



HAL
open science

Compréhension de la neurophysiopathologie de l'ataxie de Friedreich et développement d'une approche de thérapie génique dans un nouveau modèle murin

Charline de Montigny

► **To cite this version:**

Charline de Montigny. Compréhension de la neurophysiopathologie de l'ataxie de Friedreich et développement d'une approche de thérapie génique dans un nouveau modèle murin. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ051 . tel-02125274

HAL Id: tel-02125274

<https://theses.hal.science/tel-02125274v1>

Submitted on 10 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 DE STRASBOURG

École doctorale des sciences de la vie et de la santé
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THÈSE présentée par : Charline de MONTIGNY

Soutenue le 12 septembre 2018

pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Strasbourg
discipline/spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Compréhension de la neurophysiopathologie
de l'ataxie de Friedreich et
développement d'une approche de thérapie génique
dans un nouveau modèle murin.

Mme le Dr Hélène PUCCIO

Directrice de thèse

Mme le Dr Anna BUJ BELLO

Rapporteur externe

M. le Pr Massimo PANDOLFO

Rapporteur externe

M. le Dr Luc DUPUIS

Examineur

« La science, mon garçon est faite d'erreurs, mais d'erreurs qu'il est bon de commettre,
car elles mènent peu à peu à la vérité. »

Voyage au centre de la Terre, Jules Vernes

Remerciements

J'ai souvent trouvé les remerciements d'une thèse longs, je comprends maintenant pourquoi...

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, le **Dr Hélène Puccio**. Hélène, merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire en M2, et de m'avoir ensuite permis de faire ce doctorat, sans lequel je ne serais pas la même aujourd'hui. Merci pour tes conseils et pour la liberté que tu m'as laissée. Et un grand merci de m'avoir offert la possibilité de présenter lors d'évènements grands publics et symposiums, ces moments ont été pour moi particulièrement enrichissants et motivants.

Je remercie tout particulièrement les membres de mon jury, le **Dr Ana Buj Bello** et le **Pr Massimo Pandolfo** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche en tant que rapporteurs et de m'accorder un temps précieux pour lire ce manuscrit. Un grand merci également au **Dr Luc Dupuis**, examinateur de cette thèse. Luc, merci pour tes conseils lors de ma mi-thèse et pour ton soutien et tes encouragements à chacune de nos rencontres ! Merci aussi au **Dr Carla Taveggia** pour son analyse et aide précieuse à ma mi-thèse.

Je remercie grandement l'**AFAF** pour le financement de ma quatrième année de thèse et pour les moments riches en émotions lors des différentes rencontres. Merci aussi à la **Famille Lurton** pour le financement d'une partie de ce doctorat. Au **Dr Isabelle Husson**, merci beaucoup pour les échanges que nous avons eu récemment sur la clinique de l'ataxie de Friedreich et la recherche en général, qui m'ont été d'une grande aide pendant la rédaction de cette thèse. Je remercie très sincèrement l'ensemble des **patients Friedreich** que j'ai rencontré au cours de ma thèse. Les échanges et discussions que nous avons partagés m'ont donné une force et une motivation supplémentaires, essentielles à la réussite de ce beau projet.

Bien évidemment, je remercie l'ensemble de l'**équipe Puccio**, depuis le début de l'aventure jusqu'à maintenant (Alain, Aurélie, Françoise, Laura, Laurence, Pankaj, Nadège, Odile, Olivier, Tiphaine, Yiannis,...). Merci pour vos conseils et votre aide, tout au long du projet, pour la mise en place des protocoles, l'interprétation des résultats mais aussi plus récemment, merci pour votre soutien pendant les rédactions de l'article et de ce manuscrit. **Nadège**, j'ai adoré travailler avec toi ! D'abord merci de m'avoir appris de si nombreuses techniques, d'avoir si souvent aidé la petite M2 et la jeune doctorante que j'étais à l'époque. Ton calme et ta gentillesse, de premier abord, puis ton humour ont été essentiels pour moi. Merci de me pousser à prendre confiance en moi ! **Auréli**e, merci pour ton aide pour la dernière partie du projet et ces longues heures de dissections, de dissociations et de FACS à essayer d'avoir des cellules vivantes ! J'associerai éternellement certaines musiques hautement intellectuelles (J'kiffe la vibes !) aux longues dissections de DRG. Merci pour ton éternelle bonne humeur, ton sourire et

ta folie qui égayent tellement le labo ! **Nadège** et **Aurélie**, plus que des collègues de travail, vous êtes, au fur et à mesure, devenues des amies, vous m'avez tellement encouragée, soutenue, et remonté le moral (merci pour tout le chocolat !), ces années auraient été bien plus difficiles sans vous, votre rôle dans la réussite de cette thèse est juste énorme. Restez comme vous êtes, et les futurs doctorants de l'équipe HP auront de la chance de travailler avec vous ! Vous allez vraiment me manquer... **Olivier** et **Yiannis** (indissociables, bien évidemment), merci d'avoir été là ces deux dernières années, merci pour les nombreuses discussions scientifiques mais aussi les soirées géniales qu'on a passés ensemble ! Le congrès à Pise, entre autres, restera un des grands moments de ma thèse ! Olivier, merci d'avoir été présent sous la pluie et le froid au Vend'espoir, le week-end n'aurait pas été pareil sans toi. Les garçons, je vous souhaite tout le meilleur pour votre thèse (et j'espère que mon pot satisfera vos attentes !). Olivier je te laisse, je pense, un beau projet dans les mains, fais-en bon usage ;). **Tiphaine**, je t'avais demandé (ou plutôt j'avais réclamé) un paragraphe entier dans tes remerciements de thèse, je me dois donc de te dédier un paragraphe à mon tour. Tiph, juste 1000 mercis d'avoir été présente, au quotidien, au cours des trois premières années, à partager le fond du labo avec moi (cette année tu m'as sacrément manquée quand même !). Merci pour nos innombrables discussions scientifiques (« Tiph, pourquoi ça ne marche pas, comment je peux faire ? Tu interpréterais ça comment ? », « Et pourquoi je n'ai pas d'étoiles dans mes résultats ? J'aimerais bien des étoiles*** », « Comment je peux améliorer mon protocole ? », « Non Tiphaine ne tues pas ce bébé souris, il est trop mignon ») et non scientifiques également, avec des sourires et de la bonne humeur la plupart du temps mais aussi beaucoup de larmes... Merci pour ta gentillesse, ton calme et ta patience, j'en avais tellement besoin ! Et quand le laboratoire devient un terrain de jeux, merci **Odile** et **Tiphaine** pour ces moments de détente et d'expériences hautement scientifiques (souvent bien tard !). Sans cette bonne humeur ambiante, ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes.

Merci aux membres du département TMN pour les échanges enrichissants que nous avons partagés, en particulier **l'équipe Chelly-Mandel** pour tous les moments passés ensemble ! Mes longues heures au cryostat passaient bien plus vite avec vous juste à côté ! **Florent**, merci de m'avoir fait tant rire à chaque pause, pendant lesquelles le café coulait par litres (je n'ose pas imaginer le nombre de capsules de café utilisées ces dernières années) et merci de m'avoir conseillée pendant les moments plus difficiles. **Angélique**, un grand merci pour ton aide, ton grain de folie et nos nombreuses séances de psychologie (avec bien souvent pour fond de toile des dissections de souris !). Tes mots justes m'auront si souvent donné la force et la motivation pour continuer ! **Sam**, merci d'avoir été présente cette année, et merci pour «Julio », caché dans mon bureau pour les coups durs, and remember « just keep swimming, just keep swimming ».

Je remercie également l'ensemble des membres de l'IGBMC grâce à qui j'ai pu mener à bien ce projet, en particulier **Claudine** et **Muriel** pour le FACS, **Bernard** et **Céline** pour le séquençage, **Nadia** et **Jean-Luc** pour la microscopie électronique, **Gilles** et **Djemo** pour vous occuper si bien de nos souris... Un grand merci aussi aux **collègues du RU** avec qui j'ai passés des pauses déjeuner particulièrement agréables et dans la bonne humeur !

Concernant les à-côtés du laboratoire qui ont tellement enrichis mon doctorat :

Pascaline, je te remercie de m'avoir donné la possibilité d'enseigner les techniques biologiques en L1 au cours de mes deux premières années de thèse. Cette expérience m'a permis de me rendre compte de plein de choses et de ce que j'aime faire ! Les quelques heures de TP/TD par semaines étaient une bouffée d'air frais dans mon quotidien. Merci aussi à mon équipe des Doctoriales[®], les Exil3s (**Antoine, Cyriane, Boris, Damien, Thibault, Ehlam, Ali**), la semaine que nous avons passée ensemble était tellement intense et motivante ! On a vraiment formé une équipe de choc (et je maintiens qu'on méritait de gagner, la sleepbubble a de l'avenir). Merci à **Daniel Steck**, mon mentor NCT, merci pour tout ce que vous m'avez apporté et pour la prise de recul sur moi-même que j'ai dû prendre !

Je souhaite également dire un grand merci à **Bénédicte Ferlet** et **Joëlle Pugin**, sans votre enseignement passionnant et énergique des sciences de la vie au lycée, je ne serais pas allée en faculté de biologie et je ne serai pas là où j'en suis aujourd'hui !

Parce que sans humour la vie serait bien triste, une petite touche humoristique dans ces remerciements : j'ai une grosse pensée pour les nombreuses souris sacrifiées pour ce projet (je préfère ne pas compter !). Comme je l'ai si souvent répété un bûcher m'attend dans l'enfer des souris. Merci également aux Bleus pour ces moments de folie bleus, blancs, rouges qui ont fait rêver la France et qui ont illuminés plusieurs soirées pendant la rédaction de ce manuscrit en juillet !

Et parce que sans les amis et la famille la vie ne vaudrait pas le coup d'être vécue... (Ne pouvant pas écrire des remerciements de dizaines de pages, je tenterai de faire court mais vous savez tous à quel point vous avez été importants au cours de ma thèse !)

Aux « collègues de l'IGBMC » ou devrais-je dire aux copains de soirées, **Hélène, Loïc, Johan, Jérémie, Olivier, Thomas, Tim, Yiannis, Duygu + Justine, Bernadette, Lisa, Magali, Tiffany** (...), merci pour les nombreuses soirées qui permettent de se vider la tête, pour toutes les blagues et les merveilleux moments passés ensemble ! Certaines soirées resteront dans les annales ! **Docteur J** et **Docteur H**, je pourrais écrire tant de choses mais je ne sais pas par où commencer ! Vous avez été essentielles ces dernières années. Ju, on a partagé tellement de choses ensemble, simplement merci d'avoir été là, au quotidien à la salle de sport, en soirées, de m'avoir accompagnée au pays des éléphants et de m'avoir si souvent poussée à prendre du

recul sur le labo, sur la thèse, et sur la vie, je t'en suis tellement reconnaissante ! **Hélène**, ta joie de vivre et tes jérémiades incessantes ont grandement égayé ce doctorat ! Vivement les retrouvailles à Paris pour boire des diabolos menthe et des Monaco en terrasse.

Merci aussi à mes copines de toujours **Lucie, Lucy, Marion, Léa, Céline** ! **Lucy**, ma baroudeuse préférée, merci pour ces deux voyages extraordinaires passés ensemble pendant ma thèse. Continue de déménager aux quatre coins du monde pour me donner des «excuses » pour voyager ! Et s'il y a Lucy, forcément, **Marion** n'est pas loin, même en Indonésie ! Merci les filles d'être présentes depuis si longtemps dans ma vie et de m'avoir tant soutenue pendant cette thèse. À quand le prochain voyage ?? **Léa**, merci pour ces soirées, après-midis, goûters dès que tu reviens en Alsace ou en m'accueillant à Paris. Les années Fac sans toi n'auraient pas été les mêmes ! **Céline**, merci pour ton soutien indéfectible et pour cette passion commune que nous avons : HP.

Lucie, (merci pour le prêt du Marieb mais bon ça c'est un détail), merci d'avoir été présente tout au long de ma thèse, de t'être intéressée si souvent à ce que je faisais et d'avoir cru en moi en toutes circonstances et surtout MERCI pour ces 22 années d'amitiés que tu as merveilleusement bien couronné cette année (#meilleurecopinedumonde). Toi et **Romain** ne pouviez pas me faire de plus beau cadeau que de me demander d'être la marraine de Rafael (en écrivant ces quelques lignes j'ai les larmes aux yeux !). **Rafael**, te rendre visite depuis le 21 juin 2018 correspondait à des rayons de soleil pendant la rédaction de cette thèse...

Et bien évidemment, un grand merci à toute ma famille. **Renaud**, ô frère le plus merveilleux de l'univers, que serais-je sans toi ? Merci de me faire tant rire avec ton humour cru et décalé ! Chaque message (ou Snapchat) de ta part était un moment de détente tellement agréable dans mon quotidien. Tu m'as fait vivre un enfer quand nous étions petits, mais je suis ravie de t'avoir pour frère ! À **mes parents**, de tout cœur merci pour cette belle vie pleine d'amour que vous m'offrez depuis mon enfance, sans vous je ne serais pas là aujourd'hui ! Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans mes choix, de m'avoir ouverte au monde et poussée à être curieuse et à me poser éternellement des questions. **Papa**, merci d'avoir partagé avec moi ton goût pour la biologie et tout le reste ! Je suis tellement admirative de ton parcours, merci à toi et **Serge** d'avoir enseigné la génétique de manière si passionnée à la fac. En Terminale S quand je t'avais dit que je voulais faire la fac de biologie, je n'avais pas compris ta réponse « 14 de moyenne sinon rien !! », aujourd'hui je la comprends et je t'en remercie ! **Maman**, merci pour la fibre artistique que tu m'as donnée et pour ton côté complètement déjanté (sinon tu ne serais pas artiste après tout) ! Merci de m'avoir « forcée » à voir autre chose que le labo et la thèse ces dernières années, et de m'avoir fait réaliser que la vie est courte, alors autant en profiter !

Résumé

L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie mitochondriale caractérisée par une ataxie sensitive et spinocérébelleuse, une cardiomyopathie et du diabète, pour laquelle il n'existe pas de traitement. L'AF résulte de niveaux réduits de frataxine (FXN), une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des centres Fe-S. La neurophysiopathologie précise de la maladie n'est pas identifiée et malgré d'intenses progrès ces dernières années, il n'existait pas de bon modèle pour développer des approches thérapeutiques visant à stopper ou réverser l'atteinte sensitive de l'AF. Nous avons donc généré un nouveau modèle murin qui récapitule l'ataxie sensitive et la neuropathie associée au déficit en FXN. Plusieurs mécanismes moléculaires affectés en absence de FXN dans les neurones proprioceptifs, principalement affectés dans l'AF, ont pu être caractérisés. Nous avons également démontré l'efficacité d'une approche de thérapie génique, basée sur l'utilisation de vecteur adéno-associés (AAV) exprimant la FXN humaine, pour réverser la neuropathie, établissant la preuve de concept du potentiel d'une telle approche pour l'atteinte sensitive de l'AF.

Table des matières

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	8
Abréviations.....	9
Introduction.....	11
Chapitre 1 : L'ataxie de Friedreich.....	12
1. L'ataxie de Friedreich, une ataxie autosomique récessive.....	13
1.1. Définition d'une ataxie.....	13
1.2. Les ataxies cérébelleuses autosomiques récessives.....	13
1.3. Historique de la maladie et épidémiologie.....	14
2. La clinique de l'ataxie de Friedreich.....	16
2.1. Premiers symptômes de la maladie.....	16
2.2. Atteintes neurologiques.....	16
2.2.1. Signes cliniques de l'AF.....	16
2.2.2. Anatomopathologie de l'AF.....	19
2.3. Atteintes extra-neurologiques.....	30
2.4. Variabilité clinique.....	30
2.5. Espérance de vie et décès prématuré.....	31
3. L'ataxie de Friedreich, une maladie génétique.....	32
3.1. Mutations dans le gène <i>FXN</i>	32
3.1.1. Historique de l'identification du gène et expression du gène.....	32
3.1.2. Mutation majeure de l'AF : expansion de trinuécléotides GAA.....	33
3.1.3. Autres mutations.....	33
3.2. Conséquences de l'expansion GAA sur l'expression du gène <i>FXN</i>	35
3.2.1. Diminution de l'expression du gène.....	35
3.2.2. Mécanismes responsables de la diminution d'expression du gène <i>FXN</i>	35
3.3. Corrélation génotype/phénotype.....	36
4. La frataxine et son rôle dans les cellules.....	38
4.1. Description générale de la frataxine.....	38
4.2. Identification du rôle de la frataxine.....	38
4.3. La frataxine et la régulation de la biosynthèse des centres Fe-S.....	39
4.3.1. Les centres Fe-S et leurs rôles.....	39
4.3.2. La biosynthèse des centres Fe-S et le rôle de la frataxine.....	40

5.	La physiopathologie de l'ataxie de Friedreich	44
5.1.	Observations faites chez les patients	44
5.2.	Utilisation de modèles pour comprendre la physiopathologie	45
5.2.1.	Modèles mammifères animaux.....	46
5.2.2.	Modèles mammifères cellulaires	49
5.2.3.	Modèles non mammifères	50
5.3.	Physiopathologie acceptée pour l'AF et questions ouvertes	50
6.	Approches thérapeutiques pour l'AF	56
6.1.	Chélateurs de fer	56
6.2.	Amélioration de la fonction mitochondriale et diminution du stress oxydant.....	57
6.3.	Thérapies symptomatiques.....	58
6.4.	Modulation des voies métaboliques contrôlées par la frataxine.....	58
6.5.	Modulation des niveaux de frataxine	59
6.6.	Modulation de l'expression du gène <i>FXN</i>	60
6.7.	Thérapie génique.....	61
6.8.	Importance des approches paramédicales.....	62
Chapitre 2 : La thérapie génique.....		63
1.	La thérapie génique : principe et historique.....	64
1.1.	Principe de la thérapie génique.....	64
1.2.	Historique de la thérapie génique	64
1.3.	Éléments clés de la TG : les vecteurs	65
1.3.1.	Existe-t-il un vecteur idéal ?	65
1.3.2.	Les vecteurs viraux les plus utilisés.....	66
2.	Thérapies géniques basées sur l'utilisation d'AAV pour les maladies du système nerveux.....	71
2.1.	Voies d'administration pour cibler le système nerveux.....	72
2.1.1.	Injections intraparenchymales (IP).....	72
2.1.2.	Utilisation du LCR.....	72
2.1.3.	Injections intravasculaires (IV).....	73
2.2.	Les virus adéno-associés recombinants (AAVr).....	73
2.2.1.	Sérotype et tropisme des AAV.....	74
2.2.2.	Expression du transgène.....	78
2.2.3.	Réponse immunitaire face aux AAVr.....	78
2.3.	Production des AAV recombinants à grande échelle.....	81
2.3.1.	Transfection de plasmides d'ADN dans des cellules mammifères	82

2.3.2.	Infection de cellules d'insectes avec un Baculovirus recombinant	83
2.3.3.	Infection de cellules mammifères avec un Herpesvirus recombinant	83
2.3.4.	Lignées cellulaires mammifères stables	84
2.3.5.	Extraction et purification des AAVr et impuretés retrouvées dans les préparations.....	84
2.4.	Essais cliniques pour des maladies neurodégénératives basés sur l'utilisation d'AAV	86
2.4.1.	TG par injections intraparenchymales d'AAV.....	86
2.4.2.	TG par injection intrathécale ou intraveineuse d'AAV.....	88
3.	Thérapie génique et ataxie de Friedreich	90
3.1.	Faisabilité d'une TG pour l'ataxie de Friedreich ?	90
3.2.	Preuve de concept développée dans le laboratoire pour une thérapie génique cardiaque.....	90
3.2.1.	Vecteur utilisé pour TG pour l'ataxie de Friedreich dans le laboratoire	91
3.2.2.	Résultats obtenus pour la preuve de concept de la TG cardiaque dans le laboratoire.....	91
	Résultats	93
1.	Objectifs de mon projet de thèse	94
2.	Manuscrit « Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia».....	96
2.1.	Résumé du manuscrit.....	96
2.2.	Éléments établis préalablement et non publiés pour l'approche de TG.....	97
2.3.	Article.....	98
	Manuscrit.....	99
2.4.	Résultats complémentaires au manuscrit.....	100
2.4.1.	Expression du gène <i>Fxn</i> et de la frataxine	100
2.4.2.	Dérégulation de l'expression de la parvalbumine.....	101
2.4.3.	Déficit des protéines à centres Fe-S à des temps tardifs dans les DRG <i>Pvalb</i> cKO et correction partielle chez les <i>Pvalb</i> cKOAAV	102
2.4.4.	Evaluation du métabolisme du fer dans les DRG.....	103
2.4.5.	Gènes de stress classiquement associés à la déficience en frataxine	104
3.	Résultats complémentaires pour la caractérisation du modèle et l'étude de la neurophysiopathologie.....	105
3.1.	Mort prématurée des souris <i>Pvalb</i> cKO	105
3.2.	Analyse du transcriptome des DRG <i>Pvalb</i> cKO	105
3.3.	Domages axonaux et régénérescence axonale	107

3.3.1.	Activation de l'expression de gènes associés à la régénérescence.....	107
3.3.2.	Le facteur de transcription ATF3 et ses gènes cibles	108
3.4.	Neuropathie moléculaire présentée par les souris <i>Pvalb</i> cKO	109
4.	Isolement des neurones proprioceptifs pour leur analyse spécifique.....	112
4.1.	Souris <i>Pvalb</i> cKO <i>mT/mG</i>	112
4.2.	Isolement par FACS des neurones proprioceptifs des souris <i>Pvalb</i> cKO <i>mT/mG</i> ..	114
4.3.	Validation des populations isolées par FACS	115
4.4.	Stratégie expérimentale pour l'analyse NGS	116
	Discussion	118
1.	La neurophysiopathologie de l'ataxie de Friedreich et le modèle murin <i>Pvalb</i> cKO	119
1.1.	Modèle souris <i>Pvalb</i> cKO	119
1.2.	La spécificité cellulaire de l'AF et les niveaux de frataxine	120
1.3.	Éléments de la neurophysiopathologie de l'AF identifiés avec ce nouveau modèle murin	123
1.3.1.	Survie des neurones en absence de frataxine.....	123
1.3.2.	Activation secondaire de gènes de régénérescence dans les DRG	125
1.3.3.	Neuropathie sensitive progressive.....	126
1.3.4.	Diminution de l'expression de l'ARNm <i>Pvalb</i>	127
1.3.5.	Physiopathologie acceptée de l'AF.....	127
1.4.	Isolement des neurones proprioceptifs pour leur analyse spécifique.....	130
2.	Thérapie génique pour l'AF	133
2.1.	Approche pré-symptomatique de TG pour le modèle <i>Pvalb</i> cKO	133
2.2.	Approche post-symptomatique de Tg pour le modèle <i>Pvalb</i> cKO	133
2.3.	Approche de thérapie génique pour l'AF en général	136
2.3.1.	Optimisation du vecteur et voie d'administration	137
2.3.2.	Toxicité et réponse immunitaire.....	138
2.3.4.	Quels patients AF pour un essai clinique ?	139
2.3.5.	Coûts et financements de thérapies géniques ?.....	140
2.4.	Les approches thérapeutiques de l'AF en général.....	140
	Matériel et méthodes	143
	Références	148

Liste des figures

Figure 1 : Exemple d'algorithme utilisé par les cliniciens pour le diagnostic des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives.	14
Figure 2 : Gradient de prévalence de l'ataxie de Friedreich en Europe.....	15
Figure 3 : Elargissement du polygone de sustentation.....	17
Figure 4 : Organisation du système nerveux.....	19
Figure 5 : Les corps cellulaires des neurones sensitifs unipolaires sont localisés dans les DRG.....	21
Figure 6 : Substance grise de la moelle épinière.	23
Figure 7 : Substance blanche de la moelle épinière avec les différents faisceaux et tractus.....	23
Figure 8 : Architecture anatomique du cervelet.....	24
Figure 9 : Quelques faisceaux ascendants (sensitifs) et la chaîne de neurones associés.....	25
Figure 10 : Dégénérescence des larges neurones des DRG et neuropathie sensitive.....	27
Figure 11 : Atteinte de la moelle épinière et dégénérescence de différents faisceaux et noyaux.	28
Figure 12 : Atrophie du noyau dentelé du cervelet.....	29
Figure 13 : Localisation chromosomique et structure du gène <i>FXN</i>	32
Figure 14 : Différentes mutations du gène <i>FXN</i>	33
Figure 15 : Bases génétiques et moléculaire de l'AF.	35
Figure 16 : Hétérochromatinisation du locus <i>FXN</i> et déficience de l'initiation de la transcription.....	35
Figure 17 : Modèle pour le rôle des R-loops dans l'altération de la transcription du gène <i>FXN</i> et le silencing épigénétique du locus.	36
Figure 18 : Corrélation entre la taille de la plus petite expansion GAA et la durée de la maladie ou l'âge de décès chez les patients AF.	36
Figure 19 : Import mitochondrial et maturation de la frataxine humaine.	38
Figure 20 : Conservation et structure de la frataxine.....	38
Figure 21 : Structures des centres Fe-S les plus courants chez les mammifères.....	39
Figure 22 : Les protéines à centres Fe-S sont essentielles à de nombreux processus cellulaires.	39
Figure 23 : Régulation du métabolisme de fer par les centres Fe-S.....	40
Figure 24 : La biosynthèse des centres Fe-S dans les mitochondries.....	41
Figure 25 : Eléments physiopathologiques observés chez les patients AF.	44

Figure 26 : Génération de modèles murins conditionnels de l'ataxie de Friedreich.....	46
Figure 27 : Modèles murins de l'AF basés sur une expansion GAA.....	47
Figure 28 : Physiopathologie acceptée de l'AF.....	50
Figure 29 : Pipeline des traitements en cours de développement pour l'AF de leur découverte jusqu'à la mise sur le marché.....	56
Figure 30 : Les AAV sauvages et l'organisation de leur génome.....	68
Figure 31 : Mécanisme d'infection d'une cellule mammifère par un AAV.....	69
Figure 32 : Réplication du génome simple brin de l'AAV.....	70
Figure 33 : Méthodes d'administration des AAV avec les stratégies de TG <i>in vivo</i> dans le système nerveux et exemples d'essais cliniques en cours.....	72
Figure 34 : Principe de production des AAV recombinants.....	74
Figure 35 : Des variants d'AAV9 permettent une meilleure transduction du SNC et du SNP.	77
Figure 36 : Génome et génération des scAAV.....	78
Figure 37 : Réponse immunitaire adaptative contre la capsid des AAV.....	80
Figure 38 : Outils recombinants utilisés pour la génération des vecteurs viraux AAV9-FXN et AAVrh10-FXN.....	91
Figure 39 : Résumé des atteintes comportementales, physiologiques, histologiques et moléculaires des souris <i>Pvalb</i> cKO au cours du temps.....	96
Figure 40 : Comparaison de transduction de l'AAV9 et de l'AAVrh10 dans la substance blanche cérébelleuse.....	97
Figure 41 : Figure vulgarisée d'illustration de la publication.....	98
Figure 42 : Absence de corrélation entre les quantités d'ARNm <i>Fxn</i> et de FXN produites dans les DRG et le cervelet.....	100
Figure 43 : Dérégulation de l'expression de la parvalbumine dans les souris <i>Pvalb</i> cKO.....	101
Figure 44 : Déficit sévère de l'activité SDH à des temps tardifs dans les animaux <i>Pvalb</i> cKO et correction partielle suite au traitement post-symptomatique des souris.....	102
Figure 45 : Expression de TfR1 dans de nombreux neurones des DRG WT, <i>Pvalb</i> cKO et <i>Pvalb</i> cKOAAV et surexpression de la parvalbumine dans les neurones proprioceptifs des souris traitées.....	103
Figure 46 : Les DRG et le cervelet n'expriment pas différemment les gènes <i>Mthfd2</i> et <i>AsnS</i>	104
Figure 47 : RNAseq, matrice de corrélation des échantillons présentant les similarités générales du profil d'expression.....	105
Figure 48 : Schéma général d'activation de gènes associés à la régénérescence (RAG) en réponse aux dommages axonaux dans le système nerveux périphérique.....	107
Figure 49 : Expression des RAG <i>Atf3</i> et <i>Sprr1a</i> dans les DRG lombaires des souris <i>Pvalb</i> cKO en réponse aux dommages axonaux.....	108

Figure 50 : Expression des RAG <i>Atf3</i> et <i>Spr1a</i> dans les DRG suite aux traitements pré-symptomatique à 3,5 semaines et post-symptomatique à 7,5 semaines.	109
Figure 51 : La gaine de myéline dans le système nerveux périphérique.	110
Figure 52 : La neuropathie est associée à des déficiences dans l'expression de gènes de la myéline.....	111
Figure 53 : Génération d'une souris reporter double fluorescente : <i>Pvalb</i> cKO <i>mT/mG</i>	113
Figure 54 : Isolation des neurones proprioceptifs des DRG de souris <i>Pvalb Fxn mT/mG</i> par FACS.	114
Figure 55 : Validation moléculaire de l'isolation des neurones proprioceptifs des autres cellules des DRG.....	116
Figure 56 : Modèle potentiel du mécanisme de dégénérescence des axones du nerf sciatique des souris <i>Pvalb</i> cKO.	126
Figure 57 : Pipelines des traitements en cours de développement pour l'AF en 2008 et 2017.	142

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères diagnostiques pour l'ataxie de Friedreich établis par le Dr A. Harding en 1981.....	16
Tableau 2 : Fréquences des signes cliniques majeurs observés chez les patients AF dans différentes études cliniques.....	17
Tableau 3 : Liste des mutations ponctuelles identifiées dans le gène <i>FXN</i>	34
Tableau 4 : Comparaison des deux vecteurs viraux les plus utilisés en TG.	66
Tableau 5 : Sérotypes naturels d'AAV les plus communs avec leur récepteur primaire et leur profil de transduction du système nerveux central de mammifères.....	75
Tableau 6 : Méthodes de production des AAVr et contaminations associées.....	82
Tableau 7 : Essais cliniques basés sur des injections <i>in vivo</i> d'AAVr pour des maladies neurodégénératives.....	86
Tableau 8 : Gènes dérégulés dans les DRG de souris <i>Pvalb</i> cKO à 7,5s jouant un rôle dans la régénérescence axonale suite aux dommages axonaux périphériques ainsi que dans la myéline.....	106
Tableau 9 : Résultats d'isolation des cellules GFP+ par FACS.	115
Tableau 10 : Echantillons prévus pour l'analyse transcriptomique des neurones proprioceptifs isolés.....	117
Tableau 11 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les qPCR.....	144
Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés pour les immunofluorescences et les Western Blot des résultats supplémentaires au manuscrit.....	144

Abréviations

AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
AAVr	AAV recombinant
ACAR	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive
ADA-SCID	<i>Adenosine deaminase deficiency - severe combined immunodeficiency</i>
ADNc	ADN complémentaire
ADN db	ADN double brin
ADN sb	ADN simple brin
AF	Ataxie de Friedreich
ALD	Adrénoleucodystrophie
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
APP	<i>Assembly activated protein</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CIA	<i>Cytosolic iron sulfur cluster assembly</i>
cKO	<i>Conditionnal Knock-out</i>
CD	Cellules dendritiques
CP	Cellules de Purkinje
CS	Cellules de Schwann
DRG	<i>Dorsal root ganglion</i>
DRG Ce	DRG cervicaux
DRG Lu	DRG lombaires
DRG Th	DRG thoraciques
EMA	<i>European medicines agency</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FARR	<i>Friedreich ataxia with retained reflexes</i>
FARS	<i>Friedreich ataxia rating scale</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
Fe-S	Fer-soufre
FXN	Frataxine
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GMP	<i>Good manufacturing practice</i>
HSV	Herpesvirus
ICARS	<i>International cooperative ataxia rating scale</i>
IF	Immunofluorescence
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cell</i>
Injection IC	Injection intracérébrale
Injection ICV	Injection intracérébroventriculaire
Injection IP	Injection intraparenchymale

Injection IT	Injection intrathécale
Injection IV	Injection intraveineuse/intravasculaire
IRE	<i>Iron responsive element</i>
IRP1	<i>Iron regulatory protein 1</i>
ITR	<i>Inverted terminal repeats</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LOFA	<i>Late onset Friedreich ataxia</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
LV	Lentivirus
MAG	<i>Myelin associates glycoprotein</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MCK	<i>Muscle creatine kinase</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MLD	<i>Metachromatic leukodystrophy</i>
MPP	<i>Mitochondrial protein peptidase</i>
MPSIIIA/B	Mucopolysaccharidose de type IIIA/B
MPZ	<i>Myelin protein zero</i>
NGS	<i>Next Generation sequencing</i>
NSE	<i>Neuron specific enolase</i>
PFA	Paraformaldéhyde
Prp	<i>Prion protein</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
PVALB	Parvalbumine
RAG	<i>Regeneration associated genes</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SARA	<i>Scale for the assessment and rating of ataxia</i>
scAAV	<i>Self complementary AAV</i>
SCID-X1	<i>X-linked severe combined immunodeficiency</i>
SDH	Succinate déshydrogénase
SMA	<i>Spinal muscular atrophy</i>
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TG	Thérapie génique
vg	Vecteur génome
VLOFA	<i>Very late onset Friedreich ataxia</i>
WB	Western Blot
WT	<i>Wild-type</i>

Introduction



Chapitre 1 : L'ataxie de Friedreich



1. L'ataxie de Friedreich, une ataxie autosomique récessive

1.1. Définition d'une ataxie

Etymologiquement, le mot ataxie tire ses origines du grec ancien *ataxía*, dérivé du mot *táxis* (« ordre ») précédé du *a* privatif, signifiant littéralement désordre. Une ataxie se définit par un manque de coordination des mouvements et une instabilité, dus à une atteinte du cervelet et/ou des voies spinocérébelleuses (Anheim et al., 2012a). L'ataxie sera dite proprioceptive si les voies sensitives profondes centrales ou périphériques sont affectées et spinocérébelleuse en cas d'atteinte des faisceaux spinocérébelleux, de la moelle épinière, des pédoncules cérébelleux et/ou du cervelet. Ces atteintes se manifestent par de nombreux signes cliniques avec des troubles de la marche et de l'équilibre (démarche dite ébrieuse), une hypermétrie (mouvements volontaires trop longs), des mouvements saccadés, une adiadococinésie (difficultés à exécuter rapidement des mouvements alternatifs), une dysarthrie (troubles de l'articulation) et des troubles de l'oculomotricité (Anheim et al., 2012a). Les ataxies peuvent être d'origine génétique ou acquises. Les ataxies héréditaires sont réparties en trois groupes en fonction de leur mode de transmission : les ataxies autosomiques récessives, les ataxies autosomiques dominantes et les ataxies liées à l'X. Les ataxies non génétiques (ou acquises) apparaissent de manière rapide et aiguë et peuvent être d'origines très variées tel qu'une consommation excessive d'alcool, une déficience en vitamine B1, une intoxication médicamenteuse, des agents toxiques, une attaque cérébelleuse ischémique ou hémorragique, une méningite ou encore des abcès cérébelleux (Anheim et al., 2012a).

1.2. Les ataxies cérébelleuses autosomiques récessives

Les ataxies cérébelleuses autosomiques récessives (ACARs) sont des maladies neurodégénératives invalidantes très hétérogènes et complexes qui affectent principalement les enfants et les jeunes adultes. Une ACAR est envisagée lorsqu'une ataxie progressive et irréversible apparaît avant l'âge de 30 ans. Le syndrome ataxique est généralement associé à d'autres troubles neurologiques et extra-neurologiques tel qu'une neuropathie périphérique avec une diminution ou une absence des réflexes tendineux et une diminution du sens vibratoire dans les chevilles, des mouvements anormaux, une dysfonction pyramidale, une spasticité et une hyperlaxité, de l'épilepsie ou encore un retard mental. La grande hétérogénéité des signes cliniques et les chevauchements de symptômes entre les

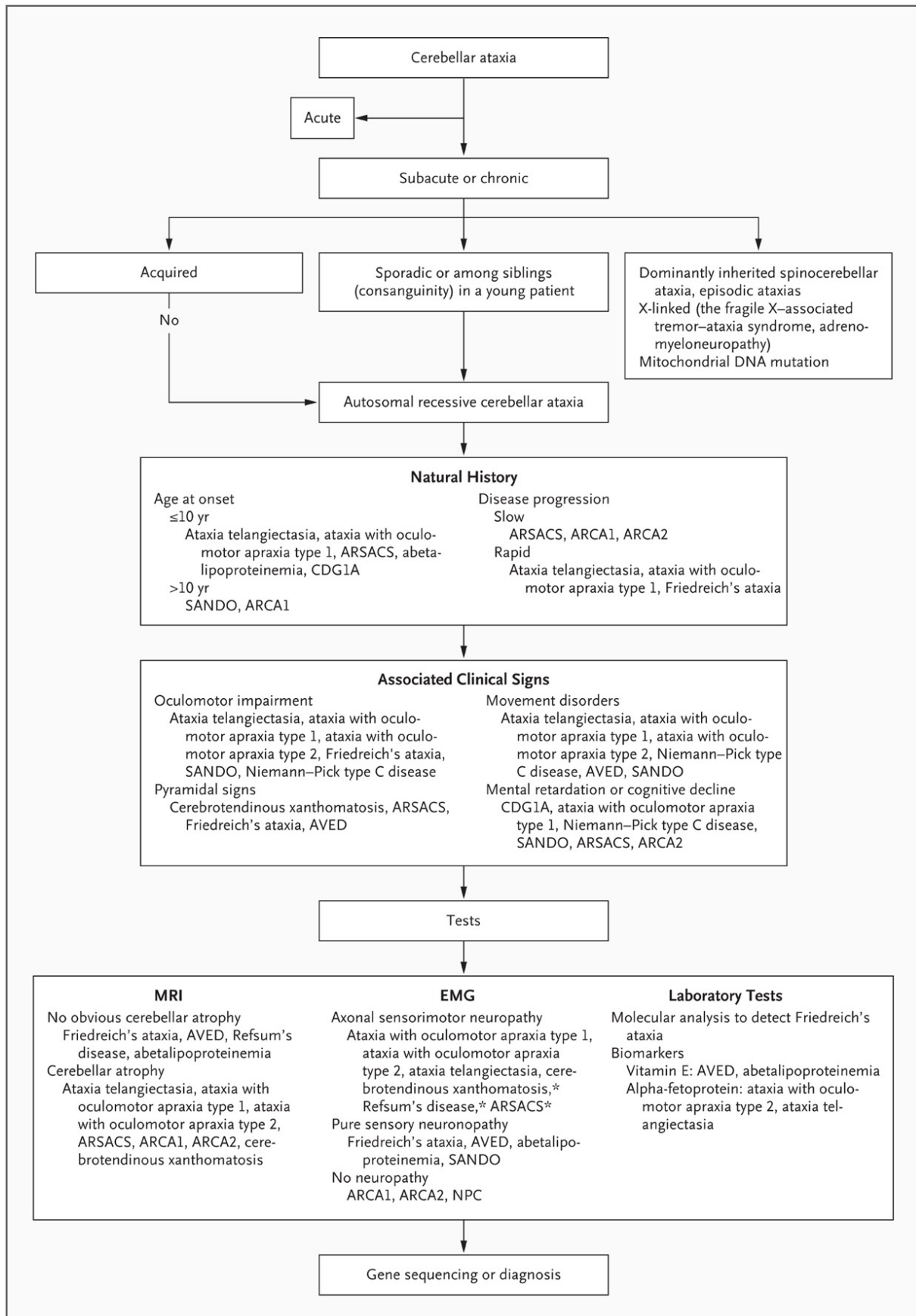


Figure 1 : Exemple d'algorithme utilisé par les cliniciens pour le diagnostic des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives.

(Issu d'Anheim et al., 2012).

différentes pathologies rendent la classification des ACARs délicate et la recherche diagnostique est bien souvent compliquée. Différents algorithmes décisionnels sont proposés pour aider le clinicien dans sa démarche (Anheim et al., 2012a; Beaudin et al., 2017; Fogel and Perlman, 2007). La **figure 1** est un exemple d'algorithme décisionnel utilisé en pratique clinique. Avec le développement des approches des séquençages haut débit (NGS, *next generation sequencing*) de nouveaux gènes associés à des ACARs sont identifiés et de nouveaux algorithmes de diagnostics sont donc générés (Renaud et al., 2017). Récemment, deux études bibliographiques poussées ont été réalisées afin d'améliorer la classification de ces ACARs pour simplifier la reconnaissance clinique, guider le diagnostic et aider à l'interprétation génétique (Beaudin et al., 2017; Rossi et al., 2018). Rossi et al. ont établi une liste de 62 ataxies récessives cérébelleuses génétiquement confirmées en leur assignant une nomenclature commune : préfixe ATX suivi du nom du gène. L'ataxie de Friedreich (AF) est l'ataxie héréditaire la plus fréquente, elle est donc très rapidement considérée lorsqu'une ACAR est envisagée (**Figure 1**). Dans la nomenclature proposée par Rossi et al. l'AF est nouvellement appelée ATX-FXN, cependant la nomenclature classique (AF) sera utilisée dans ce manuscrit.

1.3. Historique de la maladie et épidémiologie

En 1863, Nikolaus Friedreich, un neuropathologiste allemand, décrit pour la première fois un syndrome clinique distinct chez neuf patients issus de trois familles. Treize ans plus tard, en 1876, il associe une nature héréditaire à cette pathologie (Friedreich, 1863; Koeppen, 2013). Le nom d'ataxie de Friedreich fut proposé par P. Brousse en 1882 (Harding, 1981). L'ataxie de Friedreich est l'ataxie autosomique récessive la plus répandue dans la population caucasienne avec une prévalence estimée entre 1 : 30000 et 1 : 50000, mais avec une forte variabilité géographique. Elle est rare dans les populations africaines sub-sahariennes et elle est extrêmement rare en Asie. Des études épidémiologiques en Europe ont permis d'établir un gradient de prévalence de l'AF et des porteurs, ce gradient va de la côte Atlantique vers la Scandinavie/Russie (**Figure 2**) (Vankan, 2013). En effet, au nord de l'Espagne et en Irlande la prévalence de l'AF est la plus forte avec respectivement 1 : 21000, 1 : 23000 et elle est la plus basse en Finlande (1 : 750000). En France, elle varie en fonction de la zone géographique avec 1 : 25000 dans le Sud-Ouest et 1 : 65000 dans le Nord-Est avec une moyenne de 1 : 43000 (3^{ème} prévalence la plus élevée en Europe). La prévalence des porteurs sains dans les différentes zones géographiques corrèle avec celle de la maladie (1 : 55 en Espagne, 1 : 58 en Irlande, 1 : 85 en France). Ce gradient particulier

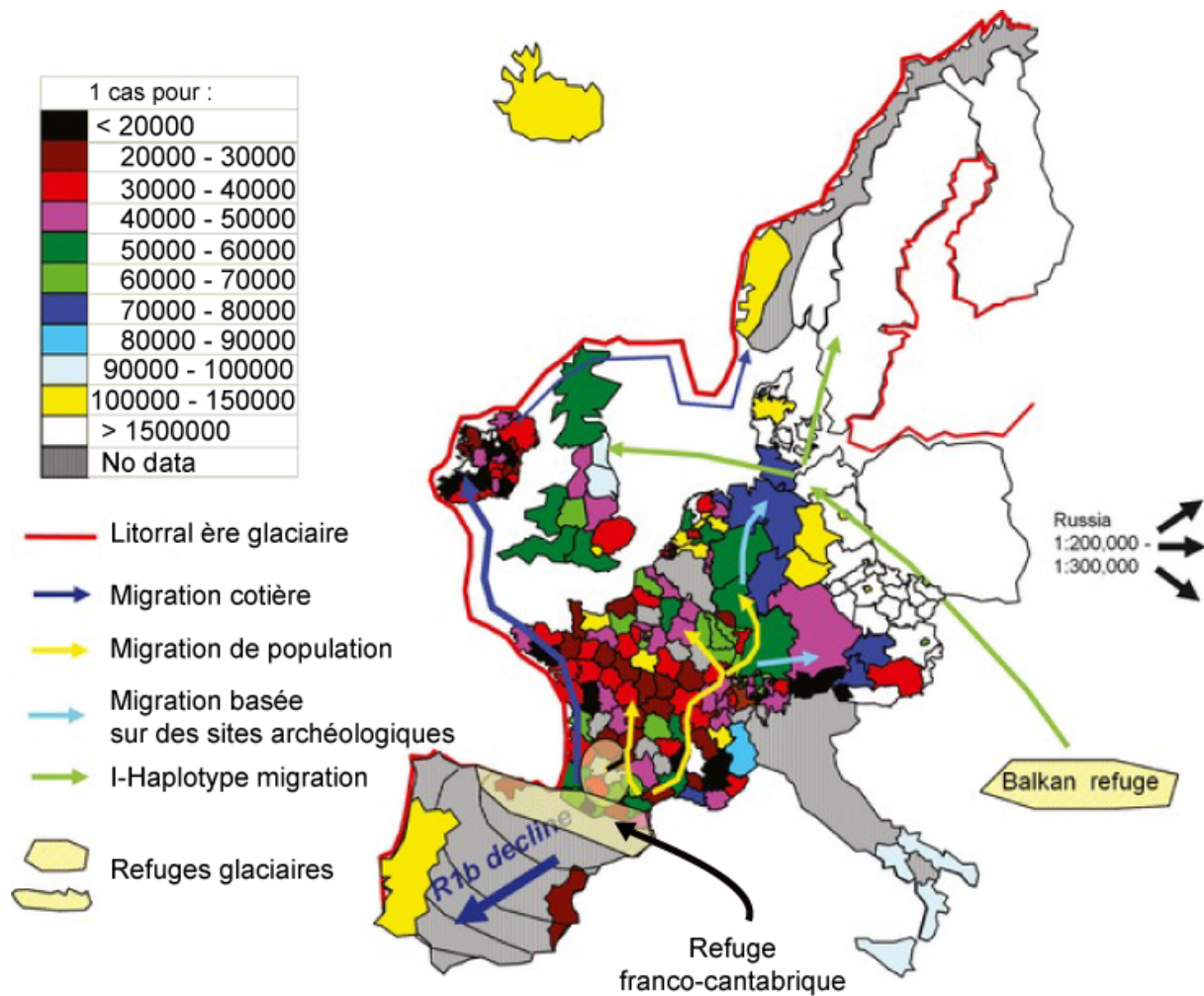


Figure 2 : Gradient de prévalence de l'ataxie de Friedreich en Europe.

Le gradient de prévalence de l'AF colocalise avec le gradient du marqueur chromosomique R1b en Europe. Ces deux gradients corrént avec les migrations de population depuis le refuge franco-cantabrique, à la suite de la dernière ère glaciaire, au Paléolithique (issu de [Vankan, 2013](#)).

suggère la présence de l'évènement fondateur probablement d'origine paléolithique lors de la dernière période glaciaire (682 ± 203 générations), au niveau de la région franco-cantabrique (allant du Nord de l'Espagne au Sud de la France) qui représentait alors un refuge glaciaire (**Figure 2**) (Cossee et al., 1997; Vankan, 2013). En suivant les migrations de population lors de la repopulation de l'Europe : le long de la côte Atlantique jusqu'en Irlande et vers le Nord-Est de la France puis à l'Est de l'Europe, ce gradient de prévalence s'établit et colocalise avec le marqueur chromosomique *R1b* (**Figure 2**).

Critères primaires essentiels

- début des symptômes avant 25 ans
 - ataxie progressive et irréversible des membres et du tronc
 - absence des reflexes ostéo-tendineux (aréflexie des membres inférieurs)
-

Critères secondaires

apparaissent dans les 5 premières années d'évolution

- dysarthrie
 - réflexe cutané plantaire (signe de Babinski)
 - perte de la sensibilité profonde (sens de position et sens vibratoire)
 - aréflexie des membres supérieurs
-

Critères additionnels variables

- scoliose
 - cardiomyopathie
 - pieds creux
 - amyotrophie spinale
 - atrophie optique
 - nystagmus
 - surdité
 - diabètes miellitus
-

Tableau 1 : Critères diagnostiques pour l'ataxie de Friedreich établis par le Dr A. Harding en 1981.

(Issu de [Harding, 1981](#))

2. La clinique de l'ataxie de Friedreich

2.1. Premiers symptômes de la maladie

La maladie débute classiquement à l'adolescence, en général entre 10 et 15 ans, mais l'apparition des premiers symptômes est très variable, allant de 2 ans à l'âge adulte. Cependant, l'apparition des symptômes avant 25 ans est l'un des critères primaires de diagnostic établit par le Dr A. Harding en 1981 (Harding, 1981). Dans la majorité des cas, les premiers symptômes sont des troubles de la marche avec des chutes ou une maladresse générale sévère, souvent remarqués par l'entourage du patient (Koeppen, 2011; Pandolfo, 2009; Parkinson et al., 2013). Une scoliose est fréquemment présente et peut précéder les symptômes ataxiques, ainsi qu'une déformation des pieds (pieds creux). Rarement, une cardiomyopathie peut être un premier signe clinique. L'AF est une maladie systémique associant des symptômes neurologiques et des symptômes non-neurologiques.

2.2. Atteintes neurologiques

2.2.1. Signes cliniques de l'AF

Au 19^{ème} siècle, N. Friedreich décrit un syndrome à progression relativement lente avec une importante ataxie progressive et une dysarthrie, suivies d'une perte de la sensibilité et une faiblesse musculaire souvent associés à une scoliose, à une déformation des pieds et à une dysfonction cardiaque (Harding, 1981; Koeppen, 2013). Ces éléments cliniques, plus une perte des réflexes ostéotendineux profonds, correspondent à la définition classique de l'ataxie de Friedreich (Parkinson et al., 2013). En 1981, le Docteur A. Harding complète le tableau clinique en se basant sur une étude de 115 patients issus de 90 familles et donne des critères diagnostiques précis pour l'AF (**Tableau 1**) (Harding, 1981). Les fréquences des signes cliniques majeurs, mesurées dans quatre études cliniques différentes, sont présentées dans le **tableau 2** (Delatycki et al., 1999; Dürr et al., 1996; Harding, 1981; McCabe et al., 2000). L'ensemble des patients développe une ataxie progressive et permanente des membres et du tronc, les membres inférieurs sont primairement atteints, puis, avec la progression de la maladie les membres supérieurs sont également touchés. Au quotidien, cette ataxie se traduit par une perte d'équilibre et une diminution de la marche (démarche dite ébrieuse) et, avec la progression de la maladie, par le besoin d'appareils d'aide à la marche (déambulateurs par exemple) puis la nécessité d'un fauteuil roulant, en

Symptômes	Harding, 1981	Durr et al., 1996	Delatycki et al., 1999	McCabe et al., 2000
Nombre de patients	115	140	51	58
Âge moyen de début de la maladie*	10,5 ± 7,4 ans	15,5 ± 8 ans	10,5 ± 6,4 ans	-
Taille moyenne de l'expansion GAA	-	761 ± 230	896 ± 212	885
Ataxie	99%	100%	100%	100%
Dysarthrie	97%	91%	95%	93%
Aréflexie des membres inférieurs	99%	87%	98%	86%
Perte de la sensibilité profonde	73%	78%	88%	89%
Réflexe cutané plantaire	89%	79%	74%	93%
Faiblesse musculaire	88%	67%	-	72%
Scoliose	79%	60%	78%	84%
Pieds creux	55%	55%	74%	79%
Nystagmus	20%	40%	-	40%
Dysphagie	-	27%	-	-
Troubles du sphincter	-	23%	41%	-
Vision réduite, cécité	18%	13%	-	-
Troubles de l'audition, surdité	8%	13%	-	-
Cardiomyopathie à l'ECG	-	63%	65%	67%
Diabète/intolérance au glucose	10%	32%	8%	7%

Tableau 2 : Fréquences des signes cliniques majeurs observés chez les patients AF dans différentes études cliniques.

* expression de la moyenne ± (Issu de [Parkinson et al., 2013](#)).

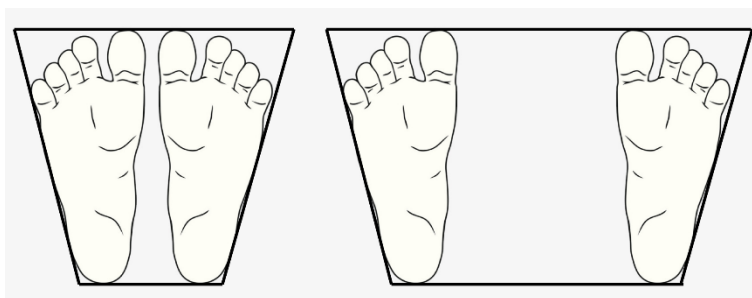


Figure 3 : Elargissement du polygone de sustentation.

Le polygone de sustentation correspond à la surface d'appui des pieds au sol. En écartant les pieds cette surface augmente ce qui permet d'améliorer la stabilité et l'équilibre.

général entre 10 et 15 ans après le début de la maladie. Le manque de coordination entraîne des difficultés dans l'exécution des gestes nécessitant précision et dextérité comme écrire, manger, s'habiller... Plus précisément, l'ataxie de Friedreich est une ataxie progressive mixte dite spinocérébelleuse sensitive associée à un syndrome pyramidal.

L'ataxie cérébelleuse est responsable de troubles la marche avec une perte de la coordination motrice et une perturbation de la balance des muscles agonistes et antagonistes. Au niveau de l'équilibre, en position debout, l'élargissement du polygone de sustentation (surface d'appui des pieds au sol) en écartant les pieds permet aux patients d'avoir plus de stabilité (**Figure 3**). Au contraire, en joignant les pieds, le corps des patients oscille en tous sens dû à un effet balancier pour équilibrer le corps dans l'espace. La fermeture des yeux ou l'absence de lumière n'entraîne pas de différences majeures sur ces paramètres. La démarche ébrieuse des patients est très particulière avec les jambes et les bras écartés du tronc, des enjambées irrégulières et des embardées dans les pas sans contrôle du mouvement des pieds. Plus de 70% des patients AF connaissent des épisodes d'entorses des chevilles résultant d'une hyperlaxité. Enfin, les difficultés de coordinations résultent de syncinésie (contraction involontaire d'un muscle ou d'un groupe de muscle pendant qu'un autre mouvement volontaire ou un réflexe est effectué).

La proprioception, ou sensibilité profonde, correspond à la perception de la position des membres par rapport aux corps et dans l'espace. Elle fait partie, avec la sensibilité thermo-algique et la sensibilité superficielle, de la somesthésie. Les patients AF présentent une perte de la proprioception entraînant des troubles de l'équilibre, avec une perte des sens de position et vibratoires, qui participent au schéma de marche particulier. L'ataxie proprioceptive est partiellement corrigée visuellement (signe de Romberg). Ainsi, les symptômes s'aggravent dans l'obscurité ou avec les yeux fermés, rendant les déplacements la nuit difficiles.

Le syndrome pyramidal se traduit par une raideur du plan postérieur avec une hypertonie des pieds. Les patients ont donc tendance à se mettre sur la pointe des pieds, ce qui joue sur le schéma de marche, participe aux risques d'entorses et implique un étirement non correct du tendon d'Achille au cours de la croissance. La spasticité des membres inférieurs peut conduire à des crampes, des douleurs musculaires et des contractures. Plus de 70% des patients (chiffres variables selon l'étude, **tableau 2**) présentent un réflexe cutané plantaire, aussi appelé signe de Babinski. A la différence d'un syndrome pyramidal pur ou les patients ont des réflexes ostéotendineux très forts, les patients AF présentent une aréflexie tendineuse des membres inférieurs.

Cette perte des réflexes ostéotendineux, présentée par 90% des patients résulte d'une neuropathie périphérique sensitive qui coupe l'arc réflexe (voir paragraphe 2.2.2.1.1) (**Tableau 2**). Bien que ce symptôme soit l'un des critères primaires et essentiels de l'AF, certains cas atypiques présentent encore des réflexes ostéotendineux (**Tableau 1**) ([Delatycki and Corben, 2012](#)). Des troubles de la parole et de la déglutition participent également au tableau clinique. Apparaissant dans la première décennie de la maladie, une dysarthrie est présente dans plus de 90% des cas et la voix est saccadée, lente et par moment explosive (**Tableau 2**) ([Folker et al., 2010](#)). Avec l'évolution de la maladie, la dysarthrie progresse et, aux stades avancés, la voix est inintelligible rendant la compréhension très difficile. Ces éléments résultent d'un problème de coordination des cordes vocales (symptôme cérébelleux). Ce défaut des cordes vocales entraîne aussi des problèmes de déglutition (dysphagie). Les fausses routes sont donc nombreuses (d'avantage liquides que solides) et très problématiques aux stades avancés de l'AF. Ces symptômes sont compliqués par des faiblesses musculaire, particulièrement des membres inférieurs ([Harding, 1981](#); [Pandolfo, 2009](#)) et un affaiblissement général. Des déformations des pieds (pieds creux) limitent la surface d'appui des pieds au sol, amplifiant d'avantage les problèmes de marche et d'équilibre dus à l'ataxie. Les systèmes visuels et auditifs peuvent également être atteints. Au niveau ophtalmique, des mouvements anormaux de l'œil peuvent être observés (instabilité de fixation, nystagmus et poursuites oculaires saccadées). Aux stades avancés, les patients décrivent des troubles de la vision et une cécité aux stades très avancés ([Fortuna et al., 2009](#)). Une neuropathie auditive se déclare tardivement, allant de troubles de l'audition en cas de bruits de fond à une surdité sévère. La durée de la maladie et la fonctionnalité de l'audition corrélerent ([Bürk, 2017](#)). Certains patients peuvent souffrir de cécité et de surdité, rendant l'interaction sociale très compliquée. Les patients ne présentent pas de déficit intellectuel impactant la vie quotidienne ([Selvadurai et al., 2018](#)). Des déficits cognitifs subtils sont décrits dans certaines études avec une diminution de la rapidité cognitive et une très légère réduction des performances au niveau des tâches visuospatiales complexes ([Selvadurai et al., 2018](#)). Ces déficiences minimales n'empêchent en rien les patients de suivre une scolarité normale et de faire des études supérieures. Aux stades tardifs de la maladie, il est cependant difficile de déterminer une potentielle atteinte cognitive en raison des problèmes de parole, de vision et d'audition, qui isolent sévèrement les patients. La sévérité clinique et la progression de la maladie sont évaluées par les cliniciens à l'aide de différentes échelles : les échelles FARS (*Friedreich Ataxia Rating Scale*), ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) et/ou SARA (*Scale for the Assessment and Rating of ataxia*) ([Bürk et al., 2013](#)).

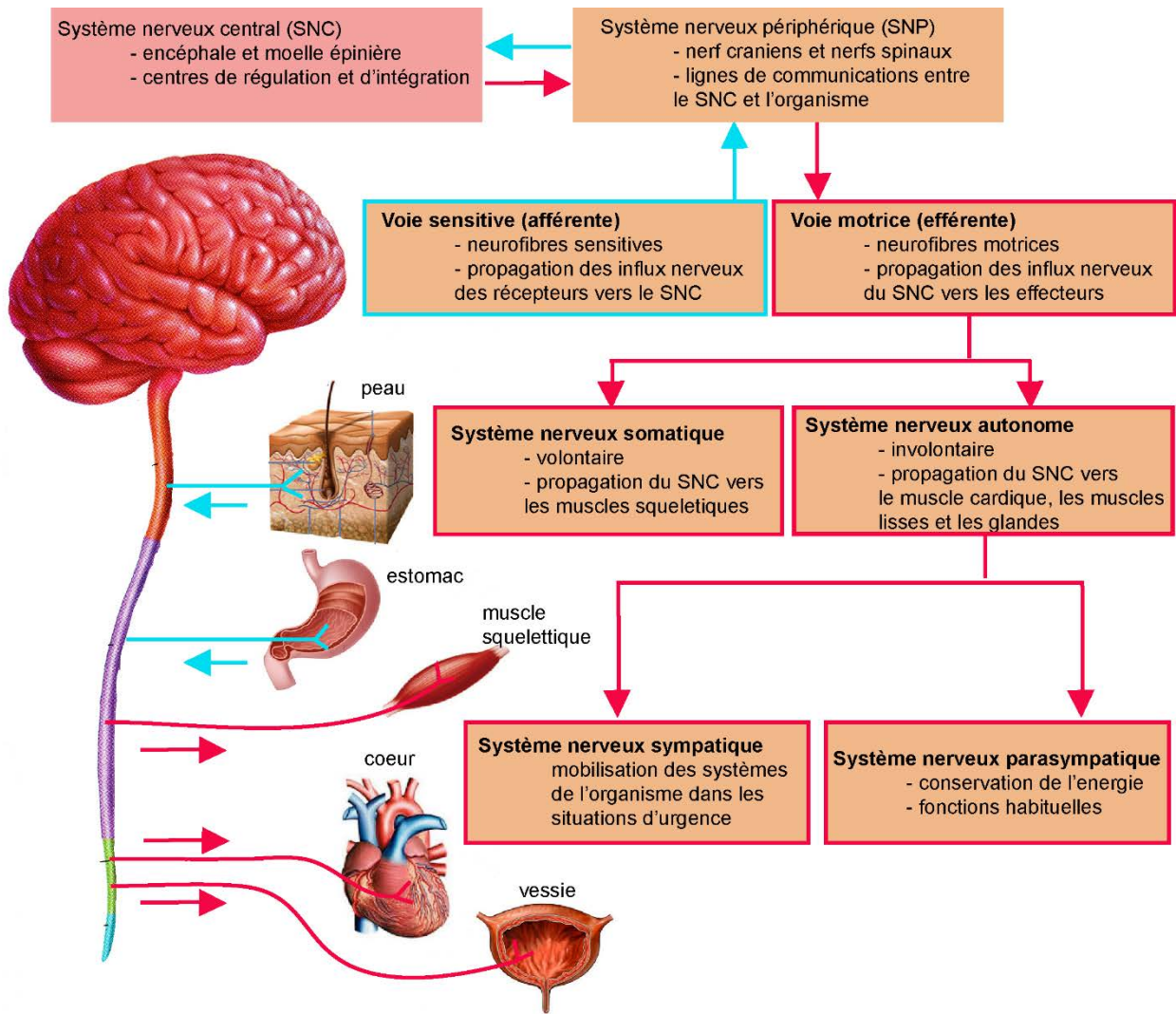


Figure 4 : Organisation du système nerveux.

