S6K ne semble pas complètement absente par comparaison avec les contrôles puisque S6P est toujours phosphorylé. Il semble que les cellules de patients répondent moins bien à l'absence de nutriments. La voie mTOR censée être complètement inhibée est toujours active et peut avoir des effets néfastes sur la cellule. En condition de stimulation, une suractivation par rapport aux contrôles est observée, même si cela est moins évident qu'en condition de privation. Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules MEF (Figure 36c). En condition de privation, S6P est davantage phosphorylée témoignant d'une plus grande activité de S6K dans les MEF^{-/-} que dans les MEF^{+/+} et MEF^{+/-}.

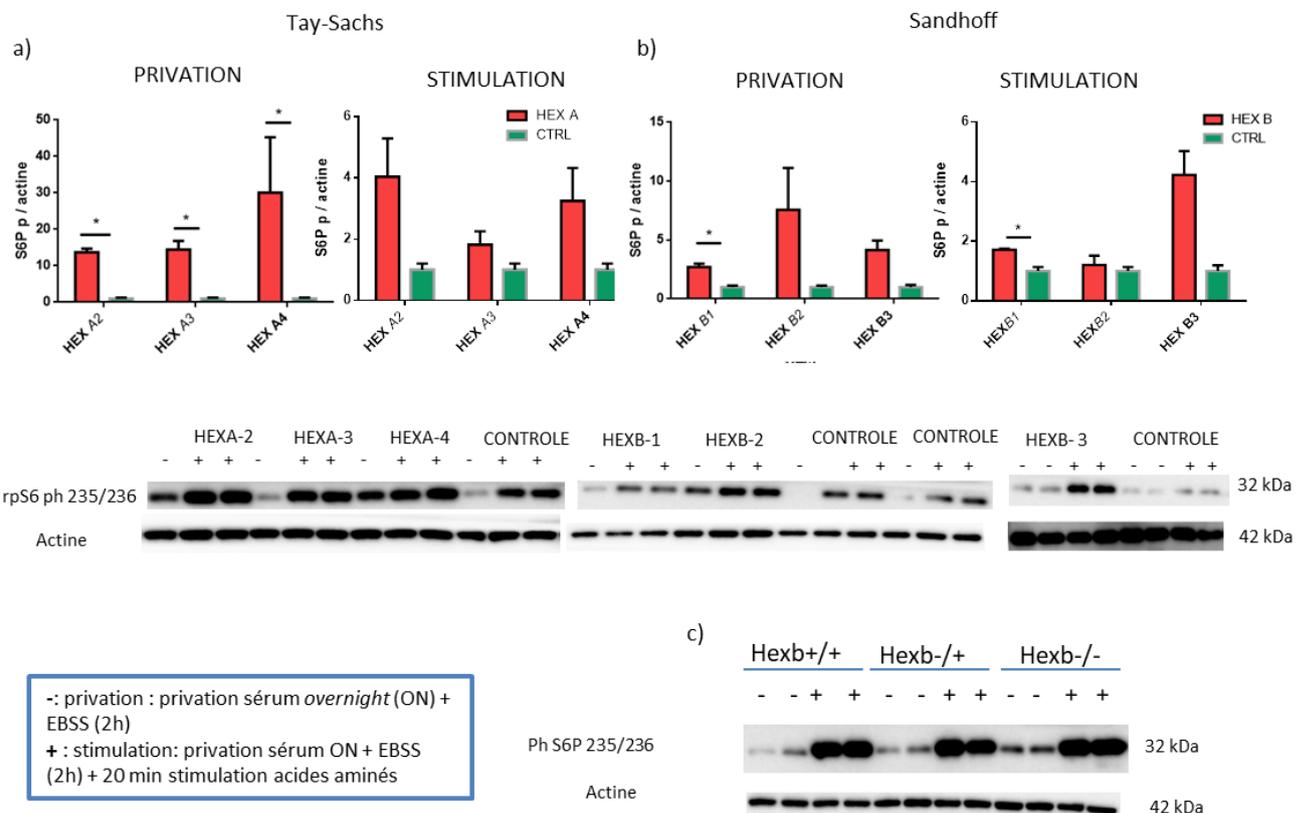


Figure 36: Etude in vitro de l'activation de S6P.

a,b) Western blot réalisés à partir d'extraits protéiques provenant de fibroblastes de patients Tay-Sachs (a) et Sandhoff (b) et utilisant des anticorps anti S6P ph 235/236 et anti-actine, dans des conditions sans nutriments ou sans nutriments + restimulation avec des acides aminés. Les histogrammes représentent les quantifications de la phosphorylation de S6P par rapport à l'actine, les résultats ont été normalisés par rapport aux contrôles. Ces quantifications sont associées à un immunoblot représentatif. c) Western blot réalisés à partir d'extraits protéiques provenant de cellules MEF Hexb+/+, Hexb-/- et Hexb-/+ et utilisant des anticorps anti S6P ph 235/236 et anti-actine dans des conditions sans nutriments ou sans nutriments + restimulation, au passage 3. Les barres d'erreurs représentent l'écart type moyen de 3 expériences similaires, *p<0,05 test de Student.

La voie a également été étudiée chez les souris Sandhoff, en conditions normales, à 3,5 mois, donc en phase tardive de la maladie (figure 37). De façon à étudier l'activité de la kinase S6K, nous avons étudié son site de phosphorylation sur la thréonine 389, connue pour corrélérer avec l'activité de la kinase. Ainsi nous observons une augmentation de la phosphorylation sur ce site chez les souris Sandhoff par comparaison avec les souris contrôles ce qui montre qu'il existe une suractivation de la kinase dans les hémisphères cérébraux. En revanche, la variabilité entre les souris est très importante pour le tronc cérébral et le cervelet. Il est donc difficile de conclure pour ce qui concerne ces deux parties du cerveau. Nous avons aussi étudié la phosphorylation de la protéine S6 sur les sérines 240 et 244 cibles directes de S6K, mais les résultats sont trop hétérogènes pour conclure. De façon à voir si cette suractivation a des effets délétères sur la progression de la maladie, nous avons traité les

souris à la rapamycine (inhibiteur de la voie mTOR) en commençant à 2 mois (phase présymptomatique), mais aucune amélioration clinique n'a été obtenue (résultats non montrés). Les mécanismes expliquant cette suractivation sont encore à déterminer, tout comme leur implication dans la progression de la maladie.

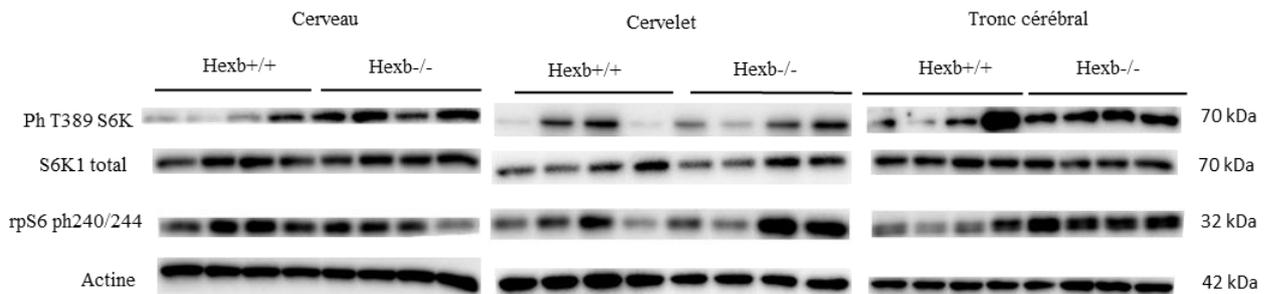


Figure 37 : Etude in vivo de la voie mTOR

Immunoblots réalisés sur des cerveaux de souris Hexb^{-/-} et Hexb^{+/+} à l'aide d'anticorps anti S6P ph 240/244, anti S6K total, anti ph T389 S6K et anti-actine. Les hémisphères cérébraux, le cervelet et le tronc cérébral ont été analysés séparément. n = 4 pour chaque groupe.

2) Dérégulation de l'autophagie

Nous nous sommes également intéressés au flux autophagique dans le modèle Sandhoff en étudiant les niveaux protéiques de LC3. LC3-II est la forme lipidique de LC3-I et elle est présente au niveau des autophagosomes. Plus le niveau de LC3-II est élevé, plus le nombre d'autophagosomes est grand. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de l'initiation de l'autophagie, ou par un blocage au niveau de la fusion entre lysosomes et autophagosomes provoquant ainsi une accumulation pathologique du nombre d'autophagosomes.

L'étude de l'autophagie sur fibroblastes nous a permis de dire que l'initiation de l'autophagie n'est pas inhibée dans le modèle Sandhoff. mTOR étant suractivé in vitro comme in vivo, il aurait pu être responsable d'un blocage de l'autophagie. Cependant, une expérience utilisant de la chloroquine (inhibiteur de la fusion lysosomes/autophagosomes) a montré une accumulation du nombre d'autophagosomes dans les fibroblastes. Si l'autophagie avait été bloquée en amont, nous n'aurions pas pu augmenter le nombre d'autophagosomes. Par contre, l'étude du flux sans drogue, en condition de stimulation et de déprivation n'a montré aucune différence significative entre les patients et les contrôles (résultats non

montrés). Dans les cellules MEF, la surcharge lysosomale a été confirmée (figure 38a) par l'augmentation de la protéine membranaire LAMP-2. Une expérience classique avec différentes conditions (privation, privation + stimulation avec ou sans rapamycine) a permis de montrer qu'en cas de privation (induisant l'autophagie), le niveau de LC3-II est supérieur dans la lignée Hexb^{-/-} par rapport à la lignée Hexb^{+/+} (figure 38b). Ceci confirme qu'il n'y a pas de défaut de l'initiation de l'autophagie potentiellement causé par la voie mTOR dans notre modèle. L'augmentation du nombre d'autophagosomes chez les Hexb^{-/-} par rapport aux Hexb^{+/+} confirme une dérégulation de l'autophagie. P62 est un autre marqueur de l'autophagie, il est incorporé à l'autophagosome juste avant la fusion avec le lysosome. Si la fusion n'a pas lieu, il a tendance à s'accumuler. P62 est en quantité plus importante dans les cellules MEF Hexb^{-/-} par rapport au MEF Hexb^{+/+}, ce qui suggère un défaut de fusion entre lysosome et autophagosome.

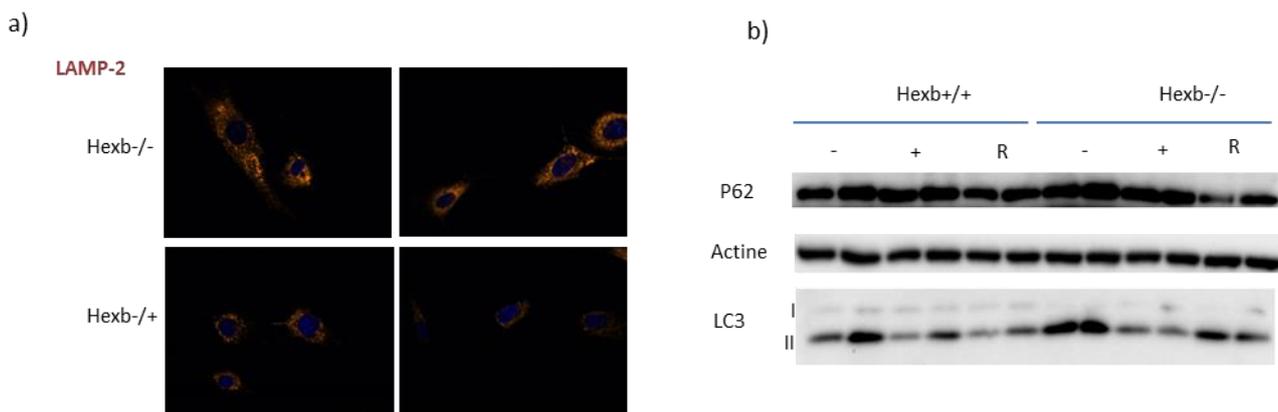


Figure 38: Etude du flux autophagique dans des cellules MEF.

a) Immunofluorescence sur cellules MEF Hexb^{-/-} et Hexb^{+/+} en condition normale, utilisant un anticorps anti-LAMP-2. b) Immunoblots utilisant des anticorps anti-P62, anti-actine et anti-LC3 suite à une expérience sur cellules MEF en absence de nutriments (-), avec restimulation après une déprivation (+) ou avec un traitement à la rapamycine (R).

Les mêmes analyses ont été effectuées chez les souris (figure 39). Tout d'abord, l'accumulation du nombre de lysosomes (habituel dans une maladie de surcharge) est confirmé au niveau du thalamus et du cortex des souris Hexb^{-/-} grâce au marquage de LAMP-1 (figure 39a). Concernant le flux autophagique, l'augmentation de LC3-II dans le cerveau indique une augmentation du nombre d'autophagosomes, comme dans les MEF. En revanche, aucune accumulation de p62 n'est observée. Ainsi, nous ne pouvons pas conclure sur les

raisons de cette augmentation d'autophagosomes (soit augmentation de l'induction de l'autophagie, soit blocage en aval empêchant la dégradation des autophagosomes). Dans tous les cas, ces résultats nous indiquent une dérégulation du nombre d'autophagosomes (figure 39b).

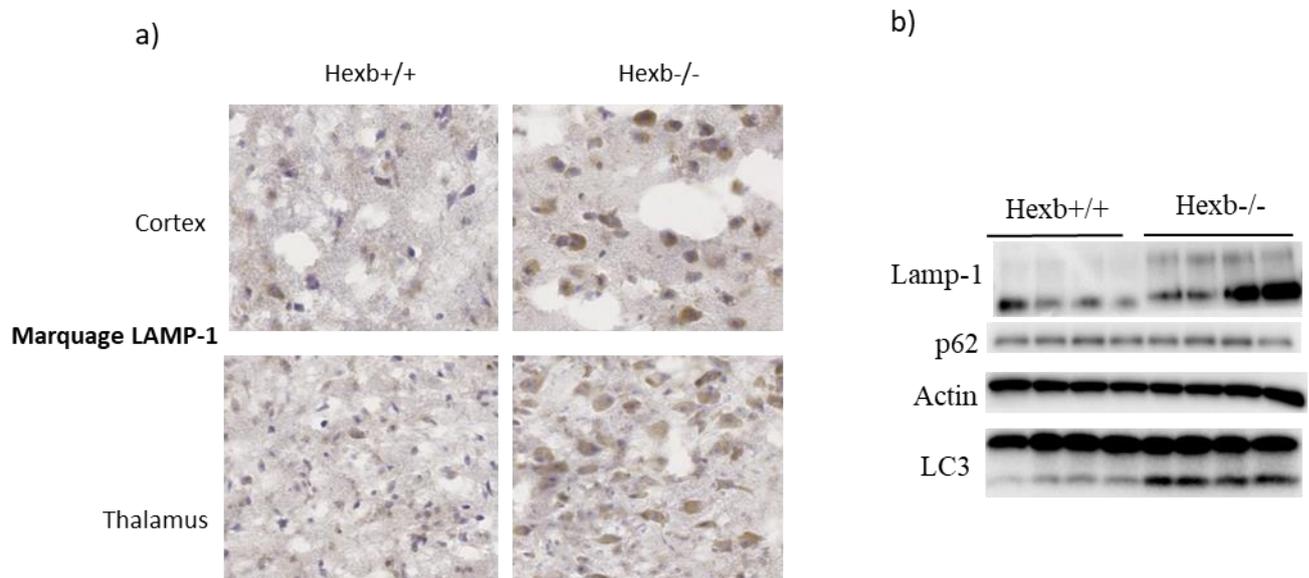


Figure 39 : Etude du flux autophagique chez les souris Sandhoff

a) Immunohistochimie sur coupes de cerveau avec un anticorps anti-LAMP-1, coloration des noyaux à l'hématoxyline. b) Immunoblots à partir de cerveaux de souris Hexb-/- et Hexb+/+ utilisant des anticorps anti LAMP-1, anti p62, anti LC3 et anti-actine. Les hémisphères cérébraux ont été analysés séparément. n = 4 pour chaque groupe.