Les flèches indiquent la direction des influx nerveux, bleu : voies afférentes, rouge : voies efférentes.

(Issu de *Anatomie et Physiologie Humaines*, Marieb et Hoehn, 9^{ème} édition).

2.2.2. Anatomopathologie de l'AF

Avant d'expliquer les dysfonctionnements anatomopathologiques responsables de la myriade de symptômes cliniques neurologiques, je vais décrire l'anatomie et la physiologie normale des systèmes nerveux atteints dans l'ataxie de Friedreich.

2.2.2.1. Fonctionnement des différents systèmes

2.2.2.1.1. Le système nerveux : quelques éléments de base

Le système nerveux est composé des systèmes nerveux centraux (SNC) et périphériques (SNP) (**Figure 4**). Ils sont tous deux affectés dans l'AF. Le SNC, composé de l'encéphale et de la moelle épinière, est le centre de régulation et d'intégration du système nerveux ([Marieb and Hoehn, 2015](#)). Il élabore les réponses motrices après l'interprétation des informations sensorielles qui lui parviennent grâce au SNP. Le SNP est composé des nerfs crâniens et rachidiens et des ganglions dont les ganglions dorso-rachidiens (DRG). La périphérie est reliée à l'encéphale par les nerfs crâniens et à la moelle épinière par les nerfs rachidiens. En fonction de la direction de l'information, le SNP se compose de deux types de voies. La voie sensitive (ou afférente) achemine l'information vers le SNC à partir des récepteurs sensoriels. La voie motrice (ou efférente) propage les influx nerveux du SNC vers la périphérie aux organes effecteurs (**Figure 4**). On distingue les neurofibres sensibles somatiques, pour les influx provenant de la peau, des organes des sens, des muscles squelettiques et des articulations, des neurofibres sensibles viscérales. La voie motrice est plus complexe avec le système nerveux somatique (ou volontaire) qui transmet l'influx du CNS aux muscles squelettiques pour produire une réponse motrice et le système nerveux autonome (ou involontaire) pour les viscères. Ce dernier regroupe les systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques (**Figure 4**). Je me limiterai à décrire les systèmes somatiques.

Dans le SNC, les corps cellulaires des neurones sont regroupés en noyaux et leurs prolongements forment les faisceaux et tractus. Dans le SNP on parle de ganglions pour le regroupement des corps cellulaires et de nerfs pour les axones. En fonction du sens de propagation de l'influx nerveux par rapport aux SNC, on trouve trois types de neurones : les neurones sensitifs, les neurones moteurs et les interneurones. Les neurones sensitifs, dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions cervicaux et rachidiens, transmettent l'information de la périphérie jusqu'au SNC. Les corps cellulaires des neurones moteurs sont

localisés dans le SNC. Ils propagent l'information jusqu'aux organes effecteurs dans la périphérie. Les interneurones, formant plus de 99% des neurones de l'organisme, servent de relais aux influx nerveux. L'information nerveuse peut être traitée en série simple ou en parallèle. Pour le traitement en série simple on parle d'arc réflexe, les réflexes correspondant à des réponses rapides et automatiques. Un stimulus particulier déclenche une réponse motrice précise via un récepteur, un neurone sensitif, un interneurone correspondant au centre d'intégration dans le SNC, un neurone moteur et un effecteur. Au contraire le traitement de l'information en parallèle implique des fonctions mentales complexes et l'intégration d'une information sensorielle dans différents réseaux. Les axones des neurones peuvent être myélinisés ou amyéliniques. La gaine de myéline, riche en lipides, a pour rôle la protection et l'isolement électrique pour une conduction rapide et efficace (Salzer, 2015). Le processus de myélinisation, les cellules gliales myélinisantes et la composition structurale de la myéline sont différents entre le SNC et le SNP. Les cellules de Schwann myélinisent les axones du SNP et les oligodendrocytes ceux du SNC. Dans ce dernier, la substance blanche correspond à des groupements d'axones myélinisés et la substance grise aux corps cellulaires des neurones et aux axones amyéliniques.

Le système nerveux est en général décrit de l'encéphale vers la périphérie (cerveau, cervelet, tronc cérébral, moelle épinière puis nerfs spinaux et récepteurs). Les voies sensitives étant les voies principalement affectées dans l'ataxie de Friedreich, je décrirai le système somatosensoriel de manière inverse, en suivant une information sensitive, de la génération de l'influx dans la périphérie à son intégration dans l'encéphale (en me concentrant sur les informations transitant par les nerfs spinaux et non crâniens).

2.2.2.1.2. La sensibilité dans le système nerveux périphérique (SNP)

Le SNP est composé des récepteurs sensoriels, des terminaisons motrices dans les muscles, des nerfs périphériques et des ganglions dont les DRG. L'information sensitive est générée suite aux stimuli des récepteurs sensoriels, elle remonte le long des axones sensitifs, localisés dans les nerfs, passe par les DRG (corps cellulaire des neurones sensitifs) puis intègre le SNC (paragraphe 2.2.2.1.3). A l'inverse, pour effectuer un mouvement, la voie motrice est activée et les terminaisons des neurones moteurs présentes dans les muscles, entraînent leur contraction (je ne détaillerai pas plus les terminaisons motrices).

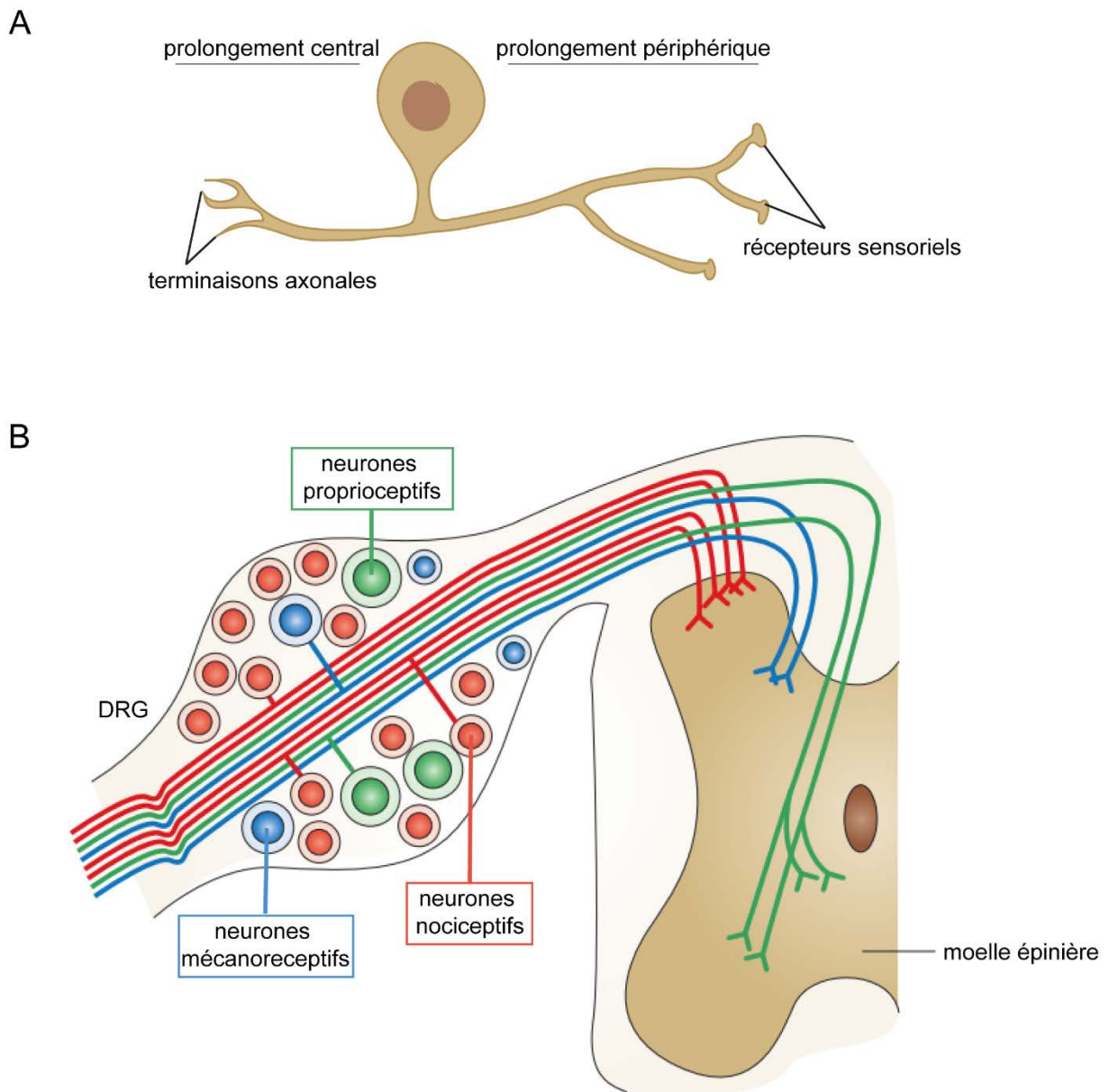


Figure 5 : Les corps cellulaires des neurones sensitifs unipolaires sont localisés dans les DRG.

(A) Les neurones sensitifs sont des neurones unipolaires. L'axone est constitué d'un prolongement central qui pénètre dans le SNC et établit des synapses avec des interneurons et d'un prolongement périphérique qui capte les stimuli sensoriels. (B) Les DRG, renflements des racines dorsales de la moelle épinière, sont composés de trois types de neurones : les neurones proprioceptifs, mécanoreceptifs et nociceptifs. Ces neurones diffèrent en termes de taille, de marqueurs d'expression et de l'information sensorielle qu'ils génèrent suite au stimulus du récepteur sensoriel. (Issu de [Marmigère and Erfors, 2007](#)).

Récepteurs sensoriels et nerfs spinaux

Les récepteurs sensoriels sont des structures spécifiques qui réagissent aux stimuli extérieurs (aux changements dans l'environnement du corps). La conscience du stimulus correspond à la sensation et l'interprétation du stimulus correspond à la perception. On distingue différents récepteurs en fonction de leur localisation dans l'organisme. Les extérocepteurs captent les stimuli provenant de l'environnement en étant principalement situés à la surface du corps. Ils correspondent donc aux récepteurs du toucher et de la pression (mécanorécepteurs), aux récepteurs de la douleur et de la température (nocicepteurs) ainsi qu'aux récepteurs des organes des sens. Les informations provenant des extérocepteurs deviennent conscientes dans le cortex cérébral après propagation de l'influx le long des voies sensitives. Les intérocepteurs, eux, informent le SNC de l'état du milieu interne. Ce sont les stimuli provoqués par les viscères et les vaisseaux qui génèrent les sensations de douleur interne, de faim, de soif, etc. Enfin, les propriocepteurs sont localisés dans les muscles squelettiques, les tendons, les articulations, les ligaments et les tissus conjonctifs, recouvrant les os et les muscles, et ils reçoivent les stimuli internes. Ils informent donc en permanence le cortex cérébral et le cervelet des mouvements du corps et de sa position dans l'espace, en mesurant les degrés d'étirement. La majorité de ces informations restent inconscientes. Après le stimulus, l'influx nerveux sensoriel généré remonte vers le SNC le long des axones sensitifs périphériques localisés dans les nerfs. La majorité des nerfs sont dits mixtes, c'est-à-dire qu'ils sont composés de neurofibres sensitives et motrices (acheminement des commandes motrices de l'encéphale vers les muscles effecteurs). Il existe quelques nerfs purement sensitifs ou moteurs.

Ganglions dorso-rachidiens (DRG)

Les corps cellulaires des neurones sensitifs associés aux nerfs spinaux sont localisés dans les DRG, situés de part et d'autre de la moelle épinière (**Figure 5**). Ces neurones sensitifs nous permettent de sentir le toucher, la chaleur, le froid, la douleur, les mouvements du corps et des membres et la position spatiale des membres par rapport au corps. Ce sont des neurones unipolaires, un prolongement unique émerge du corps cellulaire puis se divise en un prolongement central et un prolongement périphérique (**Figure 5A**). Ces deux prolongements constituent l'axone. Les prolongements périphériques, localisés dans les nerfs spinaux, sont liés aux récepteurs sensoriels et les prolongements centraux pénètrent dans le SNC. Chaque type de neurones sensitifs possède des caractéristiques moléculaires uniques et répond à un type de stimuli précis ([Marmigère and Ernfors, 2007](#)). Historiquement, on parle de trois types de neurones : les neurones nociceptifs, les neurones

mécanoréceptifs et les neurones proprioceptifs (**Figure 5B**). Les neurones nociceptifs, de petit diamètre (<30µm), légèrement myélinisés (fibres Aδ) ou non myélinisés (fibres C) sont responsables des sensations de douleurs et de température. Ils peuvent exprimer des combinaisons de marqueurs (TrkA, TRPV1, CGRP ou encore la substance P). Certains neurones nociceptifs sont peptidergiques (CGRP+, substance P+) et d'autres sont non-peptidergiques. Les neurones mécanoréceptifs servent au toucher et à la pression. Ces neurones de large diamètre (>50µm) peuvent posséder des axones myélinisés (fibres Aβ), légèrement myélinisés (Aδ) ou encore non myélinisés (C). Ils expriment généralement les marqueurs TrkB et/ou TrkC. Enfin, les neurones proprioceptifs, responsables des informations sensorielles relatives à la position des membres, sont des neurones de larges diamètres avec des fibres Aα largement myélinisées permettant une conduction rapide. Ces neurones représentent environ 15% des neurones des DRG et expriment tous TrkC et la parvalbumine (PVALB) ([Marmigère and Ernfors, 2007](#)). Les DRG sont donc composés de populations neuronales hétérogènes. Un même marqueur étant exprimé dans différentes populations neuronales (par exemple TrkC est exprimé par certains neurones mécanoréceptifs et par les neurones proprioceptifs), une population de neurone est identifiée grâce à l'expression combinée de plusieurs marqueurs. De récentes études ont permis de répartir ces neurones en sous-groupes en fonction de leur rôle et de leurs marqueurs spécifiques, à partir des trois groupes originaux ([Alshawaf et al., 2018](#); [Lopes et al., 2017](#); [Usoskin et al., 2014](#)). Usoskin et al. proposent, à la suite d'une analyse transcriptomique des DRG, la classification des neurones sensitifs en 11 populations différentes avec 6 populations nociceptives, 3 mécanoréceptives et 2 proprioceptives. Dans cette nouvelle classification certains neurones sensitifs sont extrêmement spécifiques à une sensation telle que la proprioception, la mécanoception ou les démangeaisons. A l'inverse, les autres sensations proviennent d'un ensemble de neurones avec différents états de transcription qui co-expriment différents marqueurs ([Usoskin et al., 2014](#)).

2.2.2.1.3. La sensibilité dans le système nerveux central (SNC)

Lors du transport d'un influx sensoriel, trois neurones consécutifs sont nécessaires (neurones de premier, deuxième et troisième ordre). Les neurones sensitifs des DRG correspondent aux neurones de premier ordre. Ils transportent l'information jusqu'au SNC en passant par les racines dorsales. Ils établissent alors des synapses avec les neurones de deuxième ordre dans les cornes dorsales de la moelle épinière ou dans le bulbe rachidien.

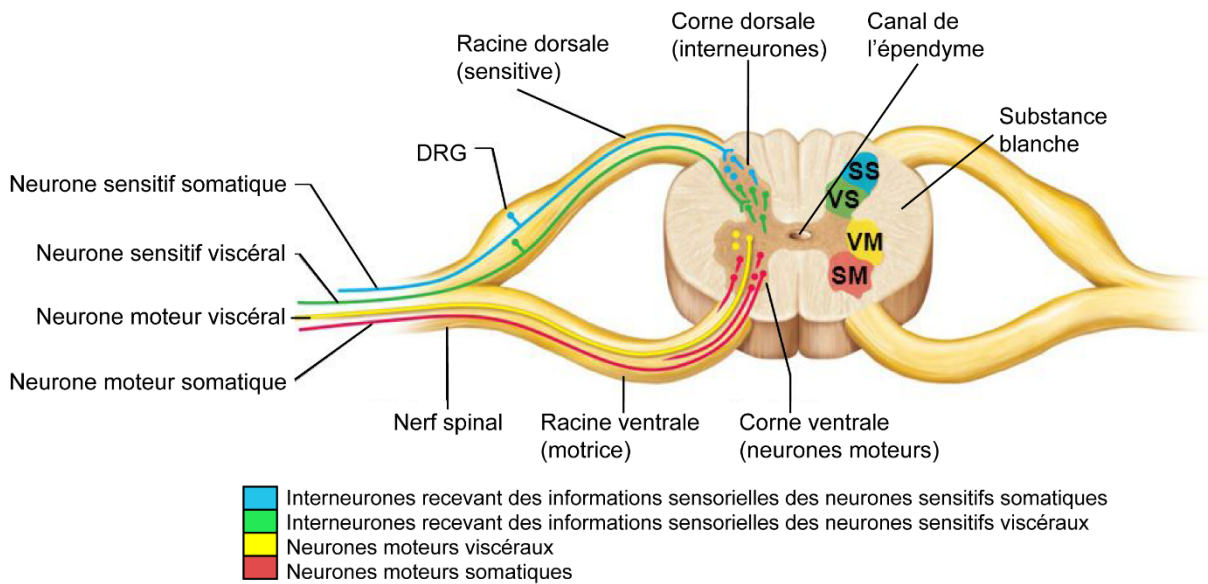


Figure 6 : Substance grise de la moelle épinière.

La région sensitive (somatique et viscérale) de la moelle épinière composée d'interneurones, correspond aux cornes dorsales. Les fonctions motrices sont localisées dans les cornes ventrales, avec la présence de neurones moteurs et d'interneurones. Les racines dorsales sensibles et les racines ventrales motrices qui fusionnent pour former les nerfs spinaux mixtes font partie du SNP.

SS : sensibilité somatique, VS : sensibilité viscérale ; SM : motricité somatique ; VM : motricité viscérale.

(Issu de [Anatomie et Physiologie Humaines, Marieb et Hoehn, 9^{ème} édition](#)).

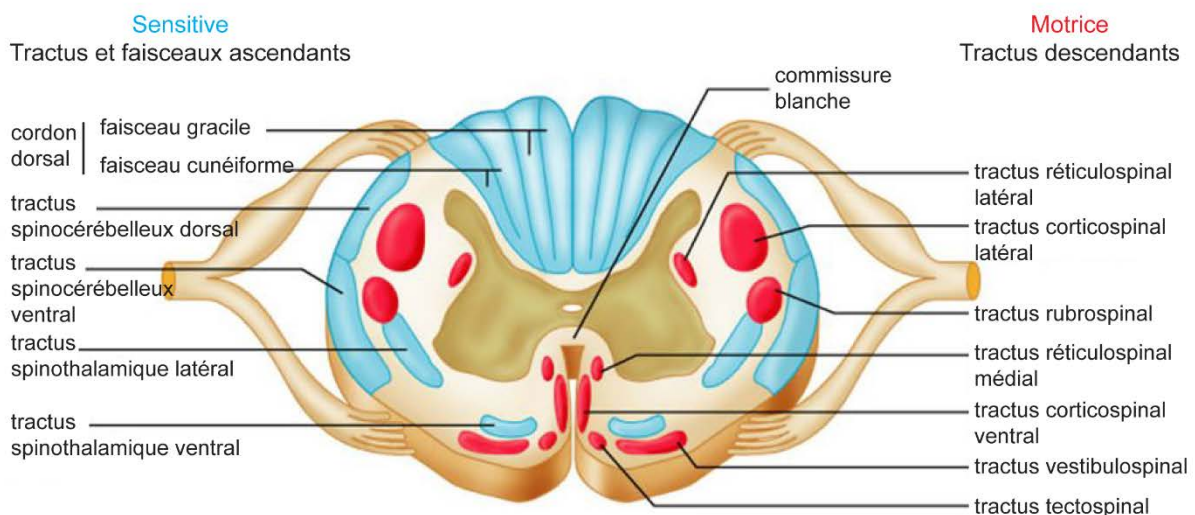


Figure 7 : Substance blanche de la moelle épinière avec les différents faisceaux et tractus.

Les tractus descendants (moteurs) sont représentés en rouge et les tractus et faisceaux ascendants (sensitivité) sont représentés en bleu. (Issu de [Anatomie et Physiologie Humaines, Marieb et Hoehn, 9^{ème} édition](#)).

Moelle épinière

Les influx allant de la périphérie vers l'encéphale (influx sensitifs) et inversement (influx moteurs) sont acheminés par la moelle épinière, cordon de 42cm de long et 1,8cm de large divisé en différentes régions : cervicale, thoracique, lombaire et sacrée. La moelle est composée sur tout son long de substance blanche entourant une colonne de substance grise (en forme de papillon) avec en son centre, le canal de l'épendyme (**Figure 6**). La décussation des fibres au niveau de la moelle est responsable du contrôle du côté gauche du corps par l'encéphale droit et inversement. La substance grise est composée de deux projections postérieures, les cornes dorsales, et de deux projections antérieures, les cornes ventrales. Les influx sensitifs somatiques et autonomes transitent par la corne dorsale pour remonter vers l'encéphale et le cervelet. Les influx moteurs passent par la corne ventrale puis la racine ventrale pour rejoindre les effecteurs (par exemple les muscles squelettiques) (**Figure 6**). La substance blanche est majoritairement composée de neurofibres ascendantes (sensitive) et descendantes (motrices) ainsi que des fibres passant d'un côté à l'autre de la moelle. Le long de la moelle, les fibres sont regroupées en colonnes formant les tractus et faisceaux qui sont spécifiquement sensitifs ou moteurs (**Figure 7**) (voir paragraphe 2.2.2.1.4).

Tronc cérébral

Toujours en suivant un influx sensitif de la périphérie vers l'encéphale, la moelle épinière est reliée au cerveau et au cervelet par le tronc cérébral. Celui-ci est composé du bulbe rachidien (partie inférieure), du pont (portion moyenne) et du mésencéphale (région supérieure). Le bulbe rachidien est constitué des tractus corticospinaux, qui descendent du cortex moteur primaire et continuent dans la moelle épinière (tractus moteurs) et des pédoncules cérébelleux inférieurs, par lesquels les faisceaux spinocérébelleux dorsaux pénètrent dans le cervelet. Le bulbe rachidien contient également différents noyaux. Les noyaux olivaires relaient au cervelet les informations sensorielles sur les étirements des muscles et des articulations et les noyaux vestibulaires transmettent les commandes motrices pour le maintien de l'équilibre. Les noyaux graciles et cunéiformes, formant le lemnisque médial, relaient les informations tactiles fines et la proprioception consciente au cortex somesthésique (synapses entre les neurones de premier et de deuxième ordre). Le pont, lui, contient des fibres de projection profondes reliant la moelle épinière aux centres cérébraux supérieurs. Il contient également des fibres superficielles formant les pédoncules cérébelleux moyens qui permettent le transit de l'information des activités motrices volontaires, déclenchées par le cortex moteur primaire au cervelet. Enfin, les pédoncules

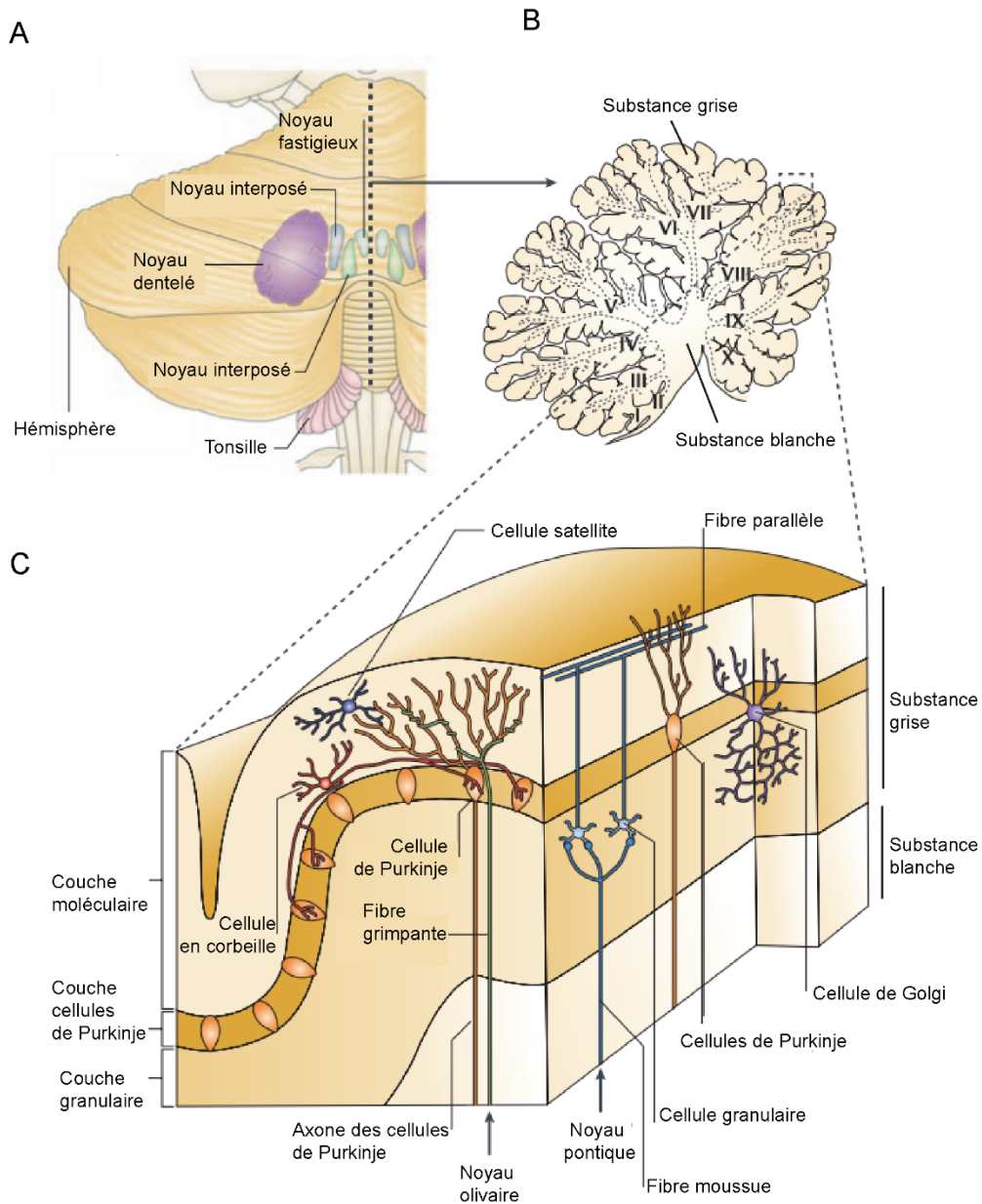


Figure 8 : Architecture anatomique du cervelet.

(A) Vue postérieure du cervelet humain avec l'hémisphère gauche et les noyaux gris profonds. (B) Section sagittale du cervelet humain présentant les 10 lobules. (C) Organisation cellulaire du cortex cérébral avec les couches granulaires et moléculaires entourant la couche des cellules de Purkinje. (Issu de [Ramnani, 2006](#)).

cérébraux du mésencéphale contiennent les tractus de la voie motrice principale qui descendent de l'encéphale (cortex moteur) vers la moelle épinière. Les pédoncules cérébelleux supérieurs du mésencéphale relient le cervelet au reste de l'encéphale.

Cervelet

Le cervelet, situé en dessous du lobe occipital du cerveau, est essentiel dans l'intégration des influx nerveux avec la réception et le traitement des informations sensorielles proprioceptives reçues. Il permet de synchroniser les contractions des muscles squelettiques pour produire des mouvements coordonnés et précis. Il ajuste donc les mouvements, de la planification, à l'initiation et à l'exécution. Au niveau de sa structure, les deux hémisphères du cervelet sont composés d'un cortex de substance grise, d'une masse de substance blanche et de masses jumelles de substance grises formant les noyaux profonds (les noyaux dentelés, interposés et fastigiux) (**Figure 8A et B**) (Ramnani, 2006). Formé de 10 lobules, le cortex cérébral est très ordonné et présente un aspect très caractéristique (**Figure 8B**). Au niveau cellulaire, le cortex est composé de trois couches : granulaire, cellules de Purkinje (CP) et moléculaire (**Figure 8C**). Parmi les 5 types de neurones composants le cortex cérébral (cellules satellite, en corbeille, de golgi, granulaire et de Purkinje), les CP sont essentielles au traitement des informations reçues par le cervelet de la périphérie. Ces neurones piriformes possèdent des dendrites extrêmement ramifiées dans la couche moléculaire du cortex et leurs axones projettent dans la couche granulaire et la substance blanche pour aller former des synapses avec d'autres neurones dans les noyaux. Les noyaux profonds du cervelet servent de relais entre le cortex cérébelleux et le reste du système nerveux, chaque noyau communiquant avec différentes régions. Le noyau dentelé est le plus grand noyau gris profond. Les pédoncules cérébelleux, dans le tronc cérébral, font le lien entre le cervelet et le reste du SN. Les pédoncules cérébelleux supérieurs (dans le mésencéphale) relient les noyaux profonds du cervelet au cortex cérébral via le thalamus. Les pédoncules cérébelleux moyens du pont permettent le transit à sens unique de l'information des activités motrices volontaires déclenchées par le cortex moteur primaire au cervelet. Enfin les pédoncules cérébelleux inférieurs du bulbe rachidien permettent l'acheminement des informations sensorielles venant des récepteurs proprioceptifs. Ainsi, comment le cervelet fonctionne-t-il pour évaluer et réguler les mouvements et la posture lors d'une activité motrice (Marieb and Hoehn, 2015) ? Tout d'abord, les régions motrices du cortex cérébral informent le cervelet de leur intention de générer des contractions musculaires volontaires, grâce aux neurofibres via les pédoncules cérébelleux moyens. En parallèle, les informations proprioceptives (tension des muscles et

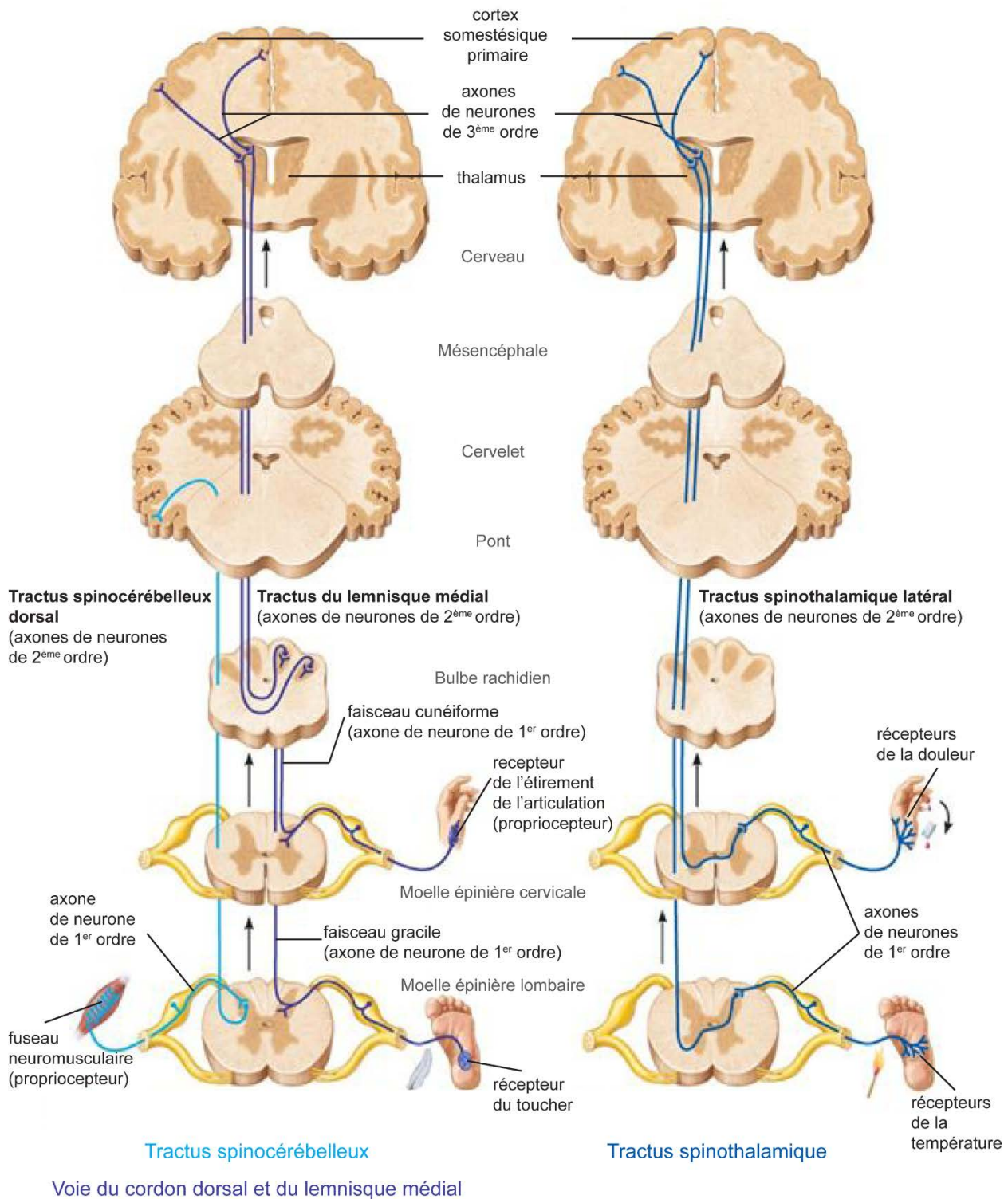


Figure 9 : Quelques faisceaux ascendants (sensitifs) et la chaîne de neurones associés.

A gauche : Le tractus spinocérébelleux dorsal transmet l'information proprioceptive inconsciente directement au cervelet, il n'y a pas de neurones de troisième ordre pour cette voie. Le tractus du lemnisque médial transmet les influx de la proprioception consciente et du toucher discriminant au cortex, en passant par les noyaux graciles et cunéiformes (synapse avec les neurones de deuxième ordre) et le thalamus (neurones de troisième ordre). A droite : Le tractus spinothalamique latéral est responsable de la nociception (douleur et température). Le thalamus sert également de relais jusqu'au cortex somesthésique. Coupes transversales jusqu'au cerveau (en coupe frontale) (Issu de [Anatomie et Physiologie Humaines, Marieb et Hoehn, 9^{ème} édition](#)).

des tendons, position des articulations) et d'équilibre sont acheminées vers le cervelet via les pédoncules cérébelleux inférieurs. Le cervelet peut donc apprécier la position du corps dans l'espace (amplifié à l'aide de la vision). Le cortex cérébelleux établit alors un plan d'action permettant de coordonner l'intensité, la direction et la contraction des muscles squelettiques, pour générer un mouvement précis et harmonieux avec une posture corporelle adaptée. Le plan d'action est alors dicté au cortex moteur primaire de l'encéphale via les pédoncules cérébelleux supérieurs. Ainsi, lors d'une activité motrice le cervelet évalue et adapte en permanence les mouvements et la posture. Il est également impliqué dans le langage, la pensée et les émotions.

Cortex cérébral

Le cortex cérébral, composé d'interneurons, correspond au sommet hiérarchique du système nerveux. De manière très simplifiée, il est le siège de la perception sensorielle et de la régulation de la motricité volontaire (Marieb and Hoehn, 2015). Les mouvements volontaires des muscles squelettiques sont contrôlés par les neurones pyramidaux au niveau du cortex moteur. Ces neurones pyramidaux, ou cellules de Betz, projettent leurs axones sur les motoneurons et interneurons formant le tractus corticospinal. Le cortex somesthésique primaire, lui, reçoit les informations somatosensorielles.

2.2.2.1.4. Les voies sensibles et motrices

Au niveau des voies sensibles, les axones des neurones sensitifs de premiers ordres (localisés dans les DRG) établissent des synapses avec les interneurons directement dans les cornes dorsales à la hauteur où ils pénètrent. Ils peuvent aussi remonter le long de la substance blanche dans les différents faisceaux et tractus et former des synapses avec des interneurons à des niveaux supérieurs (moelle épinière ou tronc cérébral). En fonction de la région à informer, les influx sensitifs somesthésiques sont transmis par trois voies : la voie spinothalamique, la voie du cordon dorsal et du lemnie discal et la voie spinocérébelleuse (**Figure 9**). Les deux premières voies transmettent leur influx au cortex somesthésique de l'encéphale. La troisième voie mène au cervelet directement. Il existe deux voies spinothalamiques : latérale et ventrale. Le tractus spinothalamique latéral transmet les influx sensitifs de douleur et de chaleur à l'encéphale (**Figure 7**). Les neurones de premier ordre établissent des synapses avec les neurones de deuxième ordre dans les cornes dorsales de la moelle (**Figure 9**). Les neurofibres croisent alors la ligne médiane et remontent jusqu'aux neurones de troisième ordre, dans le thalamus, par le tractus

spinothalamique latéral. Les neurones thalamiques transmettent ensuite l'influx sensitif au cortex somesthésique primaire. Le tractus spinothalamique ventral transmet les influx sensitifs relatifs aux sensations tactiles (toucher grossier, contact) et à la pression. La voie du cordon dorsal et du lemnisque médial est responsable des sensations tactiles fines et baresthésies ainsi que de la proprioception consciente, grâce aux récepteurs du toucher, localisés à la surface du corps et aux propriocepteurs respectivement. Les axones des neurones de premier ordre remontent le long des faisceaux graciles (partie inférieure du corps) et cunéiformes (partie supérieure du corps) dans les cordons dorsaux (**Figure 7**) et font synapses avec les interneurons de deuxième ordre dans les noyaux graciles et cunéiformes du bulbe rachidien (**Figure 9**). Les neurofibres croisent alors la ligne médiane et remontent jusqu'au thalamus (synapse avec les neurones de troisième ordre) puis au cortex. Enfin les voies spinocérébelleuses renseignent le cervelet sur l'étirement des muscles et des tendons (proprioception inconsciente). Les neurones de premier ordre établissent leurs synapses avec les neurones de deuxième ordre dans les cornes dorsales de la moelle, plus précisément, dans les noyaux de Clarke (colonne de Clarke) pour les membres inférieurs et le tronc et dans le noyau de Betcherew pour les membres supérieurs (**Figure 9**). Les axones des neurones de deuxième ordre montent ensuite par les tractus spinocérébelleux dorsaux (membres inférieurs et tronc) et ventraux (membres supérieurs) (**Figure 7**). Ils pénètrent dans le cervelet par le pédoncule cérébelleux inférieur et le pédoncule cérébelleux supérieur respectivement.

Les tractus descendants acheminent les influx moteurs (efférents) des régions motrices du cerveau aux motoneurons dans la moelle épinière. La voie motrice principale, également appelée voie pyramidale passe par les tractus corticospinaux et corticonucléaires (**Figure 7**) pour transmettre les influx moteurs volontaires aux muscles squelettiques. L'influx est initié dans les neurones pyramidaux du cortex moteur primaire. Ils forment ensuite des synapses avec des interneurons de la moelle ou directement avec les neurones moteurs inférieurs dans la corne ventrale. La décussation a lieu dans les pyramides du bulbe rachidien. Les tractus corticospinaux sont responsables de la contraction des muscles squelettiques des membres supérieurs et inférieurs. La contraction des muscles squelettiques du cou et de la tête est régie par les tractus corticonucléaires. La voie pyramidale permet donc la commande des mouvements fins et précis. Les voies motrices secondaires (tractus tectospinal, vestibulospinal, rubrospinal et réticulospinaux), autrefois appelées voies extrapyramidales, sont responsables des contractions musculaires semi-volontaires (tonus musculaire par exemple). Les axones des motoneurons de la moelle

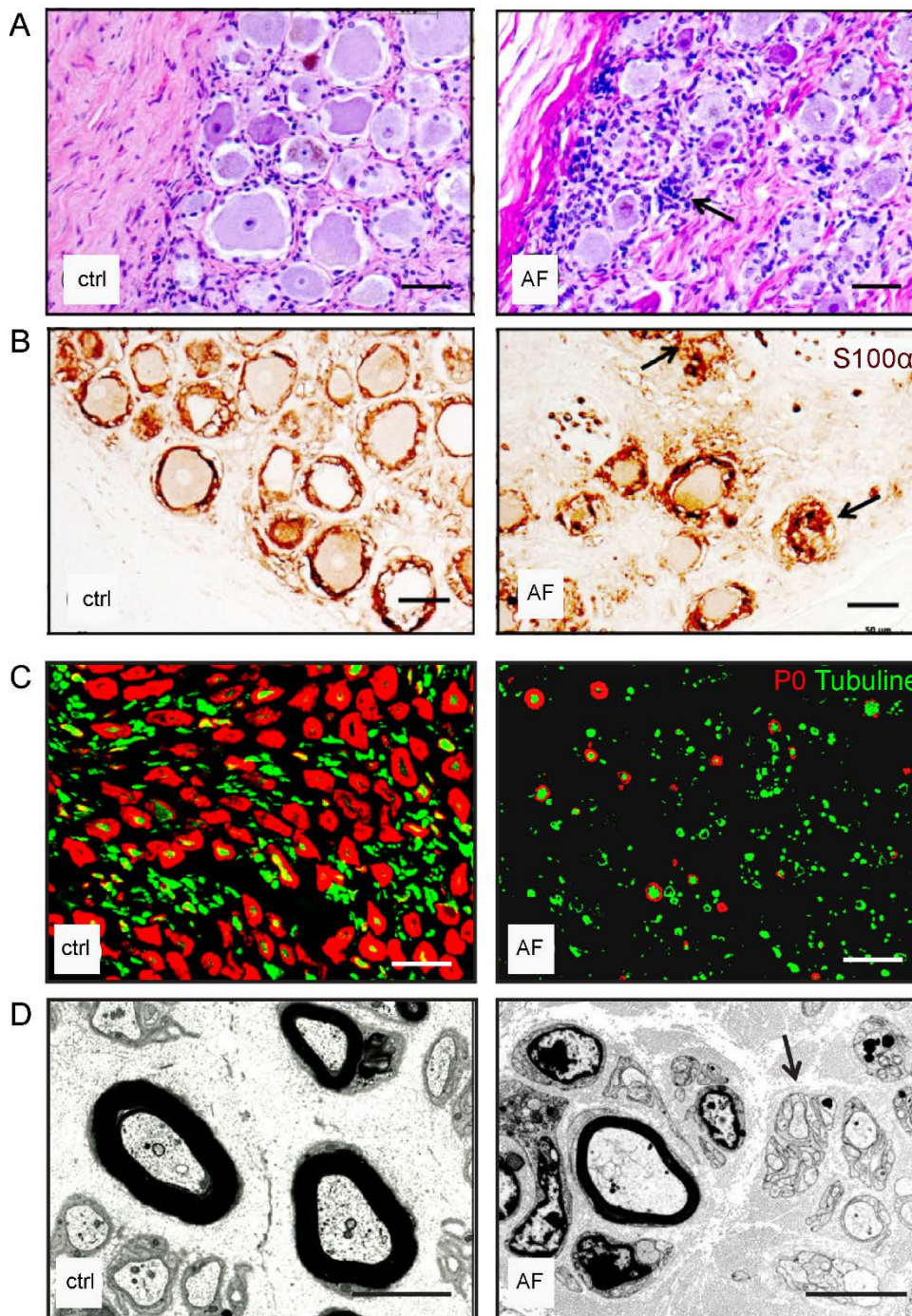


Figure 10 : Dégénérescence des larges neurones des DRG et neuropathie sensitive.

(A-B) Les DRG de patients AF montrent une diminution de la taille des neurones, une perte des larges neurones et la prolifération de cellules satellites pouvant se regrouper en nodules résiduels (flèches noires) par rapport aux contrôles (ctrl). Coloration hématoxyline-éosine (A) et immunohistochimie S100 α contre les cellules satellites (B). Barres de taille, 50 μ m. (C) La double immunofluorescence pour la protéine zéro de la myéline (P0 en rouge) et la tubuline axonale A de classe III (en vert) dans le nerf sural de patient AF par rapport au contrôle montre des axones présents mais avec un diamètre réduit et des défauts de myéline. Barres de taille, 25 μ m (D) Les nerfs présentent les mêmes déficiences en microscopie électronique avec des gaines de myéline peu épaisses ou absentes (flèche noire) et des neurofibres qui dégèrent. Barres de taille, 5 μ m. (Issu de [Koeppen et al., 2011](#) et [Koeppen et Mazurkiewicz, 2013](#))

épinière partent ensuite dans les racines ventrales des nerfs pour atteindre les muscles squelettiques.

2.2.2.2. Atteintes anatomopathologiques de l'AF

L'ataxie mixte, observée dans l'AF, résulte de dysfonctions dans la transmission de la position et de la somatosensation au cervelet et au cortex somatosensoriel dues à des anomalies à différents niveaux (DRG, nerfs périphériques, moelle épinière et cervelet). La majorité des recherches concernant l'anatomopathologie de l'AF sont effectuées sur des nécropsies de patients, donc généralement à des stades tardifs de la maladie. Il est donc difficile d'établir précisément quels sont les événements primaires et secondaires responsables des différents symptômes et différents débats existent dans le domaine.

Atteinte des neurones proprioceptifs et des nerfs sensitifs dans l'AF

La perte de la sensibilité profonde et du réflexe ostéotendineux résultent de la dégénérescence primaire des larges neurones sensitifs des DRG (Pandolfo, 2009). Des nécropsies de patients montrent des diminutions du nombre de gros neurones et de la taille des neurones (**Figure 10A**), ainsi qu'une prolifération des cellules satellites (**Figure 10B**) (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013). Ces cellules satellites, qui entourent normalement les neurones, peuvent former des nodules résiduels et participeraient à la destruction des larges neurones (Koeppen et al., 2016). Dans la communauté scientifique, les avis diffèrent concernant la pathologie des larges neurones des DRG. Classiquement, l'atteinte des neurones était décrite comme neurodégénérative conduisant à leur atrophie progressive puis à la mort cellulaire. Récemment, un processus d'hypoplasie résultant d'un problème développemental plutôt qu'un processus de neurodégénérescence et d'atrophie a été proposé (Koeppen et al., 2017). Cette hypothèse résulte du fait que la diminution de la taille des neurones analysés dans les nécropsies est similaire dans les différentes nécropsies, indépendamment de l'âge de décès des patients, de l'âge de début et de la progression de la maladie. Ainsi, la question de mécanismes hypoplasiques, atrophiques ou une association des deux se pose. De cette question découle une autre question : au moment du diagnostic, les larges neurones proprioceptifs, bien que déficients, sont-ils encore présents dans les DRG ? Et, si ils sont présents, à quel point sont-ils plastiques et le phénotype réversible ? Au niveau des racines dorsales, les larges fibres myélinisées issues des DRG qui pénètrent normalement dans le SNC sont affectées. Dans le SNP une neuropathie sensitive périphérique est également décrite (Delatycki and Corben, 2012). Dans le nerf sural de

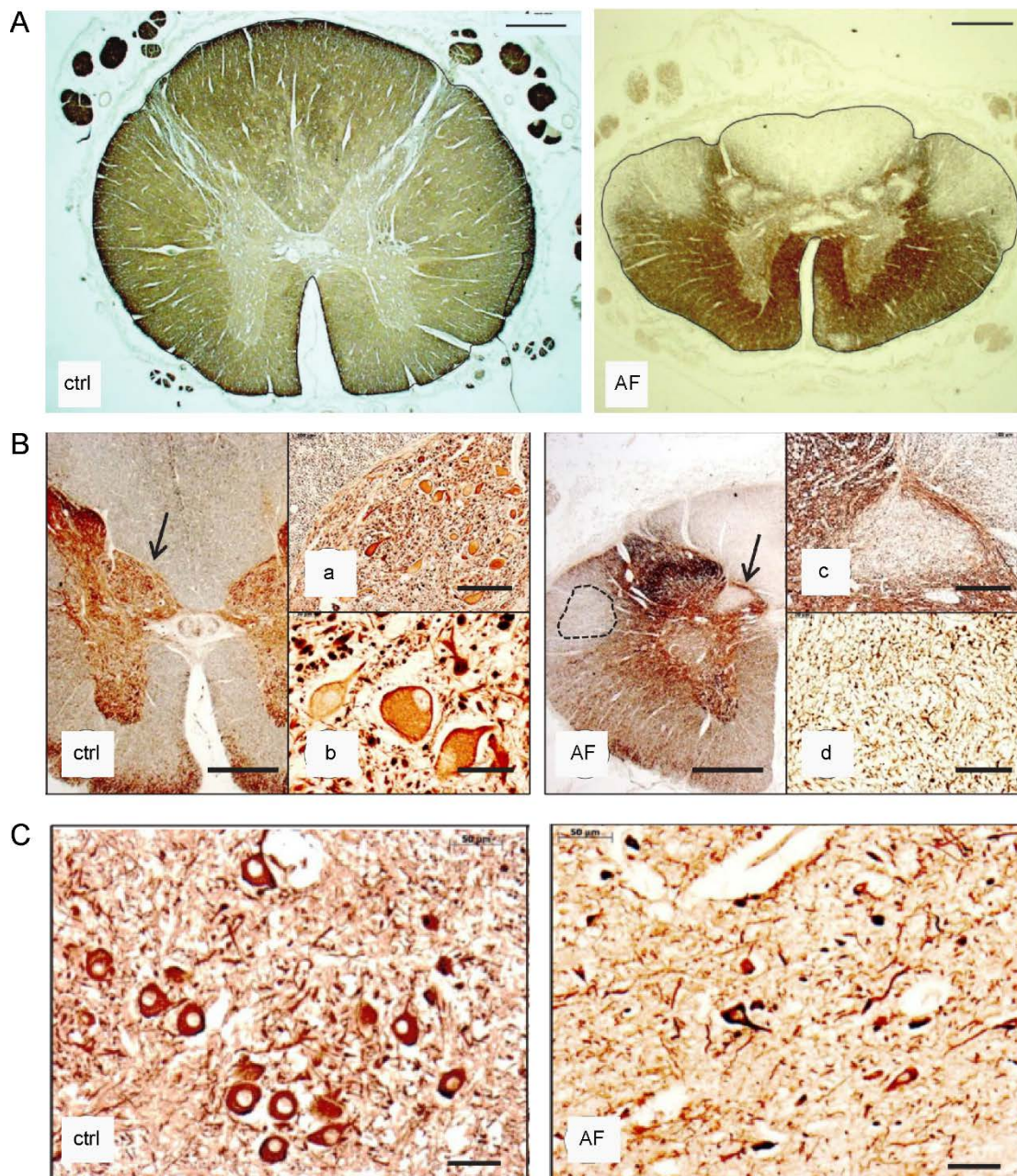


Figure 11 : Atteinte de la moelle épinière et dégénérescence de différents faisceaux et noyaux.

(A Des sections transverses de moelle épinière thoracique contrôle (ctrl) et AF avec un immunomarquage de la protéine basique de la myéline (MBP) montrent une réduction de la taille de la moelle et des pertes de fibre myélinisées dans les colonnes dorsales, dans les faisceaux spinocérébelleux dorsaux et dans les tractus corticospinaux latéraux. Barres de taille, 1mm (B) La dégénérescence de ces faisceaux et tractus est également visible avec un marquage β -tubuline classe III ; ligne interrompue : tractus corticospinal latéral. Les images (a) et (b) sont des grossissements de la région pointée avec la flèche dans le ctrl, correspondant à la colonne de Clarke (idem AF, (c) et (d)). La colonne de Clarke (relais dans le voie spinocérébelleuse) dégénère avec la perte des larges noyaux dorsaux dans les moelles AF (c, d) par rapport au contrôle (a, b)). Barres de taille, 1mm et grossissement (a, c) 200 μ m et (b, d) 50 μ m. (C) Atrophie neuronale mise en évidence dans le noyau gracile de patients AF par rapport au contrôle avec une immunochimie anti-neurofilament. Barre de taille 50 μ m. (Issu de [Koeppen et al., 2017](#) ; [Koeppen and Mazurkiewicz, 2013](#))

patients, un nerf purement sensitif, les axones sont encore présents mais une diminution de leur diamètre et de la myélinisation est observée (**Figure 10C et D**) (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013). Cette neuropathie sensitive corrèle avec les résultats d'électromyogrammes (EMG) qui présentent des potentiels d'actions sensitifs réduits ou absents. A ce jour, l'origine de cette neuropathie n'est pas déterminée : résulte-t-elle de la dégénérescence rétrograde des neurones proprioceptifs ? Où est-elle une pathologie indépendante qui amplifie les dommages dans les DRG ?

Atteintes spinocérébelleuses dans l'AF

La moelle épinière des patients AF est plus fine que celle d'individus sains et présente une atrophie dégénérative des projections axonales dans les colonnes postérieures de la moelle (**Figure 11A**) (Koeppen, 2013). L'atrophie des différentes structures semble résulter de la perte des larges neurones sensitifs des DRG. Elle serait donc une pathologie secondaire mais, elle pourrait aussi être primaire et commencer après la dégénérescence des larges neurones proprioceptifs. Dans la continuité de défauts développementaux et non neurodégénératifs, Koeppen et al. proposent une hypoplasie de la moelle épinière. Il l'explique par un canal de la moelle épinière plus étroit chez les patients AF résultant d'un élargissement incomplet de la moelle pendant la croissance (Koeppen et al., 2017).

Les faisceaux graciles et cunéiformes, formant la colonne dorsale dégénèrent (**Figure 11 A et B**) avec des défauts plus marqués au niveau lombaire (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013). En ligne, dans le bulbe rachidien, les larges neurones de second ordre de la voie du cordon dorsal et lemnisque médial (noyaux gracile et cunéiformes) sont absents dans des nécropsies de patients (**Figure 11C**). Le noyau gracile (membres inférieurs) est plus atteint que le noyau cunéiforme (membres supérieurs). La dégénérescence des faisceaux spinocérébelleux est également plus sévère au niveau des faisceaux dorsaux (proprioception inconsciente des membres inférieurs) que ventraux (proprioception inconsciente des membres supérieurs) (**Figure 11A**).

La voie spinocérébelleuse dorsale a pour relais la colonne de Clarke dans les racines de la moelle (les neurones de premier ordre y forment des synapses avec les neurones de deuxième ordre). Les larges neurones sont absents dans la colonne de Clarke des patients AF (**Figure 11B**).

Au niveau moteur, l'atrophie progressive des tractus corticospinaux, particulièrement au niveau lombaire est responsable de la spasticité des membres inférieurs, de la faiblesse musculaire et des réflexes moteurs anormaux spécifiques de l'AF (Pandolfo, 2009). La portion spinale de ces tractus dégénère et présente des défauts de myéline (**Figure 11A et**

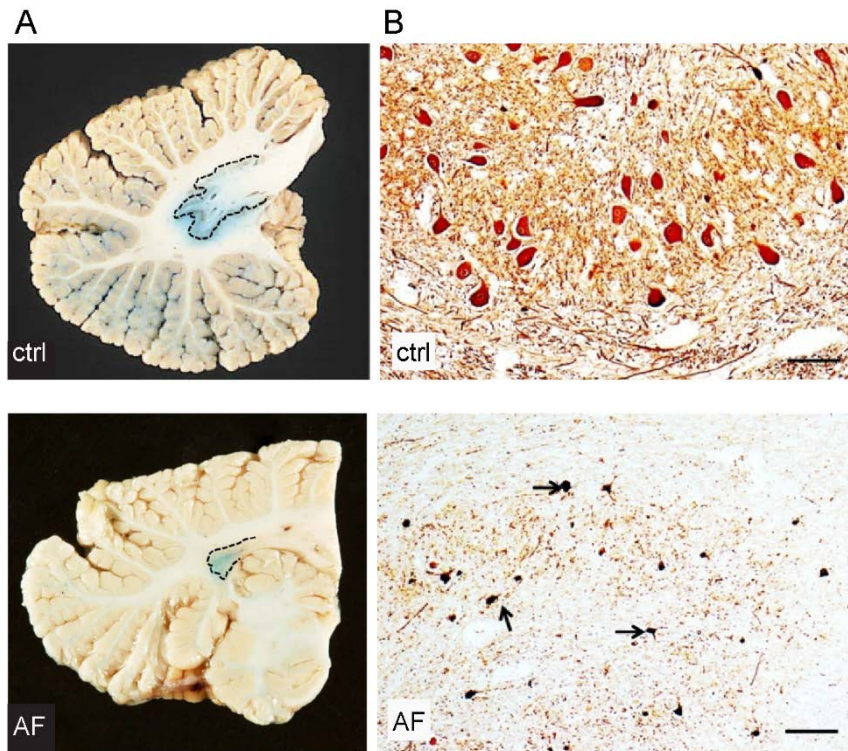


Figure 12 : Atrophie du noyau dentelé du cervelet.

(A) Le noyau dentelé du cervelet est fortement atrophié chez les patients AF par rapport aux contrôles (ctrl) (marquage pour le fer). Le reste du cervelet ne présente pas d'autre déficience majeure. (B) Une perte massive des gros neurones du noyau dentelé du cervelet est observée chez les patients AF par rapport aux contrôles grâce à une immunocytochimie anti NSE (neurones specific enolase). Les flèches (AF) indiquent des petits neurones non affectés. Barre de taille, 100µm. (Issu de [Koeppen, 2011](#))

B). De plus, dans les pyramides médullaires une atrophie des décussations corticospinales est observée et le nombre de cellules de Betz du cortex moteur primaire diminue (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013).

Atteintes cérébelleuses et cérébrales dans l'AF

Le cervelet est également un lieu de dégénérescence primaire de l'AF, avec l'atrophie du noyau dentelé (**Figure 12**) (Koeppen, 2011). Le noyau dentelé, source majeure de fibres efférentes du cervelet contient naturellement beaucoup de fer (Selvadurai et al., 2018). L'atrophie de ce noyau est associée à la perte sélective de ses gros neurones (**Figure 12**), de leurs fibres myélinisées efférentes, ainsi qu'à une gliose. Traditionnellement, seule l'atteinte du noyau dentelé était décrite dans l'AF. En effet, de manière globale, le cortex cérébelleux reste intact. Cependant, au cours de la dernière décennie, les nouvelles techniques de neuro-imageries ont permis d'identifier d'autres atteintes cérébelleuses et cérébrales légères (Selvadurai et al., 2018). Des anomalies de microstructures de la substance grise et blanche peuvent être observées dans le cervelet. De plus, certaines cellules de Purkinje présentent un élargissement et un gonflement axonal dans la couche granulaire ainsi que des défauts au niveau des terminaisons synaptiques avec les neurones du noyau dentelé (prolifération et désorganisation) (Kemp et al., 2016). Ces défauts traduisent probablement des dégénérescences rétrogrades des cellules de Purkinje, à partir des neurones atrophiés du noyau dentelé, qui ne peuvent alors plus établir leurs synapses. Mais ils peuvent aussi être une conséquence directe de l'absence de frataxine, ou une combinaison des deux. Une atrophie, avec une démyélinisation, du pédoncule cérébelleux supérieur et de ses noyaux rouges est également présente chez les patients AF (Corben et al., 2014). Les noyaux rouges reçoivent les terminaisons des neurofibres du noyau dentelé. Leur atrophie entraîne donc un défaut de connectivité du cervelet au cortex cérébral. Enfin, des dysfonctions cérébrales légères ont été identifiées avec des disruptions dans l'intégrité de la substance blanche et dans la substance grise (Selvadurai et al., 2018).

Ainsi, le système sensitif responsable de la proprioception est compromis dans de nombreuses régions du SN, de la périphérie jusqu'à l'encéphale. Il semblerait que les neurones proprioceptifs des DRG et le noyau dentelé soient les sites primaires de dégénérescence de l'AF. Cependant, la cinétique des déficiences est difficile à étudier de par l'étude de l'anatomopathologie sur des nécropsies de patients.

2.3. Atteintes extra-neurologiques

La majorité des patients développent une cardiomyopathie, en général tôt au cours de la maladie. Le phénotype cardiaque est assez variable mais des échocardiographies (ECG) montrent une cardiomyopathie hypertrophique avec, particulièrement, un épaississement de la paroi du septum et du ventricule gauche (Payne, 2011). L'hypertrophie évolue ensuite vers une dilatation cardiaque qui résulte de la perte des cardiomyocytes et de la mise en place de fibrose. Il n'y a pas de corrélation entre les sévérités cliniques cardiaques et neurologiques.

Les patients ont tendance à développer un diabète ou une intolérance au glucose (10 à 30%). Toujours secondaire aux autres pathologies (apparition en générale 15 ans après le début de la maladie), ce diabète résulte de l'atrophie des îlots β du pancréas en parallèle d'un déclin de la production d'insuline par les cellules β restantes (Koeppen, 2011). Une résistance à l'insuline se met aussi en place, aggravant les défauts pancréatiques. Une corrélation entre l'âge de début, la durée de la maladie et le risque de diabète a été décrite (Bürk, 2017). L'intolérance au glucose et le diabète sont à évaluer régulièrement chez les patients. En effet, un diabète non pris en charge pourrait entraîner l'aggravation des symptômes neurologiques (neuropathie diabétique et troubles de l'audition et de la vision).

La majorité des patients (60 à 80%) présentent aussi des déformations du squelette avec une scoliose (courbure majoritairement thoracique et lombaire) (**Tableau 2**). Cette scoliose peut être légère et peu handicapante mais elle peut aussi être très sévère et nécessiter une procédure chirurgicale (Parkinson et al., 2013). Certains patients (20 à 40%) présentent des troubles du sphincter et des problèmes intestinaux et urinaires. Ces éléments sont peu étudiés mais le confinement en fauteuil roulant amplifie ces symptômes. Comme pour de nombreuses maladies chroniques, de nombreux cas de dépression sont rapportés, allant d'une baisse de morale à une dépression sévère. Enfin les patients évoquent très souvent une grande fatigabilité, mais elle n'est renseignée que par très peu d'informations médicales.

2.4. Variabilité clinique

Environ 75% des patients présentent une forme typique de l'AF (décrite ci-dessus). Les autres 25% présentent des formes atypiques avec une apparition tardive ou des réflexes ostéotendineux maintenus (absence de certains critères de diagnostic). Dans les formes tardives de l'AF, les patients développent des symptômes après 25 ans ou après 40 ans, on

parle de LOFA (*late onset Friedreich ataxia*) et VLOFA (*very late onset Friedreich ataxia*) respectivement (Bürk, 2017; McCabe et al., 2000). Chez ces patients la maladie progresse en générale plus lentement et les atteintes non neurologiques sont peu présentes (cardiomyopathie, diabète et scoliose), mais, ils développent un phénotype plus spastique. Il existe également une forme très précoce de la maladie (*early onset Friedreich ataxia*) (Harding, 1981). Chez ces patients précoces, la progression de l'AF est extrêmement rapide et sévère et les atteintes non neurologiques sont très présentes. La FARR (*Friedreich ataxia with retained reflexes*) associe l'ensemble des symptômes de l'AF classique mais avec une neuropathie sensitive limitée et la conservation des réflexes ostéotendineux. De manière générale, l'AF est une maladie à progression et sévérité très variable entre patients. Cette variabilité est interfamiliale, en partie lié à la génétique (voir paragraphe 3) mais également intrafamiliale (impliquant donc d'autres paramètres que la génétique).

2.5. Espérance de vie et décès prématuré

L'ataxie de Friedreich est associée à un décès prématuré des patients, avec un âge moyen à 36,5 ans (très variable entre patients). La cardiomyopathie et les complications cardiaques sont responsables de la majorité des décès (60%) et diminue l'espérance de vie à 25 ans (Tsou et al., 2011). Des dysphagies, pneumonies résultant de dysphagies ou des comas diabétiques sont d'autres causes de décès prématurés (Bürk, 2017).

Le tableau clinique de l'AF est donc particulièrement sévère et démontre le caractère très handicapant de la maladie pour les patients au quotidien.

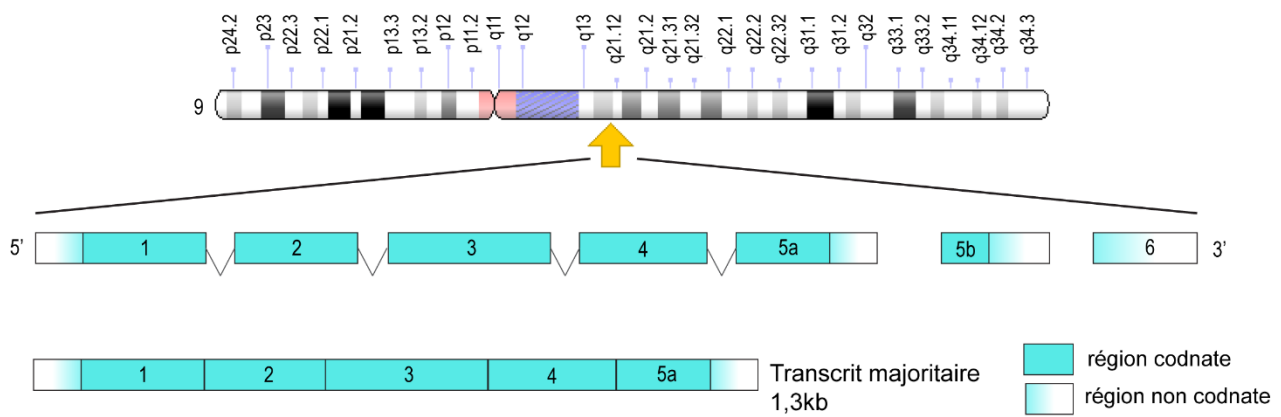


Figure 13 : Localisation chromosomique et structure du gène *FXN*.

Le gène *FXN* est localisé sur le bras long du chromosome 9 au locus q21.11. Il est composé de 7 exons, avec les exons 1 à 5a formant le transcrit majoritaire de 1,3 kb. Les échelles ne sont pas respectées.

3. L'ataxie de Friedreich, une maladie génétique

3.1. Mutations dans le gène *FXN*

3.1.1. Historique de l'identification du gène et expression du gène

L'AF est une maladie autosomique récessive, dont le caractère héréditaire avait déjà été mis en évidence en 1873, par N. Friedreich (Koeppen, 2013). En 1988 et 1989, des études de liaison ont permis de déterminer l'emplacement chromosomique de la mutation. Le gène muté est lié à deux marqueurs chromosomiques localisés sur le chromosome 9 : MCT112 (D9S15) et D9S5 (Chamberlain et al., 1988; Fujita et al., 1989). La localisation précise du marqueur D9S5 (9q13-q21.1) a ensuite été identifiée par hybridations *in situ*, plaçant le gène de l'AF dans cette région précise (Hanauer et al., 1990). Par la suite, la diminution de cette région à 150kb a entraîné la proposition de différents gènes candidats et le gène causatif a finalement été identifié en 1996, au locus 9q21.11 (Figure 13) (Campuzano et al., 1996). Ce gène, X25, a alors été renommé *FXN* et la protéine qu'il encode a été appelée frataxine (FXN), du nom de la pathologie.

Le gène *FXN* est composé de 7 exons, les exons 1 à 5a formant le transcrit majoritaire (1,3 kb) (Figure 13). Un transcrit minoritaire (incluant l'exon supplémentaire 5b) peut être formé mais aucune fonction significative ne lui a été attribué (Pandolfo, 2009). Ce gène est exprimé de manière ubiquitaire mais à différents niveaux, avec une expression particulièrement forte dans le cœur et la moelle épinière et légèrement moins dans le foie, le pancréas et les muscles squelettiques (Campuzano et al., 1996). Chez la souris, l'expression du gène *Fxn* commence au stade embryonnaire (détection expérimentale à E10,5, mais probablement plus tôt au cours du développement) et augmente progressivement (Koutnikova et al., 1997).

Deux types de mutations du gène *FXN* sont retrouvés chez les patients AF. La mutation majeure est une répétition de triplet GAA (Campuzano et al., 1996). Elle est présente à l'état homozygote pour 96% des patients. Les 4% restants sont hétérozygotes composites, ils présentent l'expansion pathogénique sur un allèle et une autre mutation (ponctuelle ou large délétion) sur l'autre allèle (Cossée et al., 1999; Galea et al., 2016; Gellera et al., 2007). Les différentes mutations sont représentées dans la figure 14 (liste non exhaustive des mutations ponctuelles).

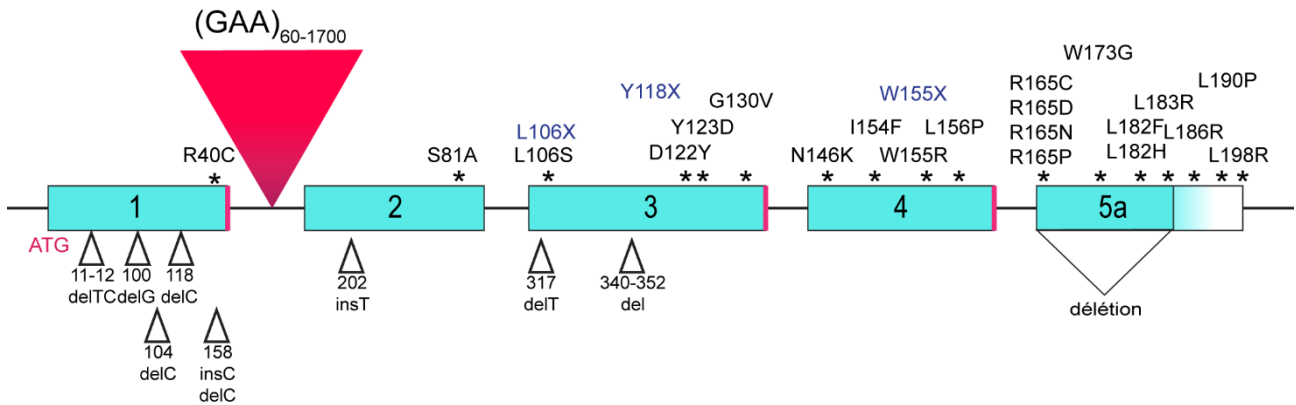


Figure 14 : Différentes mutations du gène *FXN*.

L'expansion GAA (triangle rose) dans l'intron 1 du gène *FXN* est la mutation majeure de l'AF avec 96% des patients homozygotes pour ces expansions et 4% hétérozygotes composites. Les hétérozygotes composites présentent une expansion GAA sur un allèle et une mutation ponctuelle sur l'autre allèle (mutations faux-sens : * ; insertions/délétions : triangles ; mutations au niveau de sites d'épissages : traits roses ; mutations à l'ATG : en rose ; et mutations non-sens : en bleu) (Adapté de Cossée et al., 1999 ; Galea et al., 2016).

3.1.2. Mutation majeure de l'AF : expansion de trinuécléotides GAA

L'ataxie de Friedreich fait partie de la famille des maladies à expansion de trinuécléotides. Mais, elle se différencie des autres pathologies de ce groupe en raison de son caractère récessif, de la spécificité du trinuécléotide et de sa localisation génique. L'AF résulte d'une expansion du triplet GAA dans le premier intron du gène *FXN*, au niveau d'une séquence ALU (**Figure 14**) (Campuzano et al., 1996). Chez les individus sains, une répétition de 7 à 30 GAA est présente dans le premier intron du gène, avec la majorité des allèles contenant 7 à 10 répétitions. On parle alors d'expansion normale courte (SN pour *short normal*). Entre 11 et 30 répétitions on parle d'expansion normale longue (LN, *long normal*). Les expansions pathogéniques des patients (E, *expanded*) vont de 60 à 1700 répétitions GAA, avec une moyenne entre 600 et 900 triplets (Dürr et al., 1996). Une expansion de 30 à 60 nucléotides est considérée comme une pré-mutation en raison d'un caractère instable (expansion stable jusqu'à 30 nucléotides), elle sera donc sujette à former des expansions pathologiques (Cossee et al., 1997; Montermini et al., 1997). Un effet fondateur serait à l'origine de ces expansions pathologiques. Une expansion de petite taille (SN) aurait été dupliquée en une expansion LN. Une nouvelle duplication de l'expansion LN aurait entraîné la formation d'une expansion instable (entre 30 et 60 GAA) (Cossee et al., 1997). Ces grandes expansions sont particulièrement instables lors de la transmission, avec un effet parental important. Ainsi les expansions pathogéniques ont pu apparaître progressivement dans les générations suivantes. L'instabilité peut conduire à une augmentation du nombre de GAA mais également une diminution. Il a été observé que l'allèle maternel peut s'étendre ou se contracter alors que l'allèle paternel tend à se contracter uniquement (Montermini et al., 1997; Pandolfo and Pastore, 2009). L'instabilité de l'expansion est également somatique (De Biase et al., 2007a, 2007b). Cette mutation GAA est portée par l'ensemble des patients, à l'état homozygote ou hétérozygote (associé à une autre mutation). A l'état homozygote, sur les deux allèles, les expansions sont en général de tailles différentes. Les individus porteurs d'un allèle pathogénique et d'un allèle normal ne sont pas affectés (porteurs sains).

3.1.3. Autres mutations

Chez les patients hétérozygotes composites (4%), la deuxième mutation peut correspondre à une mutation ponctuelle ou une large délétion.

Exon / Intron	Mutation	Effet	Type de mutation	Nombre de familles	Origine ethnique
Exon 1	c.1 A>C	p.M1L	Faux-sens (initiation incorrecte)	1	Etats-Unis
	c.2 T>C	p.M1T	Faux-sens (initiation incorrecte)	1	Suède
	c.2 delT	p.M1S	Faux-sens (initiation incorrecte)	1	Australie
	c.3 G>T	p.M1I	Faux-sens (initiation incorrecte)	3	Allemagne
	c.3 G>A	p.M1I	Faux-sens (initiation incorrecte)	1	Etats-Unis
	c.11-12 delTC	p.L4RfsX90	Décalage du cadre de lecture	1	Malaisie
	c.100 delG	p.A34PfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	Italie
	c.104 delC	p.P35HfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	Italie
	c.118 C>T	p.R40C	Faux-sens	1	Etats-Unis
	c.118 delC	p.R40VfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	Espagne
	c.157 delC	p.R53AfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	France
	c.157 insC	p.R53PfsX92	Décalage du cadre de lecture	1	Pologne
	g.IVS1+5 G>C	Epissage abérrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Etats-Unis
	c.202_205 delGTCainsTTG	p.V68LfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	Caucasien
	c.296_297 insT	p.A99VfsX111	Décalage du cadre de lecture	1	Basque
Intron 3	c.317 T>G	p.L106X	Non-sens	1	France
	c.317 T>C	p.L106S	Faux-sens	1	Etats-Unis
	c.317 delT	p.L106X	Non-sens	1	Caucasien
	c.340_352 delI13	p.A114TfsX128	Décalage du cadre de lecture	1	Caucasien
	c.354 C>G	p.Y118X	Non-sens	1	Italie
	c.364 G>T	p.D122Y	Faux-sens	1	Allemagne
	g.IVS3+1 G>A	Epissage abérrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Caucasien
	g.IVS3-2 A>G	Epissage abérrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Espagne
	g.168_180delITGGGGTACCCTCTT	Epissage abérrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Italie
	c.389 G>T	p.G130V	Faux-sens	5	Etats-Unis, Australie, France, Irlande
	c.438 C>G	p.N146K	Faux-sens	1	Allemagne
	c.460 A>T	p.I154F	Faux-sens	3	Italie
	c.464 C>T	p.W155R	Faux-sens	1	Etats-Unis
	c.465 G>A	p.W155X	Non-sens	1	Cuba
	c.467 T>C	p.L156P	Faux-sens	1	Suède
Intron 4	g.IVS4+2 T>G	Epissage abérrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Australie
	g.IVS4+3 delA	Epissage abérrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Italie
Exon 5a	c.493 C>T	p.R165C	Faux-sens	2	Etats-Unis, Australie
	c.494 G>C	p.R165P	Faux-sens	1	Italie
	c.517 T>G	p.W173G	Faux-sens	2	Etats-Unis, Italie
	c.544 C>T	p.L182F	Faux-sens	1	Australie
	c.545 T>A	p.L182H	Faux-sens	1	France
	c.548 A>G	p.H183R	Faux-sens	1	France
	c.557 T>G	p.L186R	Faux-sens	1	Allemagne
	c.93 T>G	p.L198R	Faux-sens	1	Irlande

Tableau 3 : Liste des mutations ponctuelles identifiées dans le gène FXN. (Issu de Gellera et al., 2007) del : délétion, ins : insertion, fs : frameshift

Mutations ponctuelles

Plus de 40 mutations ponctuelles ont été identifiées, avec des mutations non-sens, faux-sens, des petites insertions et délétions conduisant à un décalage du cadre de lecture ou encore des mutations d'épissage (exemples de mutations dans la **Figure 14, Tableau 3**) (Cossée et al., 1999; Galea et al., 2016; Gellera et al., 2007; Musco et al., 2000). Elles conduisent à l'absence d'une frataxine fonctionnelle (absence de synthèse protéique ou expression d'une frataxine tronquée ou non fonctionnelle) et touchent toutes des résidus conservés (Pandolfo and Pastore, 2009). Avec l'addition de l'expansion GAA, certaines mutations (en fonction du résidu affecté et de sa localisation dans la protéine par exemple) mènent à un phénotype classique de l'AF, par exemple les mutations I154F et W155R, alors que d'autres mutations mènent à des formes atypiques ou modérée tel que G130V. Certaines mutations ponctuelles ont été fonctionnellement et structurellement étudiées pour comprendre la structure et le rôle de la frataxine mais aussi pour comprendre les mécanismes moléculaires de la maladie. Par exemple, certaines mutations ponctuelles affectent l'entrée de la protéine dans la mitochondrie (mutations G130V, I154F), certaines entraînent un mauvais repliement et une dégradation de la protéine mature (L106S, G137V) et d'autres perturbent la fonction de la frataxine par l'inhibition de son interaction avec d'autres protéines (N146K, W155R, R165C) (Calmels et al., 2009; Clark et al., 2017; Faggianelli et al., 2015; Schmucker et al., 2011). Les effets des 44 mutations identifiées ne sont, actuellement, pas tous connus.

Larges délétions exoniques

Des hétérozygotes composites ont été identifiés avec de très larges délétions exoniques dans le gène *FXN* ; 10 cas ont été décrits (Parkinson et al., 2013). Les individus avec une large délétion présentent majoritairement des symptômes sévères avec une progression rapide. Par exemple, deux cas de délétions de l'exon 5a ont été décrits, les patients présentent un phénotype classique mais à progression rapide avec une absence de dysarthrie. En 2012, 6 cas de délétions larges (exons 2 et 3, exon 4 ou encore exons 4 et 5) ont été décrits (Anheim et al., 2012b). Ces patients développent des symptômes de manière précoce avec des atteintes neurologiques sévères et des atteintes extra-neurologiques très présentes (diabète, scoliose et cardiomyopathie).

A ce jour, aucun patient homozygote pour des mutations ponctuelles ou des larges délétions dans le gène *FXN* n'a été identifié. Cette absence peut s'expliquer par la fréquence faible des mutations ponctuelles ou par la sévérité des mutations. En effet, la frataxine est

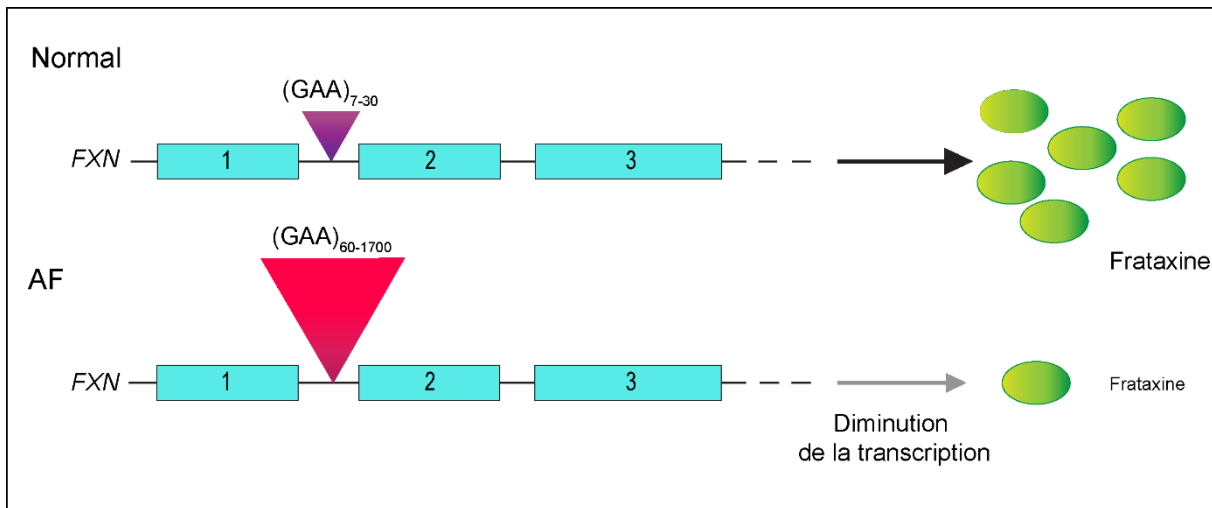


Figure 15 : Bases génétiques et moléculaire de l'AF.

L'expansion pathogénique GAA de 60 à 1700 répétitions dans le premier intron du gène *FXN* entraîne une diminution de l'expression de la frataxine (diminution de la transcription). La frataxine exprimée dans les cellules des patients AF (5 à 30%) est normale et fonctionnelle. Un allèle normal contient 7 à 30 répétitions GAA.

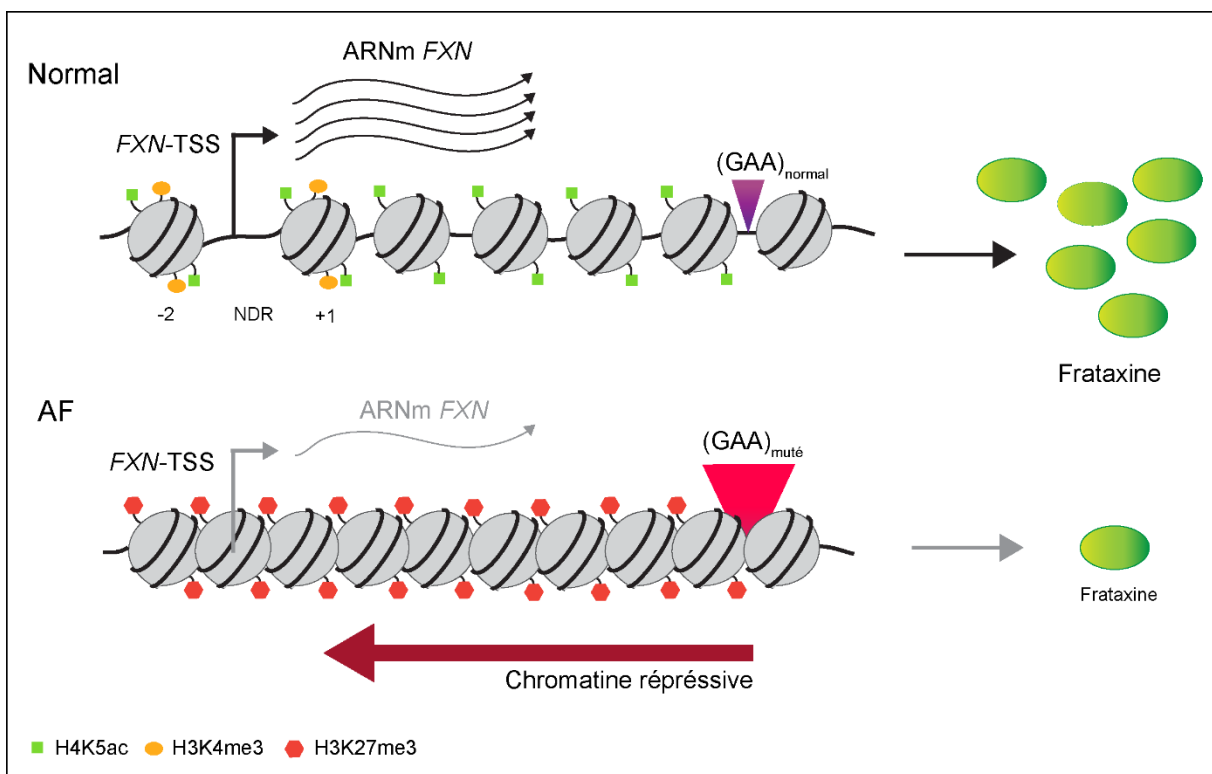


Figure 16 : Hétérochromatinisation du locus *FXN* et déficience de l'initiation de la transcription.

L'expansion pathogénique GAA initie une répression de la chromatine qui se propage jusqu'au promoteur du gène. Des modifications post-transcriptionnelles des histones associées à l'hétérochromatine, sont alors retrouvées avec par exemple la triméthylation des histones H3K27 (H3K27me3) et l'hypoacétylation des histones H4K5 (H4K5ac). Ceci entraîne une transcription fortement réduite du gène et donc l'expression faible de l'ARNm *FXN* et de la frataxine. NDR : région déplétée de nucléosomes (*nucleosome depleted region*). TSS : *transcription start site* (Adapté de Chutake et al., 2014).

une protéine essentielle et son absence au cours du développement résulte en une létalité précoce (Calmels et al., 2009; Cossée et al., 2000). Ainsi deux mutations ponctuelles menant à l'absence de frataxine ou à une frataxine non fonctionnelle ne seraient pas viables. Et de manière inverse, deux mutations moins sévères éviteraient le développement du phénotype pathologique (mutations asymptomatiques).

3.2. Conséquences de l'expansion GAA sur l'expression du gène *FXN*

3.2.1. Diminution de l'expression du gène

L'expansion pathogénique GAA conduit à une diminution de l'expression de la frataxine (**Figure 15**). En comparaison aux individus contrôles, les patients présentent des niveaux résiduels de frataxine, estimés entre 5 et 30% (Campuzano et al., 1997). Une diminution de la transcription du gène est responsable des niveaux réduits de frataxine mais la protéine produite est normale et fonctionnelle. Les porteurs sains expriment environ 50% de frataxine. Les taux de frataxine exprimés sont inversement corrélés à la longueur de l'expansion de trinuécléotides. Plus l'expansion est longue, plus la diminution transcriptionnelle sera sévère. Les mécanismes responsables de la diminution d'expression de la frataxine résultant de l'expansion GAA ont été particulièrement étudiés dans de nombreux modèles de la maladie ainsi que dans des cellules de patients. A l'heure actuelle, le mécanisme exact n'est pas connu mais il semblerait que ce soit une combinaison de deux éléments : une extinction transcriptionnelle (silencing transcriptionnel) et la formation de structures secondaires de l'ADN.

3.2.2. Mécanismes responsables de la diminution d'expression du gène *FXN*

*Extinction transcriptionnelle du gène *FXN**

Une hétérochromatinisation du locus est observée dans les cellules de patients ainsi que dans les modèles animaux présentant une expansion GAA (**Figure 16**) (paragraphe 5.2.1). En effet, en présence d'une expansion pathogénique GAA, des modifications post-transcriptionnelles d'histones sont présentes avec des marques d'hétérochromatine (H3K9me2, H3K9me3, ou encore H3K27me3 autour de l'expansion GAA) (Herman et al., 2006; Saveliev et al., 2003). Des différences de méthylation des îlots CpG ont également été détectées (Al-Mahdawi et al., 2008). Cette extinction épigénétique est restreinte au locus *FXN* et n'affecte pas les gènes voisins (Li et al., 2015a). La répression de la chromatine

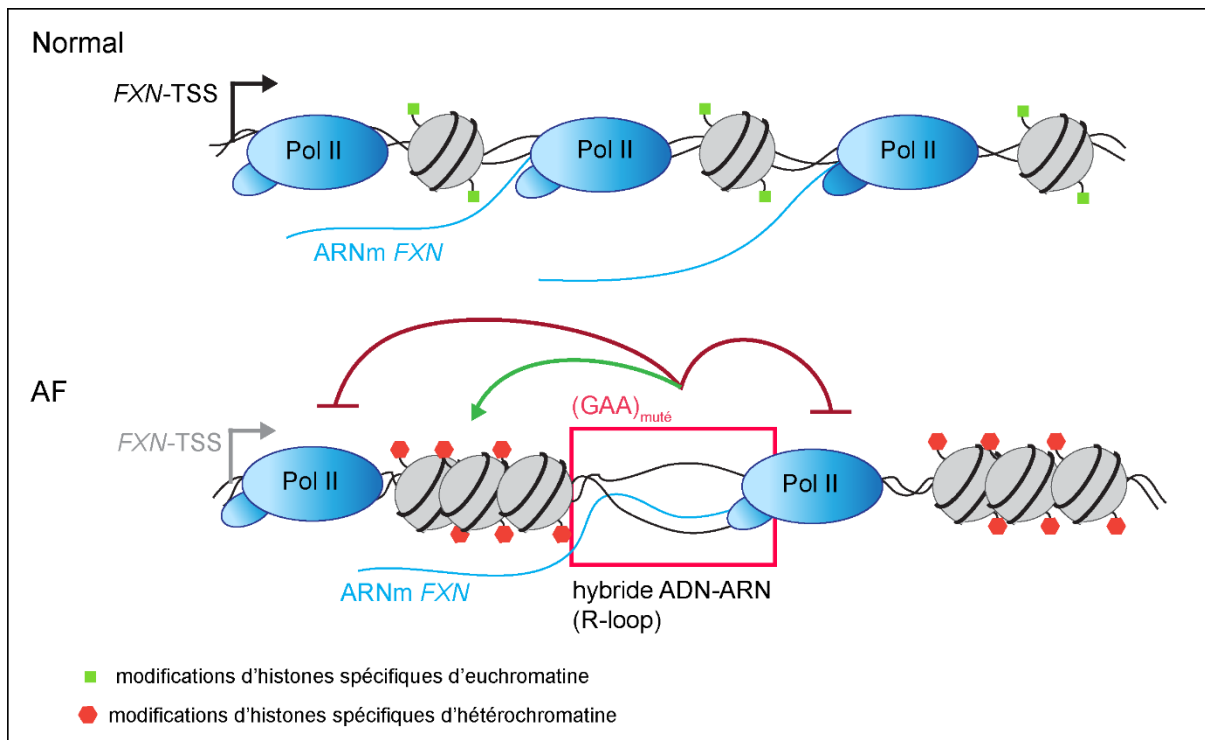


Figure 17 : Modèle pour le rôle des R-loops dans l'altération de la transcription du gène *FXN* et le silencing épigénétique du locus.

Au niveau de l'expansion pathogénique de triplets GAA, l'ARNm en cours de formation s'hybride avec l'ADN modèle, formant une structure hybride ADN-ARN, appelée R-loop. Cette structure conduit à la diminution de l'expression de la frataxine en induisant des défauts dans la progression de la machinerie de transcription (pause de l'ARN polymérase II) et entraîne la fermeture de la chromatine jusqu'au promoteur conduisant à un silencing épigénétique. TSS : *transcription start site*, Pol II : ARN polymérase II. (Issu de Groh et al., 2014).

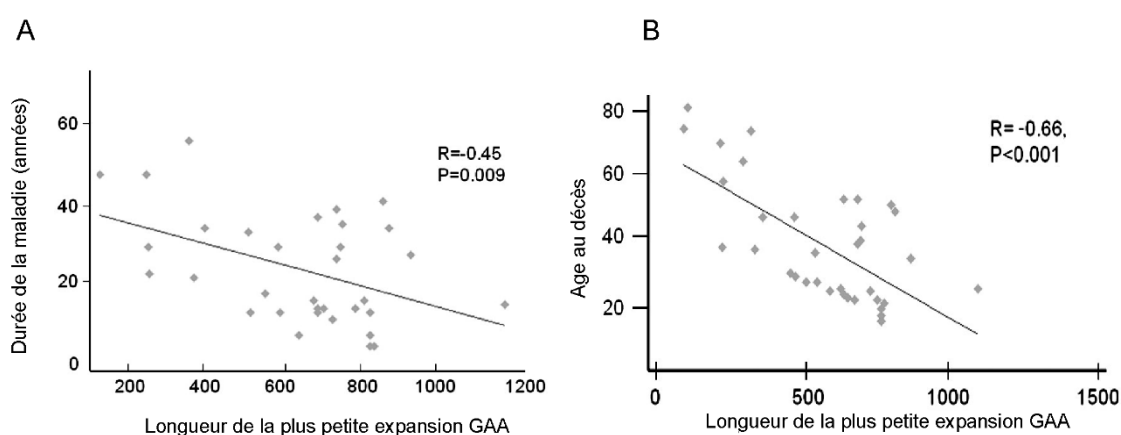


Figure 18 : Corrélation entre la taille de la plus petite expansion GAA et la durée de la maladie ou l'âge de décès chez les patients AF.

Corrélation modérée entre la taille de la plus petite expansion GAA (patients homozygotes) et la durée de la maladie (A) et corrélation forte entre la taille de la plus petite expansion GAA et l'âge de décès des patients (B). (Issu de Tsou et al., 2011, étude réalisée sur 61 patients).

s'étend de l'expansion GAA dans l'intron 1 jusqu'au promoteur du gène, entraînant une déficience de l'initiation de la transcription (**Figure 16**) (Chutake et al., 2014a; Greene et al., 2007; Kim et al., 2011). L'amplitude de l'extinction du promoteur est directement dépendante de la longueur de l'expansion GAA (Chutake et al., 2014b). Dans une moindre mesure, des défauts au niveau de l'élongation transcriptionnelle ont également été proposés avec l'identification de modifications spécifiques des histones (Kumari et al., 2011; Punga and Bühler, 2010).

Formation de structures secondaires de l'ADN

Concernant la formation de structures secondaires non canoniques de l'ADN, l'expansion GAA pathogénique conduirait à la formation de structures hybrides ADN-ARN (appelées R-loops) lors de la transcription (**Figure 17**) (Bidichandani et al., 1998; Groh et al., 2014; Kumari and Usdin, 2012). Au niveau de ces structures, le brin d'ARN nouvellement formé s'apparie au brin d'ADN modèle. Ces structures perturbent alors l'ARN polymérase II (ARN pol II) affectant donc la progression de la machinerie de transcription (**Figure 17**). Il a également été proposé que ces structures soient les signaux de modification de la chromatine, générant sa répression et donc l'inactivation de l'expression du gène (**Figure 17**). En effet, dans ces cellules de patients, Groh et al. ont observé des marques d'hétérochromatine (H3K9m2) associées aux R-loops, qui résulteraient de la formation de ces R-loops (Groh et al., 2014). Dans le cas où le mécanisme est similaire *in vivo*, ces découvertes permettraient de lier les deux mécanismes : silencing épigénétique et formation de structures secondaires. Le mécanisme entraînant l'hétérochromatinisation du locus à partir des R-loops issus de l'expansion GAA n'est pas encore identifié. En lien avec ces structures secondaires, une terminaison prématurée de la transcription a également été évoquée (Butler and Napierala, 2015).

3.3. Corrélation génotype/phénotype

Le nombre de répétitions GAA varie grandement entre les patients AF, de 60 à 1700 répétitions. Il existe une corrélation entre le nombre de répétitions dans l'expansion pathogénique et la sévérité de la maladie (Dürr et al., 1996; Filla et al., 1996; Montermini et al., 1997). En effet pour les patients homozygotes, la longueur de l'allèle avec l'expansion la plus courte est inversement corrélée à la quantité de frataxine produite, à l'âge d'apparition des symptômes et à la durée de la maladie (**Figure 18A**) (Tsou et al., 2011). Il y a également une corrélation inverse entre la taille du GAA et l'âge de décès (**Figure 18B**). Néanmoins, la

taille de l'expansion GAA n'est pas pronostic et elle ne corrèle pas avec l'ensemble des phénotypes. De plus, des différences intrafamiliales sont observées (même nombre de GAA dans la fratrie). Ces éléments indiquent que d'autres facteurs entre en jeu, tel que le fond génétique, l'instabilité de l'expansion ou encore le mosaïsme somatique ([Pandolfo, 2009](#)).

L'identification du gène en 1996 a permis de relier génétiquement les formes atypiques de l'AF avec des débuts très précoces et une grande sévérité clinique ou avec une apparition tardive de l'AF et une progression lente (LOFA et VLOFA).

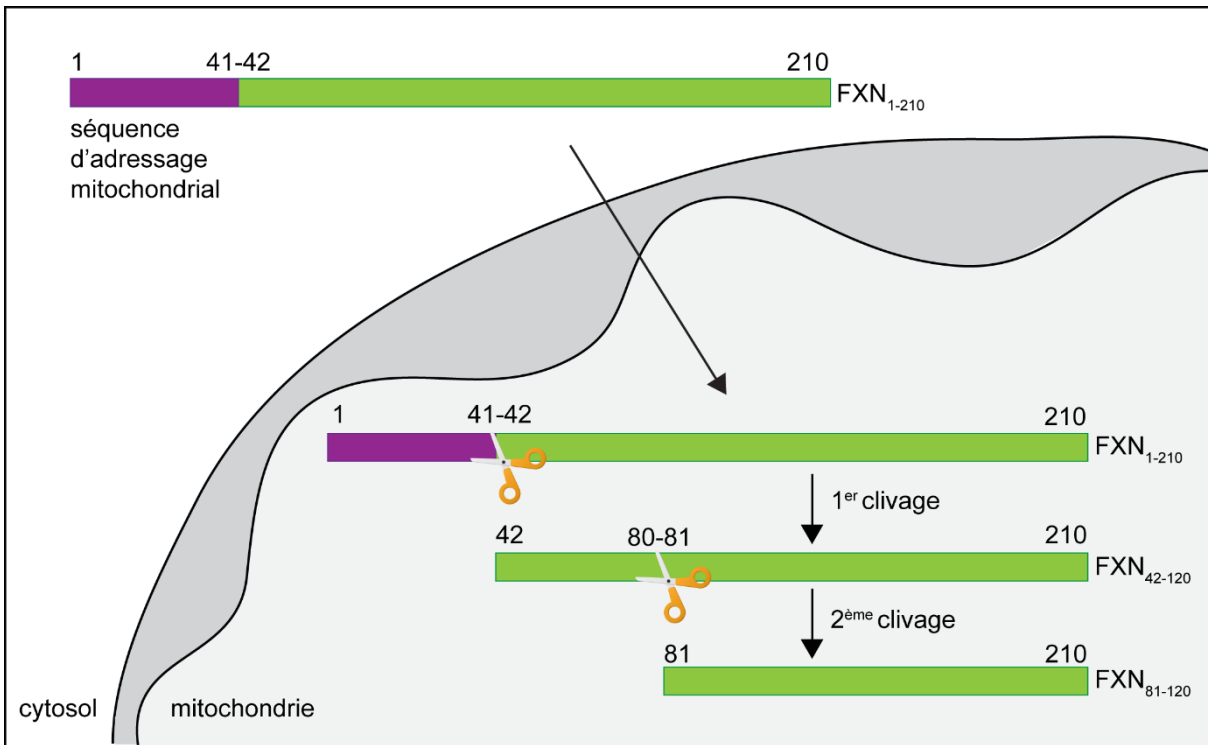
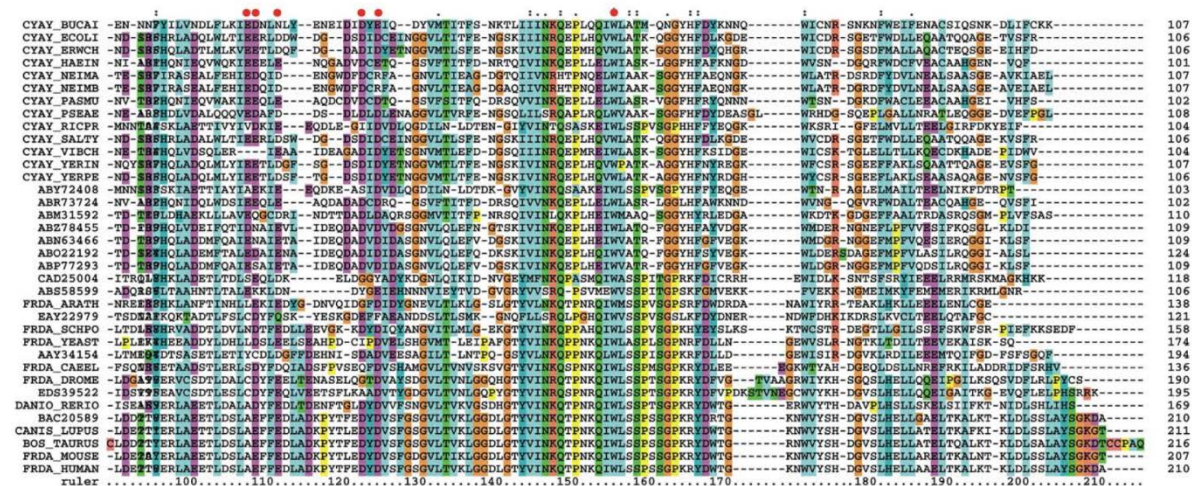


Figure 19 : Import mitochondrial et maturation de la frataxine humaine.

Le précurseur de la frataxine FXN₁₋₂₁₀ est synthétisé dans le cytosol et importé dans la mitochondrie par sa séquence d'adressage mitochondriale, localisée en N-terminal. Dans la mitochondrie, il est alors clivé par MPP (ciseaux) en une forme intermédiaire FXN₄₂₋₂₁₀. La forme mature de la frataxine est ensuite générée avec un deuxième clivage : FXN₈₁₋₂₁₀.

A



B

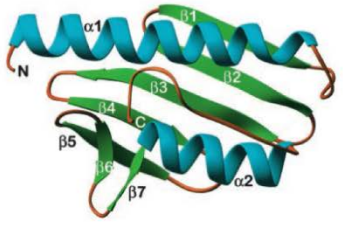


Figure 20 : Conservation et structure de la frataxine.

(A) Alignement des séquences des régions conservées de la frataxine chez différentes espèces (absence de la séquence N-terminal contenant le signal d'adressage mitochondrial). (Issu de Pandolfo and Pastore, 2009). (B) Structure de la frataxine humaine obtenue par cristallographie (Issu de Dhe Paganon et al., 2000).

4. La frataxine et son rôle dans les cellules

4.1. Description générale de la frataxine

Le gène *FXN* code pour la frataxine (FXN) une protéine ubiquitaire dont la forme mature est localisée dans la mitochondrie (Koutnikova et al., 1997). Le génome nucléaire encode un précurseur de 210 acides aminés traduit dans le cytosol (FXN₁₋₂₁₀) (**Figure 19**). Ce précurseur de 23 kDa est importé dans la mitochondrie grâce à son signal d'import mitochondrial, localisé en N-terminal, et clivé par la protéine MPP (*mitochondrial protein peptidase*). Un premier clivage, entre les résidus 41 et 42, génère une forme intermédiaire de la frataxine (FXN₄₂₋₂₁₀, 19 kDa) et un deuxième clivage donne naissance à la forme mature (FXN₈₁₋₂₁₀, 14kDa) (**Figure 19**) (Li et al., 2008; Schmucker et al., 2008).

La forme mature de la frataxine est conservée des bactéries Gram – (protéine CyaY) à l'homme (**Figure 20A**) (Pandolfo and Pastore, 2009). C'est une protéine globulaire composée de deux hélices α (longue en N-terminal et courte en C-terminal) entourant sept feuillettes β antiparallèles (**Figure 20B**). L'hélice α 1 comporte une dizaine de résidus chargés négativement, qui forment un pont acide. Ce pont a été pressenti comme site de fixation du fer, élément essentiel dans l'identification du rôle de la frataxine (Dhe-Paganon et al., 2000). La protéine contient également un cœur hydrophobe et un sillon chargé qui seraient importants pour l'interaction avec d'autres protéines.

La frataxine mature est exprimée par l'ensemble des cellules mais, à différents niveaux selon les tissus. Elle est cependant essentielle aux cellules. En effet une absence complète de frataxine mène à une létalité embryonnaire (Cossée et al., 2000). Chez l'adulte, elle est particulièrement exprimée dans le cœur puis dans le foie, les muscles squelettiques et le pancréas, des tissus riches en mitochondries (Campuzano et al., 1996; Koutnikova et al., 1997). Au niveau du système nerveux, elle est beaucoup moins exprimée que dans ces derniers organes mais, une expression plus forte est détectée dans la moelle épinière et le cervelet (très peu dans le cortex cérébral). Au niveau du SN il n'y a donc pas de corrélation avec la distribution mitochondriale.

4.2. Identification du rôle de la frataxine

A la suite de l'identification du gène, rapidement des observations faites chez les patients ainsi que dans des modèles de la maladie ont associé à la frataxine un lien avec le fer et le métabolisme du fer dans la mitochondrie. Différentes fonctions ont alors été

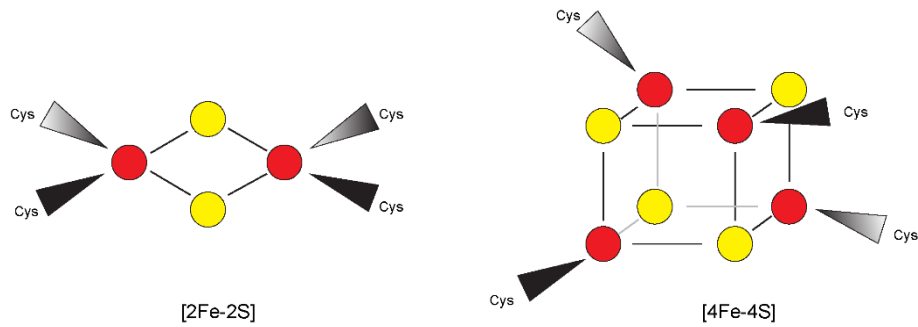


Figure 21 : Structures des centres Fe-S les plus courants chez les mammifères.

Les centres Fe-S les plus courants chez les mammifères sont les centres rhombiques [2Fe-2S] et centres cubiques [4Fe-4S]. Ils sont généralement coordonnés via des résidus cystéines des protéines. Atomes de soufre : en jaune, atomes de fer : en rouge. (Issu de [Beilschmidt and Puccio, 2014](#)).

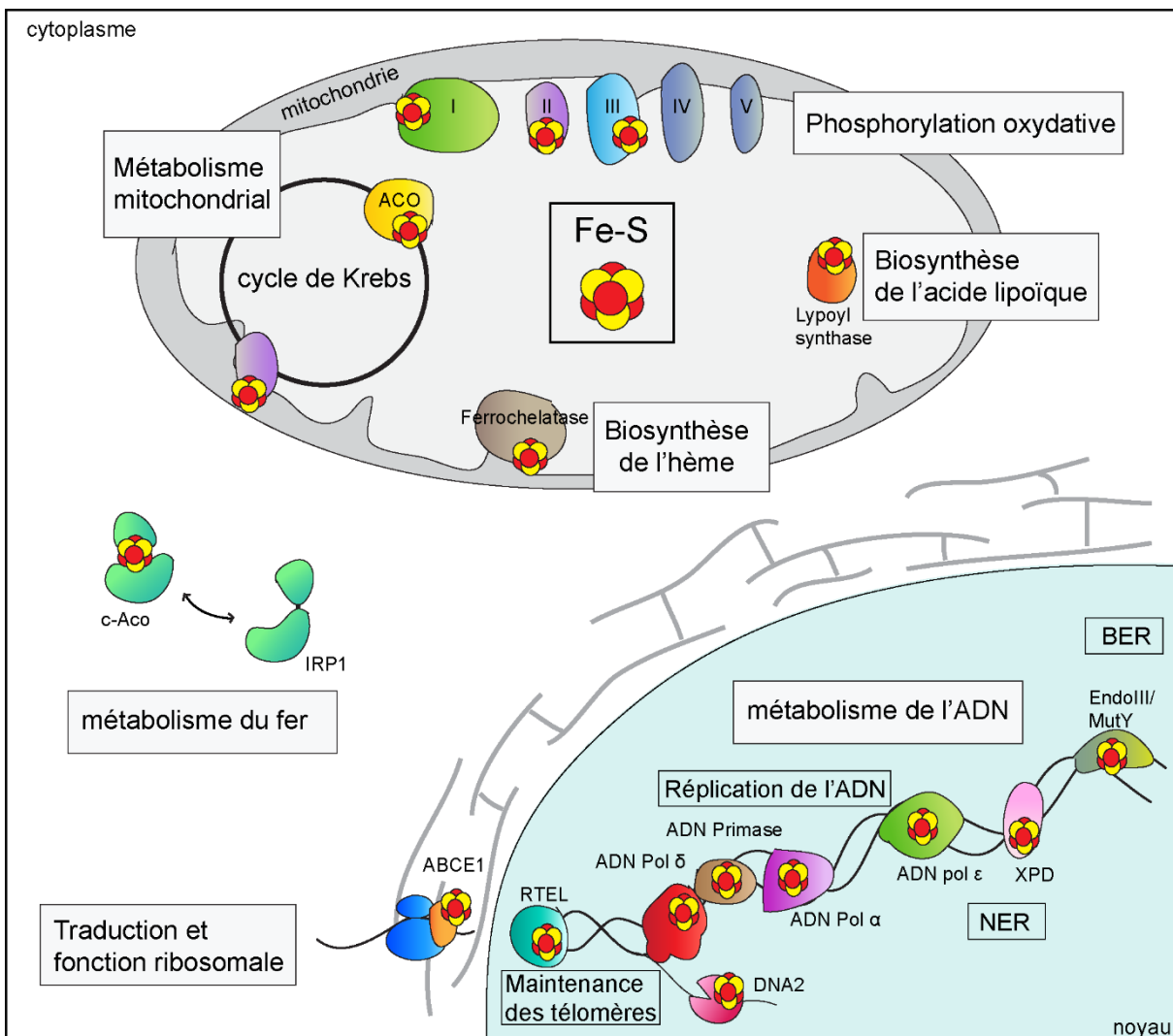


Figure 22 : Les protéines à centres Fe-S sont essentielles à de nombreux processus cellulaires.

Les centres Fe-S sont essentiels au bon fonctionnement et à la stabilité de nombreuses protéines mitochondriales, nucléaires et cytosoliques tel que les complexes I, II et III (phosphorylation oxydative), l'aconitase (cycle de Krebs), la ferrochelatase (biosynthèse de l'hème), la lypoyl synthase (biosynthèse de l'acide lipoïque), les ADN polymérase α , δ , ϵ , la DNA2, l'ADN primase, XPD, EndoIII, MutY et RTEL (métabolisme de l'ADN), la protéine IRP1 (métabolisme du fer) ou encore ABCE1 (traduction et fonction ribosomale. NER : *nucleotide excision repair*, BER : *base excision repair*).

proposées à la suite de nombreuses études *in vitro* réalisées dans des modèles bactériens, levures et mammifères. La frataxine fut proposée comme une protéine de stockage du fer (comme les ferritines), comme une protéine donneuse de fer pour différentes fonctions tel que les machineries de biosynthèse des centres fer-soufre (Fe-S) et de biosynthèse de l'hème ou encore comme une protéine de réparation des centres Fe-S (Martelli et al., 2012). Aujourd'hui, à la suite de validations *in vitro* et *in vivo*, un rôle dans la régulation de la biosynthèse des centres Fe-S lui est attribué.

4.3. La frataxine et la régulation de la biosynthèse des centres Fe-S

4.3.1. Les centres Fe-S et leurs rôles

Les centres Fe-S sont des cofacteurs inorganiques versatiles essentiels à la vie, présents chez tous les organismes vivants (Lill, 2009). Comme l'ensemble des cofacteurs inorganiques, ils sont uniquement composés d'ions métalliques. Les deux centres Fe-S les plus courants (rhombiques et cubiques) sont également les plus simples en termes de structure, ils contiennent uniquement du fer ($\text{Fe}^{2+/3+}$) et du sulfure (S^{2-}). Les noyaux rhombiques sont composés de deux atomes de fer et de deux atomes de soufre [2Fe-2S] et les noyaux cubiques de quatre atomes de Fe et quatre atomes de soufre [4Fe-4S] (**Figure 21**). Il existe aussi d'autres centres plus complexes pouvant contenir d'autres ions métalliques. En général, ces cofacteurs sont coordonnés par des résidus cystéines des protéines (ou histidine) via leurs atomes de fer. Les centres Fe-S sont particulièrement vulnérables à l'oxydation et à la dégradation (Rouault, 2012).

Les centres Fe-S sont essentiels à des centaines de protéines impliquées dans diverses voies cellulaires, aussi bien le transport d'électrons, des processus de catalyse ou de régulation, le métabolisme de l'ADN, etc... (Lill, 2009). Je décrirai ici plus précisément les protéines à centres Fe-S que j'ai utilisé dans mon projet de thèse (partie résultat) ainsi que quelques autres exemples (**Figure 22**). Les complexes I à III (NADH déshydrogénase, succinate déshydrogénase et cytochrome C réductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale sont des protéines à centres Fe-S. Les centres Fe-S participent au transfert d'électrons grâce à leur potentiel redox, ils peuvent donc servir de donneurs ou d'accepteurs d'électrons pendant la phosphorylation oxydative. La succinate déshydrogénase (SDH) est déstabilisée en absence de son cofacteur. Les Fe-S participent également à des catalyses enzymatiques avec, par exemple, l'aconitase dans le cycle de Krebs ou la lipoyl synthase dans la dernière étape de la synthèse de l'acide lipoïque. Les centres Fe-S peuvent aussi

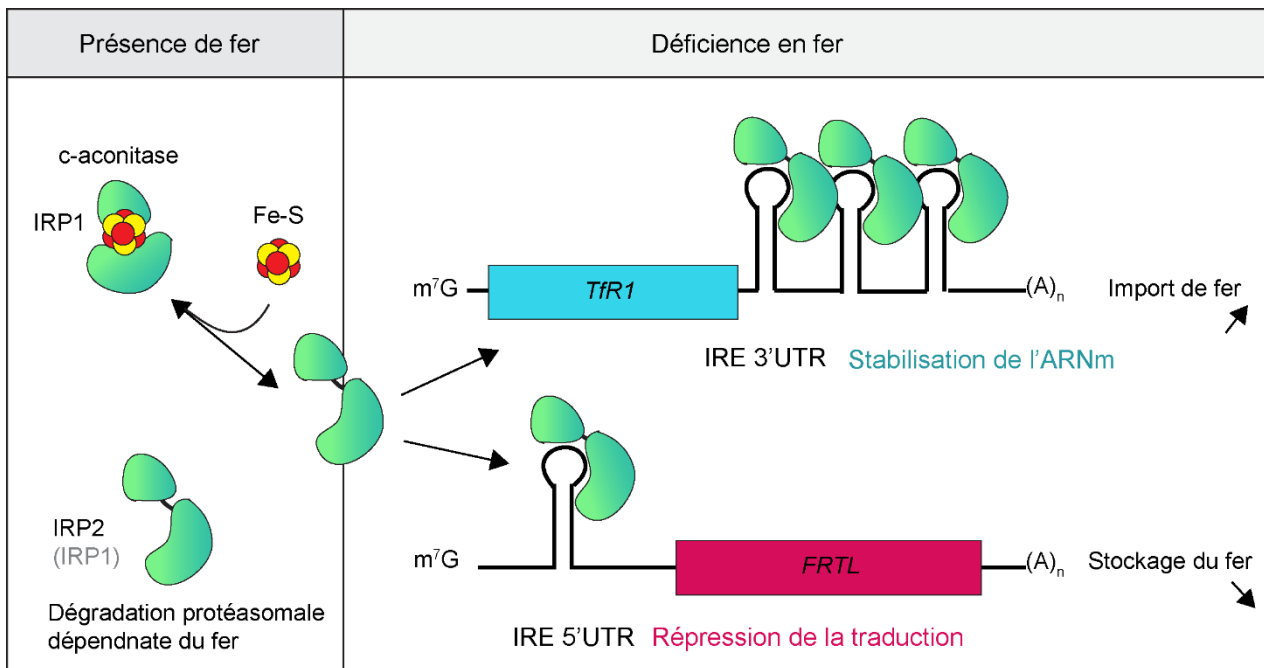


Figure 23 : Régulation du métabolisme de fer par les centres Fe-S.

Le métabolisme du fer est régulé dans les cellules par la présence ou l'absence de centres Fe-S sur la protéine IRP1. En absence de fer, IRP1 et IRP2 (*iron regulatory protein*) régulent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du fer en se liant à un élément IRE (*iron responsive element*). Si l'IRE est localisée en 3', l'ARNm est stabilisé et donc la protéine est augmentée. C'est le cas du récepteur à la transferrine (TfR1), responsable de l'import du fer dans les cellules. Au contraire, si l'IRE est en 5', la traduction du gène est réprimée et la protéine diminuée comme, pour la protéine de stockage du fer FRTL. En revanche, en présence de fer, les centres Fe-S sont produits et la protéine IRP1 coordonnée à son cofacteur, a une fonction d'aconitase cytosolique. IRP2 (et une petite partie d'IRP1) est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome, par une médiation par FBXL5, un senseur du fer qui agit au sein de la E3 ligase. (Adapté de Hentz et al, 2010)

avoir des rôles de capteurs de l'environnement cellulaire. Par exemple le métabolisme du fer est régulé grâce à une protéine à centre Fe-S cytoplasmique, en fonction de la disponibilité en fer dans les cellules (**Figure 23**) (Hentze et al., 2010). En présence de fer, les centres Fe-S sont produits et la protéine régulatrice du fer IRP1 (*iron regulatory protein 1*) lie un centre Fe-S. Elle agit alors comme une aconitase cytoplasmique. En revanche, dans le cas de déficience cellulaire en fer, IRP1, non-liée à son cofacteur modifie l'expression de gènes spécifiques, afin de réguler la quantité de fer dans la cellule. L'apoprotéine se fixe sur de structures en boucles appelées IRE (*iron responsive element*) au niveau de l'ARNm. En fonction de la localisation de l'IRE, l'ARNm est stabilisé (IRE en 3'UTR) et préservé du clivage endonucléolytique, entraînant l'augmentation de l'expression de la protéine ou alors la traduction de l'ARNm est réprimée (IRE en 5') menant à une diminution protéique. Le récepteur à la transferrine (TfR1), responsable de l'import du fer dans les cellules, possède des IRE en 3'UTR alors que l'IRE de l'ARNm de la ferritine (FRTL), protéine de stockage du fer est localisé en 5'UTR (**Figure 23**). Les centres Fe-S jouent également des rôles dans le métabolisme de l'ADN avec des protéines essentielles à la réplication l'ADN : les sous-unités catalytiques des ADN polymérase α , δ et ϵ , l'ADN primase (synthèse de l'amorce des fragments d'Okasaki à la fourche de réplication) ou encore la DNA2 (maturation des fragments d'Okasaki, plus résection des coupures doubles brins de l'ADN) (Fuss et al., 2015). On retrouve également des protéines à centres Fe-S dans les processus de réparation de l'ADN avec l'hélicase XPD pour la réparation par excision de nucléotides (NER) et les protéines MutY et EndoIII pour la réparation par excision de bases (BER). L'hélicase RTEL, impliquée dans la maintenance des télomères est également une protéine à centres Fe-S (Fuss et al., 2015) (**Figure 22**). Des protéines à centres Fe-S sont également présentes dans le métabolisme des nucléotides avec les protéines GPAT et DPYD pour la biosynthèse des purines et la dégradation des pyrimidines en β -alanine respectivement (Martelli et al., 2007; Schnackerz et al., 2004). Enfin, ABCE1, protéine essentielle à la fonction ribosomale et à l'initiation de la traduction à également des centres Fe-S pour cofacteurs (Rouault, 2015) ainsi que la ferrochelatase dans la biosynthèse de l'hème (Lill, 2009) (**Figure 22**). Cette très large variété des protéines à centres Fe-S, impliquées dans de nombreux processus essentiels, traduit l'importance des centres Fe-S.