3) Etat de TFEB dans les gangliosidoses à GM2

Il est connu que TFEB a un rôle important dans la biogénèse du lysosome et dans l'induction de l'autophagie. Nous avons donc voulu savoir s'il existait une possible dérégulation de TFEB dans les gangliosidoses à GM2. Comme il s'agit d'un facteur de transcription, nous avons étudié l'expression de ses gènes cibles par PCR quantitative sur des fibroblastes de patients, des cellules MEF et des tissus de souris Sandhoff. Aucune différence significative entre les sujets Sandhoff et les contrôles n'ont pu être trouvée (résultats non montrés). Par immunofluorescence sur fibroblastes de patients et cellules MEF Hexb-/-, nous avons pu étudier la distribution cellulaire de TFEB (figure 40). Sur les fibroblastes, les résultats étaient trop hétérogènes entre les patients pour conclure (résultats non montrés). En revanche, sur cellules MEF, en absence de nutriments, TFEB est moins présent dans le noyau chez les MEF Hexb-/- par comparaison avec les MEF Hexb+/+ suggérant une activité moins

importante chez les sujets Sandhoff. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ces résultats et pour voir si la dérégulation de l'action de TFEB pourrait avoir une incidence sur la maladie.

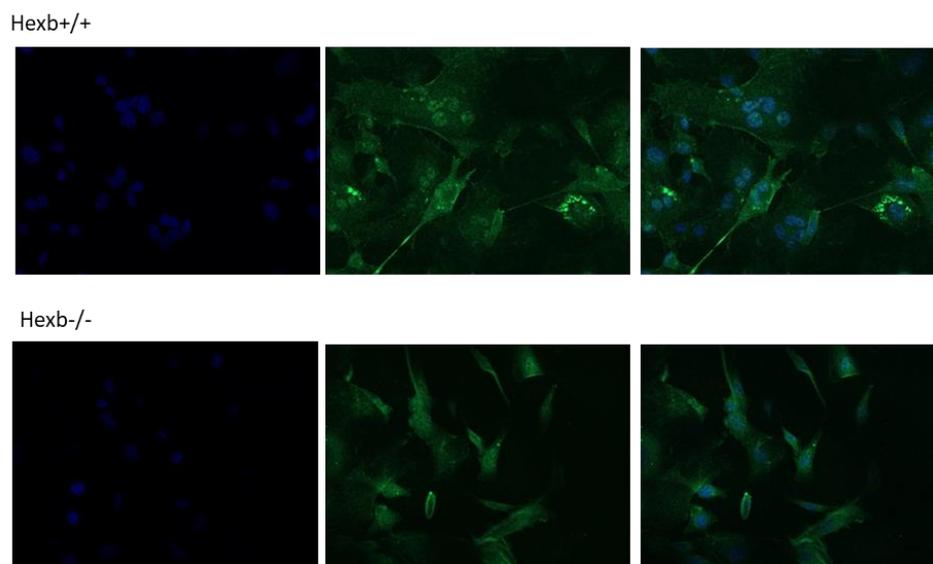


Figure 40: Localisation cellulaire de TFEB dans les cellules MEF de souris Hexb-/-.

Marquage de TFEB par immunofluorescence (anticorps anti-TFEB) sur cellules MEF Hexb-/- et Hexb+/+ en condition de privation de nutriments (EBSS 2h),

D) DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'altération de l'homéostasie cellulaire dans les maladies lysosomales a été très étudiée. Il a notamment été montré une dérégulation de plusieurs voies de signalisation, dont la voie mTOR. Compte tenu de l'implication du lysosome dans l'activation de mTOR, nous avons décidé d'étudier le fonctionnement de cette voie dans les gangliosidoses à GM2. Les expériences in vitro sur fibroblastes de patients et sur cellules MEF Hexb-/- ont montré qu'en absence de nutriments, la voie mTOR est anormalement activée, suggérant un défaut d'adaptation cellulaire en fonction de l'apport en nutriments. Des résultats similaires ont récemment été montrés dans la maladie de Pompe (Lim et al., 2017). Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette activation anormale en absence de nutriments était due à une rétention

anormale de mTOR au niveau de la membrane lysosomale, elle-même due à l'hyperactivation de la V-ATPase et à sa proximité anormale avec Rheb. En revanche, en condition normale, il a été montré une diminution de l'activité de mTOR dans les cellules du modèle murin *knock-out* Pompe et aussi au niveau des muscles de ces animaux, qui pourrait être due à une trop grande inhibition de la voie par TSC (*tuberous sclerosis complex*). Il a même été montré qu'une modulation positive de la voie mTOR permettait une amélioration du phénotype musculaire chez les souris. Nos résultats sur le modèle murin ne vont pas dans ce sens, puisqu'il semble que nous ayons une suractivation au niveau du cerveau. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ces résultats. De plus, l'utilisation de la rapamycine ne nous a pas permis d'obtenir une amélioration clinique, ce qui suggère que la voie mTOR et sa dérégulation ne serait pas impliquée directement dans la progression de la maladie.

Un autre point que nous avons étudié est le processus autophagique. Il est important pour les cellules, car en condition de privation de nutriments, il a un rôle protecteur. Si ce processus est altéré, il peut y avoir des conséquences néfastes pour la cellule, conduisant notamment à une neurodégénérescence (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). L'hypertrophie lysosomale observée dans les gangliosidoses à GM2 peut avoir des effets sur le processus autophagique. De plus, l'altération observée au niveau de la voie mTOR peut également avoir des effets délétères sur l'autophagie. Ainsi, nous avons étudié le flux dans les gangliosidoses à GM2 et nous avons pu déterminer que l'initiation de l'autophagie n'était pas perturbée *in vitro* comme *in vivo*. En revanche, l'augmentation du nombre d'autophagosomes suggère une augmentation de l'autophagie dans les gangliosidoses à GM2, associée ou non à un problème de fusion entre lysosomes et autophagosomes empêchant ainsi la dernière étape du processus autophagique. Il est probable que cette altération soit due directement à l'accumulation primaire du GM2. Un tel phénomène a été montré dans plusieurs maladies lysosomales comme nous l'avons évoqué précédemment. Très récemment, une équipe travaillant sur le modèle de souris Sandhoff a confirmé notre observation sur l'augmentation du nombre d'autophagosomes. Il a également été montré une accumulation d' α -synucléine, un substrat bien connu de l'autophagie, probablement du fait d'un blocage de la fusion lysosome/autophagosome (Keilani et al., 2012; Suzuki et al., 2016). Les processus de blocage restent encore inconnus, mais il est probable que ce soit la surcharge du lysosome qui soit responsable de ce retard de fusion.

Nous avons aussi étudié TFEB et sa potentielle implication dans la maladie. Nos résultats sont préliminaires, mais il semble que l'activité de TFEB soit diminuée dans notre modèle de cellules MEF Sandhoff, ce qui est conforme aux observations qui ont été faites dans des cellules souches neuronales de la maladie de Gaucher (Awad et al., 2015). Les mécanismes induisant cette régulation négative restent encore à déterminer. En ce qui concerne les possibles conséquences, la diminution de l'activité de TFEB pourrait être responsable d'une baisse de l'activité lysosomale, ainsi que de la clairance cellulaire, ce qui favoriserait l'hypertrophie lysosomale. En effet, il a été montré à l'inverse que sa surexpression permet une augmentation de la clairance cellulaire dans des cellules murines (*knock-out*) de déficit multiple en sulfatases (MSD), de mucopolysaccharidose de type IIIA (MPSIIIA) et de maladie de Pompe (Medina et al., 2011). La surexpression de TFEB dans le modèle murin MSD a montré son efficacité, permettant une diminution non seulement des GAG (glycosaminoglycanes), mais aussi de l'inflammation et de l'apoptose. Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle murin de maladie de Pompe (Spampanato et al., 2013a). L'efficacité de cette approche s'explique par le fait que TFEB régule positivement la fusion du lysosome avec la membrane plasmique de façon à promouvoir l'exocytose lysosomale. Ceci se fait grâce à une activation transcriptionnelle (via TFEB) de TRPML1, un canal permettant la libération de Ca^{2+} et favorisant la fusion du lysosome avec la membrane plasmique (Medina et al., 2011; Palmieri et al., 2011). Ainsi, une surexpression de TFEB permet une exocytose lysosomale plus importante, ce qui augmente la clairance cellulaire. Il pourrait donc être pertinent de tester une telle approche dans notre modèle de souris Sandhoff, afin de promouvoir la clairance cellulaire et d'induire une possible diminution de l'accumulation du GM2.

En conclusion, ces différentes altérations observées au niveau des fibroblastes de patients et de souris Sandhoff, ainsi qu'*in vivo* nous ont permis de découvrir de nouveaux aspects concernant la physiopathologie de la maladie, pouvant ouvrir la voie dans le futur à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

DISCUSSION GENERALE ET **PERSPECTIVES**

L'objectif principal de ma thèse était de développer une méthode de transfert de gènes efficace dans le modèle murin de la maladie de Sandhoff. Dans un premier temps, j'ai participé à l'analyse à long terme des souris *Hexb*^{-/-} traitées par voie IV en période néonatale avec un vecteur scAAV9 codant le gène *Hexb* sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire (PGK). Les résultats obtenus ont permis de montrer que le vecteur était efficace à long terme (survie jusqu'à 2 ans) et ceci a été confirmé par les analyses tissulaires réalisées à 24 mois (dosages enzymatiques, étude de la surcharge lysosomale). Nos résultats ont cependant mis en évidence qu'il existait une petite quantité de GM2 au niveau du cervelet à 2 et 4 mois, n'ayant aucun impact négatif chez la souris sur la période étudiée, mais pouvant peut-être poser question à plus long terme.

Nous avons donc décidé de tester une stratégie combinant deux voies d'injection de façon à cibler plus efficacement le cervelet par rapport à la voie IV classique. L'administration du vecteur scAAV9 par voie IV + ICV nous a permis d'obtenir une expression plus globale du vecteur au niveau du SNC. En plus des très bons résultats obtenus au niveau des hémisphères cérébraux, cette approche a permis d'améliorer la prévention de l'accumulation lipidique au niveau du cervelet par rapport à une injection IV classique, ceci sans augmenter la dose globale. Par contre, pour optimiser le traitement du foie avec cette approche combinée, une légère augmentation de la dose globale s'est révélée nécessaire. La figure 41 présente l'ensemble des résultats obtenus après injection IV seule et après injection combinée IV + ICV avec les différentes doses utilisées dans chaque compartiment. Nos travaux ont permis de déterminer la dose minimale à utiliser en ICV pour bien traiter le SNC et la dose nécessaire en IV pour traiter le plus efficacement possible le foie. Nous but est maintenant d'évaluer cette approche combinée pour le traitement des souris adultes à différents moments de l'évolution de leur maladie.

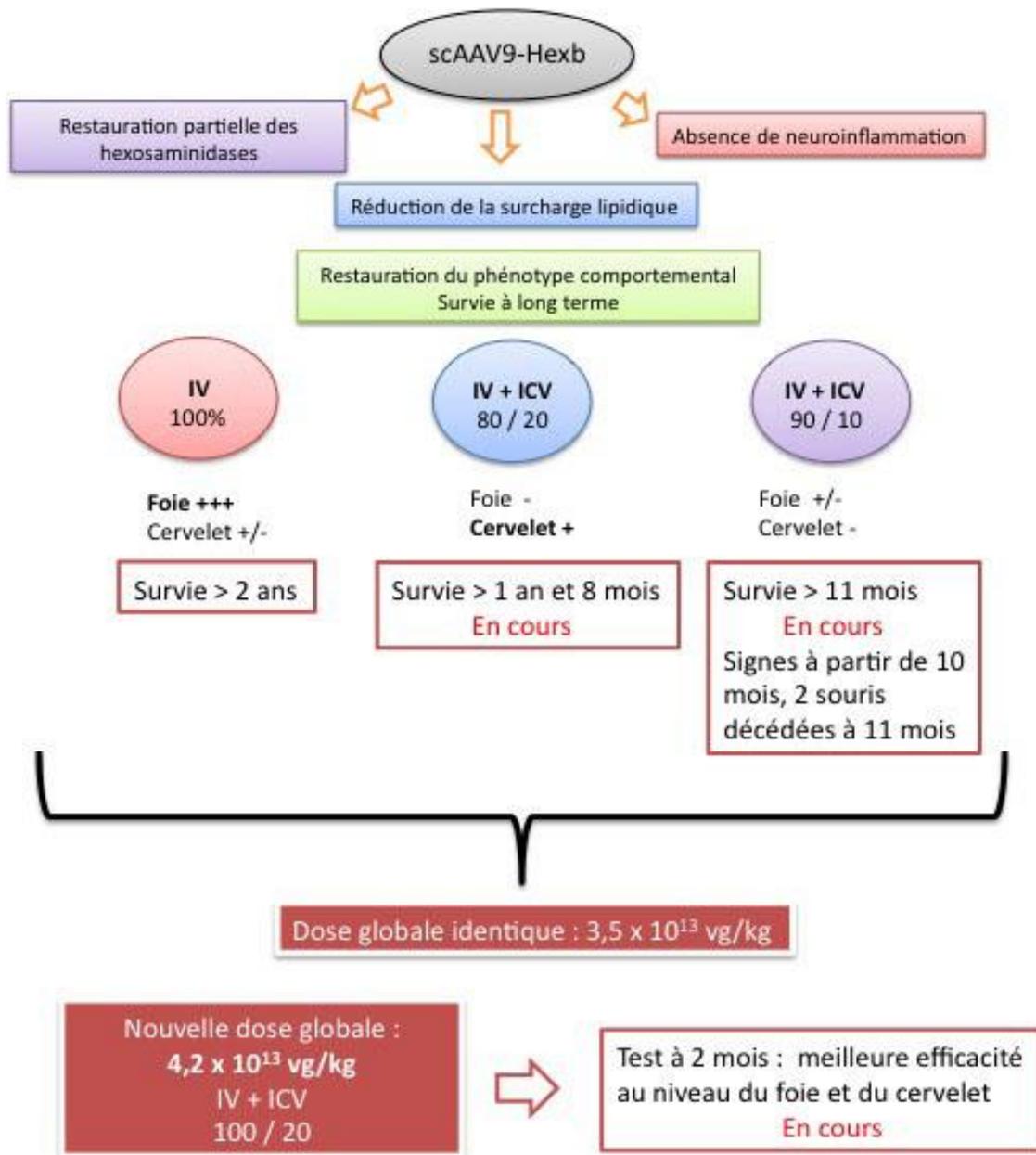


Figure 41 : Schéma récapitulant les résultats des différentes voies d'administration du vecteur scAAV9-Hexb testées chez les souris Hexb^{-/-} avec les doses et les résultats correspondants.

Les chiffres (100, 80, 20, 10) correspondent aux pourcentages par rapport à la dose initialement utilisée de 3,5 x 10¹³ vg/kg (considérée comme 100%).

A) CHOIX DE LA METHODE D'ADMINISTRATION ET DU PROMOTEUR

1) Voies d'administration

Au cours de notre projet, nous avons montré l'importance de la voie d'administration du vecteur thérapeutique. Ainsi, il est facile de cibler les organes périphériques et surtout le foie avec des injections IV, mais on cible mieux le cervelet avec des injections ICV. Ces deux voies d'administration présentent l'intérêt qu'elles sont peu invasives (surtout la voie IV) et qu'elles assurent une distribution plus générale du virus que la voie intracérébrale directe dans le parenchyme. En effet, la voie IV permet une approche systémique, tous les organes étant possiblement en contact avec le vecteur. Cependant, suivant le tropisme de celui-ci, les tissus et organes vont être plus ou moins bien ciblés. Dans le cas de l'AAV9, le foie et le cœur sont les organes les mieux transduits par le vecteur. Concernant la voie ICV, elle permet au vecteur de diffuser dans le SNC de manière homogène, offrant ainsi une meilleure délivrance du vecteur au cervelet et au tronc cérébral. Il est à noter qu'après une administration ICV seule, le vecteur peut être retrouvé dans le SNC, mais aussi dans le sérum. Ainsi, des injections dans le LCR ont suffi pour traiter l'atteinte périphérique dans le modèle murin de la MPSIIIA (Haurigot et al., 2013). Cependant, il a été montré que pour une même dose, la voie IV reste plus efficace pour traiter les organes périphériques et notamment le foie (Armbruster et al., 2016). C'est pourquoi nous avons décidé de tester une stratégie combinant les deux voies d'administration. L'intérêt de cette approche était de corriger au mieux le cervelet tout en continuant à traiter les organes périphériques sans augmenter drastiquement la dose globale afin d'éviter d'éventuels effets secondaires.