4.3.2. La biosynthèse des centres Fe-S et le rôle de la frataxine

La structure des centres Fe-S est particulièrement simple mais leur biosynthèse est un mécanisme complexe et coordonné. Ce mécanisme est divisé en deux étapes :

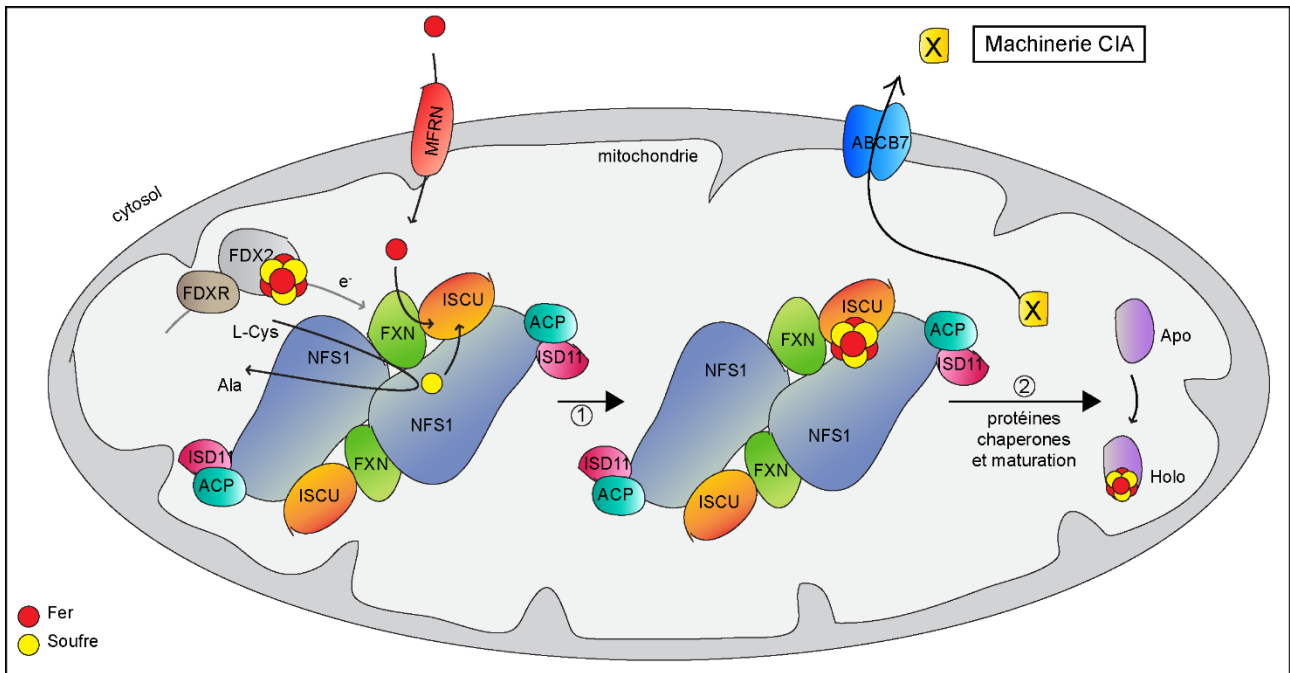


Figure 24 : La biosynthèse des centres Fe-S dans les mitochondries.

Dans les mitochondries la biosynthèse des centres Fe-S se fait en deux étapes : (1) l'assemblage *de novo* du centre Fe-S, étape dans laquelle la frataxine est impliquée et (2) le transfert des centres Fe-S aux apoprotéines (Adapté de Colin et al., 2013 ; Beilschmidt and Puccio, 2014).

l'assemblage *de novo* du centre Fe-S sur une protéine échafaudage dans la matrice mitochondriale puis la livraison aux apoprotéines avec l'assistance d'autres protéines. La frataxine joue un rôle dans la première étape. Je décrirai ici le système observé chez les mammifères, et principalement la première étape.

Assemblage de novo des centres Fe-S

L'assemblage *de novo* des centres Fe-S dans la matrice mitochondriale nécessite une coordination du fer, du soufre, un apport d'électrons et s'effectue au niveau d'un complexe protéique ISCU/NFS1/ISD11/ACP (Beilschmidt and Puccio, 2014). L'atome de soufre est apporté par la cystéine désulfurase NFS1 (cystéine désulfurase pyridoxal phosphate (PLP) dépendante) par la conversion de L-cystéine en alanine (Figure 24). Pour NFS1 requiert, pour sa stabilisation, la présence de la protéine accessoire ISD11 pour sa stabilisation ainsi que la protéine ACP (*acyl carrier protein*), récemment identifiée (Van Vranken et al., 2016). Le rôle d'ACP n'est pas encore complètement identifié mais il semblerait qu'elle soit importante pour ISD11 et pour la coordination générale de la synthèse des centres Fe-S. Sur un pont mobile cystéine de NFS1, la conversion de la cystéine en alanine génère un intermédiaire persulfure qui est ensuite réduit en sulfure et transféré sur la protéine échafaudage ISCU. Le sulfure peut alors, avec des électrons, être combiné au fer. Le complexe ISCU/NFS1/ISD11/ACP est composé d'un dimère de NFS1 avec chaque protéine NFS1 associée à une protéine ISCU, une protéine ISD11 et une protéine ACP (Figure 24) (Cai et al., 2017; Colin et al., 2013; Schmucker et al., 2011). La frataxine agit directement avec ce complexe (formation d'un complexe avec une frataxine par NFS1). La source de fer n'est, à ce jour, pas identifiée. La frataxine avait initialement été proposée comme donneur de fer (pour sa capacité à lier le fer) mais cette hypothèse a depuis été réfutée par la majorité de la communauté scientifique. Il semblerait que, dans la mitochondrie, le fer soit sous une forme directement utilisable pour la synthèse des centres Fe-S. Il est transporté du cytoplasme aux mitochondries par les mitoferrines (MFRN) (Figure 24) (Beilschmidt and Puccio, 2014). Plusieurs hypothèses sont proposées par rapport à la fonction de la frataxine mais un rôle de régulateur allostérique de la biosynthèse de novo des centres Fe-S lui est communément attribué. Il est proposé que la frataxine entraîne un changement conformation du complexe ISCU/NFS1/ISD11/ACP, permettant à NFS1 de transférer son sulfure à ISCU grâce à un rapprochement de la boucle NFS1 vers ISCU (Tsai and Barondeau, 2010). Parent et al. proposent une amélioration du transfert du sulfure à ISCU par la frataxine qui contrôleraient la réduction persulfide des thiols (Parent et al., 2015). Il a aussi été proposé une stimulation de l'activité de la cystéine désulfurase NFS1, par la

frataxine, pour augmenter la biosynthèse des centres Fe-S (Fox et al., 2015). Enfin, l'activation de la cystéine désulfurase permettrait un contrôle de l'entrée du fer par la frataxine dans le mécanisme de la biosynthèse des centres Fe-S (Colin et al., 2013) (**Figure 24**). Le frataxine stimule donc l'assemblage *de novo* des centres Fe-S, en son absence, des centres Fe-S sont formés mais la biosynthèse est très peu efficace (Colin et al., 2013; Fox et al., 2015). Enfin, des électrons sont nécessaires pour réduire les atomes de soufres. Pour un noyau rhombique, quatre électrons doivent être apportés : deux d'entre eux proviennent des atomes de fer directement et les deux autres électrons sont apportés par un agent réducteur exogène au complexe tel que la ferrédoxine, une protéine à centres Fe-S, réduite par la ferrédoxine réductase (FDRX) (**Figure 24**) (Lill, 2009; Rouault and Maio, 2017).

Transfert des centres Fe-S nouvellement formés

A la suite de sa formation *de novo* sur ISCU, dans les mitochondries, le centre Fe-S doit être transféré aux apoprotéines (**Figure 24**). Cette deuxième étape n'est pas totalement élucidée chez les mammifères mais elle implique de nombreuses protéines. Certaines protéines chaperonnes, comme HSC20 ou GLRX5, protègeraient les centres Fe-S lors de leur déplacement. D'autres protéines sont responsables de la maturation des centres (Lill, 2009). Par exemple, ISCA1 est essentielle pour la maturation des centres 4Fe-4S (Beilschmidt et al., 2017). La machinerie mitochondriale de biosynthèse des centres Fe-S fournit donc ces centres aux protéines mitochondriales mais elle synthétise également un composé inconnu soufré, exporté dans le cytosol par ABCB7, nécessaire pour la machinerie d'assemblage des centres Fe-S cytosoliques et nucléaires (CIA : *cytosolic iron sulfur cluster assembly*) (**Figure 24**). Ainsi, les protéines à centres Fe-S cytosoliques et nucléaires requièrent la machinerie mitochondriale de biosynthèse *de novo* des centres Fe-S et la CIA pour l'assemblage et la maturation des Fe-S.

La frataxine est essentielle pour la survie des cellules eucaryotes, son absence conduit à différents phénotypes menant à la mort cellulaire. De manière intéressante, les bactéries, à l'inverse des cellules eucaryotes ne sont pas dépendantes de la frataxine (homologue CyaY). Récemment, deux études publiées en parallèle ont permis de mettre en évidence un seul résidu au niveau de la protéine ISCU responsable de la dépendance à la frataxine ou non (homologue levure : Isu et bactérie : IscU) (Roche et al., 2015; Yoon et al., 2015). Yoon et al. ont montré que le remplacement unique de la méthionine 141 par une isoleucine (M141I) rend les levures indépendantes à la frataxine (homologue Yfh1). La protéine Isu mutée est alors capable de lier Nfs1 et de l'activer, sans Yfh1. De manière très

intéressante, les bactéries, indépendantes à CyaY, présentent une isoleucine au niveau de la position homologue d'iscU (position 108). La mutation de cette isoleucine en méthionine (I108M) génère des bactéries dépendantes à la frataxine qui présentent alors des phénotypes similaires aux levures eucaryotes Δyfh (Roche et al., 2015). La présence d'une isoleucine au niveau de ce résidu spécifique rendrait donc les cellules indépendantes de la frataxine.

Différentes pathologies résultent de mutations affectant les différentes protéines de la biosynthèse des centres Fe-S, aussi bien l'assemblage *de novo* que le transfert du centre Fe-S (Beilschmidt and Puccio, 2014). Selon le gène muté, le type de mutation et sa conséquence sur l'expression de la protéine, différents symptômes sont observés. Les pertes de fonction totales génèrent des maladies extrêmement sévères et des pertes de fonctions partielles (comme la frataxine et l'AF) sont plus progressives. Cependant, des phénotypes mitochondriaux sont dominants pour l'ensemble des maladies affectant cette biosynthèse.

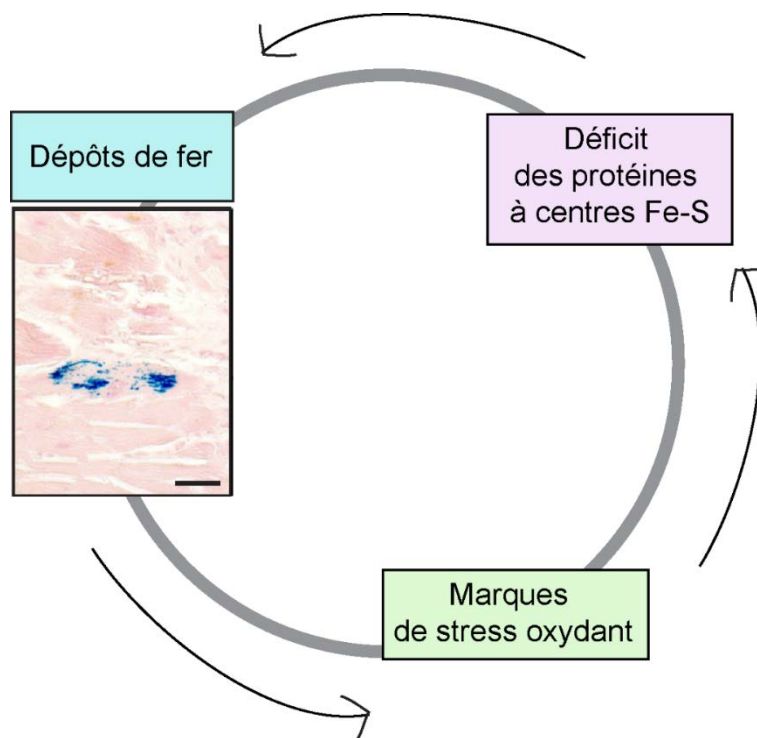


Figure 25 : Eléments physiopathologiques observés chez les patients AF.

Cercle vicieux reliant les trois anomalies biochimiques observées chez les patients AF. Les dépôts de fer (en bleu) et le déficit des protéines à centre Fe-S ont été observés dans des cardiomyocytes de patients et des signes de stress oxydants ont été détectés dans l'urine et le plasma. Ces données ne permettent pas de déterminer quel élément résulte directement de l'absence de frataxine. Histochimie du fer dans les cardiomyocytes, issu de [Koeppen, 2011](#). Barre de taille, 50 μm .

5. La physiopathologie de l'ataxie de Friedreich

Comme énoncé précédemment, la frataxine est essentielle à la survie des cellules et au développement des organismes. En effet, la déplétion complète en FXN entraîne une létalité embryonnaire précoce chez les souris (jour embryonnaire 6,5), une létalité embryonnaire des plantes (*Arabidopsis thaliana*) et une létalité pupale chez la drosophile (Chen et al., 2016a; Cossée et al., 2000; Vazzola et al., 2007). De plus, l'absence de frataxine dans des fibroblastes murins en culture conduit à une perte de la division cellulaire et à la mort des cellules (Calmels et al., 2009). Cette essentialité de la frataxine peut s'expliquer par les nombreuses protéines à centres Fe-S impliquées dans les processus de réplication cellulaire (ADN polymérase, ADN primase, DNA2) (Fuss et al., 2015).

L'utilisation de matériel biologique issu de patients ainsi que la génération de modèles d'études (cellulaires et animaux) a permis à la communauté scientifique de l'AF d'identifier certains mécanismes pathologiques de la maladie. La compréhension de ces mécanismes pathologiques est nécessaire pour développer des approches thérapeutiques.

5.1. Observations faites chez les patients

Des biopsies, prélèvements et échantillons post-mortem issus de patients mettent principalement en avant trois défauts biochimiques majeurs (**Figure 25**). Historiquement, le premier phénotype biochimique observé correspond à des dépôts de fer dans des cardiomyocytes de patients (**Figure 25**) (Lamarque et al., 1980). À la suite de l'identification du gène et de la localisation mitochondriale de la frataxine, toujours dans des cardiomyocytes de patients, des analyses de la chaîne respiratoire mitochondriale et du cycle de Krebs ont mis en avant des déficits des protéines à centres Fe-S, plus précisément les complexes I, II et III et l'aconitase (Rötig et al., 1997). La perturbation de l'homéostasie du fer et la défaillance de la chaîne respiratoire ont alors amené la question concernant le stress oxydant : joue-t-il un rôle dans la pathologie ? En effet, le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'oxydants et leur dégradation. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) correspondent à diverses molécules et radicaux libres générés à partir du métabolisme de l'oxygène. La chaîne respiratoire est la source principale de ROS, avec la génération d'ions superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Ces ions sont ensuite convertis en H_2O_2 par les superoxydes dismutases cytosoliques (SOD1 ou CuSOD) et mitochondriales (SOD2, MnSOD). Dans des conditions normales, le système de défenses antioxydantes déttoxifie l' H_2O_2 en H_2O . Cependant, l' H_2O_2 peut également réagir avec le fer ferreux (Fe^{2+}) libre dans

la cellule par la réaction de Fenton. Cette réaction entraîne la production de radicaux hydroxyles libres HO[•] hautement réactifs et dommageables pour l'ADN, les protéines et les lipides. Des dommages cellulaires, résultant de stress oxydant, ont été détectés dans des fluides de patients AF. Des augmentations de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2'dG), marqueur de dommages oxydatifs de l'ADN et de malondialdéhyde, un marqueur de la peroxydation des lipides, ont été observés dans les urines et la plasma des patients respectivement (Emond et al., 2000). Notons cependant que des études ultérieures n'ont pas réussi à reproduire des dernières données (Arnold et al., 2006; Di Prospero et al., 2007). L'hypothèse d'un cercle vicieux entre ces trois éléments biochimiques pathologiques a été proposée mais elle ne permet pas de déterminer ce qui résulte directement de la déficience en frataxine et ce qui est secondaire (**Figure 25**). Ainsi, l'étude sur des échantillons de patients est limitante pour comprendre la pathologie de la maladie et la cinétique des éléments pathologiques. L'ensemble des tissus affectés présentent-ils les mêmes phénotypes ? Pour comprendre la physiopathologie de la maladie ainsi que ses bases génétiques ou encore la fonction précise de la frataxine, la génération de modèles d'étude est essentielle. Ces modèles pourront ensuite être utilisés pour développer des thérapies efficaces.

5.2. Utilisation de modèles pour comprendre la physiopathologie

La grande conservation évolutive de la frataxine, des bactéries aux mammifères, a permis le développement de modèles unicellulaires et multicellulaires variés allant de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) à la souris (*Mus musculus*), en passant par le nématode (*Caenorhabditis elegans*) et la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Puccio, 2009). Dans une revue récapitulant l'ensemble des modèles mammifères animaux et cellulaires de l'AF, Perdomini et al. proposent une description du « modèle idéal » (Perdomini et al., 2013). En résumé, le « modèle idéal » présenterait des niveaux fortement réduits de frataxine en raison d'une longue expansion GAA dans le premier intron du gène codant la frataxine. Cette diminution d'expression devrait entraîner des défauts dans les tissus d'intérêt de l'AF (DRG, noyau dentelé et cœur de manière primaire) avec les symptômes associés à l'AF. À ce jour, malgré d'intenses efforts dans la génération de modèles d'études, aucun d'entre eux ne remplit l'ensemble de ces critères, mais chaque modèle apporte des avantages différents. Ainsi, l'utilisation et l'étude de ces différents modèles (animaux et cellulaires) devrait permettre à la communauté scientifique d'avoir un tableau général des mécanismes pathologiques menant aux symptômes de l'AF. Pour être le plus proche possible de ce qui

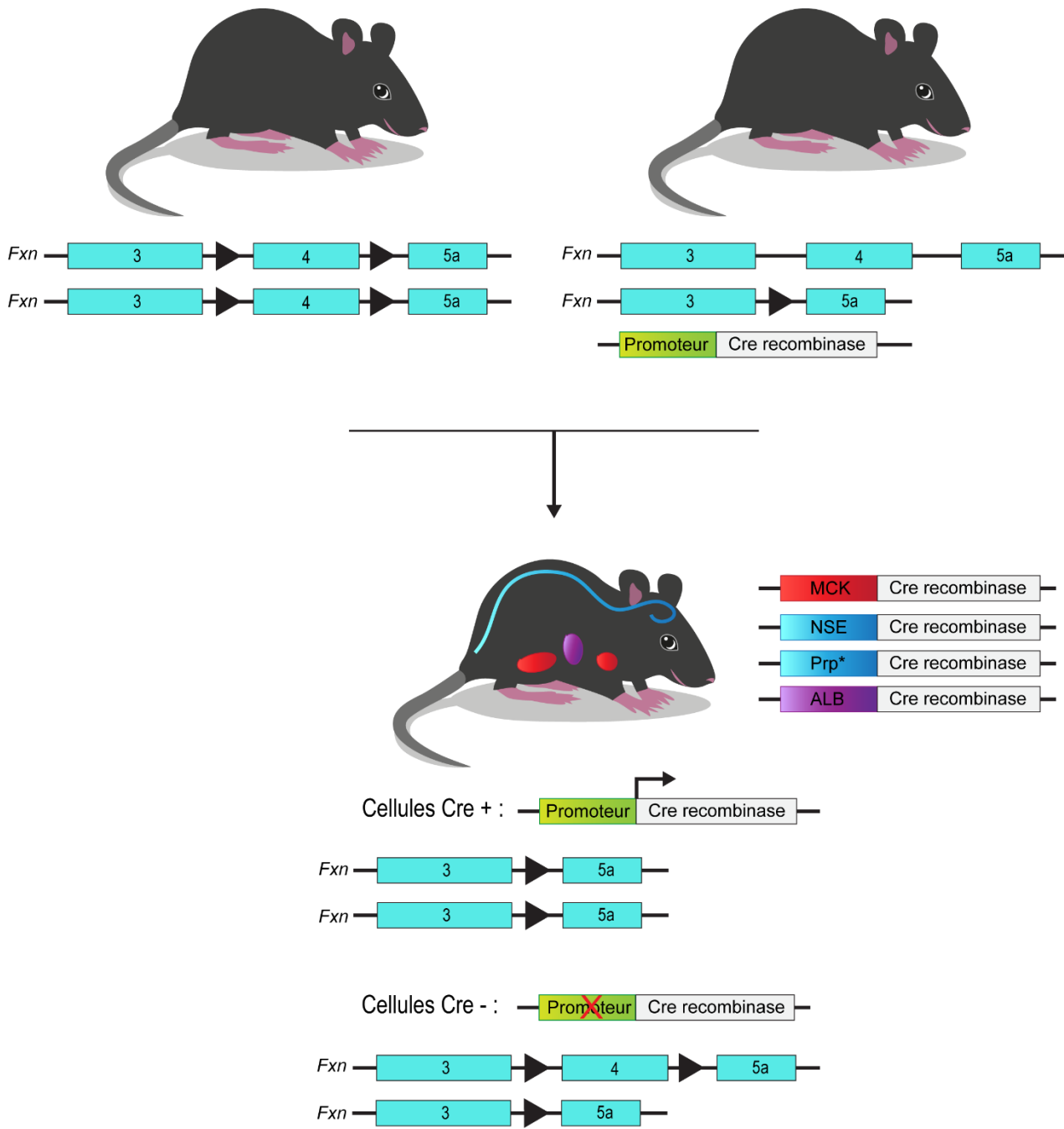


Figure 26 : Génération de modèles murins conditionnels de l'ataxie de Friedreich.

Des souris mutantes conditionnelles ont été générées avec la technologie Cre-LoxP. L'exon 4 du gène *Fxn*, entouré de sites loxP (allèle conditionnel) est excisé sous l'action de la Cre Recombinase. En fonction du promoteur utilisé en amont de la *Cre*, la frataxine sera déplétée dans différents tissus. Le promoteur MCK permet une déplétion dans le cœur et les muscles squelettiques, le promoteur NSE dans le système nerveux et le promoteur ALB dans le foie. Le modèle Prp* est un modèle inducible (Cre-ER^T) avec une déplétion de la frataxine dans le système nerveux, plus précisément dans les DRG et les cellules granulaires du cervelet.

se passe chez les patients AF, les modèles les plus pertinents sont les modèles mammifères (animaux et cellulaires). J'évoquerai les différents types de modèles utilisés dans la communauté scientifique, particulièrement les modèles mammifères, pour ensuite décrire en globalité les éléments physiopathologiques résultant de la déficience en frataxine dans l'AF, éléments identifiés grâce à l'ensemble de ces modèles.

5.2.1. Modèles mammifères animaux

Modèles présentant une déplétion totale en frataxine

Afin d'étudier les effets de l'absence de frataxine spécifiquement dans les tissus d'intérêt, des modèles murins conditionnels, basés sur la technologie Cre-LoxP ont été générés (**Figure 26**) (Puccio et al., 2001; Ristow et al., 2003; Simon et al., 2004; Thierbach et al., 2005). En fonction du promoteur utilisé en amont de la Cre Recombinase, la frataxine est spécifiquement déplétée dans les cellules d'intérêt grâce à des sites loxP entourant l'exon 4 du gène *Fxn* (allèle conditionnel) (**Figure 26**). Un très bon modèle cardiaque de l'AF a été généré avec le Cre sous le contrôle du promoteur MCK (*muscle creatine kinase*). La frataxine est alors spécifiquement déplétée dans le cœur et les muscles squelettiques, menant à une cardiomyopathie hypertrophique et une mort précoce (Puccio et al., 2001). Deux modèles neurologiques ont également été générés avec ce système, l'un avec le promoteur NSE (*neuron specific enolase*) et l'autre avec le promoteur protéine prion (Prp) avec une Cre inductible au tamoxifène (Cre-ER^T) (Puccio et al., 2001; Simon et al., 2004). Ces deux modèles ont apportées des informations sur la pathologie neurologique de l'AF mais, ils présentent d'importantes limitations. Le modèle NSE développe une ataxie progressive mais il est extrêmement sévère et non spécifique (expression de la Cre dans le cœur et le foie, et le SN est drastiquement atteint). Il ne reproduit donc pas le côté progressif de la maladie et les animaux meurent à 25 jours. Pour contourner cette sévérité, probablement résultante de la déplétion précoce de la frataxine, le modèle inductible Prp a été généré. Les souris développent une ataxie sensitive et cérébelleuse tardive, mais avec une très forte variabilité entre individus (probablement due à l'injection de tamoxifène). Une déplétion de la frataxine dans les cellules granulaires du cervelet mène à des symptômes cérébelleux aspécifiques de l'AF. Des modèles avec des déplétions de frataxine dans le foie et le pancréas ont également été générés, permettant des études plus fondamentales (Martelli et al., 2015; Ristow et al., 2003; Thierbach et al., 2005).

Récemment, un modèle souris, basé sur l'utilisation de technologie d'édition de génome, a été généré (Chen et al., 2016b). Pour cela, des virus adéno-associés (AAV)

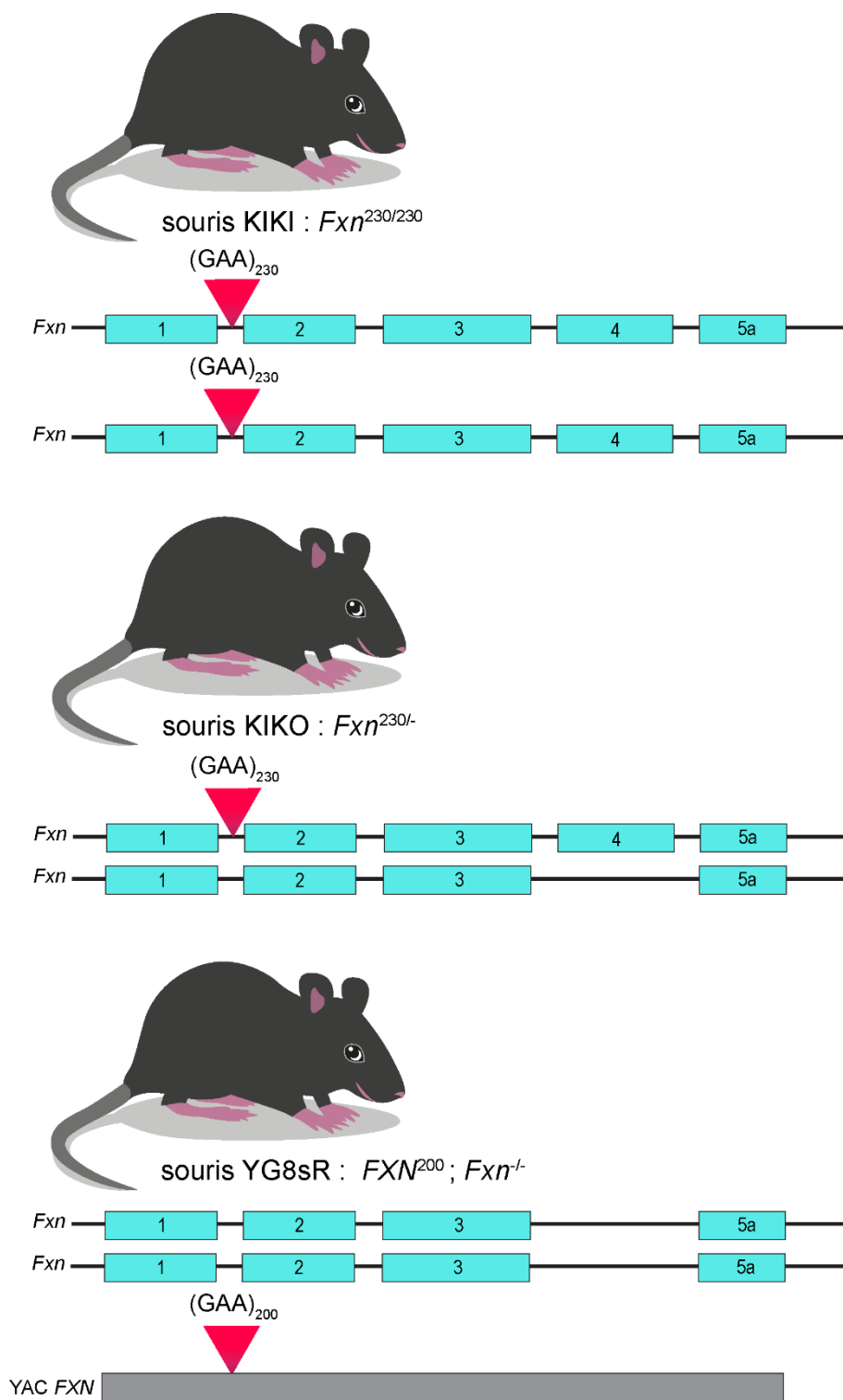


Figure 27 : Modèles murins de l'AF basés sur une expansion GAA.

Deux stratégies différentes ont permis de générer des souris avec une expansion GAA menant à une expression réduite de faratxine. Les souris KIKI et KIKO portent une expansion GAA dans le 1^{er} intron du gène *Fxn* endogène. La souris YG8sR est basée sur l'utilisation de YAC avec le locus *FXN* humain contenant l'expansion pathogénique GAA.

apportant le système CRISPR-Cas9 et un ARN guide *Fxn* ont été injectés dans le cortex de souris, menant à la déplétion en frataxine dans cette région de l'encéphale. Ce modèle développe des phénotypes cérébraux mais ne permet pas d'étudier la physiopathologie de la maladie dans les tissus primairement affectés dans l'AF (DRG et cervelet).

Ces différents modèles murins développent pour la plupart des symptômes spécifiques de l'AF, ils sont donc particulièrement utiles pour étudier les effets physiopathologiques de l'absence de frataxine ainsi que pour développer et valider des approches thérapeutiques. Cependant, les phénotypes sont probablement exacerbés. En effet, les cellules déficientes présentent une absence totale en frataxine à partir d'un temps spécifique d'expression de la Cre Recombinase alors que des taux résiduels d'une FXN fonctionnelle sont détectés chez les patients. Des modèles souris avec des expansions GAA dans le premier intron du gène seraient donc idéales pour étudier l'AF.

Modèles présentant une expression résiduelle de frataxine en présence d'une expansion GAA

Les souris ne présentent naturellement pas d'expansion GAA dans le premier intron du gène *Fxn*. Cependant, la présence d'une expansion pathologique GAA entraîne une diminution de l'expression de frataxine, démontré par plusieurs modèles souris GAA générés par deux stratégies différentes, un modèle Knock-in avec le GAA dans le premier intron du gène *Fxn* et des modèles humanisés portant un YAC avec le locus *FXN* humain (Al-Mahdawi et al., 2006; Anjomani Virmouni et al., 2015; Miranda et al., 2002). Ces différents modèles sont extrêmement utiles pour la compréhension des bases génétiques de l'AF avec l'étude de l'extinction transcriptionnelle du gène et de la formation de structures secondaires de l'ADN, ainsi que de l'analyse de l'instabilité du GAA. Ils sont donc essentiels pour les approches thérapeutiques visant à moduler l'expression du gène *FXN*. Cependant, ils présentent une absence de phénotype ou des phénotypes très légers résultant probablement de la limite de taille de l'expansion GAA (environ 200 répétitions). En effet, il est difficile d'insérer de grandes expansions et, en raison du contexte génomique, ces modèles souris sont compliqués à générer.

L'insertion d'une séquence (GAA)₂₃₀ directement dans le premier intron du gène *Fxn* a permis de générer les souris KIKI et KIKO (**Figure 27**) (Miranda et al., 2002). Les souris homozygotes KIKI (*Knock-in/Knock-in*) possèdent des expansions GAA au niveau des deux allèles du gène et expriment 66 à 83% de frataxine. Le croisement de ces souris avec des souris hétérozygotes pour la frataxine (*Fxn*^{+/-}) a permis la génération des souris KIKO (*Knock-in/Knock-out*), avec un allèle portant le (GAA)₂₃₀ et un allèle KO (absence de l'exon

4). Les souris KIKO expriment 25 à 36% de frataxine. Cependant, ces souris ne présentent pas, ou très peu de phénotype. Certaines équipes décrivent des phénotypes légers mais ils sont difficilement reproductibles d'un laboratoire à l'autre. Des changements légers dans l'expression de certains gènes ont été identifiés mais, aucun phénotype robuste et consistant n'a été décrit. Ceci résulte probablement de la taille limitée de l'expansion GAA, du contexte génétique et de la durée de vie courte des souris (2 ans), ne permettant pas un développement sévère d'une pathologie (Perdomini et al., 2013).

La seconde stratégie repose sur l'utilisation de chromosomes artificiels de levure (YAC) portant le gène *FXN* humain avec une expansion GAA, permettant la présence du GAA dans le contexte approprié du génome. Ces modèles humanisés ont ensuite été croisés avec des souris hétérozygote KO pour la frataxine afin de générer des animaux KO pour la frataxine (*Fxn*^{-/-}) portant le YAC-*FXN* (Figure 27) (Al-Mahdawi et al., 2006). Ces approches ont montré que la frataxine humaine peut substituer la frataxine endogène des souris sans développement de symptômes (Pook et al., 2001). Les modèles YG8R et YG22R ont été générés avec l'insertion d'un YAC *FXN* comportant une expansion GAA dans le premier intron du gène *FXN*. Le modèle YG8R est composé de deux séquences GAA de 90 et 190 triplets et le modèle YGG22R comporte deux séquences de 190 répétitions (Al-Mahdawi et al., 2006). Ces deux modèles présentent un phénotype neurologique très léger et une absence d'atteinte cardiaque. Récemment, une nouvelle souris, la souris YG8sR, possédant une expansion unique de 200 GAA a été générée (Figure 27) (Anjomani Virmouni et al., 2015). Cette souris semble présenter un phénotype légèrement plus fort avec une expression de la frataxine dépendante des tissus.

Modèles présentant une expression résiduelle de frataxine

Un nouveau modèle murin inductible a été publié en 2017, le modèle FRDAkd (Chandran et al., 2017). L'induction de shARN anti-*Fxn*, suite à l'administration de doxycycline, permet d'inhiber l'expression de la frataxine au temps voulu. La diminution systémique de la frataxine conduit à des phénotypes neurologiques (démarche ataxique et déficits moteurs) et cardiaques avec une mort prématurée à 25 semaines. Ce nouveau modèle est extrêmement intéressant pour l'étude de la physiopathologie de l'AF et le développement d'approches thérapeutiques. De plus, le retrait de la doxycycline permet de réexprimer des niveaux normaux de frataxine et conduit à une restauration partielle des phénotypes, indiquant une plasticité cellulaire. Cependant, il est difficile de titrer la frataxine exprimée dans ces souris et aux vues des niveaux de *FXN* évalués par Western Blot, la

plupart des tissus présentent des taux minimes voir absents de frataxine ((Chandran et al., 2017) Figure 1).

En résumé, les modèles murins conditionnels permettent l'étude d'atteintes précises et sévères de l'AF mais il leur manque le contexte génétique de l'AF. De manière inverse, les modèles GAA portent la mutation d'intérêt mais présentent des phénotypes très légers. De nombreux efforts sont effectués pour générer de nouveaux modèles (avec par exemple une expansion GAA plus longue) et les modèles inductibles (comme le modèle FRDAkd) semblent également très prometteurs.

5.2.2. Modèles mammifères cellulaires

Les cellules de patients portant le locus *FXN* dans sa globalité (gène *FXN* avec l'expansion pathogénique GAA et les séquences régulatrices associées) sont extrêmement pertinentes pour l'étude de la maladie. Les fibroblastes et lymphocytes primaires de patients sont facilement accessibles. Cependant, malgré une réduction des niveaux de frataxine, ces cellules ne présentent pas de phénotype mis à part une sensibilité au stress oxydant, aussi bien au niveau de l'organisme qu'en culture et ne correspondent pas aux cellules d'intérêt de l'AF (Rötig et al., 1997). Des modèles cellulaires humanisés ont été générés avec l'expression d'une frataxine normale ou mutée (mutations de patients hétérozygotes) dans des fibroblastes murins immortalisés KO pour la frataxine (Calmels et al., 2009). Ces cellules sont très utiles pour des études fondamentales mais, de nouveau, elles ne représentent pas les cellules d'intérêt de l'AF, à savoir les cardiomyocytes et les neurones, particulièrement les neurones sensitifs.

Ainsi, afin d'étudier les mécanismes de l'AF dans les cellules d'intérêt, la technologie de reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches (iPSC) suivie de leur différenciation a été utilisée. Des fibroblastes de patients reprogrammés en iPSC retiennent l'expansion GAA et expriment des taux réduits de frataxine (Hick et al., 2013; Liu et al., 2011). Des protocoles de différenciation ont ensuite été établis et permettent de différencier les iPSC en cardiomyocytes et en neurones, mais ces neurones différenciés correspondent à une population hétérogène de neurones (Codazzi et al., 2016; Hick et al., 2013). Etant donné que les neurones atteints de manière primaire dans l'AF sont les neurones proprioceptifs des DRG et les neurones du noyau dentelé, il serait intéressant de générer ces neurones spécifiquement à partir des iPSC, en améliorant les protocoles. Un protocole de différenciation en neurones sensitifs à partir de cellules souches embryonnaires,

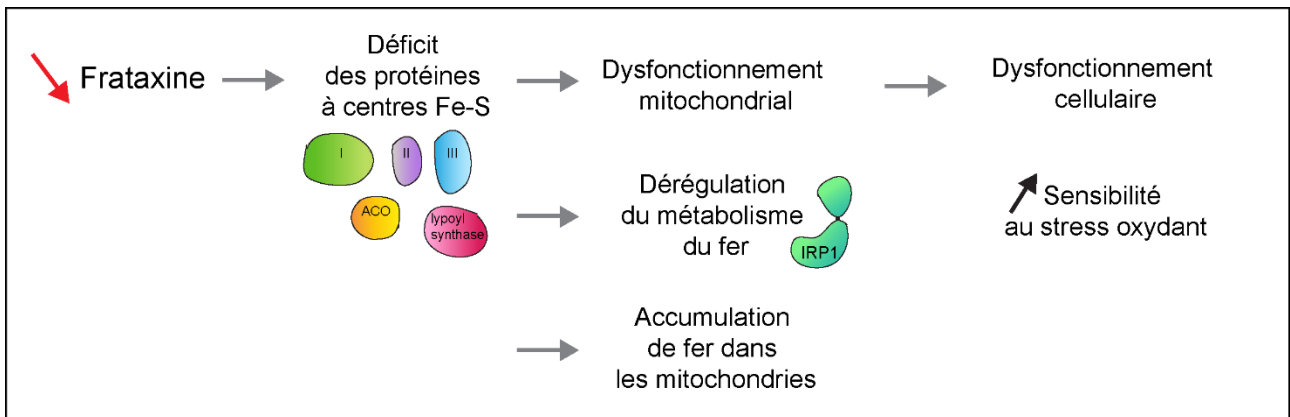


Figure 28 : Physiopathologie acceptée de l'AF.

conduisant à une population hétérogène de neurones sensitifs a été récemment publié (Alshawaf et al., 2018). L'utilisation de protocoles similaires sur des iPSC de patients AF semble très prometteuse.

5.2.3. Modèles non mammifères

Concernant les modèles non mammifères, la levure a été essentielle pour la compréhension du rôle de la frataxine et confirme certains aspects physiopathologiques observés dans les modèles mammifères (paragraphe 5.3). Pour les organismes multicellulaires, *C. elegans* et *D. melanogaster*, les technologies d'ARN interférences permettent de réduire l'expression de la frataxine (les délétions totales étant létales) et ainsi d'étudier l'AF facilement avec les avantages qu'apportent ces organismes (petite taille, reproduction rapide, peu coûteux). L'étude de ces modèles permet donc de générer des résultats complémentaires aux modèles mammifères (modèles détaillés dans une revue (Puccio, 2009).

5.3. Physiopathologie acceptée pour l'AF et questions ouvertes

Les informations apportées par l'ensemble de ces modèles, combinés aux observations faites chez les patients, ont permis de déterminer les conséquences physiologiques qui résultent de l'absence de frataxine. Ainsi, la diminution en frataxine a pour conséquence une disruption sévère des enzymes à centres Fe-S, suivie d'un dysfonctionnement mitochondrial, d'une dérégulation du métabolisme du fer couplée à une accumulation de fer dans les mitochondries et enfin un dysfonctionnement cellulaire et une sensibilité accrue au stress oxydant (**Figure 28**) (Babcock et al., 1997; Foury and Cazzalini, 1997; Martelli et al., 2007; Puccio et al., 2001; Rötig et al., 1997).

À ce jour, en termes de cinétique, il est communément accepté que la déficience en frataxine mène à un déficit primaire des protéines à centres Fe-S avec des altérations des enzymes à centres Fe-S mitochondriaux et extra-mitochondriaux (SDH, aconitase, lypoyl synthase) (Schmucker and Puccio, 2010). Ces éléments ont été identifiés dans de nombreux modèles non neurologiques de l'AF. Des déficiences de l'activité de certains enzymes Fe-S ont été décrites dans les cerveaux et cervelets de modèles souris ainsi que dans des neurones différenciés d'iPSC, mais pas encore au niveau des neurones sensitifs des DRG (Anjomani Virmouni et al., 2015; Codazzi et al., 2016).

Dans la communauté, la question de présence de stress oxydant fait débat. La présence de stress oxydant dans l'AF a rapidement été évoquée et définie comme le mécanisme pathologique majeur. En effet, des marqueurs de dommages oxydatifs ont été identifiés dans le sang et les urines des patients (Emond et al., 2000). Les levures déficientes en frataxine et les cellules de patients en culture présentent une sensibilité accrue au stress (Jiralerspong et al., 2001), et des niveaux élevés de ROS sont documentés dans les modèles souris basés sur une expansion GAA, ainsi que dans des neurones différenciés d'iPSC (Al-Mahdawi et al., 2006; Codazzi et al., 2016). Cependant, d'autres études présentent des résultats inverses. De nouvelles études sur les urines et le sang des patients n'ont pas permis de répliquer les résultats initiaux (Di Prospero et al., 2007). De plus, les modèles d'études murins conditionnels avec une déplétion totale en frataxine ainsi que la souris inductible FRDAkd ne révèlent aucun signe de stress oxydant (Chandran et al., 2017; Chen et al., 2016b; Puccio et al., 2001; Seznec et al., 2005). Ces données ne sont cependant pas en totale contradiction, en effet, dans les modèles murins des marques de stress oxydant sont observées uniquement chez les souris présentant l'expansion pathogénique GAA et pas dans les autres modèles (présentant une absence ou des niveaux extrêmement réduits de frataxine). Ainsi, dans un contexte de niveaux résiduels de frataxine, les cellules pourraient être plus sensibles au stress oxydant alors qu'en absence totale ou presque totale de frataxine, elles ne le sont pas. L'ensemble de ces éléments tend donc à penser que la sensibilité au stress oxydant correspond à un effet secondaire de l'absence de frataxine mais ne constitue probablement pas le mécanisme central primaire de l'AF. Cependant, cette hypothèse reste toujours à valider. En rapport avec la sensibilité au stress oxydant, le facteur de transcription antioxydant Nrf2 a été identifié comme diminué dans les cellules déficientes en frataxine, dans des fibroblastes de patients en culture ainsi que dans le cervelet et les DRG de souris YG8R (Paupé et al., 2009; Shan et al., 2013). Cette défaillance de la voie de signalisation Nrf2 entraîne un déficit dans la protection antioxydante, causant une sensibilité accrue au stress oxydant, ce qui contribuerait au processus de dégénérescence des cellules. Ces éléments font partis des rares éléments publiés sur la physiopathologie des DRG dans l'AF (Shan et al., 2013).

Concernant la dérégulation du métabolisme du fer cellulaire et l'accumulation de fer dans les mitochondries, les éléments sont en cours d'étude. Ce n'est pas encore clair si dans le système nerveux le fer s'accumule dans les mitochondries (Puccio et al., 2001; Solbach et al., 2014). De plus, cette accumulation de fer a-t-elle un effet pathologique sur les mitochondries ? Et quel est le mécanisme qui résulte de la dérégulation du métabolisme du fer ? Des études récentes apportent des réponses à certaines questions concernant la

physiopathologie de l'AF. Des modifications dans l'expression de gènes liés au métabolisme du fer (tel que *TfR1* et *FRTL*) avaient été identifiées dans le modèle murin conditionnel cardiaque MCK (Martelli and Puccio, 2014). Plus précisément, le déficit des protéines à centres Fe-S mènent à l'activation de la protéine régulatrice du fer IRP1, sous sa forme de liaison aux IRE, afin de maintenir la fonction mitochondriale en subsistant au besoin en fer (paragraphe 4.3.1) (Seznec et al., 2005). En effet, l'activation d'IRP1 entraîne un import de fer dans les cellules par la surexpression de *TfR1* pour augmenter la quantité de fer disponible pour les mitochondries. Afin de déterminer le rôle précis de la protéine régulatrice du fer IRP1 dans ce phénotype associé à la déficience en frataxine, Martelli et al. ont généré un modèle double KO avec une déplétion complète de la protéine IRP1 et une déplétion de la frataxine spécifiquement dans le foie (Martelli et al., 2015). Ces souris double KO développent un phénotype hépatique beaucoup plus sévère que les souris présentant une déplétion unique de la frataxine dans le foie et une mort plus précoce. Les résultats de cette étude tendent donc à montrer qu'IRP1 préserve partiellement la fonction mitochondriale en absence de frataxine, la dérégulation du métabolisme du fer serait donc un mécanisme compensatoire mis en place par les cellules pour prévenir l'apparition d'autres dommages. De plus, l'accumulation de fer mitochondrial résulterait de la surexpression du transporteur *MFRN2*, résultant de la déficience secondaire de la biosynthèse des hèmes (Martelli et al., 2015). Ainsi, la modification de la distribution du fer en absence de frataxine serait mise en place par les cellules pour protéger la fonction mitochondriale. De plus, l'absence de stress oxydant dans ce modèle démontre que ce dernier ne résulte pas de l'accumulation de fer dans les mitochondries. Cette dérégulation du fer est-elle similaire dans les tissus du système nerveux affectés dans l'AF (neurones sensitifs principalement) ? Il semblerait qu'IRP1 aient des rôles tissus-spécifiques, ainsi l'étude de ces éléments dans d'autres modèles AF est essentielle (Casarrubea et al., 2013). Dans deux autres études, une accumulation de fer a été observée dans le SN de drosophiles mutantes pour l'homologue de la frataxine (*fh*) et dans le cortex du modèle souris généré avec l'approche AAV CRISPR-Cas9 (paragraphe 5.2.1) (Chen et al., 2016a, 2016b). Chez la drosophile, l'accumulation de fer dans les mitochondries entraîne une toxicité qui contribue à une neurodégénérescence des photorécepteurs. Cette dégénérescence résulte d'une augmentation de la synthèse des sphingolipides qui activent la voie PDK1/MEF2. L'activation du facteur de transcription MEF2 conduit à la transcription de ses gènes cibles, responsables de la neurodégénérescence (Chen et al., 2016a). L'activation de cette voie de signalisation a ensuite été validée dans les neurones corticaux du modèle souris ainsi que dans des échantillons de cœurs de patients, suggérant un mécanisme évolutif conservé (Chen et al., 2016b). Le lien entre l'accumulation

de fer et l'activation de cette voie n'est, à ce jour, pas déterminé. Cependant, les neurones corticaux ne correspondent pas aux neurones d'intérêt primaire dans l'AF et, cette voie de signalisation (PDK1/MEF2) n'est pas activé dans le modèle inductible FRDAkd (Chandran et al., 2017). L'accumulation de fer dans le SN observé par Chen et al, ne conduit pas à une élévation des marqueurs de stress oxydant. Ces éléments identifiés récemment ne sont pas en accord sur tous les points mais dans les deux cas l'accumulation de fer mitochondrial n'entraîne pas d'élévation du stress oxydant. La question de la toxicité ou non de cette accumulation de fer reste entière et pourrait être tissu-dépendante.

La majorité des autres éléments physiopathologiques impliqués dans l'AF ont été identifiés dans des tissus non-neuronaux (échantillons de patients, cellules de patients en culture, cœurs ou encore muscles de modèles murins) mais très peu dans les DRG. Des dérégulations de gènes de stress ont été identifiées dans les cœurs des souris MCK par microarray, avec plus particulièrement une surexpression forte et précoce de *Mthfd2* et l'asparagine synthétase *AsnS* (Seznec et al., 2005). Les aminoacyl ARNt synthétase *GlnRS*, *AsnRS* et *AlaRS* ont également été détectés comme surexprimées. L'ensemble de ces éléments est inclut dans le métabolisme des acides aminés, proposant une déficience de ce métabolisme dans les cœurs déficients en frataxine. Plus précisément, *MTHFD2*, surexprimée avant l'apparition des phénotypes cardiaque, est une enzyme mitochondriale impliquée dans le métabolisme 1-Carbon (à partir du folate) lui-même impliqué dans les métabolismes des acides aminés et des nucléotides. L'enzyme *MTHFD2*, dont le gène *Mthfd2* est sous le contrôle du facteur de transcription ATF4, est synthétisée en réponse à une dépravation en acides aminés ou à un stress du réticulum endoplasmique. ATF4 est également surexprimé dans le cœur des souris MCK, mais détecté plus tardivement que *Mthfd2* ou *AsnS* (Seznec et al., 2005).

Des dérégulations de la voies de signalisation PPAR γ /PGC1 α , avec une diminution de l'activité du coordinateur PGC-1 α (*peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) coactivator 1A*) ont été décrites dans des tissus de modèles murins déficients en frataxine (souris KIKO) et dans des fibroblastes de patients AF en culture (Coppola et al., 2009; Marmolino et al., 2010). Cette voie de signalisation est une voie centrale de régulation de la biogénèse mitochondriale et est impliquée dans les réponses antioxydantes. La dysfonction mitochondriale est probablement la cause des dérégulations de cette voie de signalisation centrale aux mitochondries qui affecte la réponse antioxydante, cependant le lien mécanistique direct entre l'absence de frataxine et PGC1 α reste encore à déterminer. En lien avec les dysfonctions mitochondriales, une diminution de la biogénèse des mitochondries (avec une diminution du nombre de mitochondries) a récemment été décrite

dans des tissus (cerveau et muscles squelettiques) de souris KIKO, dans des fibroblastes de patients AF en culture ainsi que dans du sang de patients ([Jasoliya et al., 2017](#)). Cet élément pathologique pourrait potentiellement servir de marqueur d'évaluation de la sévérité de la maladie.

Des protéines à centres Fe-S sont impliquées dans la réparation de l'ADN (voir paragraphe 4.3.1) et des défauts dans la réparation de l'ADN sont rapportés dans différents modèles d'étude en conséquence de la déficience en frataxine. Une augmentation des dommages de l'ADN nucléaire et mitochondrial a été observée dans le sang des patients AF ([Haugen et al., 2010](#)), et des cassures doubles brins de l'ADN sont décrites dans des fibroblastes issus de patients et de souris YG8sR ([Khonsari et al., 2016](#)). De plus, des dommages de l'ADN de la microglie ont été détectés dans les cervelets de souris KIKO ([Shen et al., 2016](#)). Ces derniers dommages stimuleraient l'activation microgiale, entraînant une neuroinflammation. Par ailleurs, des signes d'inflammation des cellules de Schwann en culture, déficientes en frataxine, ont été rapportés ([Lu et al., 2009](#)).

Des analyses transcriptomiques du cœur, cervelet et DRG du nouveau modèle murin inductible à la doxycycline, le modèle FRDAkd, mettent en évidence des spécificités tissulaires, avec peu de chevauchements au niveau des gènes dérégulés en absence de frataxine entre les tissus ([Chandran et al., 2017](#)). La liste complète des gènes dérégulés n'est pas communiquée mais au niveau du cœur, plusieurs voies cellulaires sont affectées avec la voie de signalisation PPAR γ , la voie de signalisation de l'insuline, le cycle cellulaire, le métabolisme des acides gras, le métabolisme des lipides, la biosynthèse des carbohydrates, la modification des protéines, des dérégulations de la réponse immunitaire avec l'activation de cascades de chimiokines et du complément et des signaux d'autophagie. Au niveau des DRG, des mitochondries anormales associées à des vacuoles vides (probablement d'origine mitochondriale) sont décrites. Malheureusement, les mécanismes moléculaires dans les DRG (et le cervelet) ne sont que peu détaillés, la majeure partie des descriptions et analyses concernent le cœur des souris FRDAkd ([Chandran et al., 2017](#)).

De nombreux éléments participant à la physiopathologie de l'AF ont donc été identifiés au cours des dernières années, mais la physiopathologie au niveau des neurones et, en particulier au niveau des neurones proprioceptifs des DRG n'est pas claire. Il est essentiel de comprendre ce qui se passe dans les cellules spécifiquement atteintes dans l'AF pour développer les meilleures thérapies possibles. Etant donné qu'au niveau des DRG, seuls les neurones proprioceptifs sont atteints (et au niveau du cervelet les neurones du noyau dentelé), l'étude de ces neurones précis est capitale pour essayer de comprendre la spécificité tissulaire de l'AF. Dans les DRG, de nombreux modèles décrivent de larges

vacuoles dans les neurones, probablement lié à de l'autophagie (Al-Mahdawi et al., 2006; Anjomani Virmouni et al., 2015; Simon et al., 2004) et des atteintes mitochondriales (Chandran et al., 2017) mais très peu de données moléculaires sont disponibles. Ainsi, les mécanismes moléculaires et biochimiques pathologiques précis des neurones proprioceptifs ne sont, à ce jour, pas élucidés, et jusqu'à récemment, le manque de modèle robuste pour l'atteinte neurologique limitait l'étude de la neurophysiopathologie.

En conclusion, l'utilisation de différents modèles, affectant différents tissus est essentielle pour avoir un tableau générale des mécanismes déficients de l'AF et développer puis tester/valider des approches thérapeutiques.

FRIEDREICH'S ATAXIA TREATMENT PIPELINE

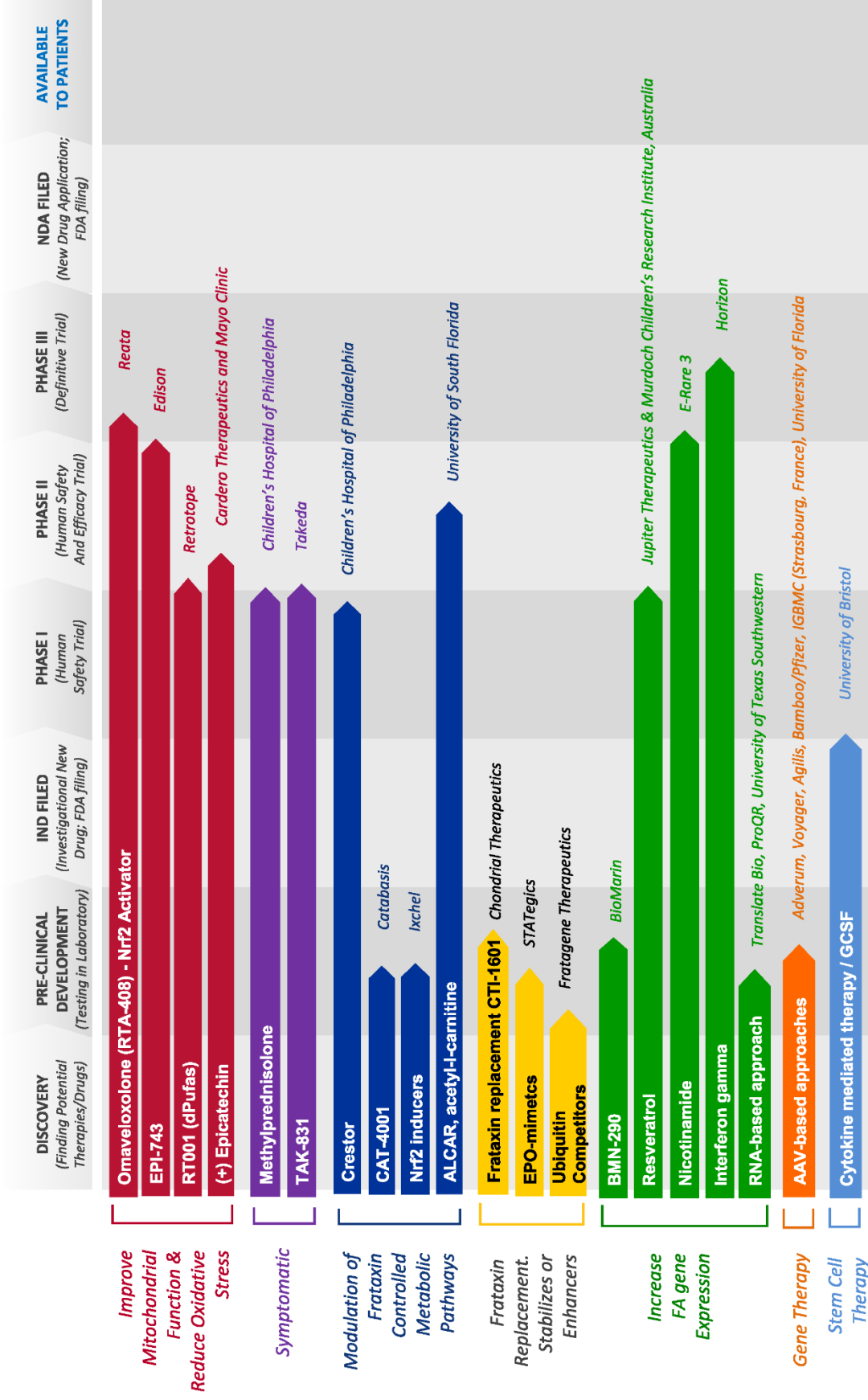


Figure 29 : Pipeline des traitements en cours de développement pour l'AF de leur découverte jusqu'à la mise sur le marché.

Ce pipeline date de décembre 2017. (Issu de <http://www.curefa.org/pipeline>).

6. Approches thérapeutiques pour l'AF

De nombreuses approches thérapeutiques sont en cours d'étude pour l'AF mais malheureusement, à ce jour, il n'existe pas de traitement efficace. Le pipeline issu du site de l'association américaine de l'AF (FARA) présente les différentes approches thérapeutiques développées dans le monde (laboratoires de recherche et entreprises biotechnologiques), de leur découverte aux essais cliniques (**Figure 29**) (<http://www.curefa.org/pipeline>). Ces essais sont classés en fonction de la stratégie thérapeutique utilisée : amélioration de la fonction mitochondriale et stress oxydant, thérapie symptomatique, modulation des voies métaboliques contrôlées par la frataxine, modulation des niveaux de frataxine, modulation de l'expression du gène *FXN*, et thérapie génique. Au fur et à mesure des années, de plus en plus d'approches parviennent en phase d'essais cliniques, ce qui est particulièrement encourageant pour les patients AF. De nombreuses molécules ont déjà été testées, mais, sans succès majeur pour le moment. Je décrirai ici les approches thérapeutiques en cours, en suivant ce pipeline (Strawser et al., 2017; Tai et al., 2018). Lors d'essais cliniques, des points de dévaluation sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de l'approche. Les différentes échelles de scores (FARS, ICARS et SARA) sont utilisées pour analyser la progression de la maladie. En parallèle l'analyse de biomarqueurs spécifiques de la maladie et de sa progression est également essentielle dans l'évaluation d'une approche thérapeutique. De nombreuses recherches pour identifier des biomarqueurs sont en cours dans le domaine. Ces biomarqueurs peuvent correspondre à des molécules présentes dans les fluides des patients (urines, sang ou liquide céphalorachidien) mais ils peuvent aussi correspondre à des mesures physiques obtenues par des nouvelles techniques d'imagerie. Par exemple, l'équipe de C. Langlet développe des approches de spectroscopie magnétique par résonance (MRS), et d'IRM par diffusion pour mesurer sensiblement la dégénérescence de la moelle épinière et du cerveau de patients AF (congrès IARC 2017, iarc2017.com).

6.1. Chélateurs de fer

Je commencerai par décrire des approches thérapeutiques développées et largement étudiées en réponse à l'accumulation de fer dans les mitochondries. Ces approches ne sont plus d'actualité en raison d'une absence de bénéfice pour les patients et l'apparition d'effets secondaires néfastes. L'accumulation de fer était initialement considérée comme toxique pour les cellules, ainsi des chélateurs d'ions, comme la défériprone ont été utilisés pour diminuer le contenu en fer des cellules (Boddaert et al., 2007). Différents essais cliniques ont

été conduits mais des effets secondaires ont été enregistrés (douleurs musculaires, étourdissements) sans aucun bénéfice pour les patients AF. L'utilisation de chélateurs d'ions pour traiter l'AF est donc fortement remise en question. De plus, l'effet toxique de l'accumulation de fer n'a pas été prouvé, et elle résulterait d'un mécanisme de défense des cellules (paragraphe 5.3) (Martelli et al., 2015). La chélation du fer ne serait donc pas approprié, le fer étant nécessaire dans le cytoplasme des cellules.

6.2. Amélioration de la fonction mitochondriale et diminution du stress oxydant

Certains composés sont capables d'améliorer la fonction mitochondriale et réduire le stress oxydant. Ces molécules ont été les premières molécules thérapeutiques testées pour l'AF. Bien que la place du stress oxydant dans la physiopathologie soit encore discutée différents essais cliniques basés sur ces composés antioxydants sont en cours. Un analogue synthétique au coenzyme Q10, l'idébénone, a été un des premiers antioxydants testé (Rustin et al., 1999). Cette molécule facilite le transport des électrons dans la mitochondrie (chaîne respiratoire). Différents essais cliniques utilisant l'idébénone ont été menés mais les résultats sont épars et non concluants. Des réductions de l'hypertrophie du myocarde et la diminution des marqueurs de stress oxydant ont été décrites dans certains essais mais non reproduits au cours d'autres essais (Tai et al., 2018). La molécule n'est donc plus considérée pour le traitement de l'AF et a été retirée du pipeline. Cependant, même à haute dose, elle ne produit pas d'effets secondaires, ainsi de nombreux patients prennent de l'idébénone quotidiennement. L'EPI-743 est une version améliorée de l'idébénone (utilisé pour d'autres maladies mitochondriales) en cours d'essais clinique de phase II chez des patients AF. Après 18 mois, il semblerait que les patients présentent une légère amélioration des fonctions neurologiques en comparaison au groupe placebo.

L'omaveloxolone (RTA-408) est une molécule aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, activatrice de Nrf2. Nrf2 (*Nuclear Factor (Erythroid-derived2)-like2*), un activateur clé des défenses antioxydantes, est l'une des cibles thérapeutiques de l'AF. En effet, Nrf2 a été observé comme diminué dans des cellules de patient AF (Paupé et al., 2009). Il a été proposé que l'activation de ce facteur améliore la biogénèse et la respiration mitochondriale en réduisant le stress oxydatif. L'omaveloxolone ralentit la dégradation d'Nrf2 et des résultats précliniques positifs ont conduit à son utilisation en essai clinique chez des patients (Abeti et al., 2015). Les premiers essais cliniques démontrent des améliorations des fonctions neurologiques et mitochondriales dépendantes de la dose administrée. Un essai clinique de phase II/III est actuellement en cours (Strawser et al., 2017).

Enfin, une autre classe de molécules, dPUFA, est actuellement testée pour protéger l'intégrité mitochondriale contre les dommages résultant de stress oxydant. Les acides gras polyinsaturés (PUFA) sont importants pour la structure et la fonction des membranes lipidiques mais ils sont facilement dégradés en cas de stress oxydant. Cette dégradation entraîne une réaction en chaîne qui conduit à des dommages de la mitochondrie et de sa membrane. Les dPUFA sont des acides gras polyinsaturés, moins sensibles que les PUFA naturel grâce à l'isotope stable deutérium qui remplace l'hydrogène. Ces dPUFA ne sont donc pas dégradés en cas de stress oxydant et les mitochondries protégées. Des essais cliniques utilisant le dPUFA RT-001 sont en cours ([Strawser et al., 2017](#)).

6.3. Thérapies symptomatiques

Le stress oxydant généré dans les cellules des patients AF pourrait entraîner une réponse inflammatoire secondaire, qui compliquerait d'avantage certains symptômes. Des thérapies anti-inflammatoires par stéroïdes (methylprednisolone) sont donc évaluées. Une étude pilote pour évaluer la sûreté et la tolérance de la molécule est en cours sur un petit groupe de patients, avec des cycles de 6 jours de traitements stéroïdiens suivis de 22 jours sans traitement ([Strawser et al., 2017](#)).

6.4. Modulation des voies métaboliques contrôlées par la frataxine

Récemment, les niveaux protéiques d'ApoA-1 ont été identifiés comme diminués dans le sérum des patients AF. ApoA-1 est la protéine principale du cholestérol HDL mais, la signification de sa diminution dans l'AF n'est pas déterminée. Des inhibiteurs de la réductase HMG-CoA, connus pour augmenter les niveaux d'ApoA-1, tel que le Crestor, sont actuellement en test chez des patients AF ([information issues du site FARA](#)).

Par rapport à la diminution de Nrf2, une petite molécule activatrice d'Nrf2 (CAT-4001) est en cours d'essai dans des modèles cellulaires et animaux de l'AF (stades préclinique) et d'autres activateurs d'Nrf2 sont recherchés et étudiés ([site FARA](#)).

Enfin, la L-carnitine, naturellement présente dans l'organisme, transporte les acides gras dans la mitochondrie. Etant considéré comme capable de d'augmenter la fonction mitochondriale, ce composé a été testé dans un essai clinique pour une première évaluation.

Ces différentes approches thérapeutiques ciblent, il semblerait, des atteintes secondaires de l'AF. Des approches visant directement la frataxine ou le gène *FXN* sont en cours d'évaluation (préclinique et clinique).

6.5. Modulation des niveaux de frataxine

Certaines molécules sont capables de stabiliser la frataxine, par des mécanismes non élucidés. C'est le cas de l'érythropoïétine (EPO), hormone qui stimule la production des globules rouges et permet l'augmentation de l'expression de la frataxine (Sturm et al., 2005). Différents mimétiques de l'EPO sont étudiés dans des modèles cellulaires et mammifères de l'AF (Miller et al., 2017). Un premier essai clinique pilote basé sur l'administration d'EPO a été conduit sur 12 patients AF. Après 8 semaines de traitement, les niveaux de frataxine mesurés étaient significativement augmentés mais non associés à des améliorations neurologiques significatives. Un deuxième essai clinique a alors été effectué sur 8 patients sur 6 mois. Des effets neurologiques modestes ont été enregistrés en parallèle de l'augmentation des taux de frataxine (24%) et de la diminution du marqueur de stress oxydant 8OH2'dG dans les urines des patients. Un troisième essai clinique avec un groupe placebo a alors été initié avec des doses plus élevées d'EPO pendant plus de 6 mois. Malheureusement, aucun effet bénéfique n'a pas été enregistré, aussi bien au niveau de l'expression de la frataxine qu'au niveau de l'amélioration des symptômes neurologiques. De plus, il y a des limites à l'utilisation prolongée d'EPO, en effet la production de globules rouges est augmentée entraînant donc des risques cardiovasculaires (Tai et al., 2018).

Un autre moyen pour augmenter les niveaux de frataxine est l'inhibition de sa dégradation protéosomale. Benini et al. ont identifié la protéine RNF-126 comme la ligase E3 qui ubiquitine spécifiquement la frataxine, entraînant sa dégradation par le protéasome (Benini et al., 2017). L'inhibition de cette ligase E3 conduit à l'accumulation de frataxine dans des cellules issues de patients. Des compétiteurs de l'ubiquitine semblent donc être des stratégies thérapeutiques intéressantes.

Enfin, des thérapies de remplacement de la frataxine en apportant une frataxine synthétique aux cellules sont en cours d'étude. Vyas et al. ont développé un système innovant de livraison pour transporter la frataxine synthétique directement dans la mitochondrie : système TAT (*Trans Activator of Transcription*) (Vyas et al., 2012). L'efficacité de cette approche a été démontrée dans le modèle murin conditionnel NSE avec des régulations moléculaires, cellulaires et physiologiques (amélioration de la fonction cardiaque

et de la survie des animaux). Une TAT-frataxine (CTI1601) est en cours de développement pour un essai clinique.

6.6. Modulation de l'expression du gène *FXN*

La diminution de l'expression de la frataxine résultant de la formation de structures secondaire de l'ADN et d'un silencing épigénétique, des approches thérapeutiques basées sur l'ouverture de la chromatine sont largement étudiées. Pour ces approches les modèles souris basés sur une expansion GAA sont essentiels.

Afin de garder la chromatine dans un état ouvert (euchromatine avec une acétylation des histones H4K5 par exemple) des inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) sont développés. *In vivo*, chez les souris, les inhibiteurs HDAC entraînent une augmentation de l'acétylation des histones et restaurent des niveaux normaux de frataxine dans le cœur et le SNC (Rai et al., 2008). De même, en présence de ces composés les niveaux d'ARNm *FXN* et de frataxine sont augmentés dans des cellules neuronales dérivées d'iPSC de patients (Soragni et al., 2014). Ces résultats précliniques encourageants ont permis le lancement d'un essai clinique de phase I sur 20 patients adultes démontrant une sécurité et une efficacité. L'inhibiteur HDAC synthétique, RG2833, augmente les niveaux de frataxine chez les patients mais génère des métabolites toxiques en parallèle. De nouveaux inhibiteurs HDAC sont générés pour améliorer l'efficacité de la molécule et prévenir la formation de métabolites secondaires (Soragni and Gottesfeld, 2016). Fin 2017, le composé BMN290, capable de pénétrer dans le CNS et le cœur a été sélectionné (investors.biomarin.com). Le nicotinamide (ou vitamine B3) est un inhibiteur HDAC naturel, capable de passer la barrière hémato-encéphalique, étudié dans l'AF. La molécule agit au niveau de la chromatine (antagoniste de l'hétérochromatine). Chez les patients, son administration conduit à une surexpression de la frataxine mais sans amélioration clinique (Libri et al., 2014). Un essai clinique sur 2 ans est planifié.

Le resvératrol, polyphénol naturel aux propriétés antioxydantes et neuro-protectives, a été démontré comme capable d'augmenter l'expression de la frataxine dans des modèles d'études (*in vivo* et *in vitro*) (Li et al., 2013). Une première étude pilote décrit des effets bénéfiques avec une forte dose de resvératrol, sans augmentation des niveaux de frataxine mais avec des effets secondaires (Yiu et al., 2015). Cette étude avait été réalisé sans groupe placebo, un nouvel essai clinique avec un groupe contrôle est planifié (Tai et al., 2018).

L'interféron gamma (IFN γ) est une cytokine qui contribue au métabolisme du fer et à la réponse immunitaire. Cette cytokine est capable d'augmenter les niveaux de frataxine

(ARNm et protéines) dans des cellules de patients et dans un modèle murin GAA , entre autre, au niveau des DRG (Tomassini et al., 2012). Un premier essai clinique sur des enfants AF a montré une amélioration des scores FARS (sans autre amélioration rapportée) mais les niveaux d'expression de frataxine ne sont pas significativement différents (ils tendent vers une augmentation). Un essai de phase II a ensuite été initié pour déterminer la sécurité et l'efficacité du traitement. Un essai de phase III avait été lancé mais interrompu en raison de l'absence d'effets après les deux premiers points de validation (horizon-pharma.com).

La formation de structures secondaires de l'ADN (R-loops) peut être ciblée avec des approches utilisant des oligonucléotides. Ces oligonucléotides détectent et se lient spécifiquement à des séquences d'ARN. Ils peuvent être dessinés en duplex d'ARN ou en ARN simples brins, complémentaires à la séquence GAA. Les ARNm nouvellement formés se lieront alors aux oligonucléotides au niveau de GAA et non plus au brin d'ADN complémentaire, évitant la formation de structures secondaire. L'hétérochromatine résulterait de la formation des R-loops, ainsi ces oligonucléotides devraient éviter la répression de la chromatine vers le promoteur du gène (Groh et al., 2014). Dans des fibroblastes de patients en culture, des oligonucléotides (en duplex ou simple brin) augmentent l'expression de la frataxine à des niveaux endogènes contrôlés (Li et al., 2016). Cette approche semble particulièrement prometteuse pour l'AF en ciblant l'ARNm *FXN* et pourquoi pas d'autres éléments de la physiopathologie (Strawser et al., 2017).

6.7. Thérapie génique

La thérapie par remplacement de gène est l'une des approches les plus encourageantes pour compenser la perte de la frataxine. L'AF est un candidat idéal pour une telle approche. Une partie de mon projet de thèse étant basée sur cette approche thérapeutique, le chapitre 2 de l'introduction est consacré à la thérapie génique.

Différentes approches sont en cours d'évaluation dans le domaine, avec l'introduction du gène déficient *FXN* (chapitre 2) ou l'excision du GAA par édition du génome. (Li et al., 2015b; Perdomini et al., 2014) L'excision du GAA avec des nucléases à doigts de zinc permet une augmentation des niveaux de frataxine dans des cellules de patients (Li et al., 2015b). Les approches de thérapie génique sont très prometteuses mais des études précliniques rigoureuses sont nécessaires pour assurer une sécurité et une efficacité pour les essais cliniques à venir.

6.8. Importance des approches paramédicales

À ce jour, aucun agent thérapeutique efficace n'est disponible pour l'ataxie de Friedreich. Mais l'importance d'un suivi médical avec des soins paramédicaux est de plus en plus reconnue, tel que la kinésithérapie, la rééducation, l'exercice physique ou l'orthophonie. Une approche paramédicale adaptée au besoin du patient permettrait de ralentir leur déclin et améliorerait la santé et le bien être (Milne et al., 2012, 2018; Tai et al., 2018).

Chapitre 2 :

La thérapie génique



1. La thérapie génique : principe et historique

1.1. Principe de la thérapie génique

La thérapie génique (TG) consiste à introduire du matériel génétique dans des cellules pour soigner une maladie, ralentir sa progression ou améliorer le statut clinique d'un patient (Verma and Weitzman, 2005). Le matériel génétique à introduire peut correspondre à des acides nucléiques thérapeutiques pour suppléer le gène muté d'une maladie monogénique (gène thérapeutique) ou pour inhiber l'expression de gènes défectueux (ARN inhibiteurs). Plus récemment, des séquences permettant de faire de l'édition de génome peuvent être introduites, particulièrement avec le système CRISPR/Cas9 (Yang et al., 2016). Dans le principe, la TG, présente le potentiel de soigner des maladies décrites comme incurables ou des maladies pour lesquelles aucun traitement médical « classique » n'est disponible ou applicable (Kumar et al., 2016). La TG est constituée de deux grandes approches : *in vivo* et *ex vivo*. L'approche *in vivo* consiste à injecter le vecteur, porteur de matériel génétique thérapeutique, directement chez les patients. L'approche *ex vivo*, elle, consiste à corriger génétiquement, en laboratoire, des cellules souches hématopoïétiques des patients avec des vecteurs porteurs du gène thérapeutique puis à réinjecter les cellules corrigées aux patients.

1.2. Historique de la thérapie génique

Historiquement, la TG a émergé dans les années 1990 avec la promesse d'un grand potentiel pour de nombreuses maladies. Cependant, et comme bien souvent dans les approches innovantes et inédites, des résultats décourageants, inquiétants voire alarmants en termes de sécurité aux cours d'essais cliniques ont ralenti le développement de ces approches thérapeutiques. En effet, entre 1997 et 1999, l'équipe du Dr J. Wilson, à l'Université de Pennsylvanie conduit un essai clinique de TG *in vivo* basée sur l'utilisation d'adénovirus de type 5 pour traiter la carence en ornithine transcarboxylase. En 1999, Jesse Gelsinger, décède 98h après l'injection du vecteur des suites d'une activation systémique du système immunitaire inné entraînant une défaillance d'organe multiple, en réponse au vecteur viral (Wilson, 2009). En parallèle, en France entre 1999 et 2002, le Dr A. Fisher et son équipe mènent un essai clinique de TG *ex vivo* sur les « bébés bulles » atteints d'immunodéficience infantile sévère (le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X, SCID-X1). En 2002, malgré un succès thérapeutique, l'essai clinique est stoppé en raison du

développement de leucémie chez deux patients (sur 10 patients au total) (Kumar et al., 2016). Cet effet secondaire résulte de l'intégration du vecteur thérapeutique dans un proto-oncogène (*LMO2*) (Hacein-Bey-Abina et al., 2003, 2008). A la suite de ces échecs, la communauté scientifique s'est quelque peu éloignée de la thérapie génique et de son utilisation. Au cours de la dernière décennie, la mise en place de nouveaux protocoles cliniques et surtout l'amélioration des techniques ont permis de replacer la TG au cœur de la recherche biomédicale avec de nouvelles avancées majeures et l'obtention de succès thérapeutiques. En 2009, le journal *Science* décrivait le retour de la thérapie génique comme la percée scientifique majeure de l'année, à la suite d'une thérapie génique *ex vivo* pour l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (Cartier et al., 2009; Naldini, 2009). Depuis, des centaines d'essais cliniques ont été menés pour une large variété de maladies (cancers, maladies monogéniques, neurologiques, cardiovasculaires ou ophtalmiques) (Hocquemiller et al., 2016; Kumar et al., 2016; Piguet et al., 2017). En octobre 2012, la première thérapie génique, Glybera®, permettant de soigner le déficit en lipoprotéine lipase, est approuvée et mise sur le marché en Europe par l'European Medicines Agency (EMA). Malgré une efficacité complète de la thérapie, Glybera® (UniQure) est retiré en octobre 2017 en raison de son coût élevé (1 million de dollars) et de la faible demande (médicament non approuvé aux Etats-Unis). Malgré ce retrait, l'accord de ce médicament en Europe fut une porte ouverte pour le développement d'autres TG. En 2016, une TG pour une immunodéficience primaire (ADA-SCID) est approuvée en Europe puis ailleurs dans le monde (médicament Strimvelis) (Ylä-Herttuala, 2016). Récemment (fin 2017) Luxturna, une TG pour la neuropathie optique héréditaire de Leber a été approuvée aux Etats-Unis par la FDA (Food and Drug Administration).

L'AF étant une maladie monogénique, je m'intéresserai principalement aux approches de TG pour les maladies monogéniques dans ce chapitre d'introduction.

1.3. Eléments clés de la TG : les vecteurs

1.3.1. Existe-t-il un vecteur idéal ?

L'un des éléments clé de la TG est le vecteur par lequel le matériel génétique thérapeutique sera délivré aux cellules et tissus d'intérêts. Le transfert doit être efficace sans association d'effets pathogéniques pour un maximum de sécurité. Dans le cas de maladies monogéniques, différents critères peuvent définir un vecteur idéal (Verma and Weitzman, 2005).

Vecteurs viraux	AAV	LV
Famille	Parvovirus	Rétrovirus, dérivé HIV-1
Taille des particules virales	20-25nm	100nm
Génome	Virus à ADN simple brin (sb)	Virus à ARN
Pathogénicité du virus sauvage	Non pathogène, 80% population séropositive	Pathogène
Capacité d'encapsulation	4,7kb	9kb
Infection	Cellules mitotiques et post-mitotiques	
Expression du transgène	Long terme	
Transduction neuronale	+++ (selon sérotype)	+
Intégration chromosomique	Non-intégratif (épisode)	Intégratif
Risque d'activation d'oncogène ?	Non	Oui
Approche de TG	<i>in vivo</i> pour cellules post-mitotiques	Majoritairement <i>ex vivo</i>
Essais cliniques ?	En cours pour maladies neurologiques, musculaires, hépatiques...	



Tableau 4 : Comparaison des deux vecteurs viraux les plus utilisés en TG.

Les AAV et les LV sont les outils de choix comme vecteurs thérapeutiques. (Adapté de [Choudhury et al., 2017](#)).

- Il doit permettre une expression durable dans le temps du/des gène/s d'intérêt/s dans les cellules cibles de la maladie, qu'elles soient en division (cellules mitotiques) ou quiescentes (cellules post-mitotiques).
- L'expression du transgène doit être en accord avec les niveaux endogènes de la protéine présente dans les cellules saines (dose de vecteur contrôlée).
- La distribution du vecteur dans les cellules d'intérêts doit être efficace, tout en évitant le développement d'une réaction immunitaire dans l'organisme.
- Il doit pouvoir être produit à des concentrations élevées avec un haut degré de pureté.

Les vecteurs se répartissent en 2 classes : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Ces derniers (ADN nu, liposomes, nanoparticules) sont généralement peu efficaces en termes de transduction et l'expression du transgène est seulement transitoire ([Verma and Weitzman, 2005](#)). Ils ne seront pas plus développés dans le cadre de ce manuscrit.

À ce jour, les vecteurs basés sur les systèmes viraux, tels que les rétrovirus, lentivirus, adénovirus ou virus adéno-associés (AAV) sont les plus efficaces et de fait les plus utilisés. Le principe général d'une infection consiste, pour le virus, à délivrer son génome dans la cellule hôte qui sera répliqué et exprimé pour permettre la formation de nouveaux virions. L'utilisation de vecteurs viraux pour la TG repose donc sur ce principe avec la livraison du gène thérapeutique dans les cellules déficientes à traiter. Souvent, au cours du cycle lytique de réplication des virus sauvages, la cellule hôte est détruite. Les vecteurs viraux sont générés en conservant la capacité infectieuse des virus sauvages tout en supprimant leur capacité répliquative. Pour permettre l'expression stable du gène thérapeutique, il doit soit s'intégrer dans le génome nucléaire de la cellule hôte (vecteurs intégratifs) ou alors se maintenir sous forme d'épisome dans le noyau (vecteurs non intégratifs). Les vecteurs intégratifs permettent l'expression continue du transgène dans les cellules en division mais ils peuvent engendrer des mutagénèses insertionnelles. Les vecteurs non intégratifs sont eux adaptés pour les cellules post-mitotiques.

1.3.2. Les vecteurs viraux les plus utilisés

Les deux vecteurs viraux les plus utilisés en TG sont les lentivirus (LV) et les virus adéno-associés (AAV). Le **tableau 4** présente les caractéristiques majeures de ces deux vecteurs ([Choudhury et al., 2017](#)). Je décrirai rapidement les lentivirus et leur utilisation en TG puis, les AAV étant les vecteurs utilisés dans mon projet de thèse je décrirai les

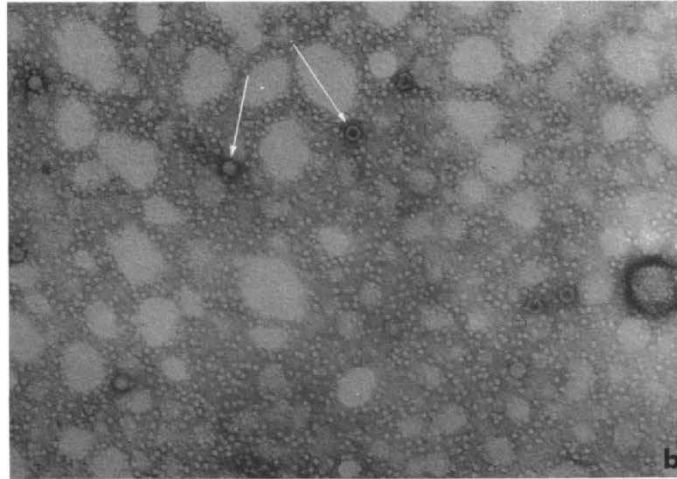
caractéristiques des AAV sauvages et leur cycle d'infection, avant de rentrer plus en détail dans les approches de TG basées sur l'utilisation d'AAV.

1.3.2.1. Les lentivirus

Les LV sont des virus à ARN, dérivé du HIV-1 appartenant à la famille des rétrovirus. Suite à l'infection d'une cellule, le génome à ARN est rétrotranscrit en ADN double brin proviral, transloqué dans le noyau et intégré au génome de la cellule hôte. Après transcription par la machinerie cellulaire, de nouvelles particules virales sont formées à la membrane plasmique. Le génome des LV est composé des gènes *gag*, *pol* et *env* ainsi que de six gènes codant des protéines accessoires. *Gag* code pour les éléments structuraux du virus (protéines de la capsid, de la matrice et de la nucléocapsid) et *pol* code pour les enzymes virales (la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase) nécessaires à la réplication. *Env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe, responsables de la médiation de l'entrée du virus dans les cellules. Le génome viral est flanqué de 2 LTR (Long Terminal Repeats), nécessaires à la rétrotranscription, à la transcription et à l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Les LV sont des virus pathogènes capables de transduire des cellules mitotiques et post-mitotiques.

Ainsi, pour les approches de TG, grâce à l'intégration du génome du lentivirus, le transgène est transmis aux cellules filles lors de la division cellulaire permettant son expression à long terme. Ces vecteurs viraux peuvent être utilisés pour des transductions *in vivo* (cerveau, œil, foie, muscles) mais ils sont surtout utilisés dans des approches *ex vivo* consistant à corriger des cellules extraites de patients, particulièrement des cellules souches hématopoïétiques, et à les réimplanter. Les cellules sont stablement transduites par les lentivirus et le gène thérapeutique est intégré au génome de la cellule hôte, permettant une expression persistante malgré les divisions cellulaires répétées. Ces approches *ex vivo* ont été utilisées pour des maladies hématologiques (hémophilie, β -Thalassémie), des immunodéficiences primaires (ADA-SCID) ou encore des maladies neurodégénératives. Par exemple dans le cas de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (ALD), une maladie démyélinisante du SNC, des cellules souches hématopoïétiques de patients ont été traitées avec un lentivirus codant pour le gène défectueux (*ABCD1*) et transplantées dans la moelle osseuse des patients (Cartier et al., 2009). A noter que la caractéristique intégrative du vecteur est aussi liée à un risque mutagène dans le cas d'intégration dans un oncogène (essai clinique SCID-X1 par exemple). Le pseudotypage de l'enveloppe de ces vecteurs

A



B

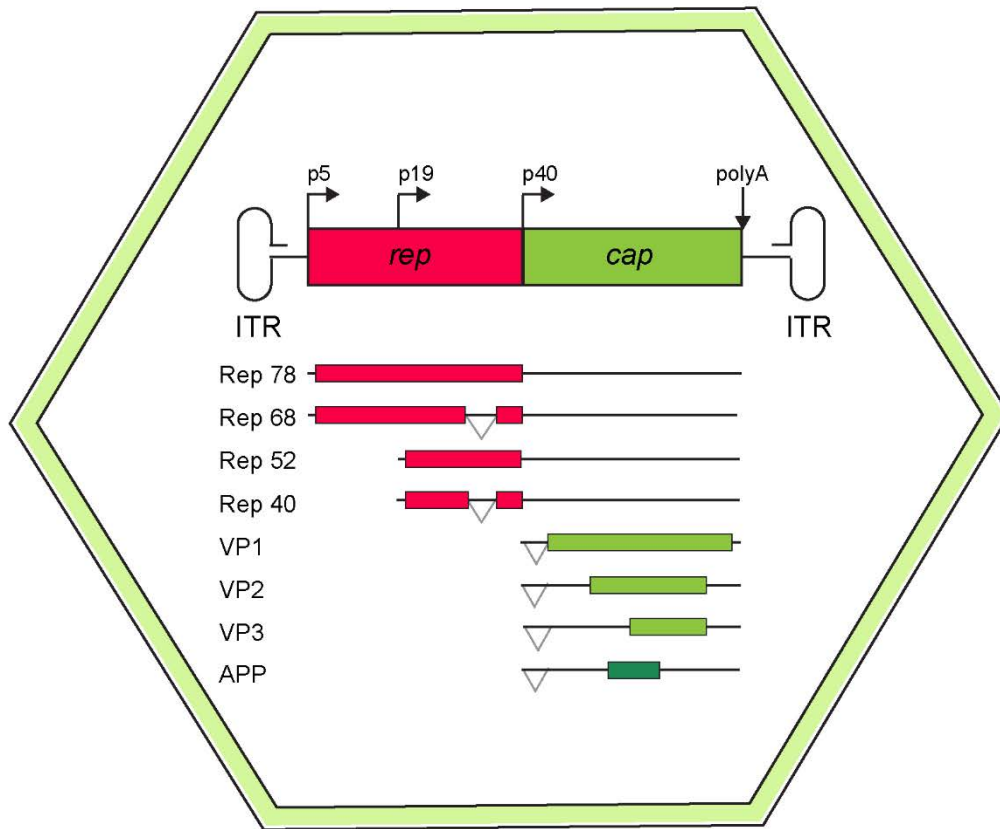


Figure 30 : Les AAV sauvages et l'organisation de leur génome.

(A) Première observation de particules AAV (flèches blanches) dans une préparation d'adénovirus simien (SV15). Grossissement x132000. (Issu de [Mayor et al., 1965](#)). (B) Organisation du génome de 4,7 kb de l'AAV2 (AAV le plus étudié). Le gène *rep* code pour quatre protéines à partir des promoteurs, p5 et p19. Le gène *cap* code pour les trois protéines de la capside et pour la protéine AAP, à partir du promoteur p40. (Flèches : promoteurs, traits horizontaux : transcrits, angles gris : introns, rectangles pleins : exons). (Adapté de [Grieger and Samulski, 2012](#)).

avec l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire G (VSVG) permet d'élargir leur tropisme en particulier pour les neurones et les cellules gliales.

1.3.2.2. Les virus adéno-associés (AAV)

1.3.2.2.1. Caractéristiques des AAV sauvages

Les AAV, de la famille des *Parvoviridae*, sont des petits virus à capsidicosaédrique de 20 à 25nm (**Tableau 4**). Ces virions non enveloppés à ADN simple brin (sb) sont non pathogènes pour l'Homme. Appartenant au genre des *Dependoparvovirus*, les AAV nécessitent des fonctions apportées par d'autres virus, appelés virus « helper », pour infecter efficacement une cellule mammifère, tel que des adénovirus ou des herpesvirus (Grieger and Samulski, 2012; Verma and Weitzman, 2005). Les AAV ont été identifiés pour la première fois en 1965 dans des préparations adénovirales et tirent leur nom de cette première observation, (**Figure 30A**) (Mayor et al., 1965). Depuis plus de 100 variants d'AAV, se répartissant en 6 clades (A à F), ont été isolés chez l'Homme et les certains primates (babouins, chimpanzés, macaques rhésus, macaques crabiers et macaques à queue de cochon) (Castle et al., 2016; Cearley et al., 2008). Ces variants présentent une taille et une organisation du génome similaires mais des différences au niveau de la structure primaire des protéines composant la capsidicosaédrique. La majorité des travaux ont été faits avec l'AAV2, c'est pourquoi nous allons nous focaliser d'avantage sur la biologie de ce sérotype.

Le génome de 4,7 kb des AAV est composé de deux gènes, *rep* et *cap* entourés de séquences ITR (*inverted terminal repeats*) en forme de T (**Figure 30B**) (Grieger and Samulski, 2012). Le gène *rep* code pour quatre transcrits nécessaires à la réplication et à l'encapsidation, à partir de deux promoteurs p5 et p19 (*Rep 78, 68, 52 et 40*). Les protéines Rep 78 et 68, sont synthétisées à partir de 2 transcrits initiés au niveau du promoteur p5. Ces deux protéines sont multifonctionnelles et impliquées dans de nombreuses étapes du cycle viral (transcription, réplication et intégration spécifique). Les protéines Rep 52 et 40 sont synthétisées à partir de 2 transcrits initiés au niveau du promoteur p19 et jouent un rôle dans l'encapsidation de l'ADN viral dans les capsides nouvellement formées dans le noyau de la cellule hôte. Le gène *cap* code pour les trois protéines structurales de la capsidicosaédrique dont les transcrits sont initiés à partir du promoteur p40. Ces trois protéines, VP1, VP2 et VP3 composent la structure de la capsidicosaédrique avec un ratio 1 :1 :10 respectivement (5VP1, 5 VP2 et 50 VP3). Un transcrit alternatif du gène *cap* code pour la protéine APP (*assembly activating protein*) qui, comme son nom l'indique joue un rôle majeur dans l'assemblage de la capsidicosaédrique.

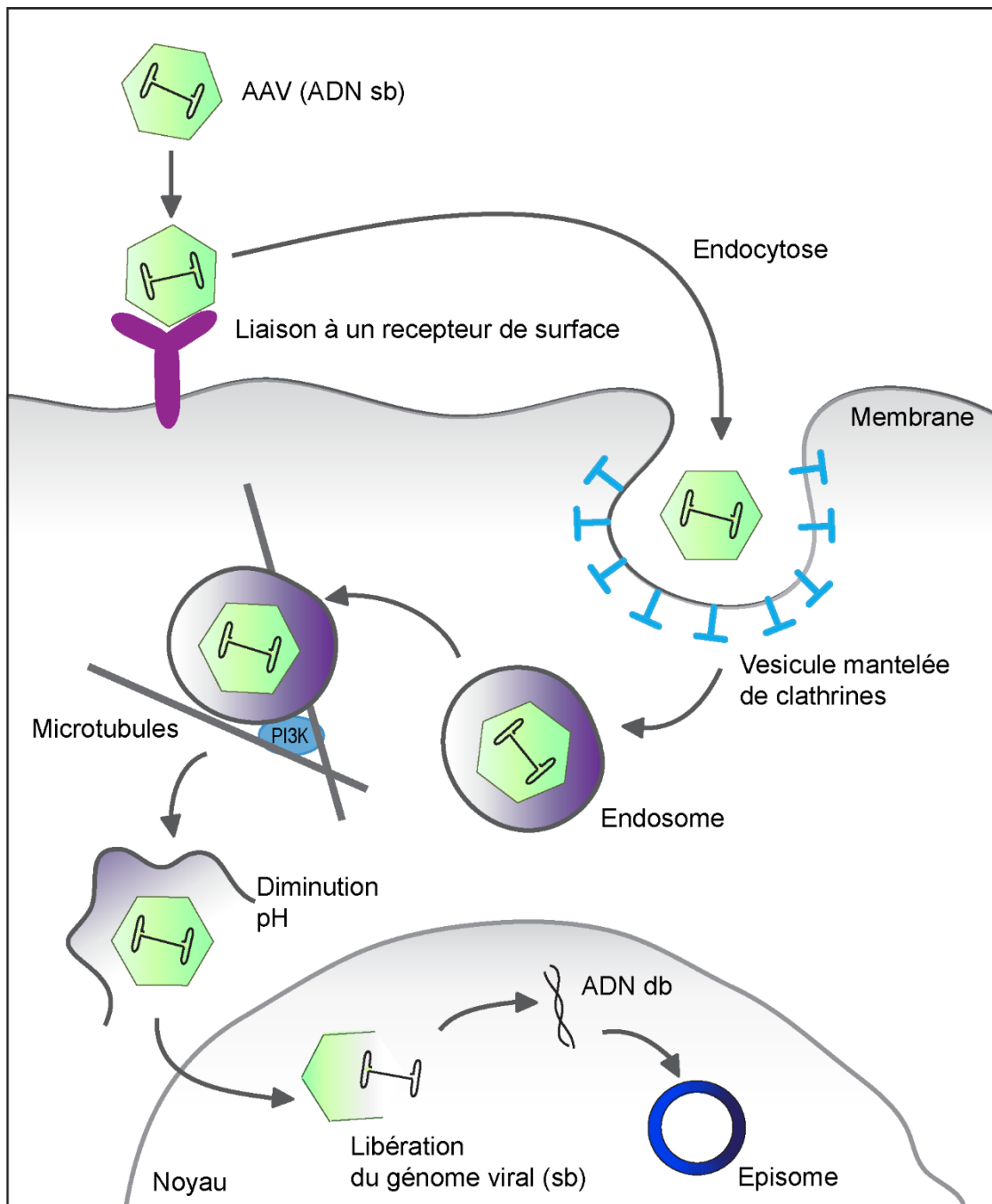


Figure 31 : Mécanisme d'infection d'une cellule mammifère par un AAV.

(Adapté de [Choudhury et al., 2017](#)).

(Penaud-Budloo et al., 2018). Les différents sérotypes d'AAV (paragraphe 2.2.1) reposent sur des différences d'acides aminés au niveau des protéines VP. La structure de la capsid a été élucidée pour un nombre restreint de sérotypes (AAV1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Les ITR longues de 145pb, localisées en 5' et 3' du génome, correspondent aux origines de réplication.

1.3.2.2.2. Cycle d'infection des AAV

Comme pour l'ensemble des virus, l'infection efficace d'une cellule par un AAV nécessite plusieurs étapes (**Figure 31**) (Choudhury et al., 2017; Grieger and Samulski, 2012). Le virion entre en contact avec la cellule à infecter via des récepteurs de surface spécifiques. Dans certains cas des corécepteurs sont présents pour faciliter l'internalisation du virus. En fonction du sérotype viral les récepteurs et corécepteurs diffèrent, conférant différents tropismes cellulaires (paragraphe 2.2.2.1). Les récepteurs pour les différents AAV ne sont pas tous identifiés mais l'AAV2 a pour récepteur cellulaire un protéoglycane héparane sulfate (HSPG) et pour corécepteurs le facteur de croissance des fibroblastes 1 (FGFR1) ainsi que l'intégrine $\alpha V\beta 5$ (Grieger and Samulski, 2012). Suite à la liaison à son récepteur de surface, l'AAV est internalisé dans la cellule par endocytose impliquant des clathrines dans la majorité des cas. Les microtubules régulent le transport de l'endosome dans le cytoplasme. Une acidification de l'endosome conduit à l'activation du domaine phospholipase de la protéine VP1. Ceci induit des changements dans l'intégrité de la capsid permettant au virus de s'échapper de l'endosome. Grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire dans les protéines VP1 et VP2, le virion est importé dans le noyau. Suite à la décapsidation, le génome viral est libéré dans le noyau de la cellule. Les AAV étant des virus à ADN sb, la synthèse du brin complémentaire par les protéines Rep virales et la machinerie de la cellule hôte est nécessaire pour permettre l'expression des gènes viraux. Il a été montré en *in vitro*, le complexe minimal, provenant de la cellule hôte, requis pour la réplication de l'ADN viral est composé de quatre protéines : l'ADN polymérase δ et les enzymes RCF (*replication factor C*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) et le MCM (*minichromosome maintenance complex*) (Nash et al., 2008). Suite à la synthèse du double brin le génome viral est instable. En absence d'une co-infection avec un virus helper, le génome de l'AAV s'établit en épisode ou plus rarement il peut s'intégrer au génome nucléaire au niveau d'un site unique dans le chromosome 19 (q13.4) appelé AAVS1. Cette intégration par homologie de séquence requiert les protéines Rep 78 et 68 codées par l'AAV. Le virus peut sortir de la phase de latence en présence d'un virus helper, qui apporte les

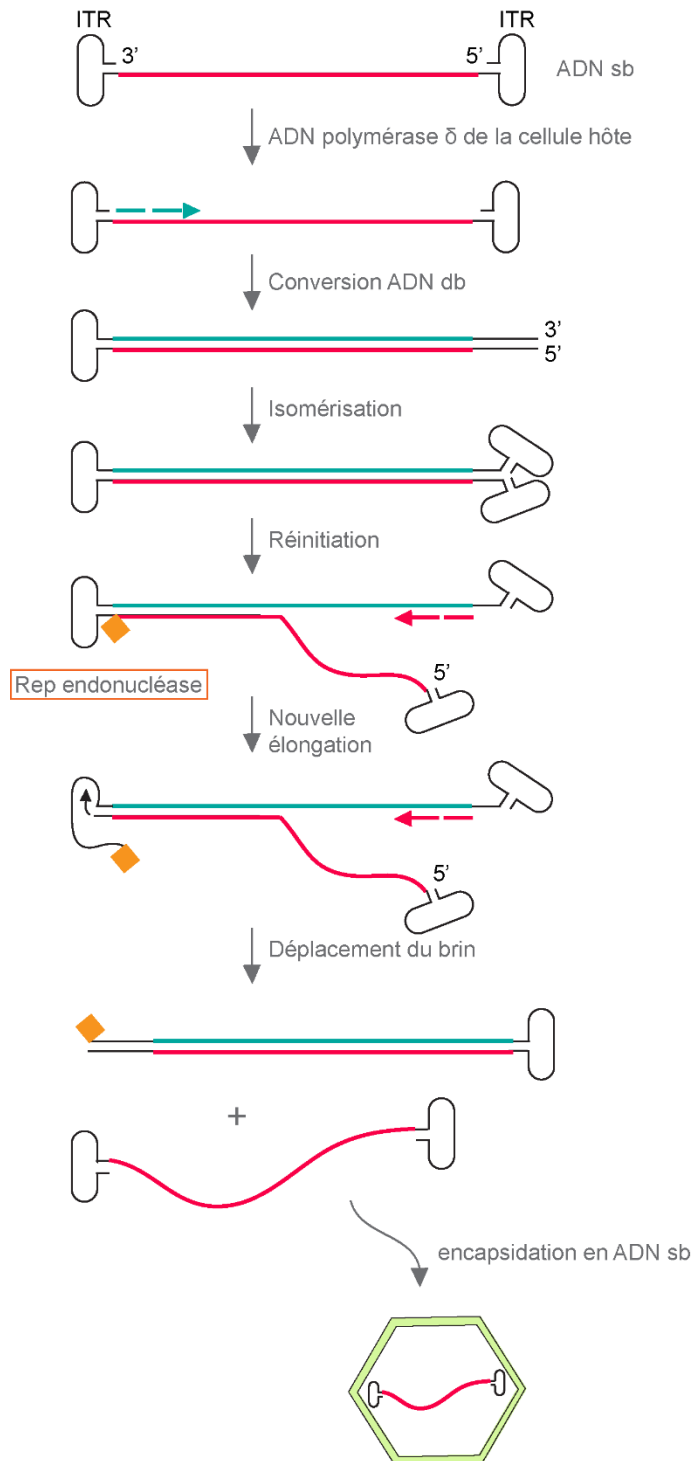


Figure 32 : Réplication du génome simple brin de l'AAV.

La réplication du génome viral nécessite un environnement permissif dans la cellule. La polymérase δ de la cellule hôte, accompagnée des protéines RFC, PCNA et MCM, synthétise le brin complémentaire à partir de l'extrémité 3' du génome viral. L'étape d'isomérisation permet la formation des ITR en 3' et en 5' de l'ADN double brin (db) créant de nouvelles amorces. L'endonucléase Rep clive ensuite le brin parental faisant apparaître une extrémité 3' et initiant la synthèse du brin complémentaire de l'ITR. Enfin, La nouvelle élongation du brin complémentaire permet de déplacer le brin monomère initial et reformer un ADN viral db. Les monomères sont ensuite encapsidés. (Adapté de [Grieger and Samulski, 2012](#)).

protéines nécessaires à la réplication du génome viral, à la synthèse de la capside et à l'encapsidation de l'ADN, permettant à l'AAV de compléter son cycle viral. Les étapes de réplication du génome viral sb sont présentées dans la **figure 32**. Les brins plus et les brins moins nouvellement formés sont empaquetés dans la capside icosaédrale sans préférence. L'infection latente, non pathogène, est particulièrement commune dans la population humaine avec 90% des adultes séropositifs pour l'AAV2 (Lykken et al., 2018).

L'ensemble des étapes du cycle d'infection du virus (liaison au récepteur, entrée par endocytose, sortie de l'endosome, entrée dans le noyau, décapsidation, libération du génome, synthèse du brin complémentaire et transcription du génome viral) peuvent chacune être limitantes dans des approches de thérapie génique utilisant des AAV recombinants (AAVr) (paragraphe suivant).

2. Thérapies géniques basées sur l'utilisation d'AAV pour les maladies du système nerveux

Dans le cadre de mon projet de thèse et pour la suite de ce manuscrit, je me limiterai à la thérapie génique basée sur l'utilisation d'AAV pour le système nerveux et les maladies neurodégénératives avec des administrations *in vivo*. De manière générale, le système nerveux est particulièrement difficile à traiter, en particulier le SNC en raison de sa complexité, des interactions cellulaires et de la présence de la barrière hématoencéphalique (BHE) (Hocquemiller et al., 2016). Plusieurs thérapies géniques pour des maladies neurologiques (maladies lysosomales, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, sclérose latérale amyotrophique, amyotrophie spinale) ont été développées avec des résultats très encourageants sur les modèles animaux. Ces résultats ont conduit au lancement de nombreux essais cliniques (Hocquemiller et al., 2016). Pour les maladies dont l'étiologie n'est pas connue, tel que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, le vecteur viral est utilisé pour délivrer des facteurs neurotrophiques, des neurotransmetteurs ou encore des protéines compensatoires (Choudhury et al., 2017). Concernant ces dernières approches thérapeutiques je ne rentrerai pas plus dans les détails.

Pour des approches de TG, les principes généraux proposés par Choudhury et ses collègues menant à une meilleure efficacité sont les suivants (Choudhury et al., 2017) :

- Les patients doivent être traités le plus tôt possible à la suite du diagnostic pour que les dommages ne soient pas trop avancés et voire irréversibles.
- Suite à l'injection des vecteurs, l'expression du transgène ne peut pas être éteinte et les niveaux d'expression ne peuvent pas être modulés. Le choix du promoteur et des séquences régulatrices en amont de la thérapie est donc essentiel.
- La taille du transgène étant limitée, la construction comportant l'ensemble de la cassette d'expression (éléments régulateurs, promoteur, ADN complémentaire, polyA) doit être adapté au vecteur choisi. Par exemple, pour la myopathie de Duchenne, le gène de la dystrophine long de 2,3 megabases (ARNm de 14 kilobases) a une taille dépassant largement la capacité d'encapsulation des vecteurs AAV (4,7 kb), conduisant à l'utilisation d'un mini-gène adapté à la capacité des AAV.
- En amont de la TG, des mesures d'évaluation réalistes doivent être établies et des biomarqueurs adaptés pour valider (ou réfuter) le succès thérapeutique sont à analyser.
- Essai clinique unique pour les patients (pas de réinjection possible à l'heure actuelle) donc les doses et les différents éléments sont à définir précisément avant l'essai.

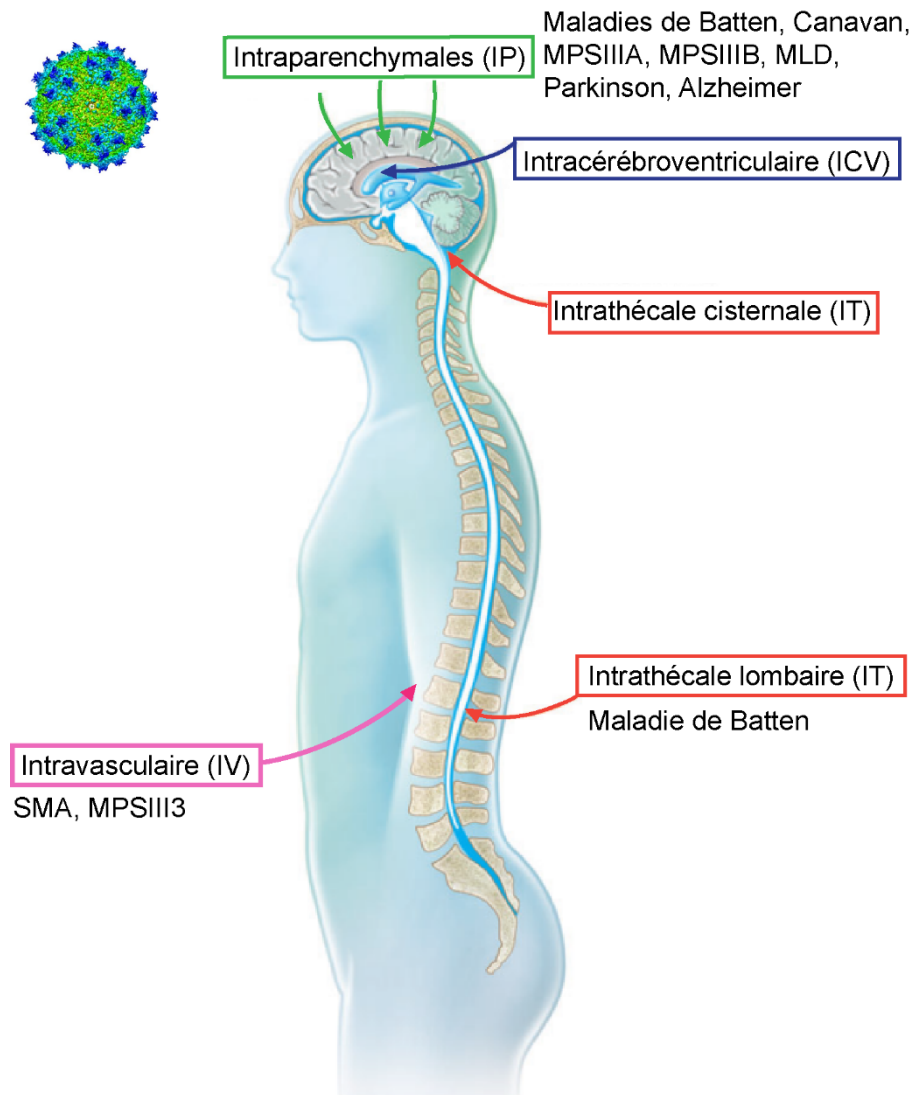


Figure 33: Méthodes d'administration des AAV avec les stratégies de TG *in vivo* dans le système nerveux et exemples d'essais cliniques en cours.

Des injections stéréotaxiques intraparenchymales (flèches vertes) permettent de cibler directement les régions d'intérêts à corriger. Le système nerveux (SN) peut également être ciblé avec des injections de vecteurs dans le LCR avec des injections intracérébroventriculaires (flèches bleues) ou intrathécales (flèches rouges) ou encore dans la circulation sanguine (injections intravasculaires, flèches roses). Les maladies neurodégénératives pour lesquelles des essais cliniques sont en cours sont présentées en fonction de la voie d'administration. (Adapté de [Hocquemiller et al., 2016](#)).

Je décrirai tout d'abord les voies d'administration de vecteur pour cibler le système nerveux pour les approches de TG *in vivo* pour les maladies neurologiques. Je développerai ensuite les vecteurs AAV recombinants utilisés dans ces approches et leurs caractéristiques.

2.1. Voies d'administration pour cibler le système nerveux

Vu la complexité du SN le choix de la méthode d'injection des vecteurs est essentiel. Elle dépend de la/les région/s et de la/les population/s cellulaire/s à traiter. La **Figure 33** présente les différentes méthodes d'administration de vecteur AAV dans le système nerveux (Hocquemiller et al., 2016).

2.1.1. Injections intraparenchymales (IP)

La plupart des approches de thérapies géniques neuronales sont basées sur des injections locales par stéréotaxie de vecteurs dans des régions spécifiques du cerveau (**Figure 33**). Ces injections intraparenchymales (IP) ont l'avantage de nécessiter une dose plus faible de vecteur, de contourner la barrière hémato-encéphalique (BHE) et présentent une meilleure immunotolérance (voir paragraphe 2.2.3). En fonction du sérotype d'AAV utilisé (voir paragraphe 2.2.1), les efficacités de transduction des cellules et de diffusion du vecteur diffèrent. Cependant, dans le cas de maladies affectant de nombreuses régions du SN, les injections IP peuvent être limitantes. Des infusions intracrâniennes de vecteurs au niveau d'axones connectant différentes structures du cerveau permettent une plus large diffusion du vecteur. Une injection avec une pression positive constante utilisant des cathéters de petits diamètres (CED : *convection enhanced delivery*) permet d'améliorer la distribution des vecteurs (Bankiewicz et al., 2000). L'injection précise des AAV peut être suivie en direct par IRM (Piguet et al., 2017).

2.1.2. Utilisation du LCR

Afin de diminuer les risques liés à des procédures chirurgicales lourdes nécessaires pour les injections IP, le liquide céphalo-rachidien (LCR) peut aussi être utilisé pour délivrer les AAV aux régions d'intérêts. Des injections intrathécales (IT) cisternales ou lombaires permettent d'injecter le vecteur dans le LCR (**Figure 33**). Chez les souris, une injection IT lombaire permet une transduction de la moelle épinière et des DRG. De plus chez les mammifères de grande taille (cochons et singes), les injections intrathécales entraînent

également une transduction efficace du cerveau et du tronc cérébral (Choudhury et al., 2017). Des injections intracérébroventriculaires (ICV) permettent également d'accéder au LCR mais nécessitent une chirurgie. Cette technique d'injection présente des limitations, particulièrement le potentiel risque de développement d'une réaction immunitaire contre le vecteur ou le transgène (voir paragraphe 2.2.3).

2.1.3. Injections intravasculaires (IV)

Historiquement les injections intravasculaires n'étaient pas utilisées pour cibler le système nerveux en raison de la BHE. Cependant, l'identification et la génération de vecteurs capables de traverser la BHE a ouvert la possibilité d'injections IV (voir paragraphe 2.2.2.1) et le lancement d'essais cliniques (voir paragraphe 2.4.1) (**Figure 33**) (Bevan et al., 2011; Zhang et al., 2011). Si les mécanismes permettant aux vecteurs de passer la BHE ne sont à ce jour pas connus, le passage est cependant facilité chez les animaux jeunes. Dans le cas d'animaux adultes, le dosage du vecteur et le promoteur utilisé ont aussi leur importance (Foust et al., 2009). Ces injections IV présentent des avantages mais également d'importantes limitations. En effet, la méthode d'administration est non invasive et le vecteur est distribué à l'ensemble de l'organisme. Mais due à cette dilution du vecteur dans l'organisme et particulièrement dans le foie, d'importantes doses de vecteurs sont nécessaires au départ pour transduire le CNS entraînant un risque de toxicité et des limitations techniques en termes de production de vecteur. De plus, la réponse immunitaire sera plus élevée en raison d'anticorps neutralisants contre les AAV présents dans le sérum (voir paragraphe 2.2.3).

2.2. Les virus adéno-associés recombinants (AAVr)

Les AAV sont des outils de choix pour des approches thérapeutique. En effet, ils peuvent transduire les cellules mitotiques et post-mitotiques, ils sont incapables de se répliquer de manière autonome et sont faiblement intégratifs. De plus, la relative simplicité de leur génome facilite le design d'AAV recombinants. Les ITR sont les seules séquences de l'AAV nécessaires en *cis* pour la réplication et l'encapsidation du génome viral (Grieger and Samulski, 2012). Le génome des AAVr est donc composé des 2 ITR des AAV sauvages et du transgène (promoteur et séquences régulatrices, gène thérapeutique et polyA) remplaçant les séquences *rep* et *cap*. La séquence de l'ADN recombinant ne doit pas excéder 4,7kb, limitant l'utilisation des AAV des lors que le transgène est de taille supérieure.

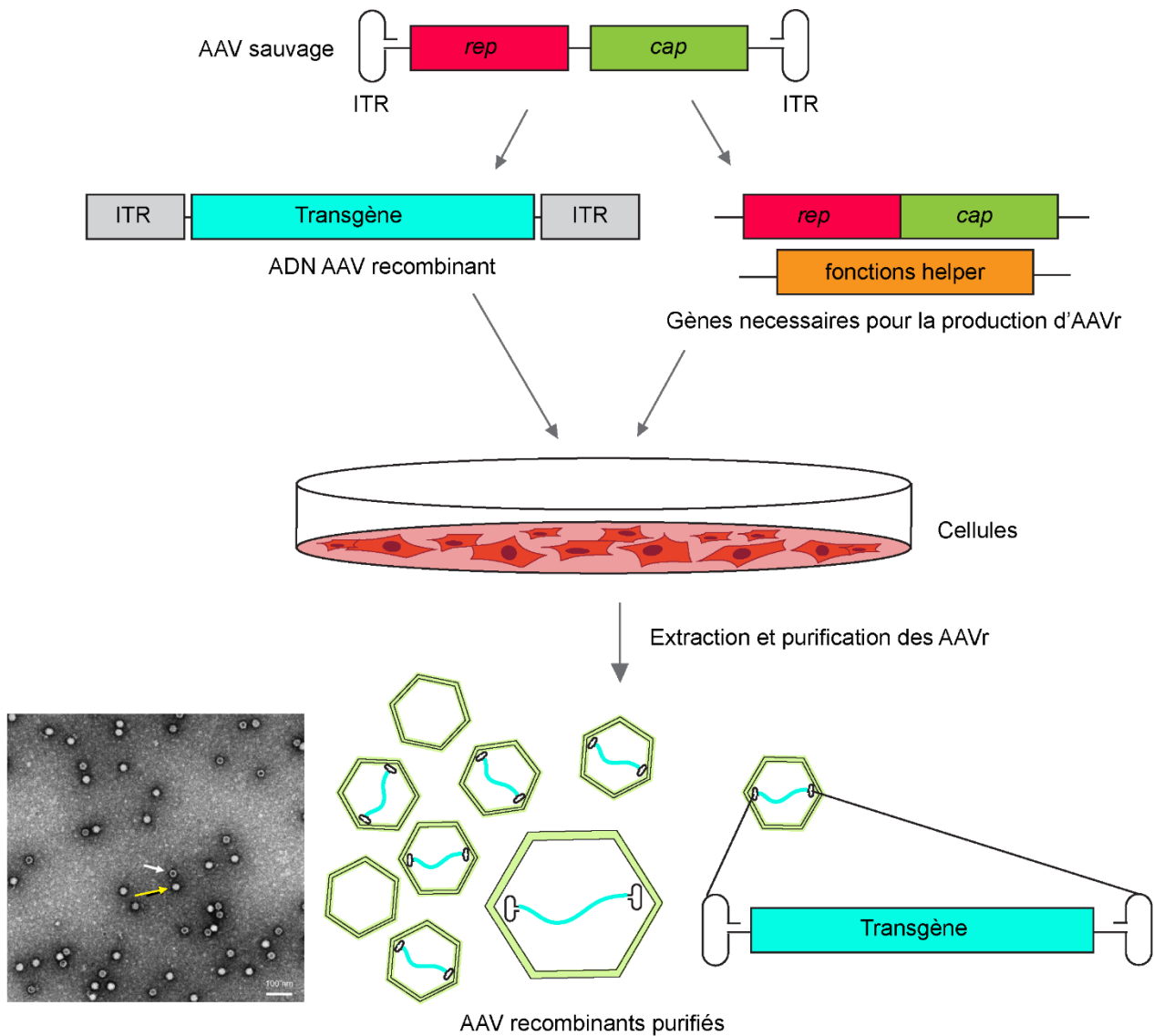


Figure 34 : Principe de production des AAV recombinants.

Le transgène correspondant au gène d'intérêt et aux éléments de régulation choisis (séquences régulatrices, promoteur, polyA, introns...) est flanqué par les ITR, seuls éléments nécessaires en *cis* pour l'encapsidation du génome. Les gènes *rep* et *cap* ainsi que les fonctions helper nécessaires pour la réplication et l'encapsidation du vecteur sont apportés en *trans* dans les cellules en culture. A gauche : photo de particules d'AAVr en microscopie électronique, la flèche jaune montre une particule AAVr et la flèche blanche pointe une particule vide (issu de [Penaud-Budloo et al., 2018](#)).

Afin de produire les vecteurs viraux AAV (correspondant aux AAV recombinants) les séquences *rep* et *cap* sont apportées en *trans* (en absence d'ITR) en parallèle des fonctions helper des adénovirus ou herpevirus. Le principe général de production des AAVr est présenté dans la **figure 34**. Les techniques de production précises sont présentées dans la section 2.3. En culture il est donc possible d'encapsider le matériel génétique de notre choix en apportant les signaux de réplication et d'encapsidation (ITR) en *cis* et l'ensemble des autres éléments en *trans*. Les vecteurs générés ne contiennent aucun gène viral, empêchant leur réplication dans les cellules transduites. Les virus recombinants formés sont ensuite extraits et purifiés. La préparation d'AAVr peut contenir des particules vides (paragraphe 2.3) (**Figure 34**).

Les AAVr correspondent sont beaucoup utilisés pour les maladies neurodégénératives en raison de leur fort tropisme neuronal (selon les sérotypes), particulièrement avec des injections *in vivo* et de leur nature non pathogène et sécuritaire ([Hocquemiller et al., 2016](#)).

2.2.1. Sérotype et tropisme des AAV

Les différents sérotypes d'AAV sont basés sur la structure de la capsid : en fonction des protéines VP la formant, les récepteurs de surface vont différer. Chaque sérotype viral présente donc un profil antigénique unique et un tropisme cellulaire spécifique. Plus d'une centaine d'isolats naturels ont été identifiés. La librairie d'AAV a ensuite été grandement enrichie grâce à des modifications *in vitro* de la structure primaire des protéines de la capsid ([Castle et al., 2016](#)).