L'équipe de Tim Cox ayant travaillé sur une administration intracérébrale directe a montré que, dans le cas d'injections conjointes au niveau du striatum et du cervelet, la moitié des animaux survivent jusqu'à deux ans (Cachón-González et al., 2006, 2012, 2014; Sargeant et al., 2011). Cependant, l'approche utilisée est relativement invasive, du fait de la stéréotaxie et les souris ont de plus été traitées par du mannitol afin de permettre au vecteur de diffuser plus largement dans le parenchyme. De plus, les organes périphériques ne sont pas du tout traités par cette voie d'administration, ce qui provoque une accumulation de GM2 et GA2 au niveau du foie, et possiblement au niveau d'autres tissus, même s'ils ne sont pas les plus touchés par la maladie. Notre approche par voie IV+ICV permet d'avoir une bonne efficacité

systémique sans caractère invasif, ce qui pourrait la rendre plus facilement utilisable à l'échelle humaine.

Par ailleurs, il a été montré récemment chez le singe que l'injection par voie intracérébrale directe peut induire une importante neurotoxicité. En effet, Golebiowski *et al.* ont réalisé une injection d'AAVrh8 codant les chaînes α et β des hexosaminidases directement par voie intracrânienne chez des singes normaux. Ils ont montré que cette approche était responsable du développement de symptômes neurologiques 2-3 semaines après l'injection chez les animaux traités avec la dose la plus élevée. Chez les animaux ayant reçu une dose plus faible, les symptômes sont apparus plus tardivement. Une importante perte cellulaire a été observée près des sites d'injection. Une réaction inflammatoire causée par l'AAV ne peut expliquer ce phénomène, car en général, elle ne provoque pas une perte cellulaire aussi importante. De plus, les singes ayant reçu des injections avec un AAV vide n'ont présenté aucun signe. Ces résultats pourraient s'expliquer par la forte expression de l'hexosaminidase A par rapport à la normale (plus de 100 fois supérieure pour les singes ayant reçu la plus forte dose). Les animaux ayant eu une dose 30 fois moins importante n'ont pas développé de neurotoxicité. Il y aurait donc un seuil à ne pas dépasser pour l'expression de l'hexosaminidase (Golebiowski *et al.*, 2017). Le fait que le vecteur diffuse mal dans le parenchyme après des injections intracérébrales pourrait favoriser ce phénomène. En effet, les cellules les plus proches du lieu d'injection sont les plus touchées, ce qui pourrait s'expliquer par le fait qu'elles ont le niveau de transduction le plus élevé. Si le vecteur diffusait mieux, la transduction des cellules serait plus homogène et le seuil critique d'activité d'hexosaminidase ne serait pas franchi.

Dans le cas de notre approche combinée, le vecteur a la possibilité de mieux diffuser et donc de transduire un nombre plus important de cellules. En effet, les deux types d'injections (IV + ICV) permettent d'avoir une distribution homogène du vecteur. Par ailleurs, les niveaux d'hexosaminidases obtenus ne dépassent pas les valeurs habituelles. Ceci est justement dû à la grande diffusion du vecteur qui se retrouve dilué dans l'organisme tout entier après ces injections. De plus, dans le cas des maladies lysosomales, nous n'avons pas besoin d'avoir une restauration de l'activité identique à celle des individus normaux, une restauration partielle pouvant suffire. Cette stratégie pourrait donc être bien adaptée pour traiter de manière optimale les maladies lysosomales.

2) Dose utilisée

La dose utilisée est un deuxième point important que nous avons exploré, et comme nous venons de le voir, elle est liée à la voie d'administration. Pour obtenir un même niveau d'activité enzymatique, une dose de vecteur plus importante est nécessaire par voie IV par rapport à la voie intracérébrale directe. De plus, de petites différences de doses peuvent engendrer de grandes différences d'efficacité pour certains tissus. Dans notre cas, pour cibler le cervelet, nous avons obtenu des différences très importantes entre deux doses utilisées en ICV : $0,7 \times 10^{13}$ vg/kg (soit 20% de la dose finale) versus $0,35 \times 10^{13}$ vg/kg (soit 10% de la dose finale). En effet, pour la plus faible dose, aucune activité enzymatique n'a été détectée au niveau du cervelet chez les animaux traités, alors qu'avec la dose plus élevée, une augmentation significative a été mise en évidence. En ce qui concerne l'accumulation du GM2, ceci aboutit à de très grandes différences également, notamment à 4 mois où l'accumulation du GM2 est très importante dans le cervelet alors qu'elle est absente au même âge dans le groupe traité avec 20% de la dose finale en ICV. Par ailleurs, au niveau du comportement, 4 souris traitées sur 5 ont commencé à avoir des signes de la maladie vers 10 mois pour le groupe traités avec 10% de la dose en ICV, alors que les souris de l'autre groupe n'ont développé aucun signe de la maladie à cet âge. Il semble donc que l'effet du scAAV9 soit fortement dose-dépendant. Dans notre approche, si l'on veut cibler plusieurs organes, il peut s'avérer délicat de trouver la bonne dose sans trop augmenter la dose globale.

En effet, l'augmentation de la dose globale peut avoir des effets néfastes comme par exemple l'apparition de tumeurs. Ainsi, après administration IV d'une dose élevée ($2,5 \times 10^{14}$ vg/kg) d'AAV9 codant la chaîne β des hexosaminidases en période néonatale, des hépatocarcinomes ont été retrouvés chez 80 % des souris à 43 semaines (Walia et al., 2015). Ceci est probablement dû à la dose très importante de virus utilisée par cette équipe. Ce phénomène a déjà été observé après un traitement AAV dans un modèle murin de MPSVI (Donsante et al., 2001). Il a été montré que cela était probablement dû à un mécanisme de mutagenèse insertionnelle causé par l'intégration de l'AAV au niveau du chromosome 12 près des gènes *Rian* et *Mirg* (Donsante et al., 2007).

3) Choix du promoteur

Outre le choix du sérotype donnant une spécificité cellulaire et tissulaire au vecteur, le choix du promoteur régulant l'expression du transgène a aussi son importance. Tout d'abord, il doit être choisi en fonction du type cellulaire à cibler. Certains promoteurs sont actifs seulement dans des types cellulaires précis, ils sont dits tissu-spécifiques, tandis que d'autres, comme le PGK (phosphoglycérate kinase) que nous avons utilisé, sont des promoteurs ubiquitaires. Dans le cas d'une approche systémique, un promoteur ubiquitaire est souvent utilisé. Le choix du promoteur est donc primordial pour l'expression du transgène, mais il est également important pour la stabilité à long terme de cette expression. Ainsi, Walia et al. ont utilisé un promoteur CMV pour leur AAV9-Hexb. Il s'agit d'un promoteur ubiquitaire et très puissant, mais il est connu pour induire une forte réponse immunitaire pouvant jouer négativement sur l'expression à long terme du vecteur (Brunetti-Pierrri and Ng, 2017; Dronadula et al., 2016; Zabner et al., 1996). Ceci pourrait expliquer pourquoi Walia *et al.*, n'ont pas obtenu une réduction complète du GM2 chez les souris traitées, ni aboli complètement les signes neurologiques (tremblement) à 43 semaines malgré la très forte dose administrée (Walia et al., 2015). Dans notre approche basée sur un scAAV9-Hexb sous promoteur PGK, aucune observation de ce type n'a été faite. En effet, une dose 10 fois moins importante de vecteur a permis d'aboutir à une absence de GM2 et de la neuroinflammation chez les souris traitées en IV+ICV, mais aussi en IV simple. Le promoteur PGK est aussi un promoteur ubiquitaire assurant une puissante transduction, mais il est connu pour permettre une expression plus pérenne du vecteur à long terme par comparaison avec le promoteur CMV (Régulier et al., 1998; Zabner et al., 1996).

B) MISE AU POINT DU TRANSFERT DE GENES CHEZ LES SOURIS SANDHOFF A L'AGE ADULTE

Un point majeur à considérer pour une éventuelle thérapie génique chez l'homme est que les patients sont généralement diagnostiqués après l'apparition des premiers signes cliniques, c'est-à-dire dans le cas de la maladie de Sandhoff, quand une accumulation du GM2 est déjà présente. Notre projet a permis de déterminer les voies d'administration et les

doses nécessaires pour un traitement optimal, mais en période néonatale, une période où le GM2 n'est presque pas accumulé dans le SNC et les autres organes périphériques. Pour mettre au point un traitement efficace, il nous faut maintenant évaluer notre stratégie chez des souris adultes, lors de la survenue des premiers symptômes.

La prochaine étape que nous allons explorer vise donc à tester notre approche chez les souris Sandhoff à l'âge adulte. L'intérêt de notre administration combinée IV + ICV est qu'elle permet une meilleure diffusion du vecteur dans le SNC, donc un traitement global du cerveau. D'autre part, elle a l'avantage de traiter aussi les organes périphériques, comme le foie et le cœur. De plus, nous avons trouvé les doses optimales pour traiter efficacement à la fois les compartiments central et périphérique. Par une approche IV seule avec un AAV9-Hexb chez l'adulte (6 semaines), *Walia et al.* ont seulement obtenu un allongement de la survie de 3 semaines, ceci sans aucune amélioration de la motricité chez les souris traitées (*Walia et al.*, 2015). Par comparaison, dans notre approche, le vecteur diffuse mieux dans les différentes parties du cerveau incluant le cervelet, laissant espérer de meilleurs résultats. De plus, l'utilisation d'un vecteur double brin (scAAV9) devrait permettre une expression plus rapide du transgène, assurant une meilleure efficacité chez les souris traitées à l'âge adulte.

Dans ce nouveau projet, différents âges seront testés pour la double administration : 1, 1,5 et 2 et 3 mois. Pour chaque groupe d'âge, différents types d'analyse seront réalisés, comme nous l'avons fait précédemment : analyses biochimiques (dosages enzymatiques, étude de l'accumulation du GM2 par HPTLC, western blot et qPCR), analyse neuropathologique, survie et évaluation régulière du comportement à long terme. Les meilleurs résultats seront probablement obtenus avec les injections faites à un mois comme l'équipe de *Cachón-González et al.* l'a montré. En effet, ils ont étudié en détail l'efficacité d'une injection intracrânienne d'AAV chez des souris Sandhoff à des âges différents. La voie d'administration permet de très bien cibler toutes les parties du cerveau touchées par la maladie. Les meilleurs résultats ont été obtenus par des injections faites à l'âge d'un mois (50% de survie à 2 ans). En revanche, lorsqu'elles ont lieu à 12 semaines, aucune amélioration n'est obtenue par rapport aux souris Sandhoff non traitées. Pour les injections en début de phase symptomatique vers 8-10 semaines, les médianes de survie sont de 233 et 292 jours respectivement, ce qui permet de doubler la durée de vie des souris (*Cachón-González et al.*, 2014) (figure 42). Si nous comparons leurs résultats à 8 semaines avec ceux de *Walia et al.* à 6 semaines, nous observons de meilleurs résultats à 8 semaines, qui est une étape de la maladie où l'accumulation du GM2 est pourtant plus importante. Ceci indique que leur

approche ciblant directement le cerveau est plus efficace. Nous devrions donc pouvoir obtenir de meilleurs résultats que l'équipe de Walia *et al.* avec notre approche IV + ICV, qui aurait de plus l'avantage par rapport au travail de Cachón-González *et al.* de traiter également les organes périphériques.

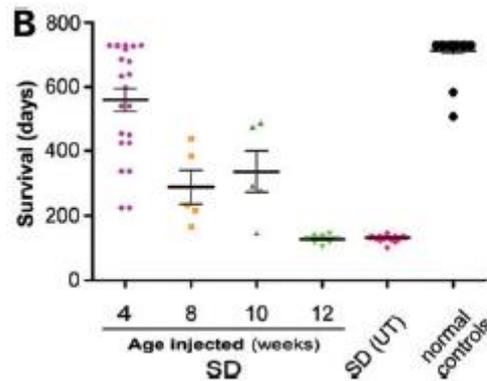


Figure 42: Survie des souris Sandhoff traitées par voie intracrânienne (Cachón-González *et al.*, 2014)

Cependant, comme nous l'avons vu, les résultats de Cachón-González *et al.* montrent qu'une meilleure efficacité est obtenue quand les injections sont effectuées à 1 mois, c'est-à-dire lorsque l'accumulation du GM2 est encore modeste. Au delà (2 et 3 mois), les résultats risquent d'être plus incertains. Il est envisageable que dans ces conditions, les souris n'atteignent pas une durée de vie normale, comme cela a été le cas pour Cachón-González *et al.* En effet, la mise en place d'une thérapie génique nécessite un peu de temps et pendant cette période de latence, la maladie continue à évoluer.

Pour pallier ce problème plusieurs méthodes peuvent être envisagées, comme par exemple une amélioration de l'efficacité de l'AAV9 à l'âge adulte. En effet, celui-ci est connu pour passer la BHE et transduire le cerveau en période adulte (en ciblant principalement les astrocytes), mais ceci avec moins d'efficacité qu'en période néonatale (Foust *et al.*, 2009). De façon à pouvoir améliorer l'efficacité du vecteur, une équipe a récemment élaboré une variante d'AAV9 permettant une meilleure transduction du SNC après administration par voie intraveineuse chez la souris adulte. Ce variant a été trouvé grâce à une approche de screening utilisant le système CREATE (*Cre-recombination-based AAV targeted evolution*). Ils ont ainsi pu déterminer comment les acides aminés de la capsid devaient être modifiés pour

permettent une transduction importante chez la souris adulte. Ainsi, ils ont obtenu un variant présentant une modification de quelques acides aminés au niveau de la capsidie et permettant une amélioration de la transduction d'environ 40 fois chez la souris adulte (Deverman et al., 2016). L'utilisation d'un variant AAV9 de ce type pourrait être envisagé afin d'optimiser les injections chez les souris adultes. Un autre moyen pourrait être d'essayer de retarder la maladie afin de laisser au vecteur le temps d'être pleinement efficace. Différentes approches peuvent être considérées.

C) UTILISATION DE TRAITEMENTS COMPLEMENTAIRES

1) Thérapies déjà expérimentées dans la maladie de Sandhoff

De façon à retarder la maladie avant et pendant la mise en place d'une thérapie génique dans des modèles animaux, puis possiblement chez l'humain, plusieurs solutions peuvent être envisagées. Certains traitements ont déjà témoigné de leur efficacité chez la souris. Comme nous l'avons vu précédemment, la transplantation de moelle osseuse permet d'allonger significativement la survie des animaux Sandhoff, mais elle est longue à mettre en place et n'aurait pas donc pas d'intérêt en cas de double traitement avec la thérapie génique. Les inhibiteurs de substrats de type Miglustat permettent une amélioration du phénotype chez la souris (Arthur et al., 2012; Jeyakumar et al., 2001). L'avantage de cette approche est qu'elle est non invasive, car elle se fait par administration orale. Cependant, chez l'homme, ce traitement a montré une efficacité seulement dans des formes moins sévères de la maladie possédant une activité enzymatique résiduelle. Chez la souris Sandhoff, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID) ont permis une amélioration clinique lorsque le traitement a été administré en phase symptomatique (Jeyakumar et al., 2004). Ces NSAID pourraient donc être utilisables conjointement avec la thérapie génique. Leur administration pourrait peut-être permettre de freiner la maladie, afin de laisser le temps au gène de l'hexosaminidase apporté par thérapie génique de s'exprimer et de produire de façon stable une protéine fonctionnelle.