2.2.1.1. Isolats naturels

La majorité des preuves de concept précliniques a été réalisée avec un AAVr de sérotype 2 (AAV2 dans la suite du manuscrit) qui présente un tropisme large. L'étude des autres sérotypes et la génération des AAV recombinants correspondants ont ensuite permis d'améliorer deux éléments essentiels de la TG à savoir une amélioration de la transduction des cellules d'intérêts ainsi que la biodistribution du vecteur, Les AAVr (autre que l'AAV2) utilisés en TG correspondent principalement à des pseudovecteurs. Ces derniers sont composés d'une capsid alternative à celle de l'AAV2 et du génome recombinant de l'AAV2 (transgène entouré des ITR de l'AAV2). Par exemple le vecteur rAAV2/9 correspond au génome recombinant de l'AAV2 avec la capsid de l'AAV9 (gène *cap* de l'AAV9 apportés en

Sérotype capside	Récepteurs primaires	Administration intracérébrale		Administration intravasculaire		Transport axonal
		Transduction Neuronale	Transduction Gliale	Transduction Neuronale	Transduction Gliale	
AAV1	$\alpha 2,3/\alpha 2,6$ N-linked sialic acid	++	+	+	+	A-, R+
AAV2	Heparan Sulfate	+	-	-	-	A+, R-
AAV4	$\alpha 2,3$ O-linked sialic acid	-	++	-	-	?
AAV5	$\alpha 2,3$ N-linked sialic acid	++	+	-	-	R+
AAV6	$\alpha 2,3/\alpha 2,6$ N-linked sialic acid					A-, R+
	Heparan Sulfate	++	-	+	+	
AAV8	Laminin receptor	++	++	++	++	A+, R+
AAV9	Galactose	+++	++	+++	+++	A+, R+
AAVrh10	?	+++	++	+++	+++	A+, R+

Tableau 5 : Sérotypes naturels d'AAV les plus communs avec leur récepteur primaire et leur profil de transduction du système nerveux central de mammifères.

? : Récepteur non identifié ou transport axonal non déterminé.

Transduction cellulaire absente : - ; faible : + ; moyenne : ++ et élevée : +++.

Transport axonal déterminé de manière *in vivo* ; A : antérograde, R : rétrograde.

(Adapté de [Muridharan et al., 2014](#)).

trans lors de la production des vecteurs). Par simplification nous appellerons ces pseudovecteurs AAV9 et non AAVr2/9.

Les sérotypes 1 à 9 présentent 45% d'identité au niveau des acides aminés de la capsid, les AAV4 et 5 étant les plus divergents (Grieger and Samulski, 2012). Les récepteurs de surface auxquels les AAV se lient pour pénétrer dans les cellules ne sont pas encore tous identifiés. Les AAV1, 4, 5 et 6 se lient à l'acide sialique, l'AAV8 au récepteur à la laminine et l'AAV9 au galactose (**Tableau 5**) (Murlidharan et al., 2014). Pour cibler le système nerveux, les sérotypes 1, 2, 5, 8, 9 et rh10 sont les plus utilisés. Ils présentent différents tropismes cellulaires en fonction de la région du système nerveux, de l'espèce animale utilisée et de la méthode d'injection (Castle et al., 2016; Hocquemiller et al., 2016; Zincarelli et al., 2008). Pour des cultures primaires neuronales, les AAV1, 6 et 7 présentent le plus fort tropisme neuronal et l'AAV5 est le candidat de choix pour une transduction gliale (Castle et al., 2016). *In vivo*, pour des injections IP, les AAV9 et rh10 sont les meilleurs candidats grâce à leur bonne efficacité de transduction, une diffusion large du vecteur et un transport axonal antérograde et rétrograde (**Tableau 5**) (Castle et al., 2016; Cearley and Wolfe, 2006). Les AAV4 et rh43 présentent un tropisme glial fort et l'AAV8 est idéal pour transduire les oligodendrocytes du cortex. Avec des injections IT, l'AAV8 transduit efficacement les neurones de larges diamètres des DRG et les AAV7 et 9 ciblent particulièrement bien le cortex, le cervelet et la moelle épinière.

Afin de cibler le SN par une administration IV, les vecteurs doivent être capables de passer la BHE et transduire les neurones. Les sérotypes 9 et rh10 sont les plus efficaces (Bevan et al., 2011; Foust et al., 2009; Zhang et al., 2011). Suite à une injection IV, l'efficacité de transduction de l'AAV9 et le type de cellules transduites vont dépendre de l'âge des animaux. Par exemple une meilleure transduction neuronale est observée dans le CNS des souris jeunes, les souris adultes présentant plutôt une transduction gliale (Zincarelli et al., 2008). Enfin chez les primates non humains (NHP), après une injection IV, l'AAV9 transduit les cellules gliales du cerveau, les neurones des DRG et les motoneurones de la moelle épinière (Bevan et al., 2011). Globalement les AAV9 et rh10 sont les vecteurs de choix pour une large transduction neuronale suite à une injection intracérébrale ou intravasculaire (**Tableau 5**).

En parallèle du choix de sérotype, le choix du promoteur peut participer au ciblage spécifique d'une population cellulaire. Par exemple, le promoteur NSE permettra une expression spécifique dans les neurones après transduction, le promoteur GFAP une expression dans les astrocytes ou encore le promoteur MBP une expression forte dans les oligodendrocytes du SNC (Castle et al., 2016).

2.2.1.2. Emergence de nouveaux vecteurs générés en laboratoire

Au cours des dernières années, des vecteurs AAV, ont été générés par modification de la capsidie dans le but de cibler au mieux certains tissus, éviter la transduction dans d'autres tissus, limiter une réponse immunologique et améliorer le passage de la BHE. Les AAV peuvent être modifiées selon cinq approches expérimentales différentes (Castle et al., 2016) :

- 1) Modifications chimiques de la capsidie permettant d'altérer le tropisme naturel avec la présence d'éléments de liaison à de nouveaux récepteurs de surface ou en masquant des éléments natifs de la capsidie. Ces dernières modifications permettent également de protéger contre les anticorps neutralisants présents dans l'organisme (voir paragraphe 2.2.3). Ces vecteurs modifiés n'ont pas encore été utilisés dans des approches *in vivo*.
- 2) Génération de vecteurs hybrides combinant les propriétés de multiples sérotypes avec la coexpression de gènes *cap* issus de ces différents sérotypes lors de la production des AAVr. Cette méthode est cependant peu utilisée, car la composition précise de la capsidie n'est pas suffisamment maîtrisée lors de la production, conduisant à des réarrangements de capsidie différents dans une même préparation d'AAVr.
- 3) Insertion de peptides dans la capsidie afin d'introduire une nouvelle capacité de liaison à un récepteur et donc modifier le tropisme naturel du vecteur. La production et la capacité infectieuse du vecteur ne doivent pas être altérées suite à cette expression de peptide. La localisation du peptide est donc essentielle. A ce jour, peu de recherches *in vivo* utilisant ces vecteurs ont été développées.
- 4) Des procédures de capsidie shuffling (brassage des gènes *cap* de plusieurs sérotypes après digestion par une nucléase) suivies de modifications dirigées ont généré de grandes banques de capsides. En fonction des éléments et caractéristiques recherchées des étapes de sélection sont ensuite nécessaires.
- 5) Des approches de mutagénèses rationnelles des gènes codant les protéines de la capsidie avec le changement de quelques acides aminés semblent être la technique la plus prometteuse pour la génération de nouveaux vecteurs AAV. Ces mutations dirigées permettent une modification du tropisme, une amélioration de l'efficacité de transduction ou encore une non reconnaissance par les anticorps neutralisants. L'amélioration de l'efficacité de transduction permet de réduire la dose de vecteur à administrer minimisant donc de potentiels effets toxiques.

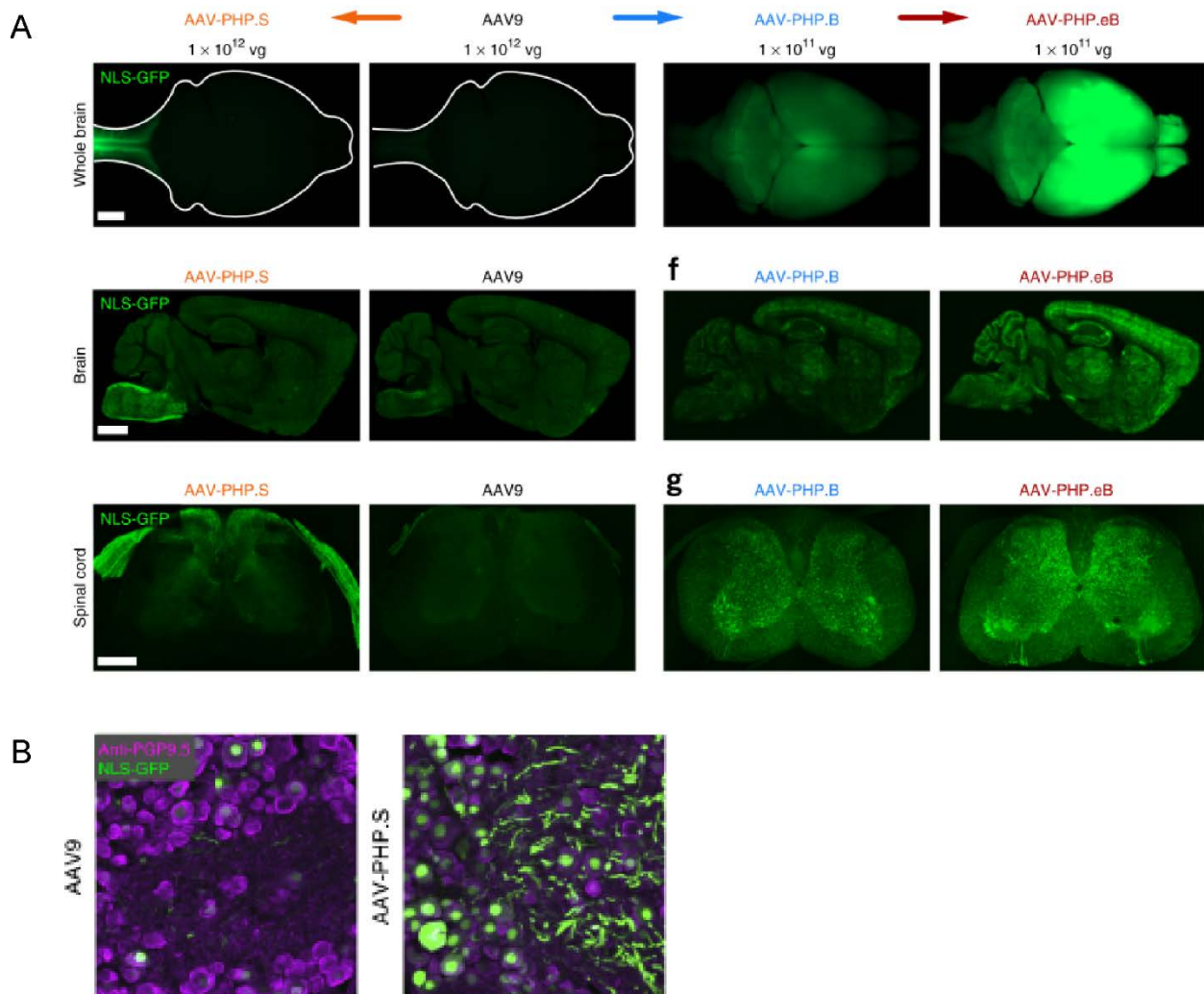


Figure 35 : Des variants d'AAV9 permettent une meilleure transduction du SNC et du SNP.

(A) Expression d'une GFP à localisation nucléaire dans le cerveau et la moelle épinière trois semaines après des injections IV d'AAV9, AAV-PhP.S, AAV-PhP.B, AAV-PhP.eB codant pour une NLS-GFP ; 1×10^{12} vg par souris pour les deux premiers vecteurs et 1×10^{11} vg par souris pour les deux derniers vecteurs. (B) Expression de la GFP nucléaire dans les DRG suite à des injections IV d'AAV9-NLS-GFP ou AAV-PhP.S-NLS-GFP. Les neurones sont marqués avec le marqueur neuronal PGP9.5 en magenta. (Issu de [Chan et al., 2017](#)).

Depuis 2016, des vecteurs particulièrement efficaces pour traverser la BHE et transduire efficacement des populations hétérogènes dans le système nerveux ont été développés. Ces vecteurs sont particulièrement intéressants pour les maladies neurodégénératives impliquant différentes régions et population neuronales, maladies pour lesquelles des injections IP sont limitantes. De plus, le SNP est difficilement accessible de manière chirurgicale ainsi des administrations IV semblent être la meilleure option. Ces nouveaux vecteurs sont des variants de l'AAV9 ou de l'AAV9.47. Ce dernier, lui-même un variant de l'AAV9, présente le même tropisme neuronal que l'AAV9 mais avec une diminution significative de la transduction du foie (particulièrement transduit après une injection IV d'AAV9) (Pulicherla et al., 2011). L'AAV-AS est un variant de l'AAV9.47 avec un peptide poly-alanine ajouté en N-terminale des protéines VP2 (fusion de la séquence du peptide dans le gène *cap*) (Choudhury et al., 2016). La présence de ce peptide permet un meilleur passage de la BHE et de la transduction du système nerveux suite à une injection en IV. Par rapport à l'AAV9 classique, son efficacité de transduction est 15 fois supérieure dans le cerveau et 6 fois supérieure dans la moelle. Il présente également une excellente transduction des cellules de Purkinje localisées dans le cervelet. Dans une autre étude, une nouvelle méthode (CREATE pour Cre Recombinase based AAV Targeted Evolution) a permis de générer l'AAV-PhP.B (Deverman et al., 2016). Ce variant de l'AAV9 présente une séquence de 7 aminés supplémentaires (TLAVPFK) au niveau de la protéine VP1. Suite à une injection IV, 40x plus de vecteurs sont retrouvés dans les astrocytes et les neurones de régions du SNC de souris adultes et peu dans le cervelet par rapport à l'AAV9. Les organes périphériques des souris présentent la même transduction à l'exception du pancréas. Afin d'améliorer ce vecteur AAV PhP.B pour diminuer la dose à injecter, de nouveaux cycles de modifications et sélections (méthode CREATE) ont été entreprises générant le variant PhP.eB (Chan et al., 2017). Ce variant (différent de trois acides aminés par rapport au PhP.B) permet la transduction de la majorité des neurones du SNC suite à une injection IV à faible dose et plus de 75% des cellules de Purkinje du cervelet. La **figure 35A** présente les résultats obtenus dans cette étude avec la transduction du cerveau et de la moelle épinière avec 1×10^{12} vg (vecteur génome) par souris pour l'AAV9-GFP et 1×10^{11} vg par souris pour les AAV PhP.B et PhP.eB. En parallèle, l'AAV PhP.S a été généré avec la même méthode (peptide QAVRTSL). Ce dernier variant transduit le SNC de manière similaire à l'AAV9 mais il présente un très bon tropisme pour le SNP (particulièrement les neurones des DRG) ainsi que les afférences sensorielles périphériques de la moelle épinière et du tronc cérébral (**Figure 35A**). Plus de 80% des neurones des DRG sont transduits (**Figure 35B**) (Chan et al., 2017). Ces efficacités de transduction élevées permettent donc de diminuer les doses de vecteur

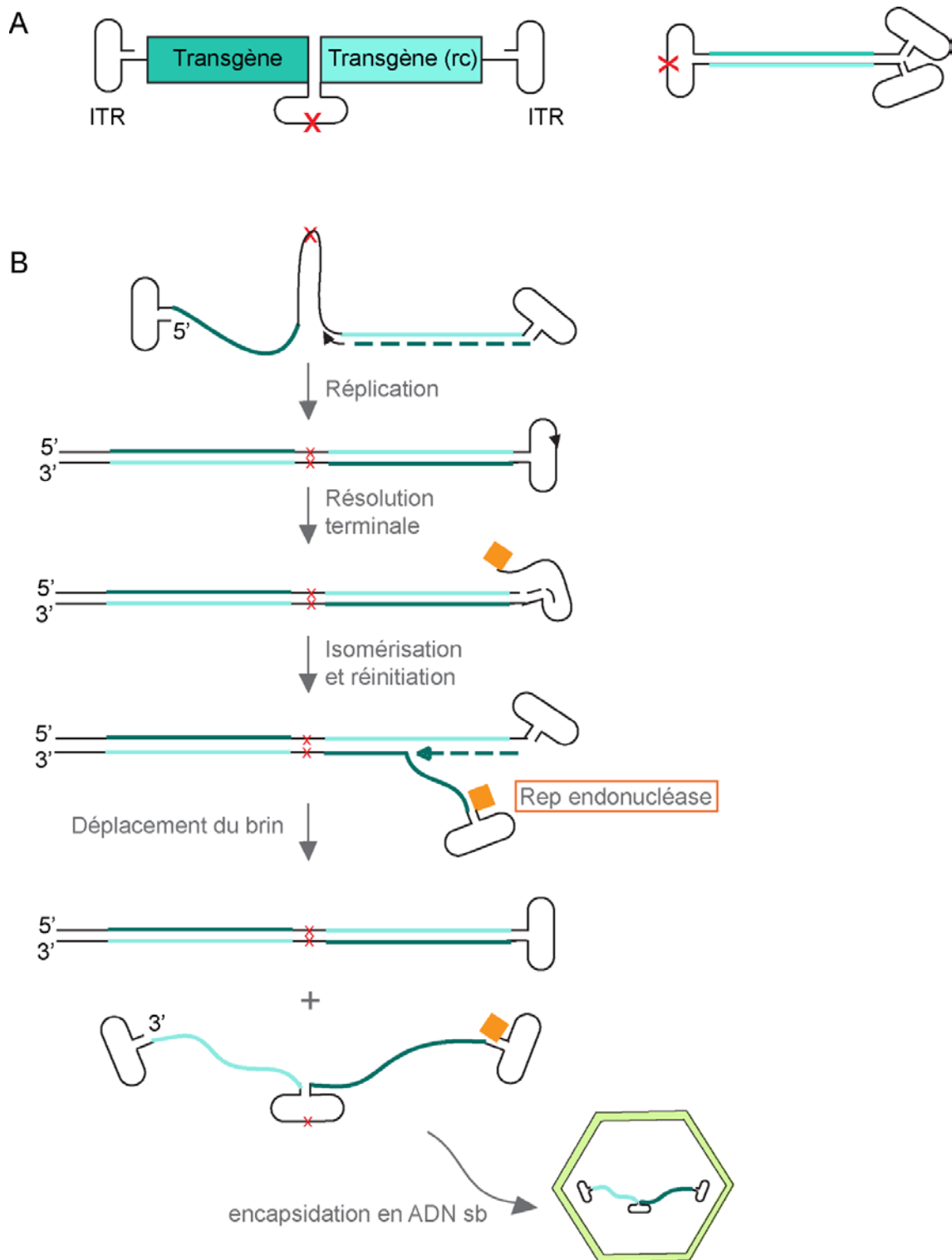


Figure 36 : Génome et génération des scAAV.

(A) Le génome des scAAV est composé de deux ITR sauvages entourant deux simples brins complémentaires d'ADN (rc : reverse complément). Les simples brins sont interrompus par une ITR muté (X rouge : mutation). Les sb complémentaires peuvent s'apparier formant un ADN db permettant une expression plus rapide du transgène. (B) Génération des scAAV et encapsidation sous forme d'ADN sb. (Adapté de [Grieger and Samulski, 2012](#)).

injectées. La diminution des doses permet également d'envisager des co-injections de vecteurs portant des génomes recombinants différents (pour l'expression de plusieurs protéines).

Enfin, récemment, des vecteurs viraux hybrides composés d'AAVr associés à des exosomes ont été générés (György et al., 2014; Hudry et al., 2016). Ces exo-AAV ont l'avantage de résister aux anticorps neutralisants, d'améliorer la transduction dans le système nerveux par comparaison aux AAV classiques et de faciliter le passage de la BHE.

2.2.2. Expression du transgène

Le sérotype de l'AAV influe également sur la cinétique d'expression du transgène (Grieger and Samulski, 2012; Zincarelli et al., 2008). La première étape limitante pour la cinétique d'expression repose sur la nécessité de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN sb de l'AAV (**Figure 32**). Cette synthèse induit un délai dans l'expression du transgène. Il a été observé que l'expression est lente au début puis atteint un plateau. De manière très rare, si des brins + et – encapsidés sont tous deux présents dans la cellule, ils peuvent s'hybrider et former un ADN db (McCarty, 2008). Afin de palier à ce délai dans l'expression du transgène des AAV recombinants à ADN doubles brins (db) ont été développés (appelés scAAV pour self-complementary AAV). Le génome de ces scAAV est formé de deux simples brins complémentaires d'ADN (gène d'intérêt) avec une ITR modifiée par mutation au milieu et entourés d'ITR sauvages (**Figure 36A**) (McCarty, 2008). Les simples brins peuvent directement s'apparier dans la cellule après transduction permettant une expression plus rapide du transgène (**Figure 36A**). Cependant en raison de la structure de ce génome modifié, la capacité d'encapsidation des scAAV est diminuée de moitié (cassette d'expression réduite à 2,5kb). La **figure 36B** présente le principe de réplication d'un scAAV. La mutation localisée dans l'ITR interne empêche l'initiation de la réplication.

Suite à la transduction des AAVr, l'expression du transgène persiste pendant de nombreuses années dans les cellules. Une récente étude démontre l'expression du transgène 15 ans après le transfert de gène dans le cerveau de primates pour la maladie de Parkinson (Sehara et al., 2017)

2.2.3. Réponse immunitaire face aux AAVr

Les AAV ont l'avantage d'être faiblement immunogène (Bessis et al., 2004). Cependant une réponse immunitaire peut se mettre en place à la suite d'injection d'AAVr.

L'organisme développe surtout une réponse immunitaire humorale contre la capsidie empêchant toute ré-administration d'AAV avec un sérotype similaire.

Lors d'une infection virale, deux types de réponses immunitaires se mettent en place. Immédiatement après l'infection, la réponse immunitaire innée, non spécifique, permet la sécrétion de cytokines inflammatoires et de chimiokines au site d'infection ou d'injection dans le cas d'une TG. Ensuite, la réponse immunitaire adaptative se met en place. De manière très simplifiée : dans les ganglions lymphatiques, les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) vont être activés suite à la présentation d'antigènes (peptides) par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) ainsi que les cellules dendritiques, via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I). Le MHC-I, exprimé à la surface de l'ensemble des cellules nucléées, présente des peptides issus de protéine du non soi d'origine cytotoxiques. Les cellules T CD8+ migrent ensuite vers le lieu d'infection et détruisent les cellules présentant les mêmes peptides sur leur MHC-I. On parle de réponse immunitaire adaptative cellulaire. En parallèle, les protéines du non soi extracellulaires seront phagocytées par les APC et présentées aux lymphocytes T helper (CD4+) via le MHC-II. L'activation des cellules T helper entraîne l'activation des lymphocytes B qui produiront alors des anticorps neutralisants contre cette protéine du non soi. On parle alors de réponse immunitaire adaptative humorale.

Les AAV étant décrits comme non pathogènes, initialement peu d'attention avait été portée aux réponses immunitaires suite à l'administration d'AAVr. Au cours d'un essai clinique pour l'hémophilie B avec l'injection d'AAV2 codant pour le facteur IX, une réponse immunitaire a été observée et étudiée ([Manno et al., 2006](#)). L'injection d'AAV ne semble pas déclencher de réponse immunitaire innée dans l'organisme (ou très légèrement) ([Bessis et al., 2004](#)). En effet, sur l'ensemble des essais cliniques de TG utilisant des AAVr aucune réaction sévère due à la réponse immunitaire innée n'a été observée. En revanche une réponse immunitaire adaptative contre le transgène ou la capsidie peut se mettre en place, conduisant à la destruction des cellules exprimant le transgène et à la production d'anticorps neutralisants. Ces réponses inhibent donc l'expression du transgène et l'efficacité de la TG à long terme. Différents paramètres influent la sévérité de cette réponse : le tissu ciblé, la dose de vecteur et le sérotype d'AAV utilisé, le transgène et son niveau d'expression, etc.

2.2.3.1. Réponse immunitaire adaptative contre le transgène

La réponse immunitaire contre le transgène varie en fonction des protocoles expérimentaux (quantité de transgène, cinétique d'expression, voie d'administration) ainsi

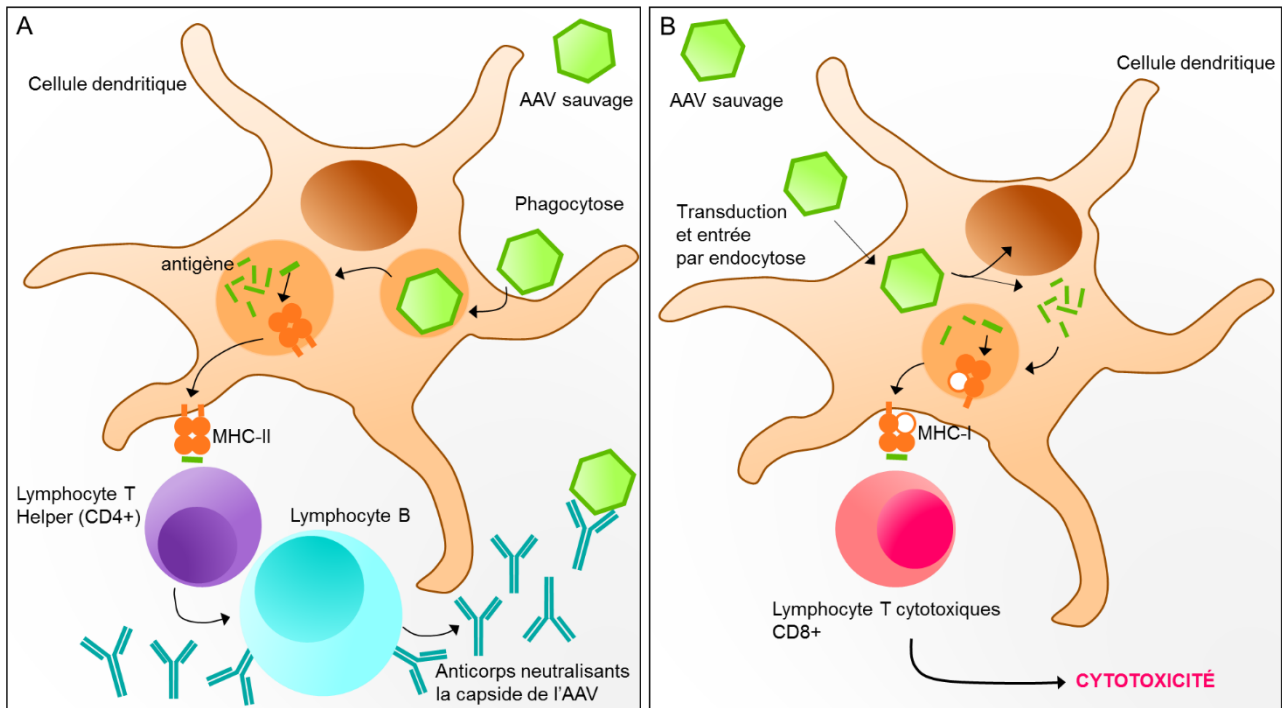


Figure 37 : Réponse immunitaire adaptative contre la capside des AAV.

La population humaine est largement pré-immunisée contre les AAV, certains sérotypes plus particulièrement (AAV2 et AAV5). Cette pré-immunisation limite l'efficacité de transduction des cellules cibles par les AAVr ainsi que l'efficacité de l'approche thérapeutique. (A) Suite à une infection, les AAV sauvages peuvent être phagocytés par les APC, le peptide (antigène) est alors présenté par le MHC-II aux lymphocytes T helper (CD4+) conduisant à l'activation des lymphocytes B et à la production d'anticorps neutralisants contre la capside virale (réponse immunitaire adaptative humorale). (B) En parallèle si l'AAV infecte l'APC (cellule dendritique par exemple), des peptides de la capside seront présentés aux lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) via le MHC-I. Ces cellules T CD8+ seront alors capables de détruire les cellules présentant des peptides similaires via leur MHC-I avec la production de molécules cytotoxiques. Cette réponse immunitaire adaptative cellulaire est beaucoup plus rare que la réponse humorale, en raison de la faible transduction des APC par les AAV. Lors d'une administration d'AAV pour une approche de TG, les anticorps préexistants pourront donc neutraliser les particules virales circulantes dans l'organisme et les lymphocytes T cytotoxiques pourront détruire les cellules transduites.

que de la présence ou non d'une protéine codée par l'allèle muté chez les patients. On pourra donc observer une gamme de réponses allant d'une absence de réponse à la destruction des cellules exprimant le transgène (réponse cellulaire) et à la neutralisation de la protéine thérapeutique par les anticorps (réponse humorale) (Choudhury et al., 2017). Chez les patients, si la mutation entraîne une absence totale de protéine la réponse immunitaire risque d'être forte, la protéine thérapeutique étant reconnue comme du non soi. Au contraire si, malgré la mutation, les cellules produisent une protéine stable, la protéine thérapeutique sera reconnue comme du soi. Les réponses adaptatives cellulaire et humorale contre le transgène dépendent donc de la protéine thérapeutique et de sa présence dans la cellule et sont généralement limitées. En effet, les AAV transduisent très peu les APC, ils sont par exemple capables de transduire les cellules dendritiques (CD) immatures mais pas les CD matures (Choudhury et al., 2017). De plus, il est peu probable que les cellules dendritiques immatures transduites par l'AAV soient présentes en grand nombre au niveau du site d'injection du vecteur. Ainsi les lymphocytes T CD8+ ne sont pas ou très peu activés dans les ganglions lymphatiques n'entraînant pas de réponse cellulaire cytotoxique majeure contre les cellules exprimant le transgène. En parallèle si la protéine thérapeutique est une protéine sécrétée dans l'espace extracellulaire, elle pourra être phagocytée par les APC conduisant à l'activation des lymphocytes B et à la production d'anticorps neutralisants. En revanche une protéine non sécrétée ne devrait pas entraîner de réponse adaptative humorale.

2.2.3.2. Réponse immunitaire adaptative contre la capsid

L'inconvénient majeur des AAV est la présence d'une séropositivité chez la plupart des individus, impliquant une immunité humorale préexistante forte ainsi qu'une immunité cellulaire (**Figure 37**) (Lykken et al., 2018). Cependant, en fonction du sérotype d'AAV la prévalence d'infection latente varie grandement : plus de 90% des adultes sont naturellement séropositifs pour l'AAV2 alors que 14% le sont pour l'AAV9. L'immunité préexistante se traduit par la production naturelle d'anticorps neutralisants ces AAV, empêchant donc la transduction efficace des cellules lors d'une TG (**Figure 37A**). Elle se traduit aussi par la présence de lymphocytes T cytotoxiques contre ces AAV préexistants, entraînant la destruction des cellules transduites (**Figure 37B**). Cette réponse cellulaire est cependant minime en comparaison à la réponse humorale puisque les APC sont peu transduites (Lykken et al., 2018). Une réponse immunitaire cellulaire contre une protéine de la capsid a cependant été observée au cours d'un essai clinique pour l'hémophilie B

entraînant la destruction des hépatocytes transduits (Manno et al., 2006). Bien que rare, cette réponse adaptative cellulaire (dépendante de la dose injectée) présente un risque pour les patients puisqu'elle stimule la production de médiateurs inflammatoires et de molécules cytotoxiques. Enfin, la réponse immunitaire contre la capsid (qu'il y ait une immunité préexistante ou non) prévient toute nouvelle administration d'AAVr de sérotype similaire.

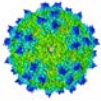
Pour des TG du système nerveux, le risque de développer une réponse immunitaire dépend grandement de la méthode d'injection. En effet, le CNS étant un environnement très protégé, des injections IP n'induiront pas de réponse immunitaire. En revanche des réactions immunitaires peuvent être particulièrement attendues à la suite d'injections IV mais également avec des injections IT, le LCR étant riche en anticorps (Lykken et al., 2018). La réponse contre le transgène peut être évaluée chez les mammifères de grande taille mais la réponse contre la capsid est très difficilement prévisible. Les modèles souris servent de preuve de concept pour l'efficacité d'une TG.

2.2.3.3. Stratégies contre la mise en place d'une réponse immunitaire

Dans le but de limiter la réponse immunitaire mise en place à la suite d'une administration de vecteur, il est fortement conseillé de tester la séropositivité des patients avant le traitement (Colella et al., 2018). En fonction de la stratégie thérapeutique et de la dose de vecteur un traitement immunosuppresseif peut être envisagé, immédiatement à la suite de l'injection ou plus tard, en cas de détection de réponse immunitaire. Cependant ces approches immunosuppresseives sont des traitements lourds pour les patients et peuvent donc affecter la qualité de vie. Des approches permettant d'éviter le développement d'une réponse immunitaire sont donc idéales. Pour cela le choix de sérotype et la modification des capsides des vecteurs pour masquer les antigènes de la capsid (paragraphe 2.2.2.1.2) sont particulièrement pertinents. Une autre approche est l'utilisation de promoteur spécifique en amont du gène thérapeutique ou encore l'utilisation de microARN tissu-spécifiques pour éviter par exemple l'expression du transgène dans les cellules dendritiques (Majowicz et al., 2013).

2.3. Production des AAV recombinants à grande échelle

L'une des limitations à l'utilisation d'AAV comme vecteurs de thérapie génique est la difficulté de production à grande échelle. Des traitements IV nécessitent de grandes



	Plasmide/cellules mammifères	Baculovirus/cellules d'insectes	rHSV/cellules mammifères	Lignées cellulaires mammifères stables
Production des AAVr	Plasmide vecteur + Plasmide Helper	rBac-AAV + rBac- <i>rep</i> cap	rHSV-AAV + rHSV- <i>rep</i> cap	WT Ad +/- rAd-AAV
	HEK293(T)	Sf9	HEK293 ou BHK	HeLa, A549 ou HEK293
Particules AAVr portant le transgène	1-30% de particules avec le transgène à la récolte	7-30% de particules avec le transgène à la récolte	≤ 8% de particules avec le transgène à la récolte	8-30% de particules avec le transgène à la récolte
	≤ 6% séquences plasmide	≤ 3% rBac	≤ 0,05% rHSV	≤ 6% séquences plasmide
	≤ 0,1% <i>rep</i> -cap	≤ 0,1% <i>rep</i> -cap	≤ 0,01% <i>rep</i> -cap	≤ 0,04% <i>rep</i> -cap
Contaminations présentes dans le stock d'AAVr	≤ 0,5% génome humain	≤ 0,5% génome insecte Sf		ADN
	Protéines cellulaires	Protéines cellulaires	Protéines cellulaires	Protéines cellulaires
	Protéines adénovirales	Protéines baculovirus	Protéines rHSV	Protéines adénovirales
Dépendant du processus de production et de purification :				
Lipides, serum, produits chimiques...				
Autres				

Tableau 6 : Méthodes de production des AAVr et contaminations associées

(Issu de [Penaud-Budloo et al., 2018](#)).

quantités de vecteur avec des exigences poussées en termes d'hygiène et de sécurité. On parle de GMP pour « good manufacturing practice » (bonnes pratiques de fabrication). A ce jour, différentes techniques de production existent mais les améliorations sont constantes. Le but de ces améliorations est de réduire le coût de fabrication, produire des AAVr concentrées, purs et sûrs pour les patients et développer des procédures de production reproductibles et adaptables à grande échelle. Quatre systèmes majeurs de production d'AAV recombinants ont été développés et utilisés pour des productions de grade clinique (**Tableau 6**) (Penaud-Budloo et al., 2018). Chaque système associe des avantages et des limitations avec la présence d'impuretés potentielles présentes dans la préparation d'AAVr tel que des vecteurs non infectieux, des particules vides sans transgènes ou encore des capsides dégradées. En moyenne dans un système efficace chaque cellule produira 1×10^5 vg (vecteur génome).

2.3.1. Transfection de plasmides d'ADN dans des cellules mammifères

Historiquement les AAVr étaient produits dans des cellules mammifères à la suite d'une double transfection de plasmides avec un plasmide vecteur codant pour le transgène entouré des ITR de l'AAV2 et un plasmide avec les gènes *rep* et *cap* du sérotype d'AAV choisi, en parallèle d'une infection par un virus helper (adénovirus). La production des AAVr était efficace mais des particules adénovirales étaient produites en parallèle conduisant à des préparations d'AAVr contaminées par des adénovirus (Grieger and Samulski, 2012). Afin d'éviter cette contamination adénovirale, les gènes helper de l'adénovirus, nécessaires à la réplication et à l'encapsidation des vecteurs sont apportés spécifiquement (gènes *E1a*, *E1b*, *E2a*, *E4orf6* et *ARN VA*). Ainsi, une tri-transfection de cellules de mammifères HEK293 exprimant de manière endogène les facteurs *E1a* et *E1b* avec un plasmide vecteur, un plasmide avec les gènes *rep* et *cap* du sérotype voulu et un plasmide helper (gènes *E2a*, *E4orf6* et *ARN VA*) permet de produire efficacement des AAVr. Les gènes *rep*, *cap* et helper peuvent être apportés dans les cellules avec un plasmide unique. La production de vecteurs recombinants nécessite alors une double transfection avec le plasmide vecteur et le plasmide helper (**Tableau 6**). Les AAVr sont récoltés 48 à 72h après transfection à partir du culot de cellules et/ou du surnageant (dépendant du sérotype). La lyse des cellules est alors une étape cruciale et influe sur les impuretés présentes dans la préparation. Cette technique de production est efficace, mais nécessite plusieurs séries de transfection et purification afin d'obtenir les quantités nécessaires pour une utilisation en essai clinique. Ceci implique donc une production longue et coûteuse. Ainsi, pour des raisons économiques les cellules

HEK293 peuvent être transfectées et cultivées en suspension et non plus en système adhérent (Penaud-Budloo et al., 2018).

2.3.2. Infection de cellules d'insectes avec un Baculovirus recombinant

Une alternative à l'utilisation de cellules mammifères est un système basé sur l'utilisation de Baculovirus et de cellules d'insectes. Ce système compatible GMP permet une production d'ampleur suffisante pour une approche clinique. L'infection de cellules Sf9 en suspension avec un Baculovirus recombinant avec le transgène entouré des ITR (rBac-AAV) et un Baculovirus pour la synthèse des protéines Rep et Cap du sérotype choisi permet la production de vecteurs (**Tableau 6**). Ce système de production présente de nombreux avantages. En effet les cellules sont cultivées en absence de sérum. Lors de culture de cellules de mammifères, en présence de sérum, des contaminations animales peuvent être retrouvées dans la préparation d'AAV. De plus, les Baculovirus infectent les cellules d'insectes mais ne sont pas capable de se répliquer dans les cellules mammifères. Enfin, les fonctions helper nécessaires aux AAV sont directement apportées par le Baculovirus. Récemment des lignées cellulaires Sf9 exprimant de manière stable les protéines Cap et Rep de sérotypes spécifiques ont été établies. Ces lignées permettent une production efficace d'AAVr suite à l'infection unique du rBac-AAV. Cette technique de production permet un important rendement mais, des impuretés issus de Baculovirus peuvent être présentes dans la préparation (Penaud-Budloo et al., 2018).

2.3.3. Infection de cellules mammifères avec un Herpesvirus recombinant

Cette méthode de production particulièrement efficace pour la génération de grandes quantités d'AAVr repose sur des co-infections de cellules mammifères par des Herpesvirus recombinants (rHSV). Les Herpesvirus étant naturellement des virus helper des AAV, la production d'AAVr repose sur l'infection de cellules BHK ou HEK293 avec un rHSV avec le transgène entouré des ITR (rHSV-AAV) et un rHSV pour les gènes *rep* et *cap* (rHSV-*rep**cap*) (**Tableau 6**). Deux à trois jours après l'infection les cellules et/ou le surnageant sont récoltés et les AAVr purifiés afin de se débarrasser des impuretés cellulaires mais aussi des contaminants HSV et de l'ADN non empaqueté (Penaud-Budloo et al., 2018).

2.3.4. Lignées cellulaires mammifères stables

Les vecteurs viraux peuvent être produits à partir de lignées cellulaires mammifères stables HeLa ou A549 exprimant les gènes *rep* et *cap*. L'infection de ces cellules avec un adénovirus de type 5 (virus helper) entraîne une forte expression des deux gènes viraux. Ainsi, les AAVr sont produits en infectant et transfectant les cellules avec l'Ad5 et un plasmide vecteur ou en les infectant avec un virus hybride recombinant Ad/AAV. La procédure de production a ensuite été optimisée avec l'utilisation d'une lignée cellulaire stable en suspension et une absence d'utilisation de sérum. Cette technique est particulièrement efficace mais elle nécessite la génération de lignées cellulaires stables spécifiques pour un sérotype précis et des contaminations adénovirales peuvent être présentes dans la préparation d'AAVr (Penaud-Budloo et al., 2018).

2.3.5. Extraction et purification des AAVr et impuretés retrouvées dans les préparations

L'extraction des AAVr avec la lyse des cellules est une étape majeure au cours de la production. Les AAV étant des particules très résistantes, la lyse est réalisée avec des approches mécaniques ou chimiques en utilisant des détergents. Les approches mécaniques ont l'avantage de ne nécessiter aucun ajout de produit (donc pas de contamination de la préparation). Des étapes de purification sont ensuite nécessaires afin de se débarrasser des molécules d'ADN nu, des protéines résiduelles, des particules d'AAVr défectives... Ces particules défectives (particules vides) peuvent représenter la majorité des particules de la préparation lors de la récolte (**tableau 6**). La longueur et la séquence du génome de l'AAVr, le sérotype, la méthode de production et de purification jouent sur la quantité de particules vides. Pour des productions destinées à la recherche fondamentale, les AAVr peuvent être purifiés par ultracentrifugation par densité de gradient au chlorure de césium (CsCl) ou à l'iodixanol. La purification avec du CsCl a l'avantage d'éliminer les particules vides présentes mais une étape de dialyse est ensuite requise pour se débarrasser du CsCl cytotoxique. La purification à l'iodixanol, non toxique, ne permet pas d'enlever l'ensemble des particules vides (20% restantes) mais l'ultracentrifugation est douze fois plus courte (2h contre 24h pour le CsCl). Pour des productions à grande échelle, ces purifications par ultracentrifugations ne sont pas réalisables mais une étape finale d'ultracentrifugation au CsCl, après concentration, permet de se débarrasser des particules vides. Enfin, la purification pour la production de pureté clinique à grande échelle est réalisée

par chromatographie d'affinité et par colonne échangeuse d'ion. Différentes colonnes d'immunoaffinités utilisant des anticorps spécifiques aux particules virales sont disponibles dans le commerce. Cependant ces colonnes ne permettent pas de discriminer les particules vides des particules pleines et des anticorps peuvent être retrouvés dans la préparation des AAVr. Les colonnes échangeuses d'ions, séparant les éléments selon leur charge de surface, permettent d'ôter les particules vides des particules pleines (points isoélectriques à 6,3 et 5,9 respectivement). Ces colonnes ont l'avantage de ne libérer aucune impureté puisqu'elles sont basées sur l'utilisation de tampons avec des sels et des pH spécifiques.

En fonction de la méthode de production et de purification, différentes impuretés pourront contaminer les préparations d'AAVr (acides nucléiques, protéines et autre). Ces différentes contaminations possibles sont présentées dans le **tableau 6** pour chaque méthode de production. Des fragments d'ADN de la cellule productrice ne correspondant pas au transgène entouré des ITR peuvent être internalisés dans les particules. De par un risque génotoxique de ces ADN résiduels, une dose maximale d'ADN résiduel avec une taille restreinte est autorisée dans les préparations de pureté clinique. De plus des séquences *rep-cap* peuvent être internalisées dans les capsides, produisant potentiellement des AAV capables de réplication. Bien que les AAV soient non pathogènes, la présence de ces séquences peut représenter un risque avec des coupures dans l'ADN par les protéines Rep et une réponse immunitaire contre la capsid du vecteur. Ainsi, moins d'une copie dans 1×10^8 vg avec une section de séquence *rep* et *cap* est autorisée dans une préparation. Pour les méthodes de production utilisant des plasmides, des gènes de résistances aux antibiotiques (issus des plasmides) peuvent être internalisés. Des protéines résiduelles issues des lignées cellulaires, virus helper, du milieu de culture (contenant du sérum par exemple) peuvent persister après les processus de purification. L'extraction à partir de cellules ou surnageant des AAVr ainsi que le type de purification influent particulièrement sur la présence de ces protéines résiduelles dans les préparations. Ainsi, les stocks d'AAVr contiennent de nombreuses contaminations qui sont à réduire au maximum pendant la production et qui doivent être quantifiées précisément. Une attention particulière lors du design du processus de fabrication et purification est donc préconisée. Jusqu'à présent, sur l'ensemble des essais cliniques en cours (paragraphe suivant) aucun élément néfaste lié à la présence de contaminations dans la préparation des AAV n'a été recensé. Mais pour les futurs essais nécessitant de très hautes doses de vecteurs (traitement IV d'adultes par exemple) ces contaminations seront à surveiller (Penaud-Budloo et al., 2018).

La méthode de préparation des AAVr peut également influencer le tropisme des vecteurs. En effet, il a été décrit qu'à la suite d'une injection IP, des AAV8 purifiés par

Maladie	Vecteur	Transgène	Approche préclinique	Phase	Identifiant essai clinique	Date de début
Alzheimer	AAV2	NGF	Souris et rat	I	NCT00087789	juin 2004
				II	NCT00876863	sept. 2009
Canavan	AAV2	ASPA	Rat	I	ND	2001
Batten	AAV2	CLN2	Souris, rat et singe vert	I	NCT00151216	juin 2004
	AAVrh10		Souris et NHP	I/II	NCT01414985	avril 2010
MPSIIIB	AAV5	NAGLU	Souris et chiens	I/II	ISRCTN19853672	sept. 2010
MPSIIIA	AAVrh10	SGSH	Souris	I/II	NCT02053064	mai 2013
MLD	AAVrh10	ARSA	Souris et NHP	I/II	NCT01801709	mars 2013
Batten	scAAV9	CLN6		I/II	NCT02725580	avril 2016
SMA	scAAV9	SMN	Souris et NHP	I	NCT02122952	mai 2014
MPSIIIA	scAAV9	SGSH	Souris	I/II	NCT02716246	mars 2016
MPSIIIB	scAAV9	NAGLU	Souris et NHP	I/II	ND	2016

Tableau 7 : Essais cliniques basés sur des injections *in vivo* d'AAVr pour des maladies neurodégénératives.

Injections IP : intraparenchymales ; IT : intrathécales, IV : intraveineuses ; MLD : leucodystrophie métachromatique ; MPSIIIA : mucopolysaccharidose type III A ; MPSIIIB : mucopolysaccharidose type III B ; NHP : primates non humains. (Adapté de Choudhury et al., 2017 ; Hocquemiller et al., 2016 ; Pigué et al., 2017).

ultracentrifugation par gradient de CsCl présentent un fort tropisme glial. Dans les mêmes conditions d'injections, des AAV8 purifiés par gradient iodixanol transduisent fortement les neurones (Klein et al., 2008).

2.4. Essais cliniques pour des maladies neurodégénératives basés sur l'utilisation d'AAV

À ce jour, plus de 150 essais cliniques de TG ont été entrepris. Je me concentrerai par la suite sur des exemples d'essais cliniques pour des maladies neurodégénératives par remplacement de gènes *in vivo*. Cependant d'importantes études précliniques et cliniques sont en cours afin d'inhiber l'expression de gène déficients avec l'utilisation d'ARN inhibiteurs (shRNA ou miRNA) ou d'oligonucléotides anti-sens modifiés chimiquement (ASOs), pour la maladie de Huntington par exemple (Merienne and Déglon, 2015). En parallèle des approches d'édition de génome sont de plus en plus développées, tout particulièrement depuis l'identification du système CRISPR-Cas9 (Yang et al., 2016). Ces approches permettraient par exemple d'éliminer le gène mutant dans les maladies autosomiques dominantes. Enfin des traitements de tumeurs neuronales avec des AAV sont particulièrement prometteurs (Choudhury et al., 2017).

Les approches de TG *in vivo* pour les maladies affectant le système nerveux reposent principalement sur des administrations IP de vecteur. Les essais par administrations IT et IV sont bien plus récents (Tableau 7, Figure 33) (Piguet et al., 2017). La majorité des essais cliniques entrepris sont de phase I/II. L'ensemble des informations concernant les essais cliniques sont disponibles sur le site ClinicalTrials.gov. A partir de 2007, des essais cliniques de thérapie génique pour l'amaurose congénitale de Leber, une rétinopathie congénitale, ont montré des résultats très prometteurs pour la restauration de la vision chez les patients (Pierce and Bennett, 2015). Cette TG repose sur l'utilisation d'un AAV2 apportant le gène muté dans la maladie (*RPE65*) par injection sous-rétinal. Récemment, à la fin de l'année 2017, la FDA a autorisé, pour la première fois, la mise sur le marché de cette thérapie génique appelée Luxturna (coût du médicament : 850000\$).

2.4.1. TG par injections intraparenchymales d'AAV

Différents essais cliniques pour les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, les deux maladies neurodégénératives les plus répandues, sont actuellement en cours. Bien que l'étiologie de ces maladies ne soit pas connue, leur prévalence rend le développement de telles approches thérapeutiques essentiel. Pour la maladie d'Alzheimer, en 2004, un premier

essai clinique de phase I basé sur l'injection d'AAV2-NGF dans le cerveau antérieur basal de 10 patients a été entrepris (**Tableau 7**) (Piguet et al., 2017). Le facteur trophique NGF (pour neuronal growth factor) stimule les neurones cholinergiques localisés dans le cerveau antérieur basal. Ces neurones dégénèrent rapidement au cours de la maladie. Les résultats encourageants de cette TG (sûreté et tolérance chez les patients pendant au moins deux ans, activité NGF persistante et ralentissement du déclin cognitif) a conduit au lancement d'un essai clinique de phase II en 2009 avec 50 patients présentant un Alzheimer léger à modéré (**Tableau 7**). Les résultats ne sont pas encore publiés. Pour la maladie de Parkinson, depuis 2005, une dizaine d'essais cliniques basés sur l'utilisation d'AAV2 avec différents transgènes ont été initiés (Hocquemiller et al., 2016).

Les autres maladies neurodégénératives pour lesquels des essais cliniques basés sur une administration d'AAV en IP ont été approuvés sont des maladies monogéniques lysosomales. Ces maladies métaboliques sévères résultent de déficiences des fonctions lysosomales conduisant à des accumulations progressives de matériel dans les cellules. La majorité de ces maladies (70%) affectent le système nerveux avec une neurodégénérescence et une neuroinflammation. Des approches de TG *ex vivo* avec la transplantation de cellules hématopoïétiques corrigées pour l'adrénoleucodystrophie (ALD) ou la leucodystrophie métachromatique (MLD) ont montré des résultats très prometteurs chez les patients (Cartier et al., 2009; Choudhury et al., 2017). Des essais cliniques *in vivo* basés sur l'utilisation d'AAV ont été entrepris à la suite de résultats très encourageants dans les modèles animaux. Les enzymes du lysosome ont l'avantage d'être sécrétés après production (diffusion thérapeutique) et peuvent être recaptés par d'autres cellules (cross-correction) (Piguet et al., 2017). Cependant, la majorité des essais cliniques développés sont peu efficaces et présentent des corrections faibles. De nouveaux essais avec des améliorations de vecteurs et d'injections sont en cours (Choudhury et al., 2017).

Maladie de Canavan :

La maladie de Canavan est une leucodystrophie pédiatrique due à des mutations dans le gène ASPA. Le déficit en enzyme aspartoacylase (codé par le gène ASPA) entraîne une accumulation de N-acétylaspartate dans le cerveau des patients, conduisant à une neurodégénérescence. L'essai clinique de phase I/II, débuté en 2001 est le premier essai de TG basé sur l'utilisation d'AAV lancé (**Tableau 7**). Bien qu'aucune toxicité et effet indésirable n'aient été observés sur du long terme, l'efficacité de cette TG avec un AAV2-ASPA est limitée par une amélioration très modeste des symptômes jusqu'à 10 ans après traitement (Leone et al., 2012).

Maladie de Batten :

La maladie de Batten, résultant de mutations dans le gène *CNL2*, entraîne des détériorations neurologiques et mentales associées à des épisodes épileptiques et à une perte de la vision. Un premier essai clinique de phase I avec un AAV2-CNL2, débuté en 2004 n'a pas permis d'amélioration clinique générale. L'utilisation d'AAVrh10-CNL2 en préclinique (souris et primates), entraînant de hauts niveaux d'expression et une large diffusion de la protéine a initié un second essai clinique en 2010 (**Tableau 7**). Les résultats ne sont pas connus à l'heure actuelle.

Mucopolysaccharidose type IIIB (MPSIIIB) et type IIIA (MPSIIIA) :

La MPSIIIB, également appelée syndrome de Sanfilippo type B, entraîne un déclin cognitif sévère accompagné de comportements agressifs et mène à un décès prématuré. Ce syndrome résulte de l'accumulation d'oligosaccharides héparine-sulfate due à la déficience de l' α -N-acetylglucosaminidase codé par le gène *NAGLU*. L'administration IP d'AAV5-NAGLU (essai clinique de phase I/II débuté en 2005) entraîne une amélioration de l'atteinte cognitive mais avec une variabilité entre les patients (évaluation sur 24 mois) (**Tableau 7**). Un essai clinique pour le syndrome Sanfilippo type A a été initié en 2013 suite à la preuve de concept dans un modèle murin. L'administration d'AAVrh10-SGSH (gène muté dans la maladie) chez quatre patients n'a présenté aucun effet adverse mais seulement une amélioration minimale des symptômes et pas d'amélioration au niveau cognitif (**Tableau 7**). Une évaluation à long terme est encore en cours ainsi que des améliorations de l'approche de TG pour un nouvel essai clinique.

Leucodystrophie métachromatique (MLD) :

Des déficiences de la protéine arylsulfatase A (gène *ARSA*) chez les patients MLD entraîne l'accumulation de sulfatides causant une démyélinisation du SNC et du SNP. En parallèle d'approches *ex vivo* de TG, un essai clinique pour la forme sévère de la MLD (apparition des symptômes neurologiques avant deux ans) basé sur l'administration IP d'AAVrh10-ARSA est en cours (**Tableau 7**).

2.4.2. TG par injection intrathécale ou intraveineuse d'AAV

L'amélioration des vecteurs a permis d'imaginer des approches basées sur des administrations autres qu'intraparenchymales (IT ou IV) afin de transduire d'avantage de régions du système nerveux.

A ce jour, le seul essai clinique basé sur des injections intrathécales, initié en 2016, utilise un scAAV9-CLN6 pour la maladie de Batten. Le recrutement de patients (douze au total) est encore en cours et aucun résultat n'est disponible pour le moment.

Grâce aux sérotypes d'AAV capable de passer la BHE des approches intraveineuses sont envisageables. Ainsi, depuis 2014, trois essais cliniques pour des maladies neurodégénératives avec des injections IV d'AAV ont débuté. Des résultats sans précédents ont été obtenus pour l'amyotrophie spinale de type I (SMA, *spinal muscular atrophy*). La SMA est une maladie neurodégénérative fatale des jeunes enfants qui apparaît dès la naissance ou au cours des premiers mois de vie pour la forme la plus sévère (type I). Elle résulte d'une dégénérescence des motoneurons due à une mutation dans le gène *SMN1* qui code pour la protéine SMN (survival motor neuron). Les enfants atteints de la forme sévère de la maladie sont incapables de se tenir en position assise sans assistance, de se retourner ou encore de maintenir leur tête. Ils ne dépassent jamais un score de 40 pour la mesure de l'évolution de la maladie (CHOP-INTEND) à 6 mois et à 13,6 mois en moyenne les patients nécessitent une assistance respiratoire ou décèdent. Des résultats très encourageants ont été obtenus en préclinique dans un modèle murin avec une administration dans le LCR d'scAAV9-SMN. Un essai clinique de phase I par injection intraveineuse d'scAAV9-IV sur 15 patients a été initié en 2014 avec deux groupes : 3 patients avec $6,7 \times 10^{13}$ vg/kg et 12 patients avec 2×10^{14} vg/kg (**Tableau 7**). Au premier point d'étude, à 28,8 mois d'âge, l'ensemble des patients étaient encore en vie et un seul patient du premier groupe nécessitait une assistance respiratoire. Pour le deuxième groupe (dose élevée), 11 bébés présentaient un score CHOP-INTEND supérieur à 40, huit d'entre eux se tenaient en position assise sans assistance et deux étaient capables de marcher à quatre pattes, se lever et marcher seuls. Ces améliorations majeures des fonctions motrices démontrent l'efficacité de cette TG ([Mendell et al., 2017](#)). Depuis 2016, deux autres essais cliniques de phase I/II par injections IV d'sc-AAV9 sont en cours pour les mucopolysaccharidoses type IIIA et IIIB avec des transgènes SGSH et NAGLU respectivement (**Tableau 7**). Pour MPSIIIA, le recrutement de patients est encore en cours et suite aux injections (jour 1 au jour 60) les patients reçoivent un traitement immunosuppresseur (prednisolone). Les prochaines années permettront de déterminer l'efficacité globale des approches *in vivo* de TG mais les premiers résultats obtenus semblent très prometteurs. Des études à long terme permettront également d'améliorer les approches pour augmenter l'efficacité et réduire de potentiels effets secondaires néfastes.

3. Thérapie génique et ataxie de Friedreich

3.1. Faisabilité d'une TG pour l'ataxie de Friedreich ?

La thérapie génique est l'une des approches thérapeutiques particulièrement prometteuse pour l'ataxie de Friedreich. En effet le concept est simple et une approche par remplacement de gène pour l'AF semble idéale et présente de nombreux avantages :

- C'est une maladie autosomique récessive donc le gène *FXN* est connu et les mutations caractérisées.
- La mutation majeure (expansion GAA) conduit à une diminution de la transcription du gène dans l'ensemble des tissus mais la protéine synthétisée est fonctionnelle. La protéine synthétisée à partir du transgène devrait donc être reconnue comme une protéine du soi par l'organisme, diminuant donc les risques de réponse immunitaire.
- Le gène *FXN* est de petite taille (ADN complémentaire : 1,7 kb) et donc compatible avec l'utilisation d'AAV non intégratifs et capables de passer la BHE. L'utilisation d'un tel vecteur pourrait permettre de cibler les systèmes nerveux périphériques et centraux ainsi que les organes périphériques dont le cœur suite à une injection IV.
- La maladie progresse relativement lentement avec cependant des différences entre les patients. Le traitement pourrait donc être envisagé dès le diagnostic et ce, avant des stades trop avancés de la maladie.
- Des cohortes de patients (comme le registre EFACTS pour *European Friedreich's Ataxia Consortium for Translational Studies*) sont disponibles mentionnant le suivi régulier des patients mais aussi l'histoire naturelle de leur maladie.

A ce jour, malgré d'intenses efforts, il manque cependant des biomarqueurs fiables de la maladie (biomarqueurs biochimiques présents dans le sérum, l'urine ou le LCR des patients et physique avec les nouvelles techniques d'imagerie) qui serviraient de premières mesures biologiques pour l'évaluation de l'approche thérapeutique.

3.2. Preuve de concept développée dans le laboratoire pour une thérapie génique cardiaque.

Dans le laboratoire, des approches de TG avec des AAV recombinants ont été développées sur des modèles murins conditionnels de la maladie, dans un premier temps d'abord pour l'atteinte cardiaque de l'AF ([Perdomini et al., 2014](#)) puis pour l'atteinte

A



B

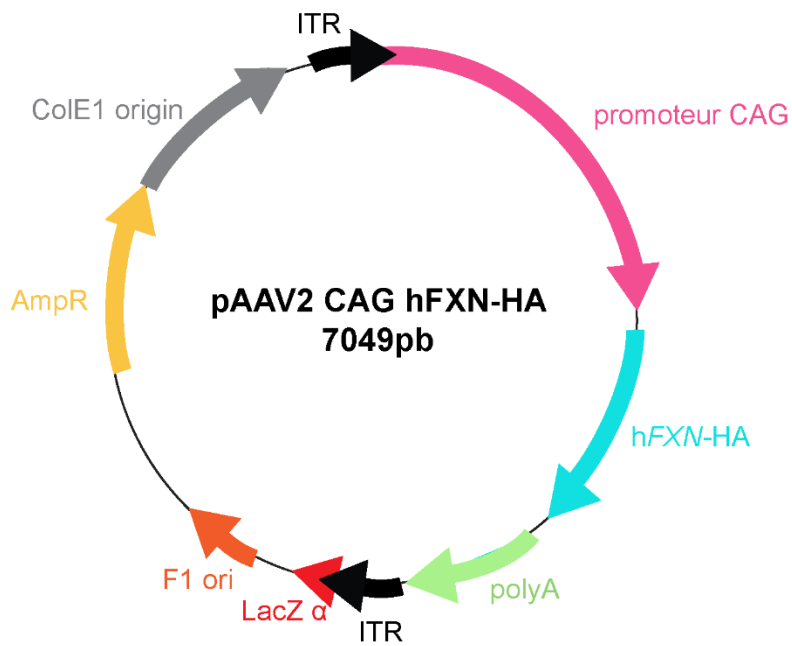


Figure 38 : Outils recombinants utilisés pour la génération des vecteurs viraux AAV9-FXN et AAVrh10-FXN.

(A) Transgène utilisé pour la génération des vecteurs viraux. (B) Plasmide pAAV2 hFXN-HA ayant servi à la production des vecteurs.

neurologique (partie de mon projet de thèse et suite de ce manuscrit) (Piguet, de Montigny et al., 2018).

3.2.1. Vecteur utilisé pour TG pour l'ataxie de Friedreich dans le laboratoire

Les vecteurs utilisés pour ces approches de TG sont des AAV9-FXN et AAVrh10-FXN sb. Le transgène pour les deux vecteurs est composé de l'ADNc *FXN* humain fusionné à la séquence du tag hémagglutinine (HA) (**Figure 38A**). Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur CAG, construit avec l'enhancer du cytomégalovirus (CMV) humain, du promoteur β -actine du poulet et de l'intron β -globine du lapin, qui permet une expression ubiquitaire et forte du transgène (**Figure 38A**). Une séquence polyA se trouve à l'extrémité 3' du transgène. Les vecteurs, de grade préclinique, ont été produits par la plateforme Vector Core de Nantes par tri-transfection de cellules HEK293 cultivées en systèmes adhérent. Le plasmide vecteur utilisé est présenté dans la **Figure 38B**.

3.2.2. Résultats obtenus pour la preuve de concept de la TG cardiaque dans le laboratoire

Pour l'approche de TG pour l'atteinte cardiaque, le modèle conditionnel MCK, qui reproduit la cardiomyopathie hypertrophique, a été utilisé (Puccio et al., 2001). Tout d'abord l'injection IV d'AAVrh10-FXN à une dose de $5,4 \times 10^{13}$ vg/kg dans des animaux MCK asymptomatiques de trois semaines prévient l'apparition de la cardiomyopathie mitochondriale présentée par les souris non traitées (au niveau physiologique, cellulaire et moléculaire) (Perdomini et al., 2014). Les souris traitées restent indiscernables des souris contrôles jusqu'à 35 semaines (âge de sacrifice), alors que les souris MCK non traitées meurent à 9 semaines environ. Dans un deuxième temps des souris MCK de 7 semaines présentant une insuffisance cardiaque avancée ont été traitées avec la même dose d'AAVrh10-FXN en IV. Une semaine après l'injection les souris traitées présentent une amélioration des fonctions cardiaques qui corrèle avec des niveaux élevés de frataxine dans les mitochondries et une correction complète à 12 semaines. Les fonctions moléculaires et cellulaires se normalisent également progressivement. Cependant les souris corrigées pour l'atteinte cardiaque développent une atrophie musculaire entraînant la mort prématurée de certains animaux. Dans ce modèle murin MCK, la frataxine est déplétée dans le muscle cardiaque mais également dans le muscle squelettique.

L'ensemble de ces résultats établit la preuve de concept d'une TG cardiaque et sont très encourageants pour une approche de thérapie génique chez les patients présentant une cardiomyopathie hypertrophique.

Résultats



1. Objectifs de mon projet de thèse

A mon arrivée au laboratoire et depuis l'identification du gène codant la Frataxine en 1996 ([Campuzano et al., 1996](#)), l'utilisation de matériel biologique de patients et les nombreux modèles d'études générés ont permis d'identifier un certain nombre d'éléments physiopathologiques de la maladie (Introduction Chapitre 1 paragraphe 5). Cependant plusieurs questionnements concernant la physiopathologie et plus particulièrement la neurophysiopathologie subsistent et sont sujets à débat dans le domaine de l'AF :

- La frataxine étant sous-exprimée dans l'ensemble des tissus, comment expliquer la spécificité tissulaire et cellulaire de l'AF ? Les neurones peuvent-ils survivre en absence de frataxine ? Pendant combien de temps ?
- La sensibilité au stress oxydant due au déficit en frataxine (décrit dans certains modèles) est-elle présente dans l'ensemble des cellules affectées ?
- Y a-t-il une dérégulation du métabolisme du fer et une accumulation de fer dans les neurones atteints dans l'AF (tel que les neurones proprioceptifs) ? Cette accumulation de fer dans les mitochondries a-t-elle un effet toxique pour les cellules ?
- De manière plus générale la neurophysiopathologie est-elle la même ? La déplétion en frataxine entraîne-t-elle un déficit des protéines à centres Fe-S puis un dysfonctionnement mitochondrial et cellulaire ?
- Quelle est la neurophysiopathologie précise, en particulier dans les neurones proprioceptifs du PNS ? Quelles voies moléculaires sont dérégulées à la suite de la déplétion en frataxine dans les neurones proprioceptifs ? Quels sont les événements primaires ? Secondaires ? Les mécanismes sont-ils les mêmes dans les différents types de neurones affectés dans l'AF ?

Certains éléments ont été partiellement étudiés dans le système nerveux ([Puccio et al., 2001](#)). Cependant les mécanismes neuropathologiques moléculaires précis, mis en place en réponse à l'absence de frataxine, ne sont pas connus dû au manque de modèles d'études robustes pour l'atteinte neurologique de l'AF.

En parallèle, quand j'ai commencé mon doctorat dans l'équipe du Dr Hélène Puccio, une preuve de concept de thérapie génique cardiaque pour l'AF (en utilisant un AAVrh10-FXN-HA) venait d'être établie et publiée ([Perdomini et al., 2014](#)). Bien qu'étant une maladie multi-systémique, l'AF affecte principalement le système nerveux avec de manière primaire les

neurones proprioceptifs des DRG et le noyau dentelé du cervelet. Il devenait logique de se poser un ensemble de questions concernant une thérapie génique neuronale:

- Les neurones d'intérêts déplétés en frataxine, bien que déficients, sont-ils encore présents dans les DRG ?
- Un apport en frataxine exogène dans ces neurones déficients conduit-il à une efficacité thérapeutique ?
 - o Les symptômes neurologiques peuvent-ils être stabilisés voire corrigés ?
 - o Un traitement à des stades avancés de la maladie aura-il un effet ? Jusqu'à quel stade peut-on envisager une approche efficace par TG ?
 - o A quel point les neurones proprioceptifs et les neurones du cervelet sont-ils plastiques ?
- Si efficacité curative il y a et au vu de la rapidité de correction dans le modèle cardiaque en une semaine, au bout de combien de temps les neurones seront-ils corrigés ?
- Quel est le sérotype d'AAV le plus adapté pour cibler les neurones des DRG et du cervelet ? Quel mode d'injection permettra de cibler au mieux le SNP et le SNC ?

Il devenait donc essentiel de développer une approche de thérapie génique pour l'atteinte neuronale de l'AF sur les mêmes principes que la TG cardiaque. Afin d'évaluer l'efficacité d'une TG neuronale, nous avons besoin d'un modèle d'étude présentant une ataxie spinocérébelleuse et sensitive, similaire à l'ataxie mixte décrite chez les patients, avec une progression relativement rapide et des marqueurs physiologiques, cellulaires et moléculaires quantifiables.

Malgré de nombreux modèles générés dans la communauté AF (Introduction Chapitre 1 paragraphe 5.2), aucun modèle n'était parfaitement adapté pour répondre à ces différentes problématiques. Ainsi, dans le but de mieux comprendre la neurophysiopathologie de l'AF et pour développer une approche de TG neuronale, il était nécessaire de générer un nouveau modèle murin pour l'atteinte neurologique de la maladie, plus particulièrement pour l'ataxie sensitive, en espérant également avoir des atteintes spinocérébelleuses secondaires, mais aussi pour l'ataxie cérébelleuse avec l'atteinte primaire du noyau dentelé et potentiellement des cellules de Purkinje. Une bonne partie des résultats de cette étude a été publiée en août 2018 dans le journal *Molecular Therapy* (Piguet, de Montigny et al., 2018). Ce travail a été effectué en étroite collaboration avec F. Piguet post-doctorante. Une première partie de ce chapitre sera donc constitué de la publication. Les résultats supplémentaires que j'ai obtenus

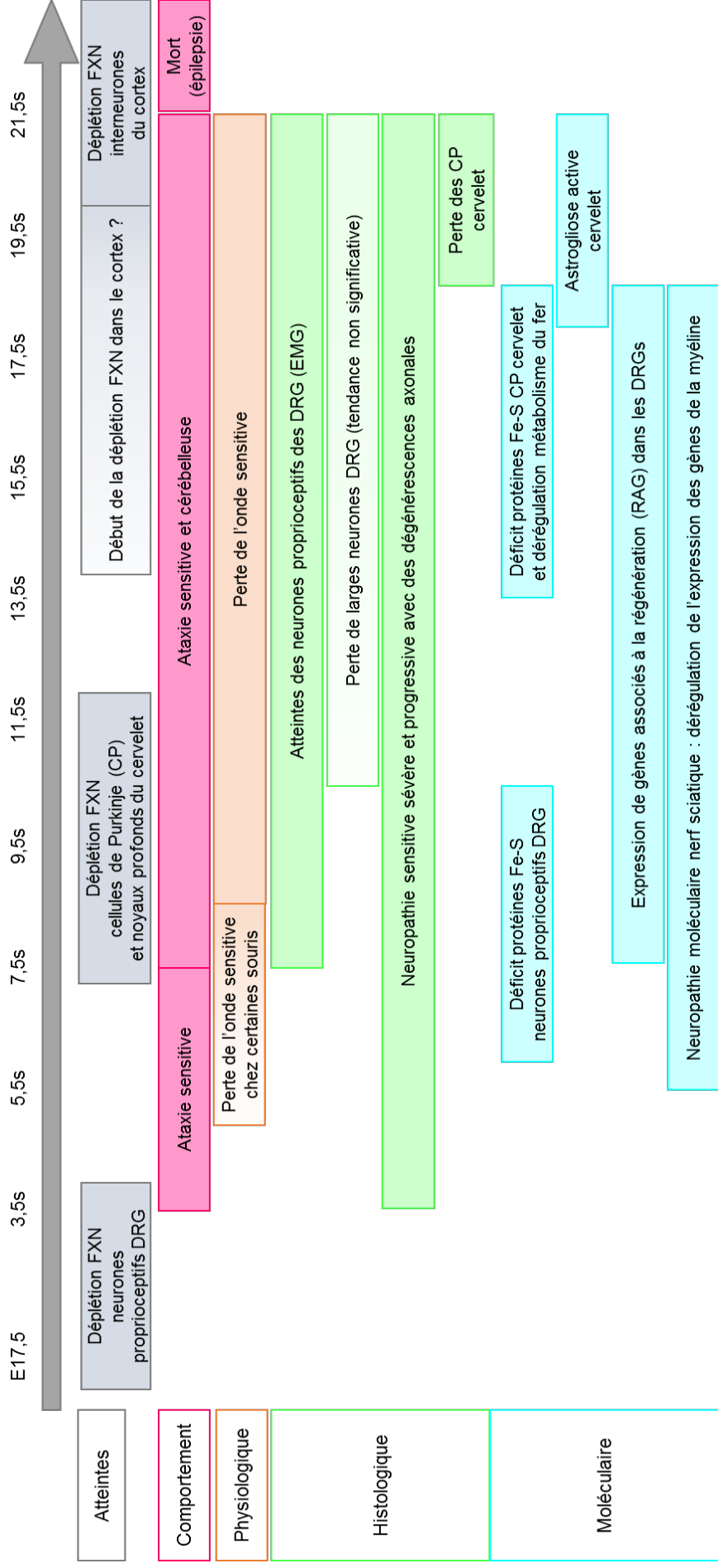


Figure 39 : Résumé des atteintes comportementales, physiologiques, histologiques et moléculaires des souris *Pvalb* cKO au cours du temps.
s : semaines ; CP : cellules de Purkinje.

pour la caractérisation du modèle et l'étude de la neurophysiopathologie seront ensuite présentés.

2. Manuscrit « Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia ».

2.1. Résumé du manuscrit

Nous avons généré un nouveau modèle murin conditionnel présentant une déplétion de la frataxine dans les cellules exprimant la parvalbumine (neurones proprioceptifs, cellules de Purkinje, noyaux profonds du cervelet et interneurons du cortex cérébral). Les souris mutantes, appelées *Pvalb* cKO, développent une ataxie sensitive progressive rapide dès 3,5 semaines. A partir de 8 semaines, une ataxie cérébelleuse sévère s'ajoute à l'atteinte sensitive. Les phénotypes comportementaux sont associés à une perte de la sensibilité profonde, sans atteinte de la motricité, mise en évidence par des tests physiologiques. Ces résultats corréleront avec ceux obtenus au niveau histologique. En effet, par microscopie électronique nous avons pu observer des atteintes de certains neurones dans les DRG (les neurones proprioceptifs vraisemblablement, des expériences supplémentaires pour valider cela sont présentées à la suite du manuscrit, paragraphe 3) avec des mitochondries affectées, des signes de mitophagie et des dégénérescences complètes de cellules à 7,5 semaines. Il est important de noter que jusqu'à 7,5 semaines aucune perte neuronale n'est observée malgré la déplétion de la frataxine aux stades embryonnaires. Dès 3,5 semaines une neuropathie sensitive sévère et progressive a également été mise en évidence et corrèle avec la perte de l'onde sensitive et la neurodégénérescence de certains neurones des DRG. Nous avons ensuite démontré une déficience des protéines à centres Fe-S dans certains neurones des DRG et dans les cellules de Purkinje ainsi qu'une dérégulation du métabolisme du fer dans ces dernières cellules, sans accumulation de Fer. Dans un deuxième temps nous avons développé une approche de TG sur ce modèle *Pvalb* avec d'une part un traitement pré-symptomatique à 3,5 semaines avec une injection intraveineuse (IV) d'un AAV9-FXN et d'autre part un traitement post-symptomatique à 7,5 semaines avec des injections IV d'AAV9-FXN et intracérébrale (IC) d'AAVrh10-FXN. Le traitement à 3,5 semaines prévient l'apparition de tout phénotype sensitif (tests comportementaux, électrophysiologiques et absence de neuropathie). Cependant une ataxie cérébelleuse se développe à partir de 8,5 semaines due à une transduction non suffisante du SNC. De manière très intéressante avec le traitement post-symptomatique, une correction totale de

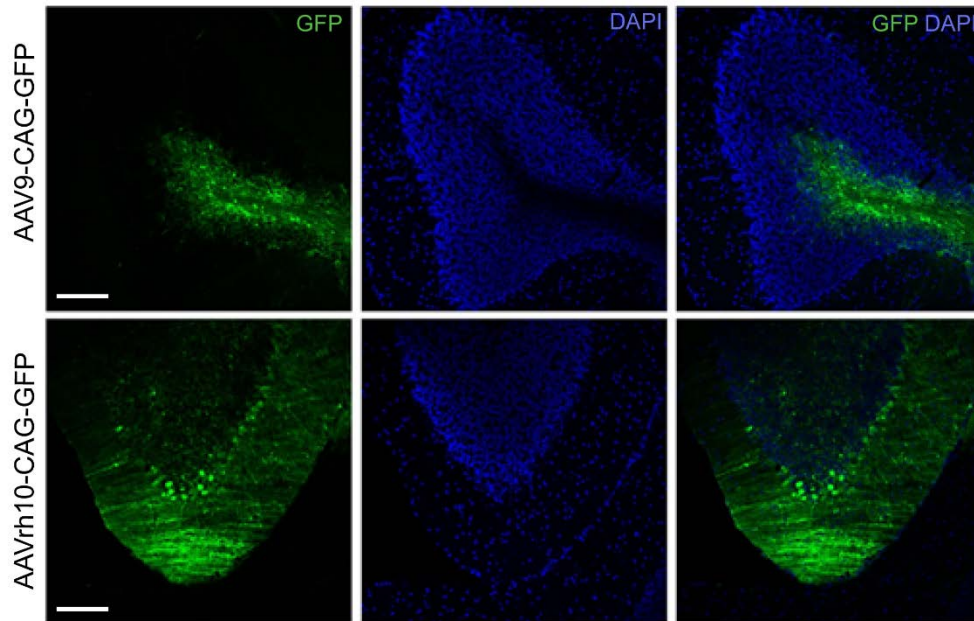


Figure 40 : Comparaison de transduction de l'AAV9 et de l'AAVrh10 dans la substance blanche cérébelleuse.

Images représentatives de la fluorescence GFP exprimée trois semaines après une injection stéréotaxique intracérébrale dans la substance blanche cérébelleuse de souris WT de 7.5 semaines avec un AAV9-CAG-GFP ou un AAVrh10-CAG-GFP (dose de 1×10^{11} vg). Barre de taille, 100 μ m.

l'ataxie sensitive en une semaine au niveau comportemental et en 2 semaines au niveau histologique est observée. L'ataxie cérébelleuse est, elle, partiellement corrigée, dû à une diffusion non homogène du vecteur AAVrh10-FXN injecté en intracérébral. Ces résultats établissent la preuve de concept d'une approche de TG pour l'atteinte neuronale de l'AF. Un résumé graphique des différents phénotypes identifiés dans le modèle *Pvalb* cKO est présenté dans la **figure 39**.

En ce qui me concerne, ma contribution dans la publication a été la suivante, j'ai réalisé l'ensemble des analyses moléculaires et histologiques pour l'expression de la frataxine, l'analyse des Fe-S et du métabolisme du fer. Pour les sacrifices et prélèvement des tissus, j'ai effectué, après la mise au point des techniques de dissections des DRG, l'ensemble des dissections nécessitant l'isolement de ces DRG (moléculaire, histologique et microscopie électronique). F. Piguet et N. Vaucamps s'occupaient quant à elles, des dissections des souris destinées aux analyses histologiques. Nous avons également travaillé en trinôme pour l'analyse du comportement des souris avec une répartition des tâches (F.P : tests des barres, N.V : analyse de la marche, C.dM et N.V : rotarod, openfield et pesée). F. Piguet a effectuée l'ensemble des injections pour l'approche de TG, les analyses électrophysiologiques (EMG) et les analyses histologiques pour les comptages des neurones des DRG et du cervelet.

2.2. Éléments établis préalablement et non publiés pour l'approche de TG

Pour l'approche de thérapie génique neuronale, certains éléments concernant le choix du sérotype d'AAV et les voies d'injections avaient été préalablement établis. Avant mon arrivée au laboratoire, des AAV9-GFP et AAVrh10-GFP (dose de 5×10^{13} vg/kg) avaient été injectés par voie intraveineuse dans des souris sauvages de 7 semaines afin d'évaluer l'efficacité de transduction de ces vecteurs dans le système nerveux (analyses effectuées par M. Perdomini et B. Belbellaa). L'analyse de l'expression de la GFP au niveau des DRG a mis en évidence une meilleure transduction des neurones sur les différentes sections (cervicales, thoraciques et lombaires) avec l'AAV9-GFP qu'avec l'AAVrh10-GFP (Perdomini et al., 2014). La très faible détection de fluorescence au niveau du SNC s'explique par la faible diffusion du vecteur dans le SNC due à la barrière hémato-encéphalique (BHE). Afin de cibler le SNC, nous avons effectué des tests d'injections stéréotaxiques intracérébrales d'AAV9-CAG-GFP et d'AAVrh10-CAG-GFP chez des souris sauvages de 7.5 semaines (dose de 1×10^{11} vg). A l'inverse des DRG, nous avons obtenu une meilleure transduction neuronale avec l'AAVrh10 suite à une injection dans la substance blanche cérébelleuse (**Figure 40**). C'est pourquoi

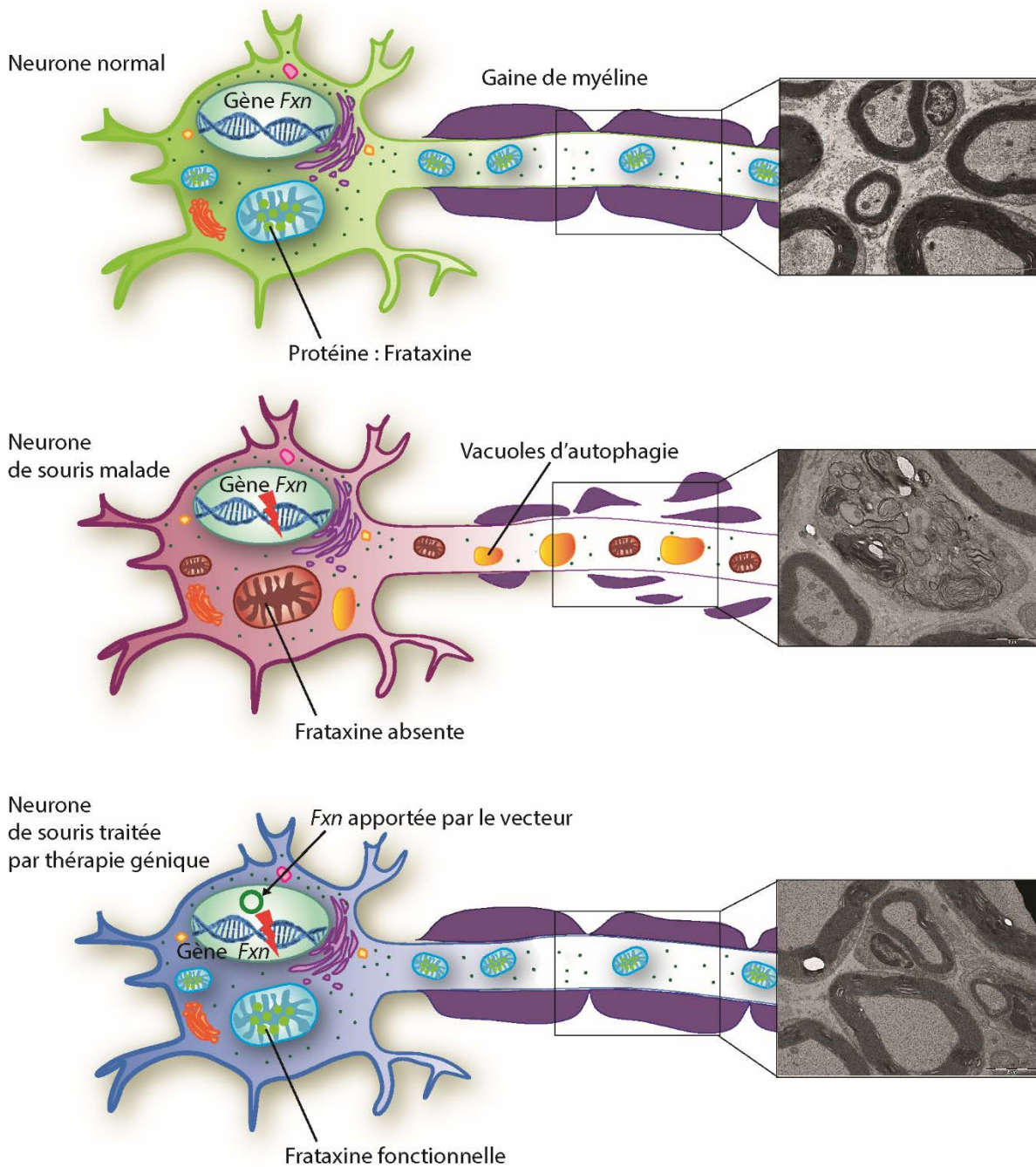


Figure 41 : Figure vulgarisée d'illustration de la publication.

Due à une mutation du gène *Fxn*, l'absence de frataxine dans certains neurones de souris mutantes entraîne des atteintes comportementales, physiologiques, cellulaires et moléculaires. Par exemple, dans les nerfs sciatiques, les axones des gros neurones sensitifs dégénèrent avec la gaine de myéline affectée et la présence de vacuoles d'autophagie (images de microscopie électronique). Le traitement par thérapie génique de ces souris malades, consistant à apporter une version non muté du gène *Fxn* en utilisant des vecteurs viraux, permet d'exprimer la frataxine et de corriger les défauts comportementaux, physiologiques, cellulaires et moléculaires.

dans notre approche de thérapie génique post-symptomatique (manuscrit ci-dessous) nous avons traité les souris avec une combinaison d'AAV9-FXN en IV et d'AAVrh10-FXN en IC.

2.3. Article

Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia

Françoise Piguet*, Charline de Montigny*, Nadège Vaucamps, Laurence Reutenauer, Aurélie Eisenmann, and Hélène Puccio.

Molecular Therapy Vol.26 No8 August 2018

* : co-premier auteurs.

La **figure 41** correspond à l'illustration grand public du manuscrit que j'ai réalisée pour les différents communiqués de presse.

Manuscrit



Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia

Françoise Piguet,^{1,2,3,4,5} Charline de Montigny,^{1,2,3,4,5} Nadège Vaucamps,^{1,2,3,4} Laurence Reutenauer,^{1,2,3,4} Aurélie Eisenmann,^{1,2,3,4} and Hélène Puccio^{1,2,3,4}

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 67404 Illkirch, France; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 67404 Illkirch, France; ³Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67404 Illkirch, France; ⁴Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

Friedreich ataxia (FA) is a rare mitochondrial disease characterized by sensory and spinocerebellar ataxia, hypertrophic cardiomyopathy, and diabetes, for which there is no treatment. FA is caused by reduced levels of frataxin (FXN), an essential mitochondrial protein involved in the biosynthesis of iron-sulfur (Fe-S) clusters. Despite significant progress in recent years, to date, there are no good models to explore and test therapeutic approaches to stop or reverse the ganglionopathy and the sensory neuropathy associated to frataxin deficiency. Here, we report a new conditional mouse model with complete frataxin deletion in parvalbumin-positive cells that recapitulate the sensory ataxia and neuropathy associated to FA, albeit with a more rapid and severe course. Interestingly, although fully dysfunctional, proprioceptive neurons can survive for many weeks without frataxin. Furthermore, we demonstrate that post-symptomatic delivery of frataxin-expressing AAV allows for rapid and complete rescue of the sensory neuropathy associated with frataxin deficiency, thus establishing the pre-clinical proof of concept for the potential of gene therapy in treating FA neuropathy.

INTRODUCTION

Friedreich ataxia (FA), the most prevalent cause of recessive hereditary ataxia, is an early-onset neurodegenerative disease characterized by progressive spinocerebellar ataxia, severe proprioceptive sensory loss, cardiomyopathy, and increase in incidence of diabetes mellitus.^{1,2} Both the CNS and the peripheral nervous system (PNS) are primarily affected. Proprioceptive sensory loss in the PNS is an early feature of the disease, while the cerebellar and spinocerebellar involvement contribute to the progression of the disease.² The neurological symptoms are a consequence of degeneration of the large sensory neurons of the dorsal root ganglia (DRGs) and their axons, of the spinocerebellar tracts,²⁻⁴ as well as lesions in the dentate nuclei of the cerebellum and Purkinje cells.^{3,5} In addition, more recent studies provide evidence of cerebral involvement.⁶ FA is associated with a shortened lifespan, with cardiac dysfunction the main cause of mortality.⁷ The disease is caused by a (GAA)_n expansion within the first intron of the frataxin

gene (*FXN*).⁸ The mutation results in heterochromatin formation⁹ leading to reduced expression of frataxin (FXN), a highly conserved mitochondrial protein, involved in iron-sulfur biogenesis.^{10,11} To date, there is no efficient treatment for FA.

Replenishment of frataxin either through epigenetic drugs, protein replacement, or gene therapy would be the optimal therapy for FA. Previously, we established a proof of concept for a gene therapy approach using adeno-associated virus (AAV)-expressing frataxin (AAV-FXN) to prevent and rapidly reverse the cardiomyopathy associated with FA.¹² Our study clearly demonstrated that dysfunctioning frataxin-deficient cardiomyocytes were still viable after the onset of heart failure and that their phenotype could be reversed. However, one critical question in the field is whether the ganglionopathy and sensory peripheral neuropathy reflect irreversible cell death or whether it is a consequence of neuronal dysfunction that could potentially be reversible. To address this question and with the aim of developing a gene therapy approach to tackle the neuropathology associated with FA, we developed a new neuronal conditional model of the disease. Although several mouse models of FA have already been generated, none are suited for testing gene therapy approaches for the primary sensory ataxia associated with FA. Indeed, while the GAA expansion-based models (KIKO, YG8, and YG22 models) are good models to assess the epigenetics consequence of the GAA expansion and early pathophysiological consequences of frataxin deficiency, they failed to display a robust behavioral phenotype.¹³⁻¹⁸ Other models have been generated based on the Cre-Lox technology to knockout frataxin in specific neuronal cells; however, these models are too severe and non-specific, such as the neuronal-specific enolase (NSE) model,¹⁹ or develop a later onset pathology and have simultaneously DRG and cerebellar ataxia with severe granule cell

Received 8 March 2018; accepted 5 May 2018;
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.006>

⁵These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Hélène Puccio, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France.

E-mail: hpuccio@igbmc.fr

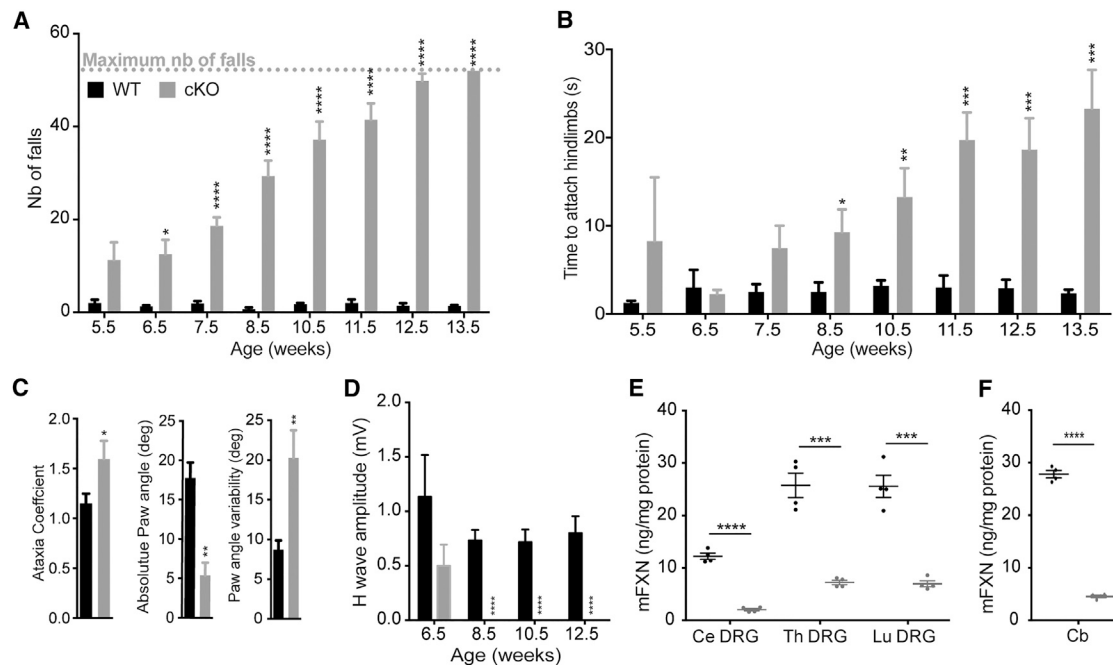


Figure 1. Impaired Behavior and Specific Loss of Sensory Wave in *Pvalb* cKO Mice Associated with Large Frataxin Depletion in DRG and Cerebellum

(A) Notched-bar test analysis, number of footfalls is represented; $n = 10$ WT and $n = 11$ *Pvalb* cKO. (B) Hanging-wire test analysis, time needed to attach hindlimbs to the string is represented; $n = 10$ WT and $n = 11$ *Pvalb* cKO. (C) Ataxia coefficient, measurement of absolute paw angle and paw angle variability after 5 s of walk on the DigitGait apparatus at 13.5 weeks of age; $n = 6$ WT and $n = 5$ *Pvalb* cKO. (D) Amplitudes of somatosensory wave (H-wave) were recorded after plantar sciatic nerve stimulation; $n = 6$ WT and $n = 7$ *Pvalb* cKO. (E and F) Mouse Frataxin expression levels evaluated by ELISA on cervical, thoracic, and lumbar DRG (E) and on cerebellum (F), in WT and *Pvalb* cKO mice at 7.5 weeks of age. $n = 4$. Data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

degeneration.²⁰ We thus generated a new conditional model using the *Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J} mouse line²¹ to more specifically target the proprioceptive neurons. The *Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J} knockin allele has the endogenous parvalbumin promoter and enhancer elements directing Cre recombinase expression in cells expressing parvalbumin, such as proprioceptive afferent sensory neurons in the DRG, cerebellar Purkinje cell, and deep nuclei, as well as interneurons in the brain.²¹

The newly generated *Pvalb*-Cre conditional knockout (cKO) model recapitulated features of FA neuropathophysiology, in particular a ganglionopathy with sensory axonopathy, albeit with a more rapid and severe course of the disease. In addition, a cerebellar ataxia and cerebral involvement occur, but after the onset of the PNS pathology. Intravenous delivery of AAV-FXN fully prevented the onset of peripheral sensory neuropathy. Moreover, combined intravenous and intracerebral delivery AAV-FXN, after the onset of behavioral impairment, was able to reverse the phenotype of these mice at the behavioral, physiological, and cellular levels within a few days. Our results strongly demonstrate that frataxin-deficient proprioceptive neurons with severe phenotype survive for several weeks and can be rapidly and completely rescued by gene therapy in the mouse model. Thus, this study establishes the pre-clinical proof of concept for the potential of gene therapy in treating FA sensory neuropathy.

RESULTS

***Pvalb* cKO Mimics Neuropathophysiology Occurring in FA Patients**

To induce frataxin deletion in parvalbumin-positive neurons (including the proprioceptive neurons of DRG, cerebellar deep nuclei, and Purkinje cells), we bred mice homozygous for the conditional frataxin allele (*Fxn*^{L3/L3}) with mice heterozygous for the frataxin allele carrying the *Pvalb*-Cre transgene (*Fxn*^{+L/-}; *Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J}). Animals were born according to Mendelian ratio indicating no substantial embryonic lethality and displayed a normal growth until 21.5 weeks (Figure S1A). Loss of coordination in *Pvalb* cKO mice was evaluated weekly from 5.5 weeks until 13.5 weeks. *Pvalb* cKO mice developed a rapidly progressive movement disorder characterized by gait abnormality as early as 6.5 weeks of age on the notched bar test (Figure 1A) and general coordination defects measured at 8.5 weeks of age on the wire-hanging test (Figure 1B) and on the rotarod (Figure S1B). The loss of coordination progressed over time, and *Pvalb* cKO mice showed a complete incapacity at the notched bar by 13.5 weeks of age (Figure 1A). Open field analysis did not reveal any change in general locomotor activity (Figures S1C and S1D). Digit gait analysis performed on a sub-cohort of mice at 13.5 weeks of age confirmed the ataxic gait in *Pvalb* cKO animals, with a significant increase in the ataxia coefficient, a decrease in absolute hindpaw angle, and an increase in paw angle variability (Figure 1C). On electromyographic measurements, motor-evoked

potential measurements in plantar muscle were normal (Figure S1E). In contrast, after somatosensory stimulation of the sciatic nerve, the H-wave response (sensorimotor reflex) was significantly affected at 8.5 weeks of age with a complete loss ($p < 0.0001$) (Figure 1D; Table S1), indicating that the large myelinated proprioceptive sensory neurons or their afferents are functionally defective. As a general observation, *Pvalb* cKO mice develop tremors after 8.5 weeks of age, worsening over time, and died prematurely around 21 weeks of age due to epileptic seizures. The expression of the Cre recombinase in the Purkinje cells at p40, as well as more widely throughout the cortex at 21.5 weeks, most likely contributes to the phenotype of the mice, in particular the tremors and the epileptic seizures (Figure S2; see Supplemental Results).

In agreement with the expression pattern of the *Pvalb-Cre* transgene, frataxin depletion was observed in the DRG, brain, cerebellum, and spinal cord by western blot (Figures S1F and S1G). By ELISA assay, a very strong reduction of frataxin (72%–83% reduction) was seen in the DRG of the *Pvalb* cKO compared to control (Figure 1E; Table S2), despite the fact that the proprioceptive neurons (i.e., the ones expressing the Cre recombinase) represent only 7.5% of the total cells of the DRG.^{22,23} Considering that the *Pvalb* cKO are constitutive heterozygotes for the frataxin locus (*Fxn*^{L3/L-}), this demonstrates that proprioceptive neurons express 44%–66% of the total frataxin of the DRG (Table S3; Supplemental Results). Interestingly, lumbar DRG express twice as much frataxin than the cervical DRG (Figure 1E), while no clear differences was observed in different sections of the spinal cord (Figure S1G). Similarly, in the cerebellum, the Purkinje cell and the deep gray nuclei express 67% of the total frataxin expression of the cerebellum (Figure 1F; Table S3).

To determine the pathological changes associated with frataxin deficiency, histological analysis was performed on both DRG and cerebellum. The main pathological feature in the DRG was the presence of vacuoles in ~1.5% of neurons at 7.5 weeks in *Pvalb* cKO ($p = 0.0429$) (Figure 2A). No neuronal loss in the DRG was observed at 7.5 weeks of age (Figure 2B), demonstrating that the loss of somatosensory response is not a consequence of neuronal loss. At 10.5 weeks of age, although not statistically significant, a trend of 10%–15% neuronal loss in the lumbar level was observed, a tendency not further exacerbated with time (Figure 2B). Neurofilament 200 staining, a marker of proprioceptive and mechanoreceptive neurons, shows a reduction of ~30% of large myelinated neurons at 21.5 weeks in *Pvalb* cKO (Figures S3A and S3B). No neuronal loss in the cervical or thoracic DRG was observed at any time despite frataxin deletion demonstrating some specificity toward lumbar DRG (Figure S3C). In the cerebellum, abnormal localization and loss of Purkinje cells was also observed starting at 10.5 weeks of age (Figures 2C and 2D).

To further determine the pathological changes associated with the specific loss of sensory wave, ultrastructural analysis was performed on both DRG and the sciatic nerve, a mixed sensory and motor nerve. Ultrastructural analysis of DRG neurons presenting vacuoles at 7.5 weeks of age (Figure 2A, arrows) revealed signs of mitochondrial

and cell degeneration. Typical features of different stages of mitophagy were observed: mitochondria starting to degenerate (Figure 2E, arrows 1), large vacuoles with membrane invagination and cytoplasmic material inside (Figure 2E, arrows 2), complete degeneration of the cell with endoplasmic reticulum (ER) dilation (Figure 2E, arrows 3). At 3.5 weeks of age, sciatic nerves of *Pvalb* cKO already displayed signs of neuropathy with degeneration affecting small caliber myelinated fibers and inner swelling tongue (Figure 2F). Such abnormalities became more frequent and severe with age. At 5.5 weeks, degenerating mitochondria were noted (Figure 2F), while by 17.5 weeks of age, clear signs of axonal loss as well as axonal shrinkage were observed, with the frequent presence of myelin debris (Figure 2F). In agreement with the lack of pathology in the thoracic and cervical DRG, analysis of radial and median nerve at 18.5 weeks did not show any abnormalities (Figure S3D).

The molecular events following frataxin depletion are iron-sulfur (Fe-S) cluster protein deficits and cellular iron dysregulation.^{19,24} We initially measured SDH activity on lumbar DRG and cerebellum protein lysates by spectrophotometry; however, no difference between wild-type (WT) and *Pvalb* KO was observed (Figures S4A and S4B). Similarly, western blot analysis of the lipoic acid bound to pyruvate dehydrogenase (PDH) and α -ketoglutarate dehydrogenase (KGDH) complexes did not reveal any differences, suggesting that the Fe₄S₄-dependent lipoic acid synthase was not affected (Figures S4C and S4D). However, we hypothesized that the absence of detectable Fe-S cluster protein deficit in whole lysate of DRG and cerebellum might be a consequence of signal dilution, as proprioceptive neurons represent only 7.5% of the total cells of the DRG and Purkinje cell represents a minority of cerebellar cells (1 Purkinje cell for 778 granule neurons²⁵). SDH activity was determined by histochemical staining on cryostat sections of lumbar DRG and cerebellum (Figures 3A–3C). In lumbar DRG sections of *Pvalb* cKO animals, large SDH-negative neurons were observed at 8.5 weeks of age (Figure 3A, zoom). Quantification of SDH staining in DRG demonstrated a significant increase in the number of negative SDH neurons in *Pvalb* cKO animals compared to WT as early as 5.5 weeks of age (Figures 1B and S4E). Similarly, in the cerebellum, faint SDH staining was observed in *Pvalb* cKO Purkinje cells compared to control animals at 13.5 weeks of age (Figure 3C). At 18.5 weeks, Purkinje cells of *Pvalb* cKO animals were either SDH negative or were absent (Figure 3C), in coherence with the partial loss of Purkinje cells. We aimed at demonstrating that the SDH-negative neurons were frataxin deficient; however, due to the low levels of frataxin in DRG and cerebellum (i.e., ~30 ng FXN per mg of protein compared to ~150 ng FXN per mg of protein in the heart), we could not detect frataxin by immunohistochemistry with the available anti-frataxin antibodies. In non-neuronal FA mouse models, Fe-S cluster deficiency leads to IRP1 activation as a translational regulator leading to iron metabolism dysregulation.^{19,26} In contrast with the clear iron accumulation observed in cardiomyocytes deficient for frataxin (MCK mutants; Figure S4F),¹⁹ cerebellar Purkinje cells were negative for Perl's-enhanced iron staining at 13.5 weeks of age in *Pvalb* cKO (Figure S4G). However, upregulation of Transferrin receptor 1 (TfR1)

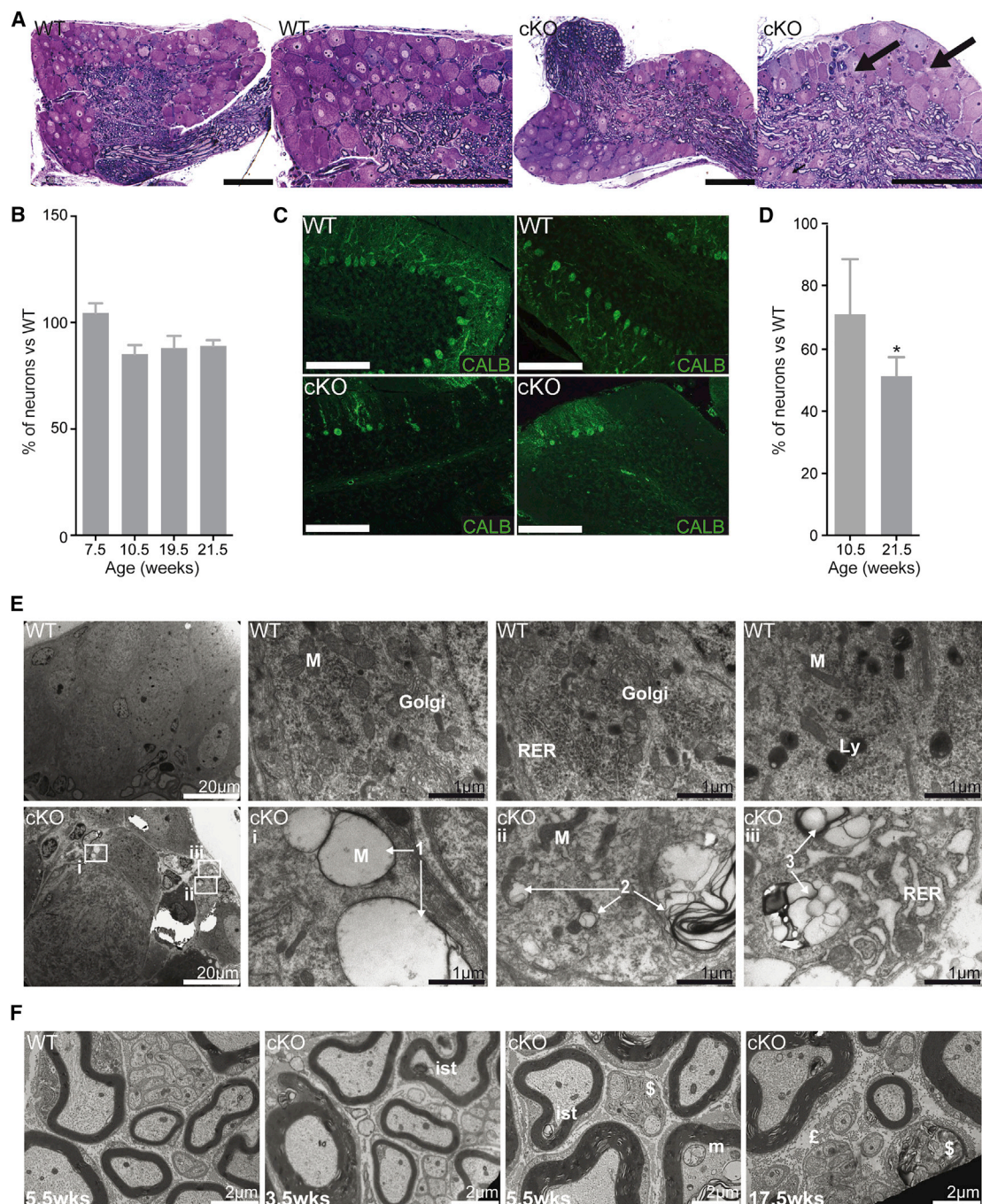


Figure 2. Neurodegeneration and Neuropathy in *Pvalb* cKO Mice

(A) Semithin sections of lumbar DRG at 7.5 weeks with arrows indicating vacuoles. $n = 7,000$ neurons scored. Scale bars, 100 μm . (B) Mean number of neurons per DRG normalized by DRG area in the lumbar section of the spinal cord. $n = 3$ or 4 mice and between 6,000 and 10,000 neurons scored per group and per age. (C) Calbindin staining on cerebellar section of control and *Pvalb* cKO mice at 21.5 weeks. Scale bars, 100 μm . (D) Purkinje cell loss in *Pvalb* cKO mice at 10.5 and 21.5 weeks assessed by scoring of Calbindin-positive cells. $n = 4$ mice and between 1,800 and 2,500 neurons scored per group and per age. (E) Ultrathin sections of lumbar DRG of WT and *Pvalb* cKO at 7.5 weeks with sign of cell death progression in large neurons with empty giant mitochondria (arrows 1), vacuoles (arrows 2) and with membrane invagination ending in a complete cell degeneration with dilated endoplasmic reticulum and larges vacuoles (arrows 3). M, mitochondria; Ly, lysosome; RER, rough endoplasmic reticulum. Scale bars, indicated sizes. (F) Ultrathin sections of sciatic nerves of WT and *Pvalb* cKO at 3.5, 5.5, and 17.5 weeks. ist, inner swelling tongue; £, fibrosis; m, abnormal mitochondria; \$, degeneration. Scale bars, 2 μm . Data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

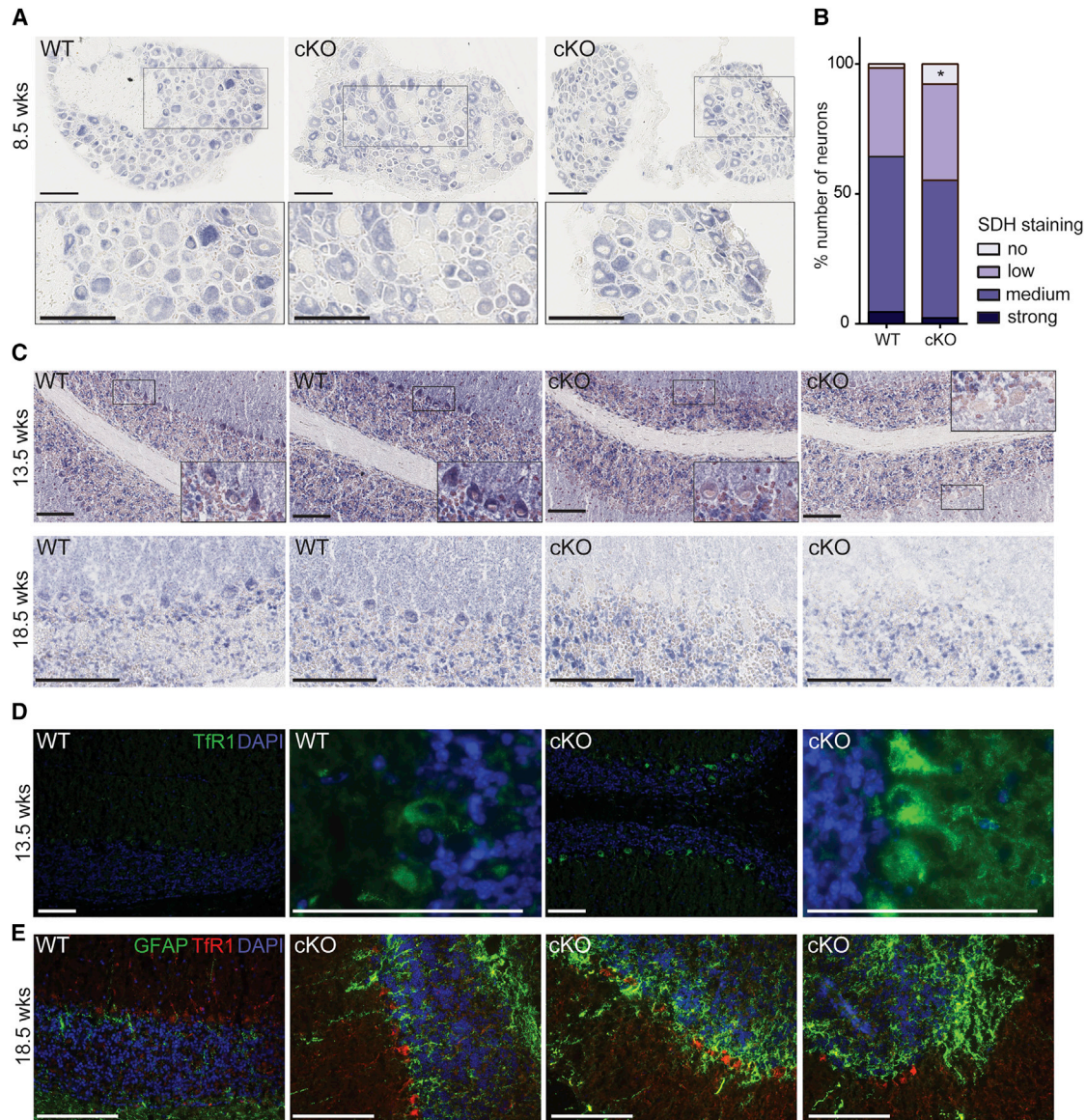


Figure 3. Fe-S Cluster Protein Deficit and Cellular Iron Metabolism Dysregulation in Some Neurons of *Pvalb* cKO Mice

(A) Representative SDH histoenzymatic activity staining in lumbar DRGs at 8.5 weeks of age WT and *Pvalb* cKO mice. Scale bars, 100 μ m. (B) Scoring SDH staining intensity in lumbar DRG neurons at 5.5 weeks of age; $n = 8,732$ neurons counted from three WT animals and $n = 11,019$ neurons counted from four *Pvalb* cKO animals. * $p < 0.05$. (C) Representative SDH histoenzymatic activity staining in cerebellum at 13.5 and 18.5 weeks of age WT and *Pvalb* cKO mice with magnifications on Purkinje cells. Scale bars, 100 μ m. (D) Representative images of TfR1 immunofluorescence (green) in cerebellum of WT and *Pvalb* cKO animals at 13.5 weeks of age. Scale bars, 100 μ m. (E) Representative images of TfR1 (red) and GFAP (green) co-immunofluorescence in cerebellum of WT and *Pvalb* cKO animals at 18.5 weeks of age. Scale bars, 100 μ m.

levels was detected in Purkinje cells in *Pvalb* cKO both at 13.5 and 18.5 weeks of age (Figures 3D and 3E), which could be a direct consequence of IRP1 activation in its iron response element (IRE) regulatory form.²⁶ Interestingly, the astrocyte marker GFAP signal was increased not only in the granular layer, but more particularly in the Purkinje cells and molecular layer in *Pvalb* cKO compare to controls (Figure 3E). The increase in GFAP is most likely a direct reflection of active astrogliosis coupled to Purkinje cell death.²⁷ All together, these results demonstrate that frataxin deficiency in neurons

leads to an Fe-S cluster protein deficit and cellular iron dysregulation leading to cellular dysfunction and death.

Prevention of Progressive Loss of Sensory Defects after Treatment of Early-Symptomatic *Pvalb* cKO Mice

To investigate the potential of gene therapy for the treatment of the FA sensory ataxia and neuropathy, a single intravenous injection of AAV9-CAG-FXN-HA at a dose of 5×10^{13} vector genomes (vg)/kg was performed in 3.5-week-old early-symptomatic *Pvalb* cKO mice.

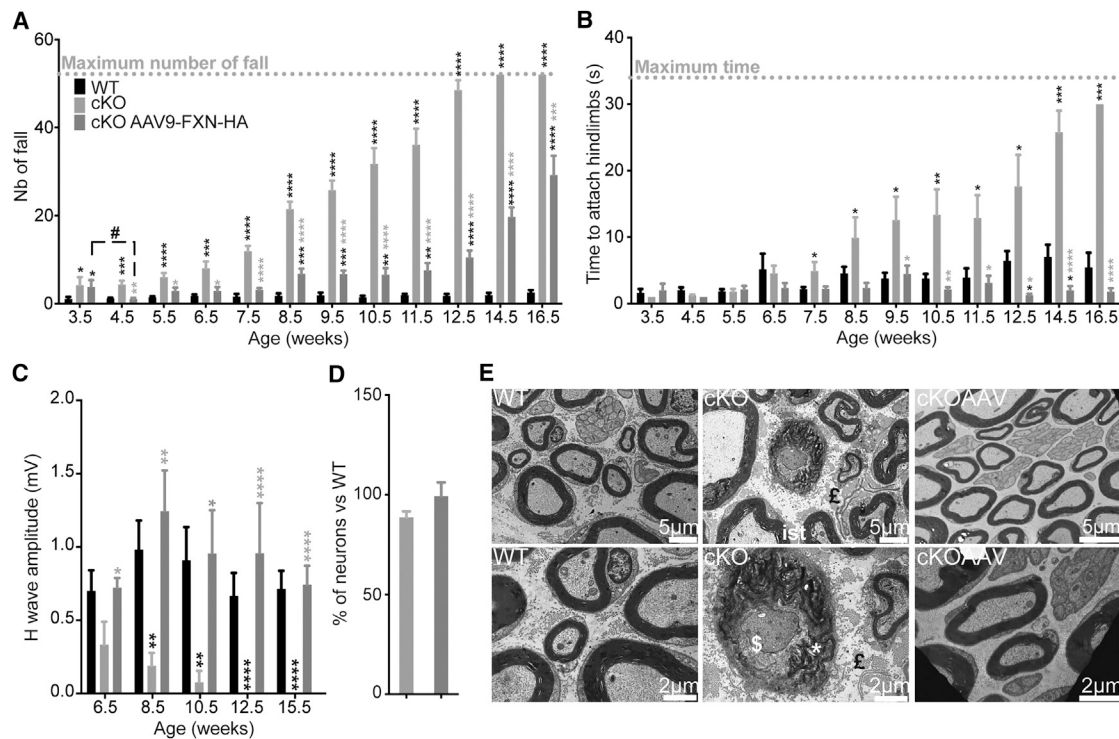


Figure 4. Evaluation of Early Symptomatic Treatment in *Pvalb* cKO Animals

(A) Notched-bar test analysis, number of footfalls is represented; $n = 11$ WT, $n = 9$ *Pvalb* cKO, and $n = 9$ *Pvalb* cKOAAV. (B) Hanging-wire test analysis, time needed to attach hindlimbs to the string is represented; $n = 11$ WT, $n = 9$ *Pvalb* cKO, and $n = 9$ *Pvalb* cKOAAV. (C) Amplitude of sensory wave (H-wave) was recorded after plantar sciatic nerve stimulation. $n = 11$ WT, $n = 9$ *Pvalb* cKO, and $n = 9$ *Pvalb* cKOAAV. (D) Mean number of neuron per DRG of WT and *Pvalb* (untreated and treated) was evaluated at the lumbar level of the spinal cord. $n = 3$ mice per group with $n = 9,314$ WT, $n = 7,666$ *Pvalb* cKO, and $n = 7,610$ *Pvalb* cKOAAV neurons scored. (E) Ultra-thin sections of sciatic nerves of *Pvalb* treated at 17.5 weeks. ist, inner swelling tongue; £, fibrosis; *, myelin debris; \$, degeneration. Scale bars, indicated sizes. Data are represented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Black stars correspond to p value versus WT and gray stars versus untreated *Pvalb* cKO.

A significant coordination improvement in treated compared to untreated *Pvalb* cKO mice was observed in all tests performed (Figures 4A, 4B, and S5A). While, 1 week after treatment, a significant improvement of coordination on the notched-bar test was observed, the treated mice's performance progressively worsened starting at 8.5 weeks of age, although never to the level of untreated animals (Figure 4A). In contrast, treated *Pvalb* cKO mice remained undistinguishable from WT controls until euthanasia on the wire-hanging test (Figure 4B), showing a clear benefit on the peripheral sensory neuropathy. Consistent with the behavioral analysis, the defect in the sensorimotor reflex after sciatic nerve stimulation was completely prevented in treated *Pvalb* cKO mice (Figure 4C; Table S4).

Due to significant tremors, animals were sacrificed at 17.5 weeks of age. Biodistribution study of the AAV9-CAG-human frataxin (hFXN)-HA vector revealed a high transduction of the liver, a moderate transduction of the heart and brain, a milder transduction of the DRG, and a poor transduction of the spinal cord and cerebellum (Figure S5B). The transgenic human frataxin expression was 22 times the endogenous level in WT animals in the DRG (thoracic portion) (697 ng hFXN/mg protein) (Figure S5C). Western blot analysis showed that the majority of the transgenic human frataxin is matured

and the absence of precursor accumulation (Figure S5D), as previously published.¹² Histologically, the trend in neuronal loss previously observed in *Pvalb* cKO in lumbar DRG was absent in the treated animal (Figure 4D). Furthermore, ultrastructural analysis of sciatic nerve showed no signs of degeneration, axonal loss, autophagy, or abnormal mitochondria in treated *Pvalb* cKO mice (Figure 4E), in agreement with the presence of normal somatosensory response.