2) Autres traitements pouvant être envisagés

La cyclodextrine pourrait être un traitement moléculaire possible. Ce composé est connu pour sa faculté à promouvoir l'export du cholestérol et des gangliosides en dehors du lysosome. Ce composé a déjà montré son efficacité sur des souris Niemann-Pick C (Ahmad et al., 2005; Griffin et al., 2004). Un traitement chronique par voie sous-cutanée chez des souris jeunes (1 semaine) a permis une amélioration de la durée de vie de ces souris, associée à une diminution du cholestérol et des gangliosides au niveau neuronal. En revanche, la molécule ne peut passer la BHE mature, puisque des équipes ayant traité des souris plus âgées ont montré que les effets positifs de la molécule au niveau du SNC diminuent en fonction de l'âge des souris (Davidson et al., 2009; Liu et al., 2010), alors que les effets sur le foie sont toujours présents. Par contre, des injections par voie ICV de la molécule chez la souris adulte ont permis de très bons résultats au niveau neuronal (Aqul et al., 2011). Ceci aboutit à un retard des cascades pathogènes, permettant de retarder légèrement l'évolution de la maladie. Un traitement par voie ICV pourrait être testé en parallèle d'une thérapie génique chez les souris Sandhoff. Le seul point négatif est que des injections ICV répétées seraient nécessaires pour l'administration de ce composé.

La minocycline est un antibiotique connu comme étant un agent neuroprotecteur, probablement par un effet anti-inflammatoire. Il a été montré que la minocycline pouvait diminuer l'activation microgliale et l'astroglie (Drabek et al., 2014; Fagan et al., 2004; Hewlett and Corbett, 2006; Jin et al., 2013; Stirling, 2004). L'efficacité de la minocycline a ainsi été observée dans des modèles murins où la neuroinflammation est importante (altération de la moelle épinière, ischémie). La minocycline permet une baisse de l'expression des marqueurs liés à la neuroinflammation tel que TNF α , IL-6 et IL1 β . De bons résultats ont été obtenus avec des injections intraveineuses et intrapéritonéales quotidiennes. Ce traitement n'a jamais été testé dans des maladies lysosomales à atteinte neurologique, mais il pourrait être intéressant pour permettre une diminution de la neuroinflammation chez les souris Sandhoff et retarder la progression de la maladie.

Par ailleurs, au cours de mon travail de thèse, j'ai exploré de nouveaux aspects de la maladie, notamment liés au lysosome et aux voies de signalisation auxquelles il participe. Ainsi, j'ai étudié l'implication de la voie mTOR dans la maladie et la dérégulation de l'autophagie et du facteur de transcription TFEB. Ces données ne sont que préliminaires, mais en agissant sur ces différentes voies qui semblent être altérées dans la maladie, il est possible

que nous puissions limiter certaines cascades pathogènes, ce qui aurait pour conséquence de retarder la progression de la maladie. Comme nous l'avons vu, l'autophagie et ses dérégulations ont déjà été étudiées dans d'autres maladies lysosomales et elles commencent à être explorées dans la maladie de Sandhoff (Keilani et al., 2012; Suzuki et al., 2016). Il a été montré à plusieurs reprises que cette dérégulation serait due à un blocage du processus autophagique causé par une fusion autophagosome/lysosome anormale (Settembre et al., 2008), avec pour conséquence la présence d'une accumulation secondaire, ce qui amplifierait le phénomène. Une stratégie thérapeutique consistant à induire l'autophagie a déjà montré son efficacité dans des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Rubinsztein et al., 2012; Sarkar, 2013). Les composés utilisables peuvent être mTOR-dépendants (rapamycine) ou mTOR-indépendants. La rapamycine est connue pour induire d'importants effets secondaires et dans notre cas, le test à la rapamycine s'est avéré peu concluant. Il serait donc intéressant d'évaluer des drogues mTOR-indépendantes, telles que carbamazépine, vérapamil, tréhalose ou SMER28. Ces drogues ont déjà montré leur rôle protecteur dans des modèles murins et chez la drosophile (Rubinsztein et al., 2012; Sarkar, 2013). Dans le cas des maladies lysosomales, la carbamazépine a permis une restauration du flux autophagique dans un modèle cellulaire NPC1 (Maetzel et al., 2014). Il pourrait être pertinent de tester ces composés dans le modèle murin Sandhoff. Par ailleurs, le fénofibrate pourrait aussi être testé, car il est connu pour promouvoir l'autophagie et il permet d'empêcher l'accumulation de substrats secondaires (Jo et al., 2017). Il a déjà été testé sur des cultures neuronales issues du modèle ovin de maladie de Batten et ce traitement a permis une induction de l'autophagie (Best et al., 2017), mais il n'a pas encore été évalué *in vivo*. Un point important est que le fénofibrate est connu pour passer la BHE après injection intraveineuse ou administration orale (Deplanque et al., 2003). Il pourrait donc être intéressant de tester ce composé favorisant la clairance cellulaire en parallèle avec la thérapie génique.

Par ailleurs, TFEB est actuellement au coeur des stratégies thérapeutiques innovantes pour certaines maladies lysosomales comme nous l'avons évoqué précédemment. Ce ciblage de TFEB est aussi lié directement à la clairance cellulaire, ceci par sa faculté à initier l'autophagie, activer les fonctions lysosomales et promouvoir l'exocytose du lysosome. Ainsi, TFEB est devenu un outil incontournable pour moduler les processus de dégradation lysosome-dépendants. Une augmentation de son activité favorise effectivement la clairance cellulaire et l'exocytose lysosomale. Ainsi, dans un modèle murin de MSD, l'administration d'un AAV codant TFEB a permis une diminution de la surcharge en glycosaminoglycanes,

mais aussi de l'inflammation et de l'apoptose (Medina et al., 2011). Dans la maladie de Pompe, une approche similaire a montré l'effet bénéfique de TFEB sur la surcharge lysosomale (Spampanato et al., 2013b). Augmenter l'activité de TFEB pourrait être bénéfique dans la maladie de Sandhoff. Cependant, une surexpression de TFEB par une approche de transfert de gène comme l'ont testée les équipes de Medina et de Spampanato ne serait pas adaptée dans le cadre d'une approche combinée, comme nous l'envisageons. L'utilisation de composés moléculaires stimulant l'activité de TFEB serait plus pertinente. Ainsi, la cyclodextrine permettrait de médier positivement l'activité de TFEB et de réduire la surcharge lysosomale (Song et al., 2014). Un autre composé, la génistéine, permet aussi d'activer positivement TFEB en favorisant sa translocation au niveau du noyau (Moskot et al., 2014). Ce composé a été initialement utilisé dans les mucopolysaccharidoses en tant qu'inhibiteur de substrat. Des analyses plus poussées sur son efficacité ont montré qu'il ne permet pas seulement de diminuer l'accumulation des GAG, mais qu'il pourrait aussi renforcer l'activité du lysosome via l'activation de TFEB. Ce composé, qui est connu pour passer la BHE, pourrait donc être une molécule à tester dans la maladie de Sandhoff.

Ces différentes stratégies thérapeutiques émergentes pourraient ainsi être utilisées dans le modèle murin de la maladie de Sandhoff parallèlement à notre approche de transfert de gène. Le but serait ici de retarder la progression de la maladie afin de laisser le temps à la thérapie génique de se mettre en place chez les souris adultes. L'efficacité d'une telle approche serait prometteuse pour un possible essai clinique chez l'homme.

D) REPONSE IMMUNITAIRE

Un autre point important à considérer avant une éventuelle application chez l'homme d'une approche de thérapie génique comme la nôtre est la réponse immunitaire engendrée par le vecteur viral. En fonction de la dose, de la voie d'administration et des caractéristiques de ce vecteur, les réponses immunitaires peuvent être différentes. En effet, deux types de réponses immunitaires (innée et adaptative) peuvent avoir lieu.

1) Réponses immunitaires vis à vis de l'AAV et impact sur l'efficacité des traitements

Dans les modèles animaux, il semble que la réponse immunitaire induite par les AAV ait été sous-évaluée, alors que chez les primates non humains et chez l'homme, l'efficacité

thérapeutique a parfois été mise à mal lors d'essais (pré)cliniques. En effet, pendant longtemps, les AAV n'ont pas été considérés comme susceptibles d'activer la réponse innée, contrairement aux adénovirus connus pour induire une importante réponse innée. Cependant, au fil des années, il a été montré que les AAV naturels provoquaient une réponse innée modeste, mais suffisamment importante pour activer les lymphocytes T responsables de l'activation de l'immunité adaptative (Ertl and High, 2016). En effet, plusieurs études sur des échantillons de la population générale a montré qu'en moyenne 50% des sujets possédaient des anticorps anti-AAV circulants dû à une infection naturelle par des AAV (Calcedo et al., 2009; Harbison et al., 2012; Kotterman and Schaffer, 2014). Le pourcentage diffère selon les sérotypes de virus et selon l'origine des sujets étudiés. En moyenne, dans la population mondiale, 67% des sujets ont des anticorps contre l'AAV1, 72% contre l'AAV2 et environ 40% contre les AAV5, 6, 7, 8 et 9. Le problème est que ces anticorps, même s'ils sont à des titres faibles, peuvent aboutir à une totale absence d'expression du transgène. Ainsi, avant les essais cliniques, les patients sont maintenant testés afin de voir s'ils possèdent des anticorps circulants. L'autre défi est que les patients traités ne pourront pas recevoir une autre injection plus tardive, car ils vont développer des anticorps circulants suite à la première injection (Tse et al., 2015).

Concernant les lymphocytes T actifs suite à la présence des AAV recombinants, cela a été montré dans certains essais cliniques chez l'homme, notamment après l'injection d'un AAV2 codant le facteur IX chez des patients atteints d'hémophilie. A forte dose, une expression suffisante de la protéine a été observée, mais au bout de quelques semaines, plus aucune expression du transgène n'a été observée. Ceci est l'indication que la présence du vecteur a provoqué une réponse des lymphocytes T CD8+ (Manno et al., 2006). De manière étonnante, de tels résultats n'avaient pas été obtenus dans l'étude préclinique chez le chien (Mount et al., 2002). Cette différence de réponse immunitaire serait due à une primo-infection des sujets humains par un AAV2 naturel.

Ces réponses immunitaires n'ont pas été très étudiées dans les modèles animaux murins ou de plus grande taille, mais chez l'homme, elles ont été responsables de quelques échecs d'essais cliniques. Par ailleurs, il faut savoir que chez l'homme, la réponse immunitaire semble variable en fonction de la voie d'administration et du type de vecteur injecté (Mingozzi and High, 2011). Plusieurs stratégies visant à éviter les réponses immunes ont été développées et seront nécessaires pour pouvoir traiter le plus grand nombre de patients possible avec la meilleure efficacité.

2) Solutions pour éviter les réponses immunitaires

Afin d'éviter l'immunité humorale induite par les anticorps anti-AAV chez l'homme, outre le fait de cibler seulement les patients n'ayant pas les anticorps concernés, d'autres stratégies ont également été testées. Tout d'abord, l'administration d'une forte dose de vecteur chez les sujets ayant un niveau d'anticorps faible pourrait permettre une bonne expression du transgène, mais cette forte dose pourrait déclencher une réponse cytotoxique des lymphocytes T capsid-dépendante (Manno et al., 2006; Mingozzi et al., 2007a; Nathwani et al., 2011; Pien et al., 2009). L'utilisation de vecteurs vides est également une option, car elle pourrait permettre d'« absorber » les anticorps présents chez le patient. Cette stratégie a l'avantage d'être facile à mettre en place et a déjà montré son efficacité chez l'homme (Mingozzi et al., 2013a). Par ailleurs, l'utilisation de drogues immunosuppressives permet de cibler les cellules B, mais le problème est que cette approche semble partiellement efficace (Mingozzi et al., 2013b). Enfin, changer de sérotype ou créer une nouvelle capsid pourrait permettre d'éviter la réponse immunitaire liée aux anticorps déjà présents (Bartel et al., 2011). En revanche, il faudra alors réévaluer le vecteur afin d'être sûr de pouvoir garder le tropisme voulu pour les cellules d'intérêt.

Afin d'éviter les réponses cytotoxiques (capsid-spécifiques) des cellules T, une stratégie consisterait à baisser la dose. Les premières données suggèrent une efficacité de cette approche (Cantore et al., 2012; Finn et al., 2012), mais le problème est que pour certains essais, des doses importantes de vecteurs sont nécessaires. De la même façon que pour éviter l'immunité humorale, l'administration d'immunosuppresseurs bloquant la réponse des cellules T pourrait être envisagée, tout comme le changement d'un sérotype ou la création d'un nouvel AAV pour éviter la reconnaissance d'un épitope par les cellules T. Ce dernier point peut s'avérer compliqué, car une reconnaissance croisée de plusieurs sérotypes par les cellules T est possible (Mingozzi et al., 2007b).

De façon à éviter les réponses immunitaires dans le cadre d'une thérapie génique, nous venons de voir que plusieurs stratégies efficaces existent. Ces approches devront être étudiées avant un éventuel passage en clinique. A ce jour, le transfert de gène n'a pas encore été testé chez les patients Sandhoff. La recherche préclinique sur les modèles murins de la maladie a permis d'obtenir des résultats significatifs. La prochaine étape est de pouvoir arriver à traiter

des souris Sandhoff en phase symptomatique et de leur permettre de survivre jusqu'à l'âge de 2 ans. Comme nous l'avons évoqué, des traitements complémentaires devront probablement être envisagés en combinaison avec la thérapie génique, afin de freiner l'évolution de la maladie chez des enfants à un stade déjà symptomatique. Par ailleurs, il reste encore beaucoup à apprendre sur la pathophysiologie de la maladie et ces découvertes pourraient offrir de nouvelles cibles thérapeutiques. Tous ces points sont encore à étudier avant une évaluation dans un modèle animal de plus grande taille et une utilisation en clinique chez les petits patients atteints de maladie de Sandhoff.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, N.J. (2013). Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis.* *36*, 437–449.

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 41–53.

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* *37*, 13–25.

Abo-ouf, H., Hooper, A.W.M., White, E.J., Rensburg, H.J.J. van, Trigatti, B.L., and Igdoura, S.A. (2013). Deletion of tumor necrosis factor- α ameliorates neurodegeneration in Sandhoff disease mice. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 3960–3975.

Ahmad, I., Lope-Piedrafita, S., Bi, X., Hicks, C., Yao, Y., Yu, C., Chaitkin, E., Howison, C.M., Weberg, L., Trouard, T.P., et al. (2005). Allopregnanolone treatment, both as a single injection or repetitively, delays demyelination and enhances survival of Niemann-Pick C mice. *J. Neurosci. Res.* *82*, 811–821.

Akgoc, Z., Sena-Esteves, M., Martin, D.R., Han, X., d’Azzo, A., and Seyfried, T.N. (2015). Bis(monoacylglycero)phosphate: A secondary storage lipid in the gangliosidoses. *J. Lipid Res.* jlr.M057851.

Andersson, U., Smith, D., Jeyakumar, M., Butters, T.D., Borja, M.C., Dwek, R.A., and Platt, F.M. (2004). Improved outcome of N-butyldoxygalactonojirimycin-mediated substrate reduction therapy in a mouse model of Sandhoff disease. *Neurobiol. Dis.* *16*, 506–515.

Ando, S., Tanaka, Y., Kobayashi, S., Fukui, F., Iwamoto, M., Waki, H., Tai, T., and Hirabayashi, Y. (2004). Synaptic function of cholinergic-specific Chol-1 α ganglioside. *Neurochem. Res.* *29*, 857–867.

Aqul, A., Liu, B., Ramirez, C.M., Pieper, A.A., Estill, S.J., Burns, D.K., Liu, B., Repa, J.J., Turley, S.D., and Dietschy, J.M. (2011). Unesterified Cholesterol Accumulation in Late Endosomes/Lysosomes Causes Neurodegeneration and is Prevented by Driving Cholesterol Export from this Compartment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 9404–9413.

Armbruster, N., Lattanzi, A., Jeavons, M., Van Wittenberghe, L., Gjata, B., Marais, T., Martin, S., Vignaud, A., Voit, T., Mavilio, F., et al. (2016). Efficacy and biodistribution analysis of intracerebroventricular administration of an optimized scAAV9-SMN1 vector in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* *3*, 16060.

Arthur, J.R., Lee, J.P., Snyder, E.Y., and Seyfried, T.N. (2012). Therapeutic effects of stem cells and substrate reduction in juvenile Sandhoff mice. *Neurochem. Res.* *37*, 1335–1343.

Aschner, M. (1998). Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* *19*, 269–281.

Ashe, K.M., Bangari, D., Li, L., Cabrera-Salazar, M.A., Bercury, S.D., Nietupski, J.B., Cooper, C.G.F., Aerts, J.M.F.G., Lee, E.R., Copeland, D.P., et al. (2011). Iminosugar-Based Inhibitors of Glucosylceramide Synthase Increase Brain Glycosphingolipids and Survival in a Mouse Model of Sandhoff Disease. *PLoS ONE* *6*, e21758.

- Astudillo, L., Sabourdy, F., Therville, N., Bode, H., Ségui, B., Andrieu-Abadie, N., Hornemann, T., and Levade, T. (2015). Human genetic disorders of sphingolipid biosynthesis. *J. Inherit. Metab. Dis.* *38*, 65–76.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* *149*, 754–755.
- Awad, O., Sarkar, C., Panicker, L.M., Miller, D., Zeng, X., Sgambato, J.A., Lipinski, M.M., and Feldman, R.A. (2015). Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells. *Hum. Mol. Genet.* *ddv297*.
- Baek, R.C., Kasperzyk, J.L., Platt, F.M., and Seyfried, T.N. (2008). N-butyldeoxygalactonojirimycin reduces brain ganglioside and GM2 content in neonatal Sandhoff disease mice. *Neurochem. Int.* *52*, 1125–1133.
- Baek, R.C., Martin, D.R., Cox, N.R., and Seyfried, T.N. (2009). Comparative Analysis of Brain Lipids in Mice, Cats, and Humans with Sandhoff Disease. *Lipids* *44*, 197–205.
- Balakrishnan, B., and R. Jayandharan, G. (2014). Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* *14*, 86–100.
- Ballabio, A., and Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: From storage to cellular damage. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1793*, 684–696.
- Bartel, M., Schaffer, D., and Büning, H. (2011). Enhancing the Clinical Potential of AAV Vectors by Capsid Engineering to Evade Pre-Existing Immunity. *Front. Microbiol.* *2*, 204.
- Barton, N.W., Brady, R.O., Dambrosia, J.M., Di Bisceglie, A.M., Doppelt, S.H., Hill, S.C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., et al. (1991). Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency — Macrophage-Targeted Glucocerebrosidase for Gaucher's Disease. *N. Engl. J. Med.* *324*, 1464–1470.
- Benkhelifa-Ziyyat, S., Besse, A., Roda, M., Duque, S., Astord, S., Carcenac, R., Marais, T., and Barkats, M. (2013). Intramuscular scAAV9-SMN Injection Mediates Widespread Gene Delivery to the Spinal Cord and Decreases Disease Severity in SMA Mice. *Mol. Ther.* *21*, 282–290.
- Ben-Sahra, I., and Manning, B.D. (2017). mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* *45*, 72–82.
- Berns, K.I., and Muzyczka, N. (2017). AAV: An Overview of Unanswered Questions. *Hum. Gene Ther.* *28*, 308–313.
- Berthet, J., and De Duve, C. (1951). Tissue fractionation studies. I. The existence of a mitochondria-linked, enzymically inactive form of acid phosphatase in rat-liver tissue. *Biochem. J.* *50*, 174–181.
- Best, H.L., Neverman, N.J., Wicky, H.E., Mitchell, N.L., Leitch, B., and Hughes, S.M. (2017). Characterisation of early changes in ovine CLN5 and CLN6 Batten disease neural cultures for the rapid screening of therapeutics. *Neurobiol. Dis.* *100*, 62–74.

- Bley, A.E., Giannikopoulos, O.A., Hayden, D., Kubilus, K., Tifft, C.J., and Eichler, F.S. (2011). Natural History of Infantile GM2 Gangliosidosis. *Pediatrics* *128*, e1233–e1241.
- Bosch, M.E., and Kielian, T. (2015). Neuroinflammatory paradigms in lysosomal storage diseases. *Front. Neurosci.* *9*.
- Bradbury, A.M., Cochran, J.N., McCurdy, V.J., Johnson, A.K., Brunson, B.L., Gray-Edwards, H., Leroy, S.G., Hwang, M., Randle, A.N., Jackson, L.S., et al. (2013). Therapeutic Response in Feline Sandhoff Disease Despite Immunity to Intracranial Gene Therapy. *Mol. Ther.* *21*, 1306–1315.
- Bradbury, A.M., Peterson, T.A., Gross, A.L., Wells, S.Z., McCurdy, V.J., Wolfe, K.G., Dennis, J.C., Brunson, B.L., Gray-Edwards, H., Randle, A.N., et al. (2017). AAV-mediated gene delivery attenuates neuroinflammation in feline Sandhoff disease. *Neuroscience* *340*, 117–125.
- Braulke, T., and Bonifacino, J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1793*, 605–614.
- Brown, D.A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* *275*, 17221–17224.
- Brunetti-Pierri, N., and Ng, P. (2017). Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: lessons from studies in large animal models. *Virus Genes* 1–8.
- Cachón-González, M.B., Wang, S.Z., Lynch, A., Ziegler, R., Cheng, S.H., and Cox, T.M. (2006). Effective gene therapy in an authentic model of Tay-Sachs-related diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 10373–10378.
- Cachón-González, M.B., Wang, S.Z., McNair, R., Bradley, J., Lunn, D., Ziegler, R., Cheng, S.H., and Cox, T.M. (2012). Gene Transfer Corrects Acute GM2 Gangliosidosis—Potential Therapeutic Contribution of Perivascular Enzyme Flow. *Mol. Ther.* *20*, 1489–1500.
- Cachón-González, M.-B., Wang, S.Z., Ziegler, R., Cheng, S.H., and Cox, T.M. (2014). Reversibility of neuropathology in Tay–Sachs-related diseases. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 730–748.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *J. Infect. Dis.* *199*, 381–390.
- Cantore, A., Nair, N., Valle, P.D., Matteo, M.D., Mâtrai, J., Sanvito, F., Brombin, C., Serio, C.D., D’Angelo, A., Chuah, M., et al. (2012). Hyperfunctional coagulation factor IX improves the efficacy of gene therapy in hemophilic mice. *Blood* *120*, 4517–4520.
- Cao, Y., Espinola, J.A., Fossale, E., Massey, A.C., Cuervo, A.M., MacDonald, M.E., and Cotman, S.L. (2006). Autophagy Is Disrupted in a Knock-in Mouse Model of Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *J. Biol. Chem.* *281*, 20483–20493.
- Castle, M.J., Turunen, H.T., Vandenberghe, L.H., and Wolfe, J.H. (2016). Controlling AAV Tropism in the Nervous System with Natural and Engineered Capsids. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1382*, 133–149.

Chira, S., Jackson, C.S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M.S., Diaconu, I., Braicu, C., Raduly, L.-Z., Calin, G.A., Berindan-Neagoe, I., et al. (2015). Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget* 6, 30675–30703.

Chiricozzi, E., Niemir, N., Aureli, M., Magini, A., Loberto, N., Prinetti, A., Bassi, R., Polchi, A., Emiliani, C., Caillaud, C., et al. (2014). Chaperone Therapy for GM2 Gangliosidosis: Effects of Pyrimethamine on β -Hexosaminidase Activity in Sandhoff Fibroblasts. *Mol. Neurobiol.* 50, 159–167.

Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C.W., and Kordower, J.H. (2009). Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol. Dis.* 35, 385–398.

Clarke, J.T.R., Mahuran, D.J., Sathe, S., Kolodny, E.H., Rigat, B.A., Raiman, J.A., and Tropak, M.B. (2011). An open-label Phase I/II clinical trial of pyrimethamine for the treatment of patients affected with chronic GM2 gangliosidosis (Tay–Sachs or Sandhoff variants). *Mol. Genet. Metab.* 102, 6–12.

Collaco, R.F., Cao, X., and Trempe, J.P. (1999). A helper virus-free packaging system for recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene* 238, 397–405.

Conzelmann, E., Kytzia, H.J., Navon, R., and Sandhoff, K. (1983). Ganglioside GM2 N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity in cultured fibroblasts of late-infantile and adult GM2 gangliosidosis patients and of healthy probands with low hexosaminidase level. *Am. J. Hum. Genet.* 35, 900–913.

Coutinho, M.F., Prata, M.J., and Alves, S. (2012a). Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol. Genet. Metab.* 105, 542–550.

Coutinho, M.F., Prata, M.J., and Alves, S. (2012b). A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol. Genet. Metab.* 107, 257–266.

Curcio-Morelli, C., Charles, F.A., Micsenyi, M.C., Cao, Y., Venugopal, B., Browning, M.F., Dobrenis, K., Cotman, S.L., Walkley, S.U., and Slaugenhaupt, S.A. (2010). Macroautophagy is defective in mucopolin-1-deficient mouse neurons. *Neurobiol. Dis.* 40, 370–377.

Dalkara, D., Byrne, L.C., Klimczak, R.R., Visel, M., Yin, L., Merigan, W.H., Flannery, J.G., and Schaffer, D.V. (2013). In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci. Transl. Med.* 5, 189ra76.

Davidson, C.D., Ali, N.F., Micsenyi, M.C., Stephney, G., Renault, S., Dobrenis, K., Ory, D.S., Vanier, M.T., and Walkley, S.U. (2009). Chronic Cyclodextrin Treatment of Murine Niemann-Pick C Disease Ameliorates Neuronal Cholesterol and Glycosphingolipid Storage and Disease Progression. *PLoS ONE* 4, e6951.

Denny, C.A., Heinecke, K.A., Kim, Y.P., Baek, R.C., Loh, K.S., Butters, T.D., Bronson, R.T., Platt, F.M., and Seyfried, T.N. (2010). Restricted ketogenic diet enhances the therapeutic action of N-butyldeoxynojirimycin towards brain GM2 accumulation in adult Sandhoff disease mice. *J. Neurochem.* 113, 1525–1535.

Deplanque, D., Gelé, P., Pétrault, O., Six, I., Furman, C., Bouly, M., Nion, S., Dupuis, B., Leys, D., Fruchart, J.-C., et al. (2003). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α

Activation as a Mechanism of Preventive Neuroprotection Induced by Chronic Fenofibrate Treatment. *J. Neurosci.* 23, 6264–6271.

Desnick, R.J., and Schuchman, E.H. (2002). Enzyme replacement and enhancement therapies: lessons from lysosomal disorders. *Nat. Rev. Genet.* 3, 954–966.

Desnick, R.J., and Schuchman, E.H. (2012). Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Diseases: Lessons from 20 Years of Experience and Remaining Challenges. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 13, 307–335.

Deverman, B.E., Pravdo, P.L., Simpson, B.P., Kumar, S.R., Chan, K.Y., Banerjee, A., Wu, W.-L., Yang, B., Huber, N., Pasca, S.P., et al. (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat. Biotechnol.* 34, 204–209.

DiMattia, M.A., Nam, H.-J., Van Vliet, K., Mitchell, M., Bennett, A., Gurda, B.L., McKenna, R., Olson, N.H., Sinkovits, R.S., Potter, M., et al. (2012). Structural Insight into the Unique Properties of Adeno-Associated Virus Serotype 9. *J. Virol.* 86, 6947–6958.

Donsante, A., Vogler, C., Muzyczka, N., Crawford, J.M., Barker, J., Flotte, T., Campbell-Thompson, M., Daly, T., and Sands, M.S. (2001). Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther.* 8, 1343–1346.

Donsante, A., Miller, D.G., Li, Y., Vogler, C., Brunt, E.M., Russell, D.W., and Sands, M.S. (2007). AAV Vector Integration Sites in Mouse Hepatocellular Carcinoma. *Science* 317, 477–477.

Drabek, T., Janata, A., Wilson, C.D., Stezoski, J., Janesko-Feldman, K., Tisherman, S.A., Foley, L.M., Verrier, J.D., and Kochanek, P.M. (2014). Minocycline attenuates brain tissue levels of TNF- α produced by neurons after prolonged hypothermic cardiac arrest in rats. *Resuscitation* 85, 284–291.

Dronadula, N., Wacker, B.K., Van Der Kwast, R., Zhang, J., and Dichek, D.A. (2016). Stable In Vivo Transgene Expression in Endothelial Cells with Helper-Dependent Adenovirus: Roles of Promoter and Interleukin-10. *Hum. Gene Ther.* 28, 255–270.

Duque, S., Joussemet, B., Riviere, C., Marais, T., Dubreil, L., Douar, A.-M., Fyfe, J., Moullier, P., Colle, M.-A., and Barkats, M. (2009). Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 17, 1187–1196.

El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S.E., Means, T.K., Terada, K., Geula, C., and Luster, A.D. (2007). *Ccr2* deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.* 13, 432–438.

Elsabahy, M., Nazarali, A., and Foldvari, M. (2011). Non-viral nucleic acid delivery: key challenges and future directions. *Curr. Drug Deliv.* 8, 235–244.

Ertl, H.C.J., and High, K.A. (2016). Impact of AAV Capsid-Specific T-Cell Responses on Design and Outcome of Clinical Gene Transfer Trials with Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors: An Evolving Controversy. *Hum. Gene Ther.* 28, 328–337.

- Fagan, S.C., Edwards, D.J., Borlongan, C.V., Xu, L., Arora, A., Feuerstein, G., and Hess, D.C. (2004). Optimal delivery of minocycline to the brain: implication for human studies of acute neuroprotection. *Exp. Neurol.* *186*, 248–251.
- Fan, J.-Q., Ishii, S., Asano, N., and Suzuki, Y. (1999). Accelerated transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* *5*, 112–115.
- Finn, J.D., Nichols, T.C., Svoronos, N., Merricks, E.P., Bellenger, D.A., Zhou, S., Simioni, P., High, K.A., and Arruda, V.R. (2012). The efficacy and the risk of immunogenicity of FIX Padua (R338L) in hemophilia B dogs treated by AAV muscle gene therapy. *Blood* *120*, 4521–4523.
- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal-neurons and adult-astrocytes in CNS. *Nat. Biotechnol.* *27*, 59–65.
- Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M., Le, T.T., Morales, P.R., Rich, M.M., Burghes, A.H.M., et al. (2010). Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotechnol.* *28*, 271–274.
- Foust, K.D., Salazar, D.L., Likhite, S., Ferraiuolo, L., Ditsworth, D., Ilieva, H., Meyer, K., Schmelzer, L., Braun, L., Cleveland, D.W., et al. (2013). Therapeutic AAV9-mediated suppression of mutant SOD1 slows disease progression and extends survival in models of inherited ALS. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *21*, 2148–2159.
- Fox, M.F., DuToit, D.L., Warnich, L., and Retief, A.E. (1984). Regional localization of alpha-galactosidase (GLA) to Xpter----q22, hexosaminidase B (HEXB) to 5q13----qter, and arylsulfatase B (ARSB) to 5pter----q13. *Cytogenet. Cell Genet.* *38*, 45–49.
- Fraldi, A., Klein, A.D., Medina, D.L., and Settembre, C. (2016). Brain Disorders Due to Lysosomal Dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.* *39*, 277–295.
- Fu, H., Dirosario, J., Killedar, S., Zaraspe, K., and McCarty, D.M. (2011). Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 1025–1033.
- Futerman, A.H., and van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 554–565.
- Gallala, H.D., Breiden, B., and Sandhoff, K. (2011). Regulation of the NPC2 protein-mediated cholesterol trafficking by membrane lipids. *J. Neurochem.* *116*, 702–707.
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *J. Biol. Chem.* *284*, 12297.
- Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *J. Virol.* *78*, 6381–6388.

- Gerasimenko, J.V., Gerasimenko, O.V., and Petersen, O.H. (2001). Membrane repair: Ca(2+)-elicited lysosomal exocytosis. *Curr. Biol. CB* 11, R971-974.
- Ghosh, P., Dahms, N.M., and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 202–213.
- Ginzburg, L., Kacher, Y., and Futerman, A.H. (2004). The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 417–431.
- Gluscock, J.J., Osman, E.Y., Wetz, M.J., Krogman, M.M., Shababi, M., and Lorson, C.L. (2012). Decreasing disease severity in symptomatic, *Smn(-/-);SMN2(+/+)*, spinal muscular atrophy mice following scAAV9-SMN delivery. *Hum. Gene Ther.* 23, 330–335.
- Golebiowski, D., van der Bom, I.M.J., Kwon, C.-S., Miller, A.D., Petrosky, K., Bradbury, A.M., Maitland, S., Kühn, A.L., Bishop, N., Curran, E., et al. (2017). Direct Intracranial Injection of AAVrh8 Encoding Monkey β -N-Acetylhexosaminidase Causes Neurotoxicity in the Primate Brain. *Hum. Gene Ther.* 28, 510–522.
- Gray, S.J., Matagne, V., Bachaboina, L., Yadav, S., Ojeda, S.R., and Samulski, R.J. (2011). Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 1058–1069.
- Griffin, B. (2002). The use of fecal markers to facilitate sample collection in group-housed cats. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 41, 51–56.
- Griffin, L.D., Gong, W., Verot, L., and Mellon, S.H. (2004). Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat. Med.* 10, 704–711.
- Guidotti, J.E., Mignon, A., Haase, G., Caillaud, C., McDonnell, N., Kahn, A., and Poenaru, L. (1999). Adenoviral Gene Therapy of the Tay-Sachs Disease in Hexosaminidase A-Deficient Knock-Out Mice. *Hum. Mol. Genet.* 8, 831–838.
- Guo, D., Dunbar, J.D., Yang, C.H., Pfeffer, L.M., and Donner, D.B. (1998). Induction of Jak/STAT Signaling by Activation of the Type 1 TNF Receptor. *J. Immunol.* 160, 2742–2750.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803–809.
- Harbison, C.E., Weichert, W.S., Gurda, B.L., Chiorini, J.A., Agbandje-McKenna, M., and Parrish, C.R. (2012). Examining the cross-reactivity and neutralization mechanisms of a panel of mAbs against adeno-associated virus serotypes 1 and 5. *J. Gen. Virol.* 93, 347–355.
- Harlalka, G.V., Lehman, A., Chioza, B., Baple, E.L., Maroofian, R., Cross, H., Sreekantan-Nair, A., Priestman, D.A., Al-Turki, S., McEntagart, M.E., et al. (2013). Mutations in *B4GALNT1* (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis. *Brain J. Neurol.* 136, 3618–3624.

- Hauck, B., Chen, L., and Xiao, W. (2003). Generation and Characterization of Chimeric Recombinant AAV Vectors. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 7, 419–425.
- Haurigot, V., Marcó, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Añor, S., Andaluz, A., Pineda, M., et al. (2013). Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy. *J. Clin. Invest.* 123, 3254–3271.
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J.E., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer’s disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405.
- Henkart, M. (1980). Identification and function of intracellular calcium stores in neurons. *Fed. Proc.* 39, 2776–2777.
- Hewlett, K.A., and Corbett, D. (2006). Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. *Neuroscience* 141, 27–33.
- Hinderer, C., Bell, P., Gurda, B.L., Wang, Q., Louboutin, J.-P., Zhu, Y., Bagel, J., O’Donnell, P., Sikora, T., Ruane, T., et al. (2014). Intrathecal Gene Therapy Corrects CNS Pathology in a Feline Model of Mucopolysaccharidosis I. *Mol. Ther.* 22, 2018–2027.
- Hooper, A.W.M., and Igdoura, S.A. (2016). Bi-phasic gliosis drives neuropathology in a Sandhoff disease mouse model. *J. Neuroimmunol.* 299, 19–27.
- Hooper, A.W.M., González, J.F.A., Venier, R.E., Gillespie, D.C., and Igdoura, S.A. (2016). Neuronal pentraxin 1 depletion delays neurodegeneration and extends life in Sandhoff disease mice. *Hum. Mol. Genet.* 26, 661–673.
- Hossain, M.A. (2008). Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Brain: Involvement of a Novel Neuronal Molecule in Neuronal Cell Death and Potential Target for Neuroprotection. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 26, 93–101.
- Huang, J.-Q., Trasler, J.M., Igdoura, S., Michaud, J., Hanai, N., and Gravel, R.A. (1997). Apoptotic Cell Death in Mouse Models of GM2 Gangliosidosis and Observations on Human Tay-Sachs and Sandhoff Diseases. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1879–1885.
- Ichikawa, S., and Hirabayashi, Y. (1998). Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 8, 198–202.
- Izikson, L., Klein, R.S., Charo, I.F., Weiner, H.L., and Luster, A.D. (2000). Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J. Exp. Med.* 192, 1075–1080.
- Jeyakumar, M., Norflus, F., Tifft, C.J., Cortina-Borja, M., Butters, T.D., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A., and Platt, F.M. (2001). Enhanced survival in Sandhoff disease mice receiving a combination of substrate deprivation therapy and bone marrow transplantation. *Blood* 97, 327–329.

Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D.A., Spoel, V.D., C, A., d'Azzo, A., Hugh Perry, V., Butters, T.D., Dwek, R.A., et al. (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126, 974–987.

Jeyakumar, M., Smith, D.A., Williams, I.M., Borja, M.C., Neville, D.C.A., Butters, T.D., Dwek, R.A., and Platt, F.M. (2004). NSAIDs increase survival in the Sandhoff disease mouse: Synergy with N-butyldeoxynojirimycin. *Ann. Neurol.* 56, 642–649.

Jeyakumar, M., Williams, I., Smith, D., Cox, T.M., and Platt, F.M. (2009a). Critical role of iron in the pathogenesis of the murine gangliosidoses. *Neurobiol. Dis.* 34, 406–416.

Jeyakumar, M., Lee, J.-P., Sibson, N.R., Lowe, J.P., Stuckey, D.J., Tester, K., Fu, G., Newlin, R.M., Smith, D.A., Snyder, E.Y., et al. (2009b). Neural stem cell transplantation benefits a monogenic neurometabolic disorder during the symptomatic phase of disease. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2362–2370.

Jiang, L., Bechtel, M.D., Bean, J.L., Winefield, R., Williams, T.D., Zaidi, A., Michaelis, E.K., and Michaelis, M.L. (2014). Effects of Gangliosides on the Activity of the Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1255–1265.

Jin, W.-J., Feng, S.-W., Feng, Z., Lu, S.-M., Qi, T., and Qian, Y.-N. (2013). Minocycline improves postoperative cognitive impairment in aged mice by inhibiting astrocytic activation: *NeuroReport* 1.

Jo, E., Li, S., Liang, Q., Zhang, X., Wang, H., Herbert, T.P., Jenkins, T.A., Xu, A., and Ye, J.-M. (2017). Chronic activation of PPAR α with fenofibrate reduces autophagic proteins in the liver of mice independent of FGF21. *PLoS ONE* 12.

Kanae, Y., Endoh, D., Yamato, O., Hayashi, D., Matsunaga, S., Ogawa, H., Maede, Y., and Hayashi, M. (2007). Nonsense mutation of feline beta-hexosaminidase beta-subunit (HEXB) gene causing Sandhoff disease in a family of Japanese domestic cats. *Res. Vet. Sci.* 82, 54–60.

Kanatsu, Y., Chen, N.H., Mitoma, J., Nakagawa, T., Hirabayashi, Y., and Higashi, H. (2012). Gangliosides stimulate bradykinin B2 receptors to promote calmodulin kinase II-mediated neuronal differentiation. *J. Biochem. (Tokyo)* 152, 63–72.

Kanzaki, S., Yamaguchi, A., Yamaguchi, K., Kojima, Y., Suzuki, K., Koumitsu, N., Nagashima, Y., Nagahama, K., Ehara, M., Hirayasu, Y., et al. (2010). Thymic Alterations in GM2 Gangliosidoses Model Mice. *PLoS ONE* 5.

Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22, 407–417.

Kawashima, N., Tsuji, D., Okuda, T., Itoh, K., and Nakayama, K. (2009). Mechanism of abnormal growth in astrocytes derived from a mouse model of GM2 gangliosidosis. *J. Neurochem.* 111, 1031–1041.

Keilani, S., Lun, Y., Stevens, A.C., Williams, H.N., Sjoberg, E.R., Khanna, R., Valenzano, K.J., Checler, F., Buxbaum, J.D., Yanagisawa, K., et al. (2012). Lysosomal Dysfunction in a

Mouse Model of Sandhoff Disease Leads to Accumulation of Ganglioside-Bound Amyloid- β Peptide. *J. Neurosci.* 32, 5223–5236.

Kohyama, M., Yabuki, A., Kawasaki, Y., Kawaguchi, H., Miura, N., Kitano, Y., Onitsuka, T., Rahman, M.M., Miyoshi, N., and Yamato, O. (2015). GM2 Gangliosidosis Variant 0 (Sandhoff Disease) in a Mixed-Breed Dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 51, 396–400.

Kolter, T., and Sandhoff, K. (2006). Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1758, 2057–2079.

Koprich, J.B., Johnston, T.H., Reyes, M.G., Sun, X., and Brotchie, J.M. (2010). Expression of human A53T alpha-synuclein in the rat substantia nigra using a novel AAV1/2 vector produces a rapidly evolving pathology with protein aggregation, dystrophic neurite architecture and nigrostriatal degeneration with potential to model the pathology of Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 5, 43.

Kotterman, M.A., and Schaffer, D.V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 445–451.

Krivit, W. (2004). Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of lysosomal and peroxisomal metabolic diseases. *Springer Semin. Immunopathol.* 26, 119–132.

Kyrkanides, S., Miller, A.W., Miller, J.H., Tallents, R.H., Brouxhon, S.M., Olschowka, M.E., O'Banion, M.K., and Olschowka, J.A. (2008). Peripheral blood mononuclear cell infiltration and neuroinflammation in the HexB^{-/-} mouse model of neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* 203, 50–57.

Lachmann, R.H., and Platt, F.M. (2001). Substrate reduction therapy for glycosphingolipid storage disorders. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 455–466.

Lamanna, W.C., Lawrence, R., Sarrazin, S., and Esko, J.D. (2011). Secondary Storage of Dermatan Sulfate in Sanfilippo Disease. *J. Biol. Chem.* 286, 6955–6962.

Lawson, C.A., and Martin, D.R. (2016). Animal models of GM2 gangliosidosis: utility and limitations. *Appl. Clin. Genet.* 9, 111.

Lecommandeur, E., Baker, D., Cox, T.M., Nicholls, A.W., and Griffin, J.L. (2017). Alterations in endo-lysosomal function induce similar hepatic lipid profiles in rodent models of drug-induced phospholipidosis and Sandhoff disease. *J. Lipid Res.* jlr.M073395.

Ledeen, R., and Wu, G. (2011). New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function. *J. Neurochem.* 116, 714–720.

Lee, H.-F., Chi, C.-S., and Tsai, C.-R. (2017). Early cardiac involvement in an infantile Sandhoff disease case with novel mutations. *Brain Dev.* 39, 171–176.

Lee, J.-P., Jeyakumar, M., Gonzalez, R., Takahashi, H., Lee, P.-J., Baek, R.C., Clark, D., Rose, H., Fu, G., Clarke, J., et al. (2007). Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nat. Med.* 13, 439–447.

- Liao, G., Yao, Y., Liu, J., Yu, Z., Cheung, S., Xie, A., Liang, X., and Bi, X. (2007). Cholesterol Accumulation Is Associated with Lysosomal Dysfunction and Autophagic Stress in *Npc1*^{-/-} Mouse Brain. *Am. J. Pathol.* *171*, 962–975.
- Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Ashe, K.H., Frautschy, S.A., et al. (2000). Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 5709–5714.
- Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Gahtan, E., Ubeda, O., Beech, W., Overmier, J.B., Hsiao-Ashec, K., Frautschy, S.A., and Cole, G.M. (2001). Ibuprofen effects on Alzheimer pathology and open field activity in APPsw transgenic mice. *Neurobiol. Aging* *22*, 983–991.
- Lim, J., Li, L., Shirihai, O.S., Trudeau, K.M., Puertollano, R., and Raben, N. (2017). Modulation of mTOR signaling as a strategy for the treatment of Pompe disease. *EMBO Mol. Med.* *9*, 353–370.
- Limberis, M.P., Vandenberghe, L.H., Zhang, L., Pickles, R.J., and Wilson, J.M. (2009). Transduction Efficiencies of Novel AAV Vectors in Mouse Airway Epithelium In Vivo and Human Ciliated Airway Epithelium In Vitro. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 294–301.
- Lisowski, L., Tay, S.S., and Alexander, I.E. (2015). Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* *24*, 59–67.
- Liu, B., Ramirez, C.M., Miller, A.M., Repa, J.J., Turley, S.D., and Dietschy, J.M. (2010). Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. *J. Lipid Res.* *51*, 933–944.
- Liu, Y., Wada, R., Kawai, H., Sango, K., Deng, C., Tai, T., McDonald, M.P., Araujo, K., Crawley, J.N., Bierfreund, U., et al. (1999). A genetic model of substrate deprivation therapy for a glycosphingolipid storage disorder. *J. Clin. Invest.* *103*, 497–505.
- Lukina, E., Watman, N., Arreguin, E.A., Banikazemi, M., Dragosky, M., Iastrebner, M., Rosenbaum, H., Phillips, M., Pastores, G.M., Rosenthal, D.I., et al. (2010). A phase 2 study of eliglustat tartrate (Genz-112638), an oral substrate reduction therapy for Gaucher disease type 1. *Blood* *116*, 893–899.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 622–632.
- Maegawa, G.H.B., Tropak, M., Butner, J., Stockley, T., Kok, F., Clarke, J.T.R., and Mahuran, D.J. (2007). Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of gm2 gangliosidosis. *J. Biol. Chem.* *282*, 9150–9161.
- Maetzel, D., Sarkar, S., Wang, H., Abi-Mosleh, L., Xu, P., Cheng, A.W., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2014). Genetic and Chemical Correction of Cholesterol Accumulation and Impaired Autophagy in Hepatic and Neural Cells Derived from Niemann-Pick Type C Patient-Specific iPS Cells. *Stem Cell Rep.* *2*, 866–880.
- Mai Ohsawa, Kotani, M., Tajima, Y., Tsuji, D., Ishibashi, Y., Kuroki, A., Itoh, K., Watabe, K., Sango, K., Yamanaka, S., et al. (2005). Establishment of immortalized Schwann cells from Sandhoff mice and corrective effect of recombinant human β -hexosaminidase A on the accumulated GM2 ganglioside. *J. Hum. Genet.* *50*, 460–467.

- Manfredsson, F.P., Rising, A.C., and Mandel, R.J. (2009). AAV9: a potential blood-brain barrier buster. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 403–405.
- Manno, C.S., Glenn F. Pierce, Arruda, V.R., Pierce, G.F., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J.E., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* *12*, 342–347.
- Mark, B.L., Mahuran, D.J., Cherney, M.M., Zhao, D., Knapp, S., and James, M.N.G. (2003). Crystal Structure of Human β -Hexosaminidase B: Understanding the Molecular Basis of Sandhoff and Tay–Sachs Disease. *J. Mol. Biol.* *327*, 1093–1109.
- Martin, D.R., Krum, B.K., Varadarajan, G.S., Hathcock, T.L., Smith, B.F., and Baker, H.J. (2004). An inversion of 25 base pairs causes feline GM2 gangliosidosis variant. *Exp. Neurol.* *187*, 30–37.
- Martiney, J.A., Cuff, C., Litwak, M., Berman, J., and Brosnan, C.F. (1998). Cytokine-induced inflammation in the central nervous system revisited. *Neurochem. Res.* *23*, 349–359.
- Martinez-Vicente, M., and Cuervo, A.M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* *6*, 352–361.
- Martini-Stoica, H., Xu, Y., Ballabio, A., and Zheng, H. (2016). The Autophagy–Lysosomal Pathway in Neurodegeneration: A TFEB Perspective. *Trends Neurosci.* *39*, 221–234.
- Masciullo, M., Santoro, M., Modoni, A., Ricci, E., Guitton, J., Tonali, P., and Silvestri, G. (2010). Substrate reduction therapy with miglustat in chronic GM2 gangliosidosis type Sandhoff: results of a 3-year follow-up. *J. Inherit. Metab. Dis.* *33*, 355–361.
- Matsuoka, K., Tsuji, D., Taki, T., and Itoh, K. (2011a). Thymic involution and corticosterone level in Sandhoff disease model mice: new aspects the pathogenesis of GM2 gangliosidosis. *J. Inherit. Metab. Dis.* *34*, 1061–1068.
- Matsuoka, K., Tamura, T., Tsuji, D., Dohzono, Y., Kitakaze, K., Ohno, K., Saito, S., Sakuraba, H., and Itoh, K. (2011b). Therapeutic potential of intracerebroventricular replacement of modified human β -hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 1017–1024.
- McCarty, D.M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *16*, 1648–1656.
- McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., and Samulski, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* *10*, 2112–2118.
- McCurdy, V.J., Rockwell, H.E., Arthur, J.R., Bradbury, A.M., Johnson, A.K., Randle, A.N., Brunson, B.L., Hwang, M., Gray-Edwards, H.L., Morrison, N.E., et al. (2015). Widespread correction of central nervous system disease after intracranial gene therapy in a feline model of Sandhoff disease. *Gene Ther.* *22*, 181–189.
- McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (2002). Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer’s disease. *J. Neurovirol.* *8*, 529–538.

- Medina, D.L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampanato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J.A., Sardiello, M., et al. (2011). Transcriptional Activation of Lysosomal Exocytosis Promotes Cellular Clearance. *Dev. Cell* 21, 421–430.
- Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., and Carey, W.F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281, 249–254.
- Meng, Y., Sohar, I., Sleat, D.E., Richardson, J.R., Reuhl, K.R., Jenkins, R.B., Sarkar, G., and Lobel, P. (2014). Effective Intravenous Therapy for Neurodegenerative Disease With a Therapeutic Enzyme and a Peptide That Mediates Delivery to the Brain. *Mol. Ther.* 22, 547–553.
- Menzies, F.M., Fleming, A., and Rubinsztein, D.C. (2015). Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 345–357.
- Meyer, K., Ferraiuolo, L., Schmelzer, L., Braun, L., McGovern, V., Likhite, S., Michels, O., Govoni, A., Fitzgerald, J., Morales, P., et al. (2015). Improving Single Injection CSF Delivery of AAV9-mediated Gene Therapy for SMA: A Dose–response Study in Mice and Nonhuman Primates. *Mol. Ther.* 23, 477–487.
- Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682.
- Miklyaeva, E.I., Dong, W., Bureau, A., Fattahie, R., Xu, Y., Su, M., Fick, G.H., Huang, J.-Q., Igdoura, S., Hanai, N., et al. (2004). Late onset Tay–Sachs disease in mice with targeted disruption of the Hexa gene: behavioral changes and pathology of the central nervous system. *Brain Res.* 1001, 37–50.
- Miljan, E.A., and Bremer, E.G. (2002). Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2002, re15.
- Mingozzi, F., Hasbrouck, N.C., Basner-Tschakarjan, E., Edmonson, S.A., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Zhou, S., Wright, J.F., Jiang, H., Pierce, G.F., et al. (2007a). Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood* 110, 2334–2341.
- Mingozzi, F., Maus, M.V., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Murphy, S.L., Rasko, J.E.J., Ragni, M.V., Manno, C.S., Sommer, J., Jiang, H., et al. (2007b). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* 13, 419–422.
- Mingozzi, F., Anguela, X.M., Pavani, G., Chen, Y., Davidson, R.J., Hui, D.J., Yazicioglu, M., Elkouby, L., Hinderer, C.J., Faella, A., et al. (2013a). Overcoming Preexisting Humoral Immunity to AAV Using Capsid Decoys. *Sci. Transl. Med.* 5, 194ra92-194ra92.
- Mingozzi, F., Chen, Y., Edmonson, S.C., Zhou, S., Thurlings, R.M., Tak, P.P., High, K.A., and Vervoordeldonk, M.J. (2013b). Prevalence and pharmacological modulation of humoral immunity to AAV vectors in gene transfer to synovial tissue. *Gene Ther.* 20, 417–424.
- Misquitta, C.M., Mack, D.P., and Grover, A.K. (1999). Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium* 25, 277–290.

- Miyake, N., Miyake, K., Asakawa, N., Yamamoto, M., and Shimada, T. (2014). Long-term correction of biochemical and neurological abnormalities in MLD mice model by neonatal systemic injection of an AAV serotype 9 vector. *Gene Ther.* 21, 427–433.
- Montalvo, A.L.E., Filocamo, M., Vlahovicek, K., Dardis, A., Lualdi, S., Corsolini, F., Bembi, B., and Pittis, M.G. (2005). Molecular analysis of the HEXA gene in Italian patients with infantile and late onset Tay-Sachs disease: detection of fourteen novel alleles. *Hum. Mutat.* 26, 282.
- Moskot, M., Montefusco, S., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Mozolewski, P., Węgrzyn, A., Di Bernardo, D., Węgrzyn, G., Medina, D.L., Ballabio, A., and Gabig-Cimińska, M. (2014). The Phytoestrogen Genistein Modulates Lysosomal Metabolism and Transcription Factor EB (TFEB) Activation. *J. Biol. Chem.* 289, 17054–17069.
- Mount, J.D., Herzog, R.W., Tillson, D.M., Goodman, S.A., Robinson, N., McClelland, M.L., Belling, D., Nichols, T.C., Arruda, V.R., Lothrop, C.D., et al. (2002). Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* 99, 2670–2676.
- Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377–388.
- Murlidharan, G., Samulski, R.J., and Asokan, A. (2014). Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* 7.
- Myerowitz, R., and Costigan, F.C. (1988). The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha-chain of beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* 263, 18587–18589.
- Myerowitz, R., and Hogikyan, N.D. (1987). A deletion involving Alu sequences in the beta-hexosaminidase alpha-chain gene of French Canadians with Tay-Sachs disease. *J. Biol. Chem.* 262, 15396–15399.
- Myerowitz, R., Lawson, D., Mizukami, H., Mi, Y., Tifft, C.J., and Proia, R.L. (2002). Molecular pathophysiology in Tay-Sachs and Sandhoff diseases as revealed by gene expression profiling. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1343–1351.
- Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G.D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdhary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011). Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365, 2357–2365.
- Navon, R., and Proia, R.L. (1989). The mutations in Ashkenazi Jews with adult GM2 gangliosidosis, the adult form of Tay-Sachs disease. *Science* 243, 1471–1474.
- Neote, K., McInnes, B., Mahuran, D.J., and Gravel, R.A. (1990). Structure and distribution of an Alu-type deletion mutation in Sandhoff disease. *J. Clin. Invest.* 86, 1524–1531.
- Netland, E.E., Newton, J.L., Majojcha, R.E., and Tate, B.A. (1998). Indomethacin Reverses the Microglial Response to Amyloid β -Protein. *Neurobiol. Aging* 19, 201–204.
- Neuwelt, E.A., Johnson, W.G., Blank, N.K., Pagel, M.A., Maslen-McClure, C., McClure, M.J., and Wu, P.M. (1985). Characterization of a new model of GM2-gangliosidosis (Sandhoff's disease) in Korat cats. *J. Clin. Invest.* 76, 482–490.

- Nixon, R.A. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell Sci.* *120*, 4081–4091.
- Nixon, R.A., Yang, D.-S., and Lee, J.-H. (2008). Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* *4*, 590–599.
- Norflus, F., Tiffit, C.J., McDonald, M.P., Goldstein, G., Crawley, J.N., Hoffmann, A., Sandhoff, K., Suzuki, K., and Proia, R.L. (1998). Bone marrow transplantation prolongs life span and ameliorates neurologic manifestations in Sandhoff disease mice. *J. Clin. Invest.* *101*, 1881–1888.
- Ohmi, Y., Tajima, O., Ohkawa, Y., Mori, A., Sugiura, Y., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2009). Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 22405–22410.
- Osellame, L.D., Rahim, A.A., Hargreaves, I.P., Gegg, M.E., Richard-Londt, A., Brandner, S., Waddington, S.N., Schapira, A.H.V., and Duchon, M.R. (2013). Mitochondria and Quality Control Defects in a Mouse Model of Gaucher Disease—Links to Parkinson’s Disease. *Cell Metab.* *17*, 941–953.
- Osmon, K.J.L., Woodley, E., Thompson, P., Ong, K., Karumuthil-Meilethil, S., Keimel, J.G., Mark, B.L., Mahuran, D., Gray, S.J., and Walia, J.S. (2016). Systemic Gene Transfer of a Hexosaminidase Variant Using an scAAV9.47 Vector Corrects GM2 Gangliosidosis in Sandhoff Mice. *Hum. Gene Ther.* *27*, 497–508.
- de Pablo-Latorre, R., Saide, A., Polishhuck, E.V., Nusco, E., Fraldi, A., and Ballabio, A. (2012). Impaired parkin-mediated mitochondrial targeting to autophagosomes differentially contributes to tissue pathology in lysosomal storage diseases. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 1770–1781.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., and Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 3852–3866.
- Paw, B.H., Tieu, P.T., Kaback, M.M., Lim, J., and Neufeld, E.F. (1990). Frequency of three Hex A mutant alleles among Jewish and non-Jewish carriers identified in a Tay-Sachs screening program. *Am. J. Hum. Genet.* *47*, 698–705.
- Pelled, D., Lloyd-Evans, E., Riebeling, C., Jeyakumar, M., Platt, F.M., and Futerman, A.H. (2003). Inhibition of Calcium Uptake via the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in a Mouse Model of Sandhoff Disease and Prevention by Treatment with N-Butyldeoxynojirimycin. *J. Biol. Chem.* *278*, 29496–29501.
- Penati, R., Fumagalli, F., Calbi, V., Bernardo, M.E., and Aiuti, A. (2017). Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccharidosis I. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1–12.
- Perry, V.H., Bolton, S.J., Anthony, D.C., and Betmouni, S. (1998). The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration. *Res. Immunol.* *149*, 721–725.
- Phaneuf, D., Wakamatsu, N., Huang, J.-Q., Borowski, A., Peterson, A.C., Fortunato, S.R., Ritter, G., Igdoura, S.A., Morales, C.R., Benoit, G., et al. (1996). Dramatically Different

Phenotypes in Mouse Models of Human Tay-Sachs and Sandhoff Diseases. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1–14.

Pien, G.C., Basner-Tschakarjan, E., Hui, D.J., Mentlik, A.N., Finn, J.D., Hasbrouck, N.C., Zhou, S., Murphy, S.L., Maus, M.V., Mingozzi, F., et al. (2009). Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *J. Clin. Invest.* 119, 1688–1695.

Pincheira, R., Castro, A.F., Ozes, O.N., Idumalla, P.S., and Donner, D.B. (2008). Type 1 TNF Receptor Forms a Complex with and Uses Jak2 and c-Src to Selectively Engage Signaling Pathways That Regulate Transcription Factor Activity. *J. Immunol.* 181, 1288–1298.

Platt, F.M., Neises, G.R., Reinkensmeier, G., Townsend, M.J., Perry, V.H., Proia, R.L., Winchester, B., Dwek, R.A., and Butters, T.D. (1997). Prevention of Lysosomal Storage in Tay-Sachs Mice Treated with *N*-Butyldeoxynojirimycin. *Science* 276, 428–431.

Platt, F.M., Boland, B., and van der Spoel, A.C. (2012). Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.* 199, 723–734.

Prinetti, A., Iwabuchi, K., and Hakomori, S. (1999). Glycosphingolipid-enriched signaling domain in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. Mechanism of ganglioside-dependent neuritogenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 20916–20924.

Prinetti, A., Prioni, S., Chiricozzi, E., Schuchman, E.H., Chigorno, V., and Sonnino, S. (2011). Secondary Alterations of Sphingolipid Metabolism in Lysosomal Storage Diseases. *Neurochem. Res.* 36, 1654–1668.

Rahman, M.M., Chang, H.-S., Mizukami, K., Hossain, M.A., Yabuki, A., Tamura, S., Kitagawa, M., Mitani, S., Higo, T., Uddin, M.M., et al. (2012). A frameshift mutation in the canine HEXB gene in toy poodles with GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff disease). *Vet. J.* 194, 412–416.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 90, 1383–1435.

Reddy, A., Caler, E.V., and Andrews, N.W. (2001). Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell* 106, 157–169.

Régulier, E., Schneider, B.L., Déglon, N., Beuzard, Y., and Aebischer, P. (1998). Continuous delivery of human and mouse erythropoietin in mice by genetically engineered polymer encapsulated myoblasts. *Gene Ther.* 5, 1014–1022.

Renaud, D., and Brodsky, M. (2016). GM2-Gangliosidosis, AB Variant: Clinical, Ophthalmological, MRI, and Molecular Findings. *JIMD Rep.* 25, 83–86.

Ribera, A., Haurigot, V., Garcia, M., Marcó, S., Motas, S., Villacampa, P., Maggioni, L., León, X., Molas, M., Sánchez, V., et al. (2015). Biochemical, histological and functional correction of mucopolysaccharidosis Type IIIB by intra-cerebrospinal fluid gene therapy. *Hum. Mol. Genet.* 24, 2078–2095.

- Rockwell, H.E., McCurdy, V.J., Eaton, S.C., Wilson, D.U., Johnson, A.K., Randle, A.N., Bradbury, A.M., Gray-Edwards, H.L., Baker, H.J., Hudson, J.A., et al. (2015). AAV-Mediated Gene Delivery in a Feline Model of Sandhoff Disease Corrects Lysosomal Storage in the Central Nervous System. *ASN Neuro* 7.
- Rubinsztein, D.C., Codogno, P., and Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 709–730.
- Ruzo, A., Marcó, S., García, M., Villacampa, P., Ribera, A., Ayuso, E., Maggioni, L., Mingozzi, F., Haurigot, V., and Bosch, F. (2012). Correction of Pathological Accumulation of Glycosaminoglycans in Central Nervous System and Peripheral Tissues of MPSIIIA Mice Through Systemic AAV9 Gene Transfer. *Hum. Gene Ther.* 23, 1237–1246.
- Sabourdy, F., Astudillo, L., Colacios, C., Dubot, P., Mrad, M., Ségui, B., Andrieu-Abadie, N., and Levade, T. (2015). Monogenic neurological disorders of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 1040–1051.
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 623–635.
- Sandhoff, K., and Harzer, K. (2013). Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *J. Neurosci.* 33, 10195–10208.
- Sango, K., Yamanaka, S., Hoffmann, A., Okuda, Y., Grinberg, A., Westphal, H., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Sandhoff, K., Suzuki, K., et al. (1995). Mouse models of Tay–Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nat. Genet.* 11, 170–176.
- dos Santos, M.R., Tanaka, A., Sá Miranda, M.C., Ribeiro, M.G., Maia, M., and Suzuki, K. (1991). GM2-gangliosidosis B1 variant: analysis of beta-hexosaminidase alpha gene mutations in 11 patients from a defined region in Portugal. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 886–890.
- Saraiva, J., Nobre, R.J., and Pereira de Almeida, L. (2016). Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. *J. Controlled Release* 241, 94–109.
- Sardiello, M., Palmieri, M., Ronza, A. di, Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Malta, C.D., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science* 325, 473–477.
- Sargeant, T.J., Wang, S., Bradley, J., Smith, N.J.C., Raha, A.A., McNair, R., Ziegler, R.J., Cheng, S.H., Cox, T.M., and Cachón-González, M.B. (2011). Adeno-associated virus-mediated expression of β -hexosaminidase prevents neuronal loss in the Sandhoff mouse brain. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4371–4380.
- Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1103–1130.
- Schengrund, C.-L. (2015). Gangliosides: glycosphingolipids essential for normal neural development and function. *Trends Biochem. Sci.* 40, 397–406.

- Schepers, U., Glombitza, G., Lemm, T., Hoffmann, A., Chabas, A., Ozand, P., and Sandhoff, K. (1996). Molecular analysis of a GM2-activator deficiency in two patients with GM2-gangliosidosis AB variant. *Am. J. Hum. Genet.* *59*, 1048–1056.
- Schröder, M., Schnabel, D., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (1991). A mutation in the gene of a glycolipid-binding protein (GM2 activator) that causes GM2-gangliosidosis variant AB. *FEBS Lett.* *290*, 1–3.
- Schröder, M., Schnabel, D., Hurwitz, R., Young, E., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (1993). Molecular genetics of GM2-gangliosidosis AB variant: a novel mutation and expression in BHK cells. *Hum. Genet.* *92*, 437–440.
- Settembre, C., Fraldi, A., Jahreiss, L., Spampinato, C., Venturi, C., Medina, D., Pablo, R. de, Tacchetti, C., Rubinsztein, D.C., and Ballabio, A. (2008). A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 119–129.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* *332*, 1429–1433.
- Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., et al. (2012). A lysosome- to- nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* *31*, 1095–1108.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013a). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 283–296.
- Settembre, C., Cegli, R.D., Mansueto, G., Saha, P.K., Vetrini, F., Visvikis, O., Huynh, T., Carissimo, A., Palmer, D., Klisch, T.J., et al. (2013b). TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat. Cell Biol.* *15*, 647.
- Seyrantepe, V., Canuel, M., Carpentier, S., Landry, K., Durand, S., Liang, F., Zeng, J., Caqueret, A., Gravel, R.A., Marchesini, S., et al. (2008). Mice deficient in Neu4 sialidase exhibit abnormal ganglioside catabolism and lysosomal storage. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1556–1568.
- Seyrantepe, V., Lema, P., Caqueret, A., Dridi, L., Bel Hadj, S., Carpentier, S., Boucher, F., Levade, T., Carmant, L., Gravel, R.A., et al. (2010). Mice Doubly-Deficient in Lysosomal Hexosaminidase A and Neuraminidase 4 Show Epileptic Crises and Rapid Neuronal Loss. *PLoS Genet.* *6*.
- Simonato, M., Bennett, J., Boulis, N.M., Castro, M.G., Fink, D.J., Goins, W.F., Gray, S.J., Lowenstein, P.R., Vandenberghe, L.H., Wilson, T.J., et al. (2013). Progress in gene therapy for neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* *9*, 277–291.
- Simpson, M.A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D.A., Neville, D.C.A., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., et al. (2004). Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat. Genet.* *36*, 1225–1229.

- Smith, D., Wallom, K.-L., Williams, I.M., Jeyakumar, M., and Platt, F.M. (2009). Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Neurobiol. Dis.* 36, 242–251.
- Song, W., Wang, F., Lotfi, P., Sardiello, M., and Segatori, L. (2014). 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Promotes Transcription Factor EB-mediated Activation of Autophagy: IMPLICATIONS FOR THERAPY. *J. Biol. Chem.* 289, 10211–10222.
- Spampanato, C., De Leonibus, E., Dama, P., Gargiulo, A., Fraldi, A., Sorrentino, N.C., Russo, F., Nusco, E., Auricchio, A., Surace, E.M., et al. (2011). Efficacy of a Combined Intracerebral and Systemic Gene Delivery Approach for the Treatment of a Severe Lysosomal Storage Disorder. *Mol. Ther.* 19, 860–869.
- Spampanato, C., Feeney, E., Li, L., Cardone, M., Lim, J.-A., Annunziata, F., Zare, H., Polishchuk, R., Puertollano, R., Parenti, G., et al. (2013a). Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol. Med.* 5, 691–706.
- Spampanato, C., Feeney, E., Li, L., Cardone, M., Lim, J.-A., Annunziata, F., Zare, H., Polishchuk, R., Puertollano, R., Parenti, G., et al. (2013b). Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol. Med.* 5, 691–706.
- Stein, A., Stroobants, S., Gieselmann, V., D’Hooge, R., and Matzner, U. (2015). Anti-inflammatory Therapy With Simvastatin Improves Neuroinflammation and CNS Function in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. *Mol. Ther.* 23, 1160–1168.
- Stirling, D.P. (2004). Minocycline Treatment Reduces Delayed Oligodendrocyte Death, Attenuates Axonal Dieback, and Improves Functional Outcome after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* 24, 2182–2190.
- Suzuki, K., Yamaguchi, A., Yamanaka, S., Kanzaki, S., Kawashima, M., Togo, T., Katsuse, O., Koumitsu, N., Aoki, N., Iseki, E., et al. (2016). Accumulated α -synuclein affects the progression of GM2 gangliosidosis. *Exp. Neurol.* 284, Part A, 38–49.
- Takamura, A., Higaki, K., Kajimaki, K., Otsuka, S., Ninomiya, H., Matsuda, J., Ohno, K., Suzuki, Y., and Nanba, E. (2008). Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine GM1-gangliosidosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 616–622.
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J. Biol. Chem.* 281, 21362–21368.
- Tallaksen, C.M.E., and Berg, J.E. (2009). Miglustat therapy in juvenile Sandhoff disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 32, 289–293.
- Tanguy, Y., Biferi, M.G., Besse, A., Astord, S., Cohen-Tannoudji, M., Marais, T., and Barkats, M. (2015). Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice. *Front. Mol. Neurosci.* 8.
- Thomas, M., and Jankovic, J. (2004). Neurodegenerative disease and iron storage in the brain. *Curr. Opin. Neurol.* 17, 437–442.

- Thomsen, G.M., Gowing, G., Latter, J., Chen, M., Vit, J.-P., Staggenborg, K., Avalos, P., Alkaslasi, M., Ferraiuolo, L., Likhite, S., et al. (2014). Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 15587–15600.
- Torres, P.A., Zeng, B.J., Porter, B.F., Alroy, J., Horak, F., Horak, J., and Kolodny, E.H. (2010). Tay-Sachs disease in Jacob sheep. *Mol. Genet. Metab.* *101*, 357–363.
- Triggs-Raine, B., Mahuran, D.J., and Gravel, R.A. (2001). Naturally occurring mutations in GM2 gangliosidosis: a compendium. *Adv. Genet.* *44*, 199–224.
- Tropak, M.B., Reid, S.P., Guiral, M., Withers, S.G., and Mahuran, D. (2004). Pharmacological Enhancement of β -Hexosaminidase Activity in Fibroblasts from Adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients. *J. Biol. Chem.* *279*, 13478–13487.
- Tropak, M.B., Zhang, J., Yonekawa, S., Rigat, B.A., Aulakh, V.S., Smith, M.R., Hwang, H.-J., Ciufolini, M.A., and Mahuran, D.J. (2015). Pyrimethamine Derivatives: Insight into Binding Mechanism and Improved Enhancement of Mutant β -N-acetylhexosaminidase Activity. *J. Med. Chem.* *58*, 4483–4493.
- Tse, L.V., Moller-Tank, S., and Asokan, A. (2015). Strategies to circumvent humoral immunity to adeno-associated viral vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* *15*, 845–855.
- Tsunemi, T., Ashe, T.D., Morrison, B.E., Soriano, K.R., Au, J., Vázquez Roque, R.A., Lazarowski, E.R., Damian, V.A., Masliah, E., and La Spada, A.R. (2012). PGC-1 α rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Sci. Transl. Med.* *4*, 142ra97.
- Utz, J.R., Crutcher, T., Schneider, J., Sorgen, P., and Whitley, C.B. (2015). Biomarkers of Central Nervous System Inflammation in Infantile and Juvenile Gangliosidoses. *Mol. Genet. Metab.* *114*, 274.
- Valori, C.F., Ning, K., Wyles, M., Mead, R.J., Grierson, A.J., Shaw, P.J., and Azzouz, M. (2010). Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Sci. Transl. Med.* *2*, 35ra42.
- Vergarajauregui, S., Connelly, P.S., Daniels, M.P., and Puertollano, R. (2008). Autophagic dysfunction in mucopolisidosis type IV patients. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 2723–2737.
- Villamizar-Schiller, I.T., Pabón, L.A., Hufnagel, S.B., Serrano, N.C., Karl, G., Jefferies, J.L., Hopkin, R.J., and Prada, C.E. (2015). Neurological and cardiac responses after treatment with miglustat and a ketogenic diet in a patient with Sandhoff disease. *Eur. J. Med. Genet.* *58*, 180–183.
- Vite, C.H., Passini, M.A., Haskins, M.E., and Wolfe, J.H. (2003). Adeno-associated virus vector-mediated transduction in the cat brain. *Gene Ther.* *10*, 1874–1881.
- Wada, R., Tiffit, C.J., and Proia, R.L. (2000). Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 10954–10959.

- Walia, J.S., Altaleb, N., Bello, A., Kruck, C., LaFave, M.C., Varshney, G.K., Burgess, S.M., Chowdhury, B., Hurlbut, D., Hemming, R., et al. (2015). Long-Term Correction of Sandhoff Disease Following Intravenous Delivery of rAAV9 to Mouse Neonates. *Mol. Ther.* *23*, 414.
- Walkley, S.U., and Vanier, M.T. (2009). Pathomechanisms in Lysosomal Storage Disorders. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 726–736.
- Wang, Y., and Qin, Z.-H. (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *15*, 1382–1402.
- Weismann, C.M., Ferreira, J., Keeler, A.M., Su, Q., Qui, L., Shaffer, S.A., Xu, Z., Gao, G., and Sena-Esteves, M. (2015). Systemic AAV9 gene transfer in adult GM1 gangliosidosis mice reduces lysosomal storage in CNS and extends lifespan. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 4353–4364.
- Wendeler, M., Hoernschemeyer, J., Hoffmann, D., Kolter, T., Schwarzmann, G., and Sandhoff, K. (2004). Photoaffinity labelling of the Human GM2-activator protein. *Eur. J. Biochem.* *271*, 614–627.
- Wortmann, S.B., Lefeber, D.J., Dekomien, G., Willemsen, M. a. a. P., Wevers, R.A., and Morava, E. (2009). Substrate deprivation therapy in juvenile Sandhoff disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* *32*, 307–311.
- Wu, Y.-P., and Proia, R.L. (2004). Deletion of macrophage-inflammatory protein 1 α retards neurodegeneration in Sandhoff disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8425–8430.
- Wu, Y.-P., Mizugishi, K., Bektas, M., Sandhoff, R., and Proia, R.L. (2008). Sphingosine kinase 1/S1P receptor signaling axis controls glial proliferation in mice with Sandhoff disease. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 2257–2264.
- Xiao, X., Xiao, W., Li, J., and Samulski, R.J. (1997). A novel 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adeno-associated virus life cycle. *J. Virol.* *71*, 941–948.
- Yamaguchi, A., Katsuyama, K., Nagahama, K., Takai, T., Aoki, I., and Yamanaka, S. (2004). Possible role of autoantibodies in the pathophysiology of GM2 gangliosidosis. *J. Clin. Invest.* *113*, 200–208.
- Yamanaka, S., Johnson, M.D., Grinberg, A., Westphal, H., Crawley, J.N., Taniike, M., Suzuki, K., and Proia, R.L. (1994). Targeted disruption of the Hexa gene results in mice with biochemical and pathologic features of Tay-Sachs disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 9975–9979.
- Yamato, O., Matsuki, N., Satoh, H., Inaba, M., Ono, K., Yamasaki, M., and Maede, Y. (2002). Sandhoff disease in a golden retriever dog. *J. Inherit. Metab. Dis.* *25*, 319–320.
- Yamato, O., Hayashi, D., Satoh, H., Shoda, T., Uchida, K., Nakayama, H., Sakai, H., Masegi, T., Murai, A., Iida, T., et al. (2008). Retrospective diagnosis of feline GM2 gangliosidosis variant 0 (Sandhoff-like disease) in Japan: possible spread of the mutant allele in the Japanese domestic cat population. *J. Vet. Med. Sci.* *70*, 813–818.

- Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., et al. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465, 942–946.
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011). Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—An overview. *J. Oleo Sci.* 60, 537.
- Zabner, J., Wadsworth, S.C., Smith, A.E., and Welsh, M.J. (1996). Adenovirus-mediated generation of cAMP-stimulated Cl⁻ transport in cystic fibrosis airway epithelia in vitro: effect of promoter and administration method. *Gene Ther.* 3, 458–465.
- Zeng, B.J., Torres, P.A., Viner, T.C., Wang, Z.H., Raghavan, S.S., Alroy, J., Pastores, G.M., and Kolodny, E.H. (2008). Spontaneous appearance of Tay-Sachs disease in an animal model. *Mol. Genet. Metab.* 95, 59–65.
- Zhang, G., Lehmann, H.C., Manoharan, S., Hashmi, M., Shim, S., Ming, G.-L., Schnaar, R.L., Lopez, P.H., Bogdanova, N., and Sheikh, K.A. (2011). Anti-ganglioside antibody-mediated activation of RhoA induces inhibition of neurite outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 1664–1675.
- Zhong, L., Li, B., Mah, C.S., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., Cooper, M., Herzog, R.W., Zolotukhin, I., Warrington, K.H., Weigel-Van Aken, K.A., et al. (2008). Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: Point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7827–7832.
- Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y.-P., Yamashita, T., et al. (2004). Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells. *Science* 306, 1786–1789.
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the Vacuolar H⁺-ATPase. *Science* 334, 678–683.

Résumé

La maladie de Sandhoff est une maladie génétique rare due à des mutations du gène *HEXB*. Elle se caractérise par un double déficit en hexosaminidase A ($\alpha\beta$) et B ($\beta\beta$), responsable d'une accumulation de ganglioside GM2 essentiellement dans le système nerveux central (SNC). Cliniquement, la maladie débute dès les premiers mois de vie et le décès survient vers l'âge de 3 ans. A ce jour, aucun traitement n'est disponible pour cette maladie. Le modèle murin obtenu par invalidation du gène *Hexb* est un bon outil pour le développement d'approches thérapeutiques, car il présente un phénotype proche de la maladie humaine.

Le but principal de mon projet de thèse était d'explorer une approche de transfert de gène dans le modèle murin de la maladie de Sandhoff en utilisant un vecteur scAAV9. Ce vecteur a la particularité de pouvoir traverser la barrière hématoencéphalique et de transduire le SNC après administration intraveineuse (IV). Un vecteur codant la chaîne β des hexosaminidases, appelé scAAV9-Hexb, a précédemment été administré par voie IV à des souris en période néonatale à une dose de $3,5 \times 10^{13}$ vg/kg. Les souris traitées ont survécu comme les souris normales (>700 jours) sans développer d'atteinte neurologique, ni périphérique alors que les souris Sandhoff non traitées sont décédées vers l'âge de 4 mois. J'ai réalisé toutes les analyses à long terme des souris traitées en utilisant des tests de comportements, ainsi que des analyses tissulaires 24 mois après le traitement. Une analyse lipidique par HPTLC a montré que la surcharge en ganglioside GM2 est totalement absente au niveau du cerveau (4 mois après l'injection), alors que dans le cervelet cette accumulation est non significative, mais pas totalement absente. Aucun symptôme lié à cette surcharge n'a été mis en évidence chez les souris à 24 mois, mais nous nous sommes posés la question d'un possible effet délétère à long terme en cas d'extrapolation à la clinique.

Nous avons donc décidé de tester une double administration IV + ICV (intracérébroventriculaire) en utilisant le même vecteur et la même dose globale de façon à mieux corriger le cervelet. Deux groupes de souris ont été injectés en période néonatale en utilisant des doses différentes dans les deux compartiments. Les analyses ont montré que dans le cerveau, à court terme, la restauration de l'activité enzymatique est partielle, mais significative. Par ailleurs, il existe une absence totale de surcharge en GM2, ainsi qu'une correction des biomarqueurs associés à la maladie. Dans le cervelet, l'efficacité du traitement a été montrée seulement pour le groupe traité avec la dose la plus importante en ICV, ce qui suggère qu'une dose minimale en ICV est nécessaire pour atteindre de manière globale le SNC. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse à long terme. Concernant le foie, nos résultats ont montré qu'une dose IV minimale est nécessaire pour obtenir une baisse de l'accumulation lipidique. Ce travail a permis de définir les doses minimales nécessaires dans chaque compartiment (IV et ICV) et il montre que la double administration peut être avantageuse pour traiter toutes les régions du SNC et notamment les plus atteintes, comme le cervelet. Il va maintenant nous permettre de traiter de façon optimale les souris adultes.

L'autre but de mon projet était d'explorer les défauts de signalisation et la physiopathologie cellulaire dans la maladie de Sandhoff en utilisant des études *in vivo* et *in vitro*. Les études *in vitro* ont été réalisées sur des fibroblastes de patients et des cellules embryonnaires murines (MEF) obtenues à partir des souris *Hexb*^{-/-} et la surcharge lysosomale a été confirmée dans ces cellules. La voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) a été analysée et nous avons montré qu'elle était dérégulée. L'activité autophagique a aussi été étudiée et nous avons mis en évidence une augmentation du nombre d'autophagosomes chez les souris *Hexb*^{-/-} suggérant un défaut de cette voie. Ces résultats apportent de nouveaux biomarqueurs qui pourront être utilisés pour tester l'efficacité des thérapies dans la maladie de Sandhoff. Ils nous offrent également de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient être testées en combinaison avec le transfert de gène.