AAV-hFXN Delivery Rapidly Rescues Sensory Ataxia in Late Symptomatic *Pvalb* Mice

While preventing the sensory ataxia is an important step, it is crucial to determine the therapeutic potential after the onset of the symptoms. Intravenous administration of AAV9-CAG-FXN-HA at a dose of 5×10^{13} vg/kg simultaneously with intracerebral deliveries of AAVrh.10-CAG-FXN-HA (1×10^{10} vg/deposit) in the striatum and the cerebellar white matter to target the CNS was performed post-symptomatically at 7.5 weeks of age. A complete correction of the peripheral fine coordination measured by the wire-hanging test was observed 1 week after treatment, which sustains overtime up to euthanasia (Figure 5A). On the notched-bar test, treated *Pvalb* cKO mice show a clear stabilization of the phenotype until 9.5 weeks of age then developed a progressive worsening of the phenotype

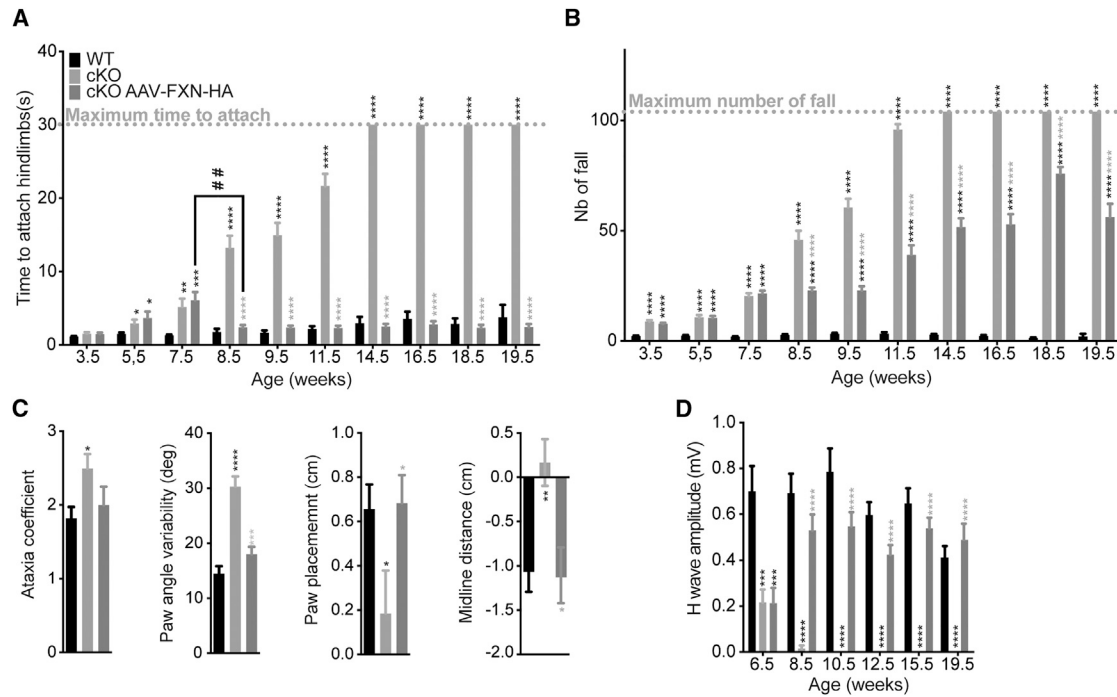


Figure 5. Rapid Correction of Neurological Phenotype after Post-symptomatic Treatment of *Pvalb* cKO Animals

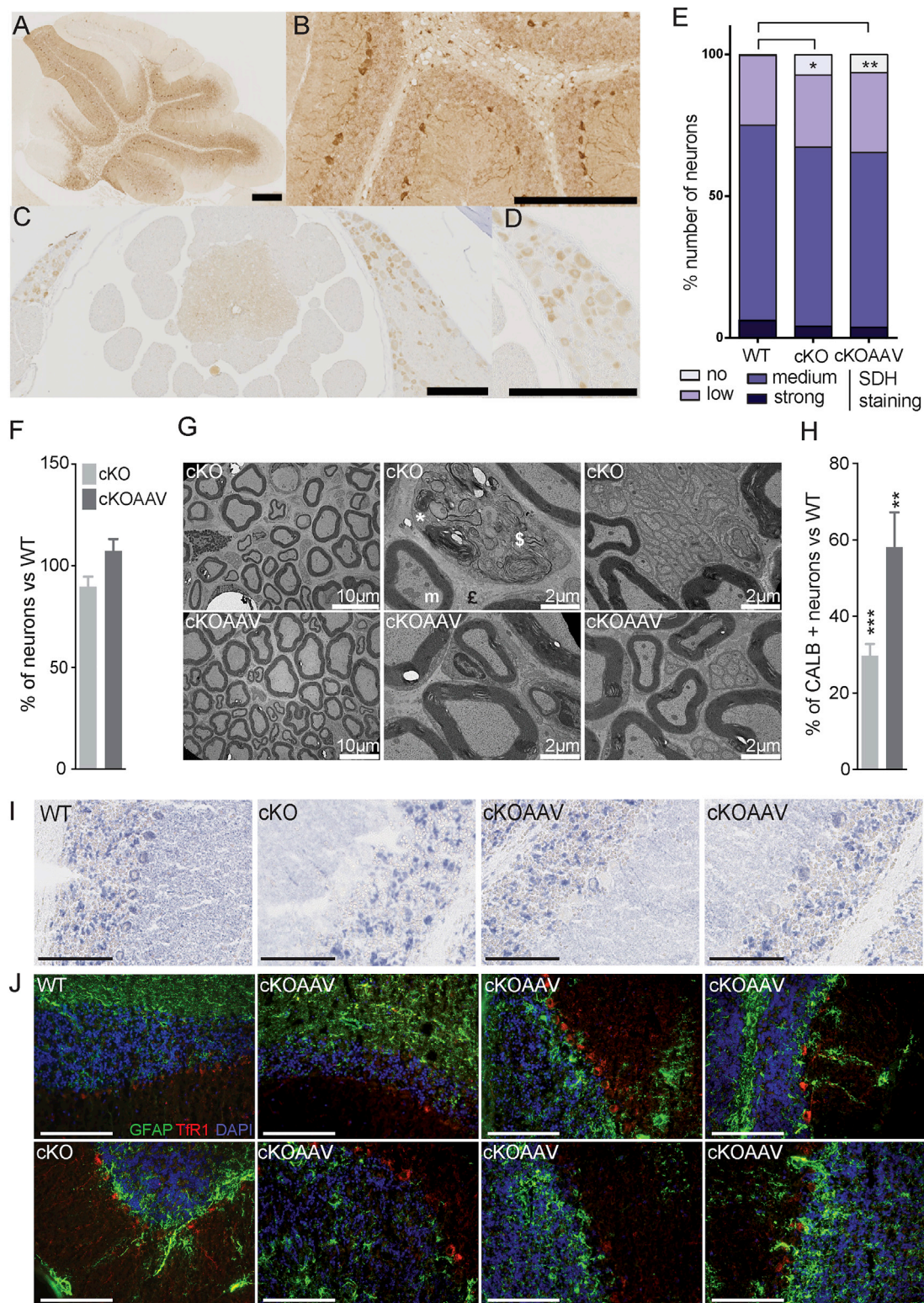
(A) Hanging-wire test analysis, time needed to attach hindlimbs to the string is represented; n = 26 WT, n = 29 *Pvalb* cKO, and n = 32 *Pvalb* cKOAAV. (B) Notched-bar test analysis, number of footfalls is represented; n = 26 WT, n = 29 *Pvalb* cKO, and n = 32 *Pvalb* cKOAAV. (C) Ataxia coefficient, paw angle variability, paw placement, and midline distance measured after 2.5 s of walk on the DigitGait apparatus at 17.5 weeks of age; n = 8 WT, n = 6 *Pvalb* cKO, and n = 8 *Pvalb* cKOAAV. (D) Amplitude of sensory wave (H-wave) was recorded after plantar sciatic nerve stimulation; n = 26 WT, n = 29 *Pvalb* cKO, and n = 32 *Pvalb* cKOAAV. Data are represented as mean \pm SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001. Black stars correspond to p value versus WT and gray stars versus untreated *Pvalb* cKO.

(Figure 5B), as it was also observed on the rotarod (Figure S6A). Evaluation of the gait at 17.5 weeks of age by DigitGait analysis showed a complete correction of several parameters in the treated *Pvalb* cKO animals, including the ataxic coefficient, the paw angle variability, the paw placement, and the midline distance (Figure 5C). Concomitantly with the improvement of coordination and the ataxic phenotype, *Pvalb* cKO mice displayed a complete reversion of sensorimotor reflexes (Figure 5D; Table S5), with H-wave amplitudes within the normal range. Due to significant tremors, to avoid losing the animals of epileptic seizures and for ethical reasons, most animals were sacrificed at 18.5 weeks of age for histological and molecular analyses, with a few animals kept until 22.5 weeks for ultrastructural analysis.

Biodistribution study of the AAV-CAG-hFXN-HA vectors (both AAV9 and AAVrh10) reveals a high transduction of brain (cortex, cerebellum), a moderate transduction of brainstem in accordance with the intraparenchymal delivery of AAVrh.10, a milder transduction of the DRG, and quite poor transduction of the spinal cord (Figure S6B). Compared to what has been shown in pre-symptomatic treatment, DRG transduction is milder, in accordance with tropism and different transduction, depending on the age of delivery.²⁸ In agreement with the biodistribution of the vector, a widespread expression of hFXN-HA in the brain surrounding the injection site, especially in Purkinje cells and in striatum as well as in DRG neurons,

was observed in the treated animals (Figures 6A–6D and S6C). Transgenic hFXN concentration was quantified by ELISA at 39.9 ng hFXN/mg protein in the DRG, corresponding to \sim 1.5 times the endogenous level, and at 176.3 ng hFXN/mg protein in the cerebellum, corresponding to 6 times the endogenous level (Figure S6D).

At 8.5 weeks of age, 1 week after treatment, the number of SDH-negative neurons in the DRG of treated *Pvalb* cKO animals did not differ from that of untreated animals (Figure 6E), despite the clear functional rescue at the physiological level. However, the trend in neuronal loss previously observed in lumbar DRG was absent in the treated animal, suggesting a protection against neuron loss at 18.5 weeks (Figure 6F). Moreover, ultrastructural analysis of the sciatic nerve of treated *Pvalb* mice at 22.5 weeks of age revealed a complete normal morphology with the absence of degeneration, axonal loss, autophagy, and abnormal mitochondria (Figure 6G), suggesting a complete regeneration of the sensory axonopathy. Interestingly, 1 week post-treatment, a clear process of regeneration (clearance of myelin debris, axon regrowth, and remyelination) was observed in treated animals (Figure S7A) with the nerve structure almost completely normal 2 weeks post-treatment (Figure S7B). All together, these results demonstrate a rapid and complete correction of the sensory neuropathy associated with frataxin deficiency by intravenous treatment using AAV9.



(legend on next page)

At 18.5 weeks, a significant prevention of Purkinje cell loss in the cerebellum occurred in treated animals (Figure 6H), although this was lobule dependent (Figure S6E), probably reflecting the non-homogeneous biodistribution of the vector (Figure S6C). A partial rescue of SDH-positive Purkinje cell was observed at 18.5 weeks in the treated animals (Figure 6I). Indeed, while in the cerebellum of untreated *Pvalb* cKO, few surviving Purkinje cells could be observed (all SDH negative); in treated animals, while the Purkinje cells appeared to be mostly preserved, the SDH staining varied from dark staining similar to the Purkinje cell of WT animals to SDH-negative staining, suggesting only a partial rescue. Similarly, the Tfr1 and GFAP upregulation were partially corrected in treated animals, with some Purkinje cells presenting Tfr1 and GFAP expression similar to WT Purkinje cells while other Purkinje cells (although less common) show various intermediate profiles of Tfr1 and GFAP overexpression (Figure 6J). This is in agreement with the non-homogeneous biodistribution of the vector in the cerebellum.

DISCUSSION

Here, we report the generation of a new conditional mouse model for the ganglionopathy and sensory neuropathy associated with frataxin deficiency followed by the proof of concept of a gene therapy approach for the neuronal symptoms of FA. The new *Pvalb* cKO model developed a progressive loss of coordination and gait abnormalities, with a specific early onset of sensory defects followed by a cerebellar ataxia.

Through the characterization of this new model, several important findings were uncovered that might be of particular interest regarding the neuropathophysiology and cellular specificity in FA. One question that is still left unanswered in the field is the tissue specificity of the disease, and in particular why the large proprioceptive neurons are early and specifically affected compared to other neuronal populations, such as the nociceptive or mechanoreceptor neurons, for example. Quantitative measurements of frataxin by ELISA demonstrated not only more expression of frataxin in lumbar and thoracic DRGs than cervical DRGs, but more interestingly that proprioceptive neurons express 44%–66% of total frataxin protein of the DRGs, despite representing only 7.5% of total cell. Why would proprioceptive neurons express such high levels of frataxin compared to other cell types in the DRG is not known, but this may account partially for their higher vulnerability and premature loss in FA.²⁹ While it is technically impossible to measure sensori-

motor reflexes in upper limbs due to the short length of the paw in mice, no signs of degeneration nor neuronal loss could be found in the radial or median nerve nor in thoracic and cervical DRG despite depletion of frataxin expression, suggesting that as in patients, the phenotype proceeds from lumbar to cervical region.²⁹ However, as the model exhibits premature death at 20 weeks due to epileptic seizures most likely as a consequence of frataxin depletion in cortical interneurons, it is not known whether degeneration of cervical DRG could occur with aging of the mice. Importantly, we showed that sensorimotor dysfunction by electrophysiology was an early event in the disease. While this is difficult to translate into human, the mouse model demonstrates that proprioceptive neurons completely deficient for frataxin can survive at least 7.5 weeks (as deletion occur around E17.5) and probably even more than 10 weeks of age, despite being dysfunctional early after frataxin deficiency. Considering that Schwann cells are not depleted for frataxin in the current model, our results demonstrate that proprioceptive neuronal dysfunction and pathology can occur in a cell-autonomous manner. However, it is likely that Schwann cells participate in the pathology in human, as low frataxin occurs in all tissues. Interestingly frataxin-deficient Purkinje cells in the cerebellum survive less time than frataxin-deficient proprioceptive neurons in DRG. While the reason for this difference is not known, the fact that the peripheral nervous system is regeneration competent might explain the better resistance of proprioceptive neurons to cell death. This resistance of proprioceptive neurons is a crucial point for therapeutical approaches for the sensory neuropathy, as most patients present a severe loss of proprioception at the time of the diagnosis, and the presence of proprioceptive neurons is not known. Finally, frataxin depletion in neurons, as in cardiac tissues, leads to an Fe-S cluster protein deficit, a secondary iron dysmetabolism, and mitochondrial defects before loss of cell. Whether iron accumulates in the nervous system is still under debate in the field, and recently iron accumulation was detected in cortical neurons of CRISPR-Cas9 frataxin-deficient mice.³⁰ In the present model, we did not detect any iron accumulation, probably because of the time course of the events. Indeed, iron accumulation in the CNS was shown to be a late event following frataxin deficiency.³⁰ Therefore, although the iron importer Tfr1 is increased in the frataxin-deficient Purkinje cell, the neurons are lost most likely prior to sufficient iron accumulation to be detected by 3,3'-diaminobenzidine (DAB)-enhanced Perl's. In conclusion, the *Pvalb* cKO animals mimic several features of FA patients even if more severe on certain aspects and with a non-specific cerebral component due to full

Figure 6. Molecular and Histological Improvements after Post-symptomatic Treatment

(A–D) Representative images of FXN-HA expression in DRG and spinal cord (A and B) and cerebellum (C and D) of AAV-treated animals at 18.5 weeks. Scale bar, 100 μ m. (E) Scoring of lumbar DRG neurons depending on the SDH staining intensity at 8.5 weeks of age; n = 6,574 neurons counted from two WT animals, n = 5,971 neurons counted from three *Pvalb* cKO animals, and n = 5,239 neurons counted from three *Pvalb* cKOAAV animals. (F) Mean number of neuron per DRG of WT and *Pvalb* cKO (untreated and treated) was evaluated at the lumbar level of the spinal cord; n = 6 mice with n = 13,375 WT, n = 11,581 *Pvalb* cKO, and n = 16,891 *Pvalb* cKOAAV neurons scored. (G) Ultrathin sections of sciatic nerves of 22.5-week *Pvalb* cKOAAV mice. £, fibrosis; m, abnormal mitochondria; *, myelin debris; \$, degeneration. Scale bars, indicated sizes. (H) Mean number of Purkinje cell number in total in the cerebellum of WT and *Pvalb* cKO-treated and -untreated mice; n = 6 mice per group. (I) Representative SDH histoenzymatic staining of WT, untreated and treated *Pvalb* cKO animals in cerebellum at 18.5 weeks of age. Scale bars, 100 μ m. (J) Representative images of Tfr1 (red) and GFAP (green) co-immunofluorescence in cerebellum of WT, untreated, and treated *Pvalb* cKO animals at 18.5 weeks of age. Scale bars, 100 μ m. Data are represented as mean \pm SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Black stars correspond to p value versus WT.

frataxin deficiency in cortical interneurons. In contrast to previously described models,¹⁸ this new model has the advantage of having a specific proprioceptive phenotype from birth until 8 weeks of age and then develops a cerebellar ataxia with loss of frataxin in Purkinje cell and deep cerebellar nuclei.

Furthermore, our results demonstrate the capacity of intravenous AAV-hFXN delivery at a late symptomatic stage to rapidly and completely rescue the sensory neuropathy associated with frataxin deficiency. Importantly, our results suggest that dysfunctional frataxin-deficient proprioceptive neurons are in majority still alive for several weeks despite their severely affected nerve structure, and their phenotype can be completely reversed, demonstrating high plasticity. Furthermore, the rapidity of the rescue (1 week after treatment) demonstrates that little frataxin is needed to permit the neurons to regenerate and fully recover their nerve structure. This is in contrast to the recently published results from the doxycycline-inducible systemic knockdown of frataxin, which show only partial correction of the ganglionopathy and a mild improvement of axonal neuropathy after 8 weeks of frataxin rescue.³¹ In addition, through intraparenchymal AAVrh10-hFXN delivery, we demonstrate a partial rescue and prevention of Purkinje cell loss. The partial rescue is mainly due to the limited diffusion of the virus and the consecutive transduction of Purkinje cells, which correlates with the correction of SDH activity as well as TfR1 and GFAP dysregulation. The absence of full transduction of the Purkinje cells as well the cortical interneurons is most likely responsible for the tremors and epileptic attacks in the treated *Pvalb* cKO.

In conclusion, our results demonstrate the strong potential of AAV delivery to restore frataxin expression in DRG and rescue the ganglionopathy and sensory neuropathy associated to frataxin deficiency, even in severely affected animals. While this is encouraging for the development of a therapeutic approach in clinical settings, the FA neuropathology in humans is complex, and the status of proprioceptive neurons in FA patients in the early stages of the disease remains to be determined. Mice still developed a cerebral phenotype; however, this is not a phenotype occurring in FA patients, although it is important to target the Purkinje cell and the dentate nucleus in the cerebellum of FA patients. To improve the therapeutic approach, it would be of interest to optimize overall brain transduction, especially the cerebellum, with new generation of AAV vectors with an optimized capsid, such as the newly described PHPeB vectors.³²

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mice carrying the conditional allele for the frataxin gene (*Fxn*^{L3/L3}) as described previously¹⁹ were mated with B6;129P2-*Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J} (<https://www.jax.org/strain/008069>; Jackson Laboratory, Maine, USA)²¹ in order to generate *Fxn*^{L3/L-}; *Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J} (named *Pvalb* cKO thereafter) and the *Fxn*^{+L3} mice used as controls. To monitor tissue specificity and temporal expression of Cre recombinase activity, B6;129P2-*Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J} mice were mated with a reporter B6;129S4-*Gt(ROSA)26Sor*^{tm1Sor/J} (<https://www.jax.org/strain/003309>).³³ Animals were maintained in a temperature- and humidity-controlled

animal facility with a 12-hr light-dark cycle and free access to water and a standard rodent chow (D03, SAFE, Villemoisson-sur-Orge, France) and supplement after 7.5 weeks of age with jellified food (gel diet A03 SAFE or Dietgel 76A clear H20). All animal procedures were approved by the local ethical committee (C2EA-17, agreements 604 and 2852) and were performed in accordance with the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals (US NIH).

For early symptomatic studies, 3.5-week-old mice were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection with ketamine and xylazine (130/13 mg/kg) to allow retro-orbital intravenous administration of AAV9-CAG-FXN-HA at a dose of 5×10^{13} vg/kg. Untreated *Pvalb* cKO and WT mice were injected with equivalent volumes of saline solution. For late symptomatic studies, 7.5-week-old mice were anesthetized by i.p. injection with ketamine and xylazine (130/13 mg/kg), positioned on the stereotactic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) and injected bilaterally in the striatum and in the white matter of the cerebellum with an AAVrh10-CAG-FXN-HA at a dose of 1×10^{10} vg/deposit (Table S6). Injections were done using a 30G blunt needle attached to a 10 μ L Hamilton syringe (Hamilton, USA) at a rate of 0.2 μ L/min. Animals were then intravenously injected with AAV9-CAG-FXN-HA at a dose of 5×10^{13} vg/kg. To avoid suffering, animals received an injection of buprenex (0.3 mg/kg) before waking up (Animal Care, France). Untreated *Pvalb* cKO and WT mice were injected with equivalent volumes of saline solution. Animals were monitored daily after the surgery. The combination of AAV serotypes used was based on published³⁴ and preliminary tests. Pre-symptomatic AAVrh10-CAG-FXN-HA IV delivery at a dose of 5×10^{13} vg/kg, did not prevent the onset sensory ataxia in *Pvalb* cKO animals measured by electromyogram (EMG) (data not shown). Furthermore, comparison of intraparenchymal delivery of AAVrh10-GFP and AAV9-GFP demonstrated better neuronal transduction efficiency for AAVrh10 (data not shown).

The AAV vectors were the same as the ones used in the previous gene therapy study¹² with final titers of 8.5×10^{13} vg/mL for the AAV9-CAG-hFXN-HA and 5.5×10^{13} vg/mL for the AAVrh10-CAG-hFXN-HA.

Behavioral Analysis

Behavioral experiments were conducted to evaluate motor and muscular function. Coordination was evaluated using the notched-bar test (scored number of falls of the upper or lower limbs) and the wire-hanging test (scored the time needed by animal to attach their hindlimbs) as previously described³⁵ but without training. General motor capacities were tested using the accelerating rotarod LE8200 (Bioseb, France), and open field activity was measured on the photocell actimeter LE8811 (Bioseb, France), as previously described (<https://www.mousephenotype.org/>). Animals were scored weekly for each test from 3.5 weeks of age until euthanasia, in the following order: wire-hanging test, notched-bar test, rotarod, and open field. Gait analysis was performed at 13.5 weeks or at 18.5 weeks of age using a DigitGait Apparatus (Mouse Specific, Boston, USA), as described previously.³⁶ The paws of the mice were captured by video

during treadmill locomotion at a speed of 21 cm/s for at least 5 s of proper gait, and analysis was performed using the DigitGait Analyzer software (Mouse Specific, Boston, USA).

Electromyogram analyses were performed using the Natus UltraProS100 apparatus (Mag2Health, France). Mice were anesthetized using i.p. injection with ketamine/xylazine (130/13 mg/kg). Animals were maintained at 37°C during the whole experiment until wakeup. Latency and amplitude of M and H-waves were recorded in the plantar hindpaw muscle after sciatic nerve stimulation (0.1 ms and 8 mA intensity). An additional recording of the M-wave was performed in the gastrocnemius muscle. Measurements were performed every 2 weeks starting at 3.5 weeks of age.

Histology

For histological analyses, mice were killed by i.p. injection of ketamine-xylazine (300/13 mg/kg) and perfused with 10 mL of PBS. Various tissues were dissected and either fixed in paraformaldehyde (PFA) and embedded in paraffin or directly embedded in Shandon Cryomatrix embedding resin (Thermo Fisher Scientific) and snap-frozen in isopentane chilled on dry ice. For spinal cord and DRG analysis, prior to the paraffin embedding, the column was decalcified in EDTA 0.34 M (pH 7.4) for 14 days, and the spinal cord was divided into cervical, thoracic, and lumbar levels. DRG neurons were scored on paraffin sections (5 µm) stained with H&E. The number of neurons was normalized by the area of the DRG section. DAB-enhanced Perl's iron staining was performed on 8-µm tissue cryosections as previously described.¹² β-galactosidase staining was performed on 10-µm cryopreserved sections with a protocol adapted from Sanes et al.³⁷

HA immunodetection was performed on paraffin sections using Vectastain ABC kit followed by DAB enhancement according to manufacturer's protocol (Vector Labs), with slight modification, including epitope unmasking in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20 (pH 8.75) for 45 min at 95°C, and images acquired on a Hamamatsu NanoZoomer 2.0 slide scanner. Succinate dehydrogenase (SDH) activity was determined on 8-µm cryosections of tissues, as previously described¹⁹ with adapted incubation time with the substrate solution (25 min for the DRG sections, 30 min for the brain sections). Images were acquired using the Hamamatsu NanoZoomer 2.0 slide scanner. DRG neurons were then scored on the intensity of the SDH signal: strong, medium, low, and no SDH staining. All experiments were performed blindly.

Calbindin, MBP, and Neurofilament 200-kDa (NF-200) immunofluorescences were performed on paraffin sections according to previous protocols.^{38,39}

TfR1 and GFAP immunofluorescence single labeling or co-labeling were performed on 8-µm 4% PFA fixed cryosections. Sections were mounted using ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen), and images were recorded with a Leica DM4000B-M microscope equipped with a Coolsnap HQ2 camera and Micromanager software (see [Table S7](#) for antibodies dilutions and references).

For electron microscopy analysis, animals were perfused with 5 mL of PBS and 10 mL 4% PFA in saline, and tissues were fixed in 2.5% PFA/2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, and samples were processed as previously described.^{12,19}

Molecular Biology

Mice were killed by i.p. injection of ketamine-xylazine (300 mg/kg; 30 mg/kg), and samples for biochemical and molecular analyses were immediately frozen in liquid nitrogen. Protein extractions and western blot were performed as previously described.¹² Twelve micrograms of proteins were loaded on the gels, and the membranes were incubated with the different antibodies ([Table S7](#)) detected with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific) or SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (for frataxin detection). Chemiluminescent images were acquired on the Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences). The activity of the respiratory chain enzyme SDH (complex II) was determined as previously described.^{19,40} Mouse and human frataxin were quantified in DRG (cervical, thoracic, and lumbar) and cerebellum extracts using the mouse frataxin ELISA and human frataxin ELISA kits (Abcam, ab199078, and Abcam, ab176112, respectively) according to the manufacturer's protocol.

Vector Genome Copy Number was measured by qPCR on extracted genomic DNA from DRG, spinal cord (cervical, thoracic, and lumbar levels), brain, cerebellum, heart, and liver using the Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche, France). The results (vector genome copy number per cell) were expressed as n-fold differences in the transgene sequence copy number relative to the *Adck3* gene copy as internal standard (number of viral genome copy for 2N genome).

Statistical Analyses

All data are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software (La Jolla, USA). Student's t tests were used to compare group, and a value of $p < 0.05$ was considered as significant.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Results, seven figures, and seven tables and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.006>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, F.P., C.d.M., H.P.; Methodology, F.P., C.d.M., H.P.; Investigation, F.P., C.d.M., N.V., A.E.; Resources, L.R.; Writing – Original Draft, F.P., C.d.M., H.P.; Writing – Review & Editing, F.P., C.d.M., H.P.; Funding Acquisition, H.P.; Supervision, H.P.; F.P. and C.d.M. contributed equally to the study.

CONFLICTS OF INTEREST

H.P. is scientific consultant to Voyager Therapeutics. All other authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nadia Messaddeq from the IGBMC imaging platform for EM analysis and Véronique Blouin (Institut de Recherche Thérapeutique, INSERM UMR 1089) for vector production. This work was supported by the US Friedreich Ataxia Research Alliance (to H.P.) and a personal donation from the Lurton family (to H.P.). C.d.M. is a recipient of a 4th year PhD fellowship from the Association Française pour l'Ataxie de Friedreich. This study was supported by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissement d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

REFERENCES

- Harding, A.E. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104, 589–620.
- Pandolfo, M. (2009). Friedreich ataxia: the clinical picture. *J. Neurol.* 256 (Suppl 1), 3–8.
- Koeppen, A.H., and Mazurkiewicz, J.E. (2013). Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 78–90.
- Koeppen, A.H., Ramirez, R.L., Becker, A.B., and Mazurkiewicz, J.E. (2016). Dorsal root ganglia in Friedreich ataxia: satellite cell proliferation and inflammation. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 46.
- Kemp, K.C., Cook, A.J., Redondo, J., Kurian, K.M., Scolding, N.J., and Wilkins, A. (2016). Purkinje cell injury, structural plasticity and fusion in patients with Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 53.
- Selvadurai, L.P., Harding, I.H., Corben, L.A., and Georgiou-Karistianis, N. (2018). Cerebral abnormalities in Friedreich ataxia: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 84, 394–406.
- Tsou, A.Y., Paulsen, E.K., Lagedrost, S.J., Perlman, S.L., Mathews, K.D., Wilmot, G.R., Ravina, B., Koeppen, A.H., and Lynch, D.R. (2011). Mortality in Friedreich ataxia. *J. Neurol. Sci.* 307, 46–49.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423–1427.
- Kumari, D., and Usdin, K. (2012). Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clin. Epigenetics* 4, 2.
- Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donzé, M., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS ONE* 6, e16199.
- Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.M., Gambarelli, S., Zepieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., and Ollagnier de Choudens, S. (2013). Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 733–740.
- Perdomini, M., Belbellaa, B., Monassier, L., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Cartier, N., Crystal, R.G., Aubourg, P., and Puccio, H. (2014). Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat. Med.* 20, 542–547.
- Miranda, C.J., Santos, M.M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossée, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J., and Pandolfo, M. (2002). Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett.* 512, 291–297.
- Pook, M.A., Al-Mahdawi, S., Carroll, C.J., Cossée, M., Puccio, H., Lawrence, L., Clark, P., Lowrie, M.B., Bradley, J.L., Cooper, J.M., et al. (2001). Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics* 3, 185–193.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Ruddle, P., Carroll, C., Webster, Z., and Pook, M. (2004). GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics* 84, 301–310.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J.M., King, R., and Pook, M.A. (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* 88, 580–590.
- Anjomani Virmouni, S., Ezzatizadeh, V., Sandi, C., Sandi, M., Al-Mahdawi, S., Chutake, Y., and Pook, M.A. (2015). A novel GAA-repeat-expansion-based mouse model of Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* 8, 225–235.
- Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., and Pook, M.A. (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *J. Neurochem.* 126 (Suppl 1), 65–79.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* 27, 181–186.
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2004). Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 24, 1987–1995.
- Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., and Arber, S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol.* 3, e159.
- Marmigère, F., and Ernfors, P. (2007). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 114–127.
- Zacharová, G., and Paleček, J. (2009). Parvalbumin and TRPV1 receptor expression in dorsal root ganglion neurons after acute peripheral inflammation. *Physiol. Res.* 58, 305–309.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* 17, 215–217.
- Lange, W. (1975). Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tissue Res.* 157, 115–124.
- Martelli, A., Schmucker, S., Reutenauer, L., Mathieu, J.R.R., Peyssonnaud, C., Karim, Z., Puy, H., Galy, B., Hentze, M.W., and Puccio, H. (2015). Iron regulatory protein 1 sustains mitochondrial iron loading and function in frataxin deficiency. *Cell Metab.* 21, 311–323.
- Eng, L.F., and Ghirnikar, R.S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4, 229–237.
- Bostick, B., Ghosh, A., Yue, Y., Long, C., and Duan, D. (2007). Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther.* 14, 1605–1609.
- Koeppen, A.H., Morral, J.A., Davis, A.N., Qian, J., Petrocine, S.V., Knutson, M.D., Gibson, W.M., Cusack, M.J., and Li, D. (2009). The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol.* 118, 763–776.
- Chen, K., Ho, T.S.Y., Lin, G., Tan, K.L., Rasband, M.N., and Bellen, H.J. (2016). Loss of Frataxin activates the iron/sphingolipid/PDK1/Mef2 pathway in mammals. *eLife* 5, 1–14.
- Chandran, V., Gao, K., Swarup, V., Versano, R., Dong, H., Jordan, M.C., and Geschwind, D.H. (2017). Inducible and reversible phenotypes in a novel mouse model of Friedreich's Ataxia. *eLife* 6, 1–41.
- Chan, K.Y., Jang, M.J., Yoo, B.B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.L., Sánchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S.K., Deverman, B.E., and Gradinaru, V. (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* 20, 1172–1179.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.* 21, 70–71.
- Piguet, F., Sondhi, D., Piraud, M., Fouquet, F., Hackett, N.R., Ahouansou, O., Vanier, M.T., Bieche, I., Aubourg, P., Crystal, R.G., et al. (2012). Correction of brain oligodendrocytes by AAVrh.10 intracerebral gene therapy in metachromatic leukodystrophy mice. *Hum. Gene Ther.* 23, 903–914.
- Arbogast, T., Raveau, M., Chevalier, C., Nalesso, V., Dembele, D., Jacobs, H., Wendling, O., Roux, M., Duchon, A., and Herault, Y. (2015). Deletion of the App-Runx1 region in mice models human partial monosomy 21. *Dis. Model. Mech.* 8, 623–634.

www.moleculartherapy.org

36. Wooley, C.M., Sher, R.B., Kale, A., Frankel, W.N., Cox, G.A., and Seburn, K.L. (2005). Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve* 32, 43–50.
37. Sanes, J.R., Rubenstein, J.L., and Nicolas, J.F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* 5, 3133–3142.
38. Sevin, C., Benraiss, A., Van Dam, D., Bonnin, D., Nagels, G., Verot, L., Laurendeau, I., Vidaud, M., Gieselmann, V., Vanier, M., et al. (2006). Intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer in rapidly progressive forms of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 53–64.
39. Bolino, A., Piguet, F., Alberizzi, V., Pellegatta, M., Rivellini, C., Guerrero-Valero, M., Nosedà, R., Brombin, C., Nonis, A., D'Adamo, P., et al. (2016). Niacin-mediated Tace activation ameliorates CMT neuropathies with focal hypermyelination. *EMBO Mol. Med.* 8, 1438–1454.
40. Martelli, A., Friedman, L.S., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Perlman, S.L., Lynch, D.R., Fedosov, K., Schulz, J.B., Pandolfo, M., and Puccio, H. (2012). Clinical data and characterization of the liver conditional mouse model exclude neoplasia as a non-neurological manifestation associated with Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* 5, 860–869.

YMTHE, Volume 26

Supplemental Information

Rapid and Complete Reversal of Sensory

Ataxia by Gene Therapy in a Novel

Model of Friedreich Ataxia

Françoise Piguet, Charline de Montigny, Nadège Vaucamps, Laurence Reutenauer, Aurélie Eisenmann, and Hélène Puccio

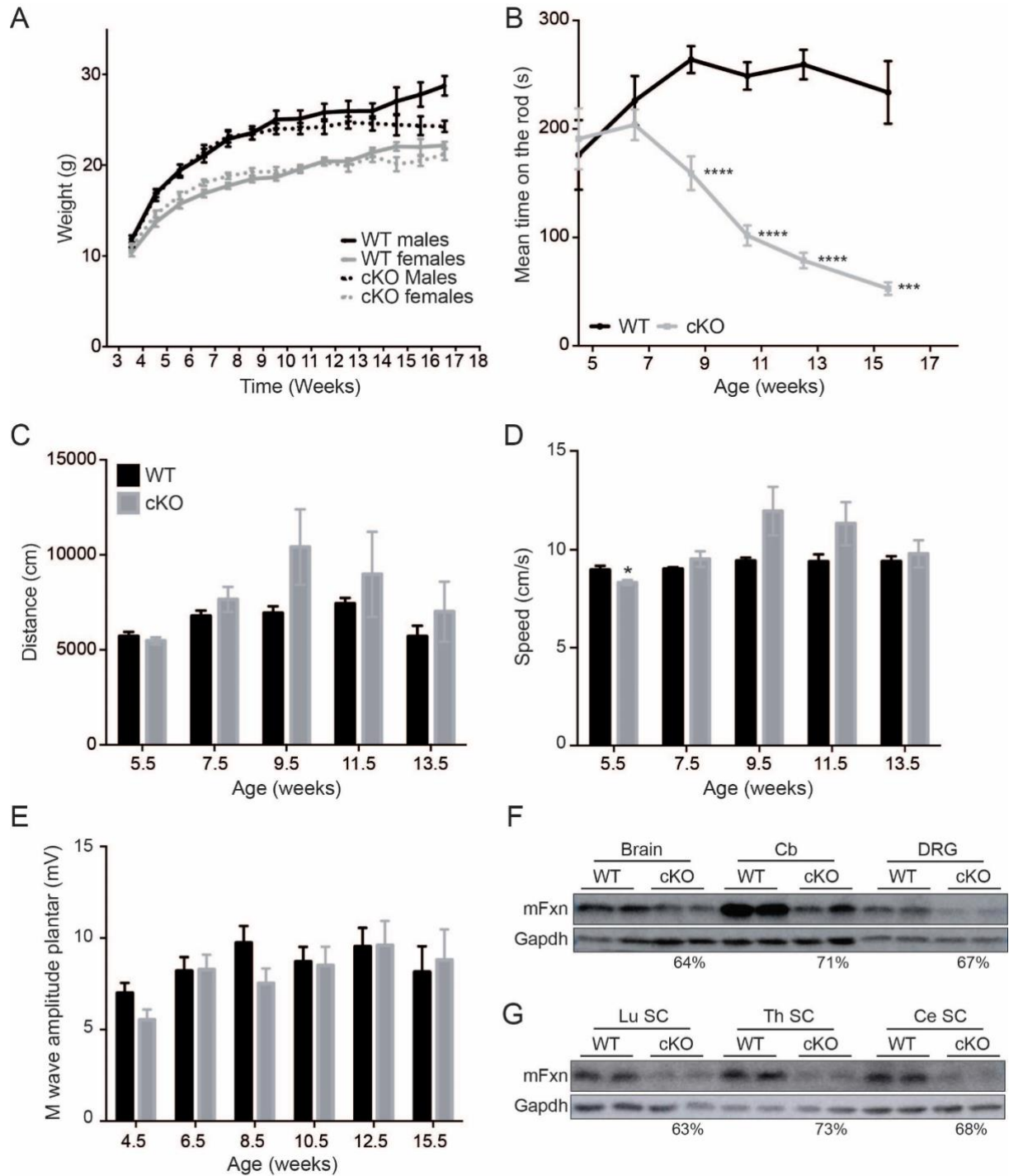


Figure S1: *Pvalb* cKO mice characterization

(A) Growth curve, N= 10 WT and N= 11 *Pvalb* cKO. (B) Evaluation of rotarod performances, N= 10 WT and N= 11 *Pvalb* cKO. (C-D) Openfield analysis with measurement of the distance (C) and mean speed in the arena (D) in a 20 min activity session, N= 6 WT and N= 7 *Pvalb* cKO. (E) Amplitude of motor wave (M-Wave) were recorded after plantar sciatic nerve stimulation, N= 6 WT and N= 7 *Pvalb* cKO. *Pvalb* cKO animals did not differ from control animals. (F-G) Expression of mouse Frataxin (mFXN) protein in brain, cerebellum, total DRG (F) lumbar, thoracic and cervical spinal cord (LuSC, Th SC, Ce SC, respectively) (G) from WT and *Pvalb* cKO mice at 7.5 weeks of age. Percentage of depletion in each tissue is indicated under the western blot. Data are represented as mean +/- SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

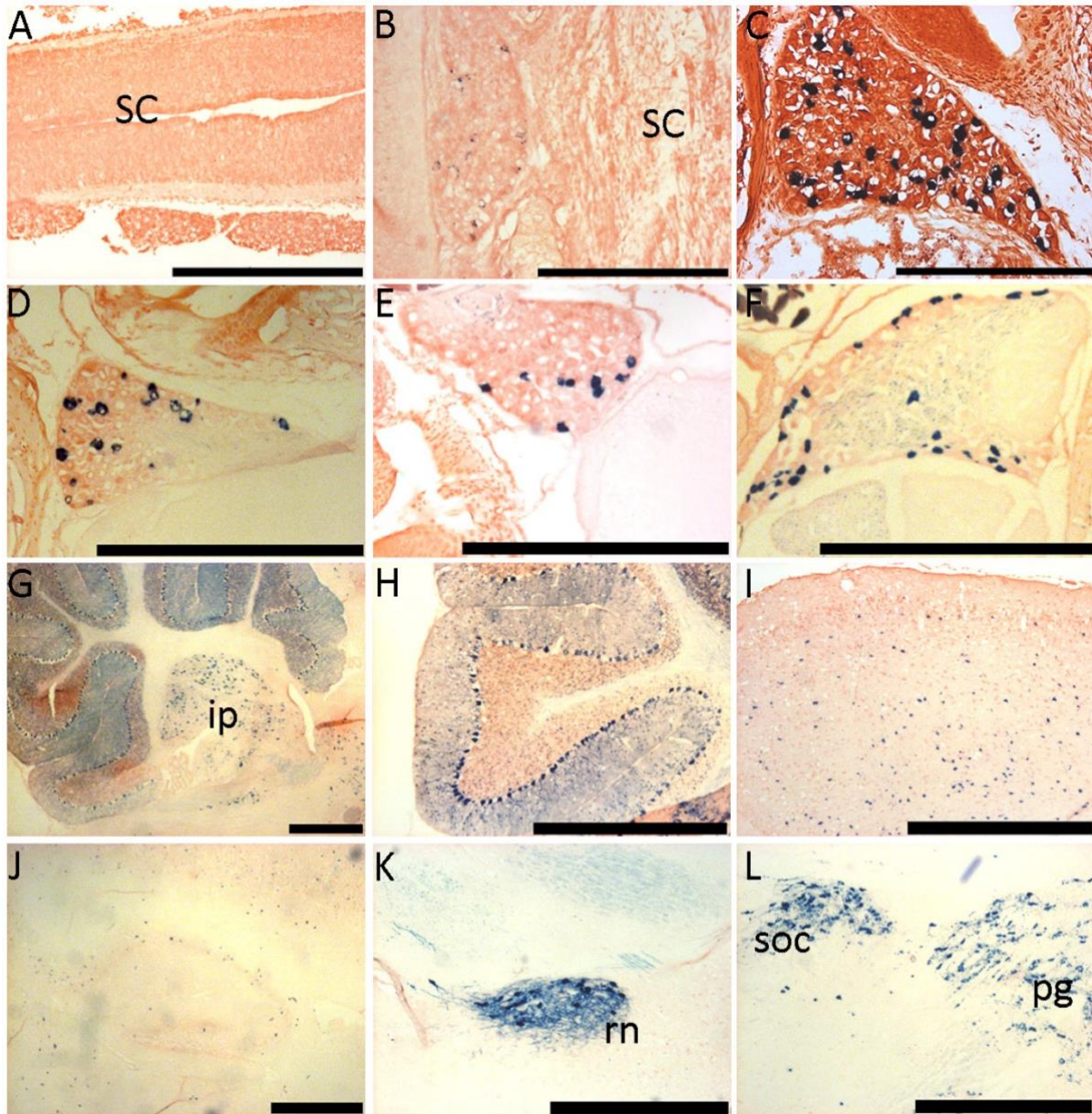


Figure S2: *Pvalb*-Cre expression in DRG and brain overtime.

LacZ staining on frozen section of DRG at E14.5 (A), E17.5 (B) and p8 (C) and at 21.5 weeks in cervical (D), thoracic (E) and lumbar (F) DRG. Enlargements of cerebellum (G-H), cortex (I), hippocampus (J), midbrain (K) and pons (L) at 21.5 weeks; ip: interposed nucleus, rn: red nucleus, soc: superior olive complex, pg: pontine grey. Scale bars, 500 μ m.

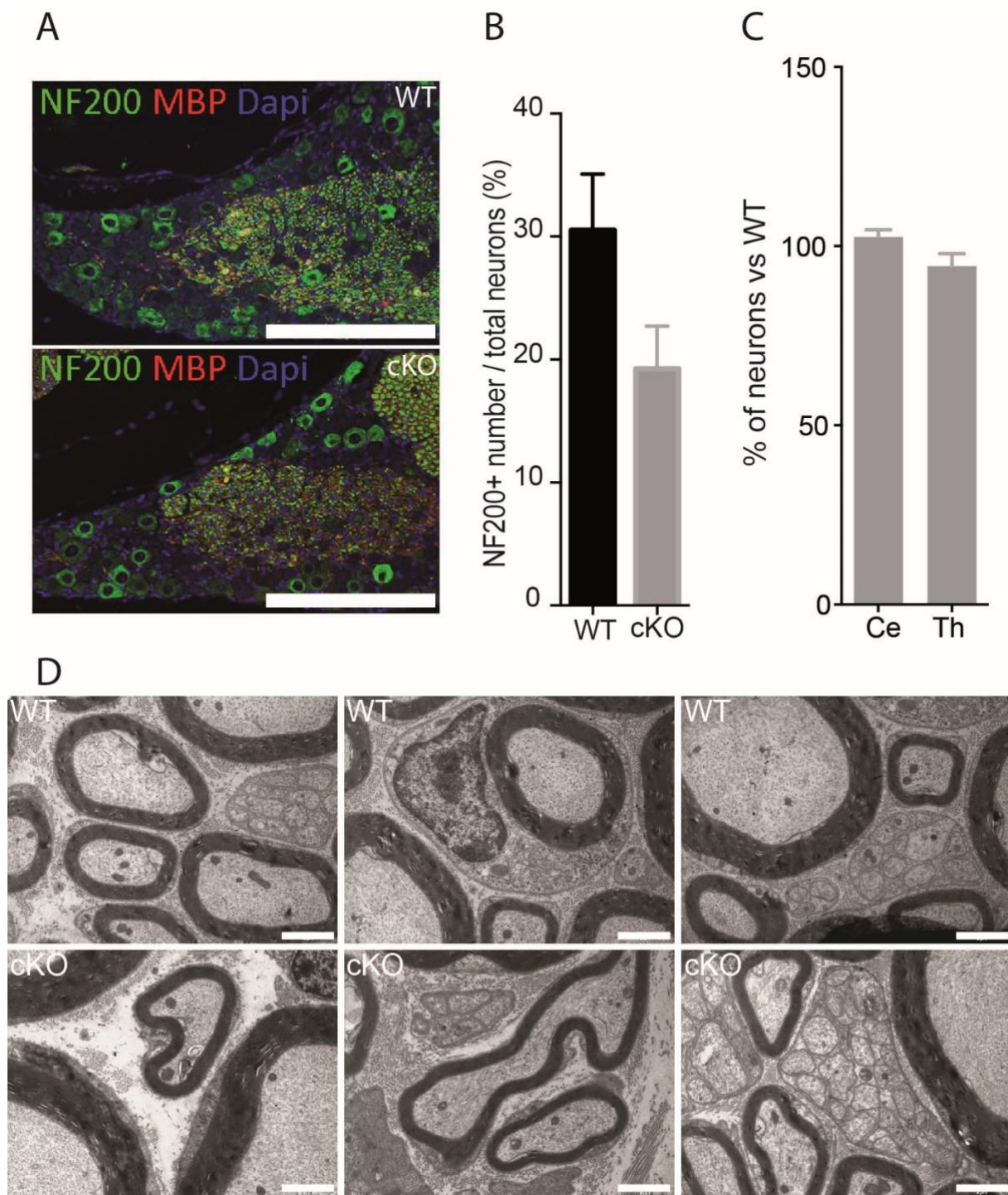


Figure S3: Histological evaluation of *Pvalb* cKO animals.

(A) Representative images of NF200 and MBP co-staining in 21.5 weeks DRG. Scale bars, 200 μ m. (B) Scoring of neurons co-stained with NF200 and MBP showed a 30% loss of large neurons within DRG, N= 4 WT and N= 4 *Pvalb* cKO scored. (C) Mean number of neuron per DRG of WT and *Pvalb* cKO was evaluated at the cervical and thoracic level of the spinal cord, N= 3-4 mice analyzed per group for the cervical and thoracic portions. (D) Ultrathin sections of radial and median nerves at 18.5 weeks. Scale bars, 2 μ m. Data are represented as mean \pm SEM.

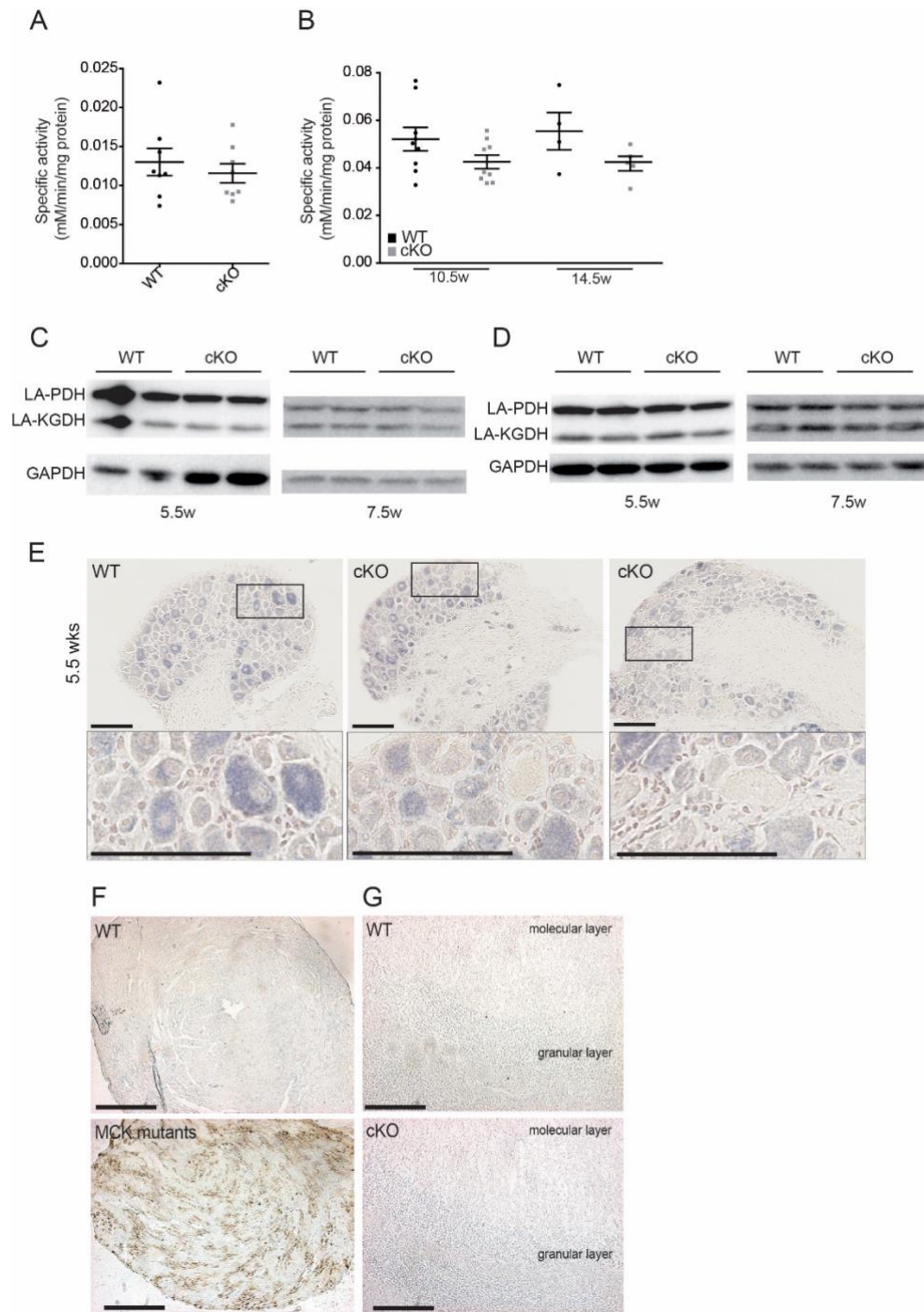


Figure S4: Fe-S cluster protein deficit is not detected on total protein extracted samples.

(A) SDH specific enzymatic activity on lumbar DRG at 7.5 weeks of age, N = 8 per group. (B) SDH specific enzymatic activity on cerebellum samples at 10.5 and 14.5 weeks of age, N= 9 per group at 10.5 weeks, N= 4 per group at 14.5 weeks. (C-D) Expression of Fe-S cluster apoprotein in DRG (C) and cerebellum (D) samples from WT and *Pvalb* cKO mice at 5.5 and 7.5 weeks of age. LA-PDH: lipoic acid bound PDH, LA-KGDH: lipoic acid bound KGDH. (E) Representative SDH histochemical activity staining in lumbar DRG at 5.5 weeks of age WT and *Pvalb* cKO mice. Scale bars, 100 μ m. (F-G) Heart cryosections (apex) from 9 weeks WT and MCK mutant mice¹⁹ (F) and cerebellum cryosections from 13.5 weeks WT and *Pvalb* cKO mice (G) stained with Perl's DAB. Scale bars, 500 μ m.

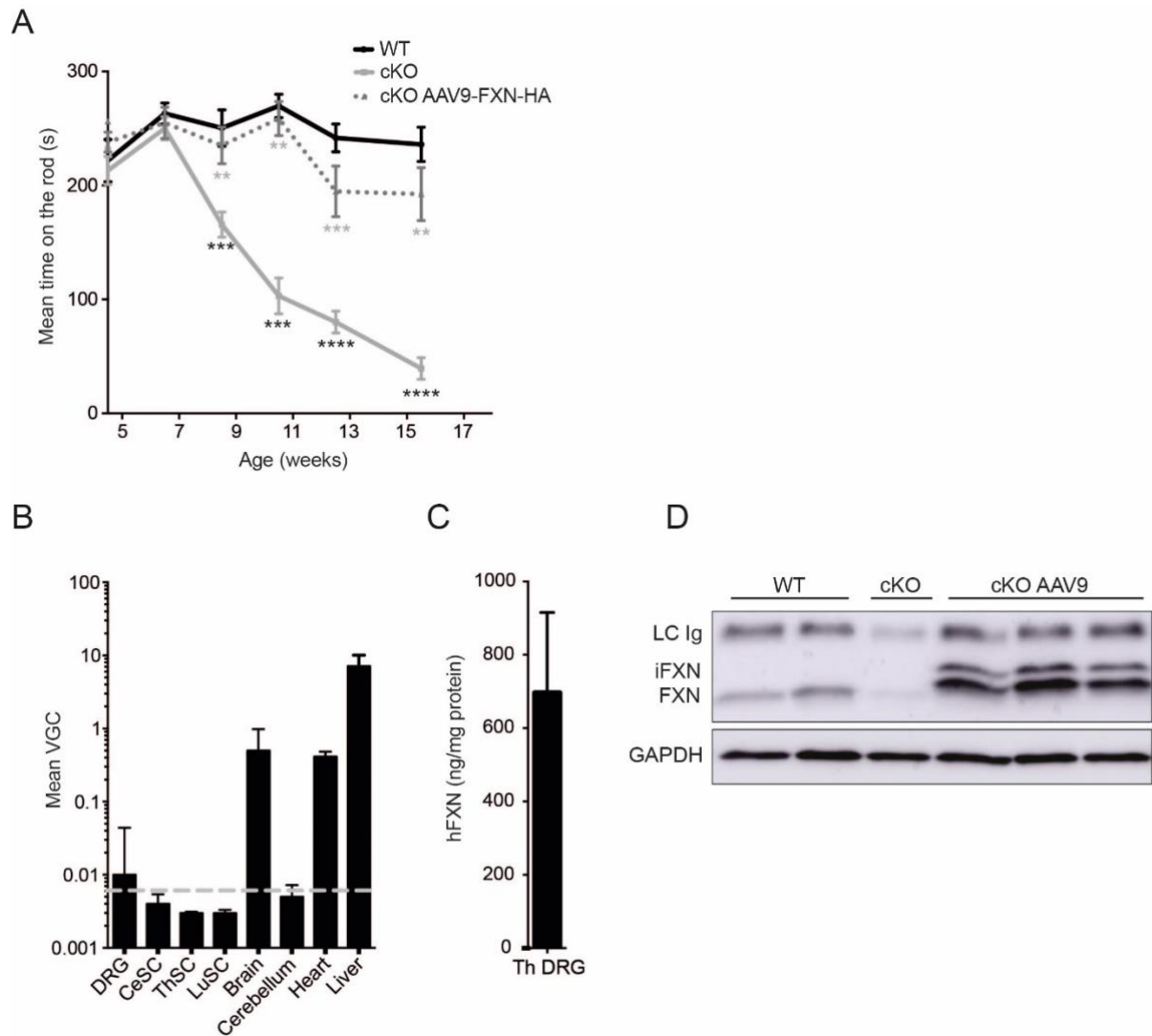


Figure S5: Early symptomatic treatment in *Pvalb* cKO animals

(A) Motor performances after early symptomatic treatment on the rotarod N= 11 WT, N= 9 *Pvalb* cKO and N= 9 *Pvalb* cKOAAV. (B) Biodistribution of AAV9-CAG-hFXN-HA after IV delivery and (C) quantification of human frataxin expression in thoracic DRG by ELISA, N= 3 animals per group. (D) Expression of mouse and human frataxin protein in thoracic DRG from WT, *Pvalb* cKO and *Pvalb* cKOAAV mice at 10.5weeks of age. LC Ig: Immunoglobulins light chains; iFXN: intermediate frataxin; FXN: mature frataxin. Data are represented as mean +/- SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

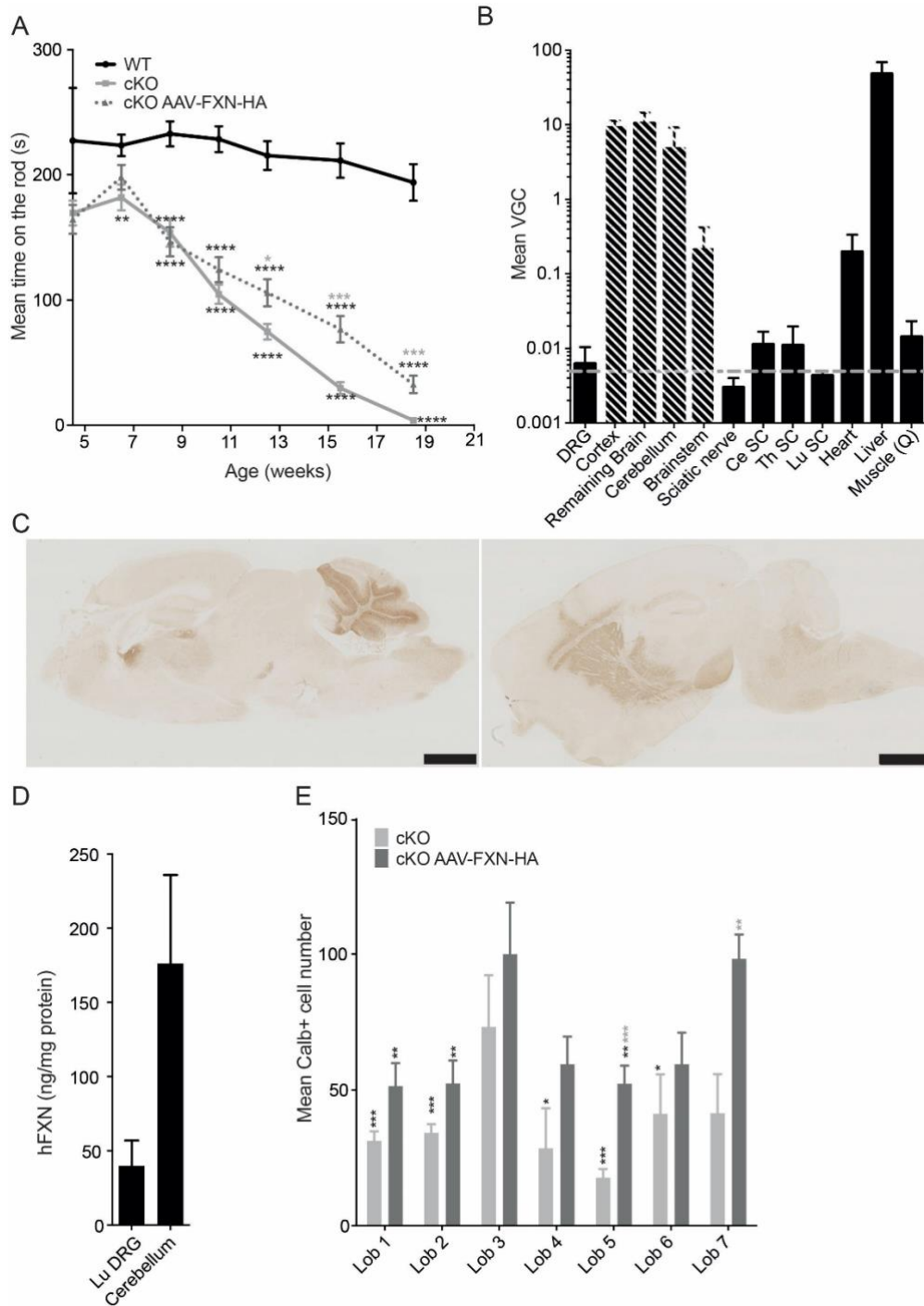


Figure S6: Late symptomatic treatment in *Pvalb* cKO animals

(A) Motor performances after late symptomatic treatment on the rotarod N= 26 WT, N= 29 *Pvalb* cKO and N= 32 *Pvalb* cKOAAV. (B) Biodistribution of AAV-CAG-hFXN-HA after IV and IC delivery, dashed bars correspond to VGC coming mainly from AAVrh10 IC delivery, N= 3. (C) Immunostaining for Frataxin HA expression in brain, Scale bars, 100 μm. (D) Quantification of human frataxin (hFXN) expression in lumbar DRG and cerebellum, N= 3 animals per group. (E) Mean Purkinje cell number in different lobules of the cerebellum of WT, *Pvalb* cKO treated and untreated mice, N= 6 mice analyzed per group. Black stars correspond to p-value versus WT and grey stars versus KO. Data are represented as mean +/- SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

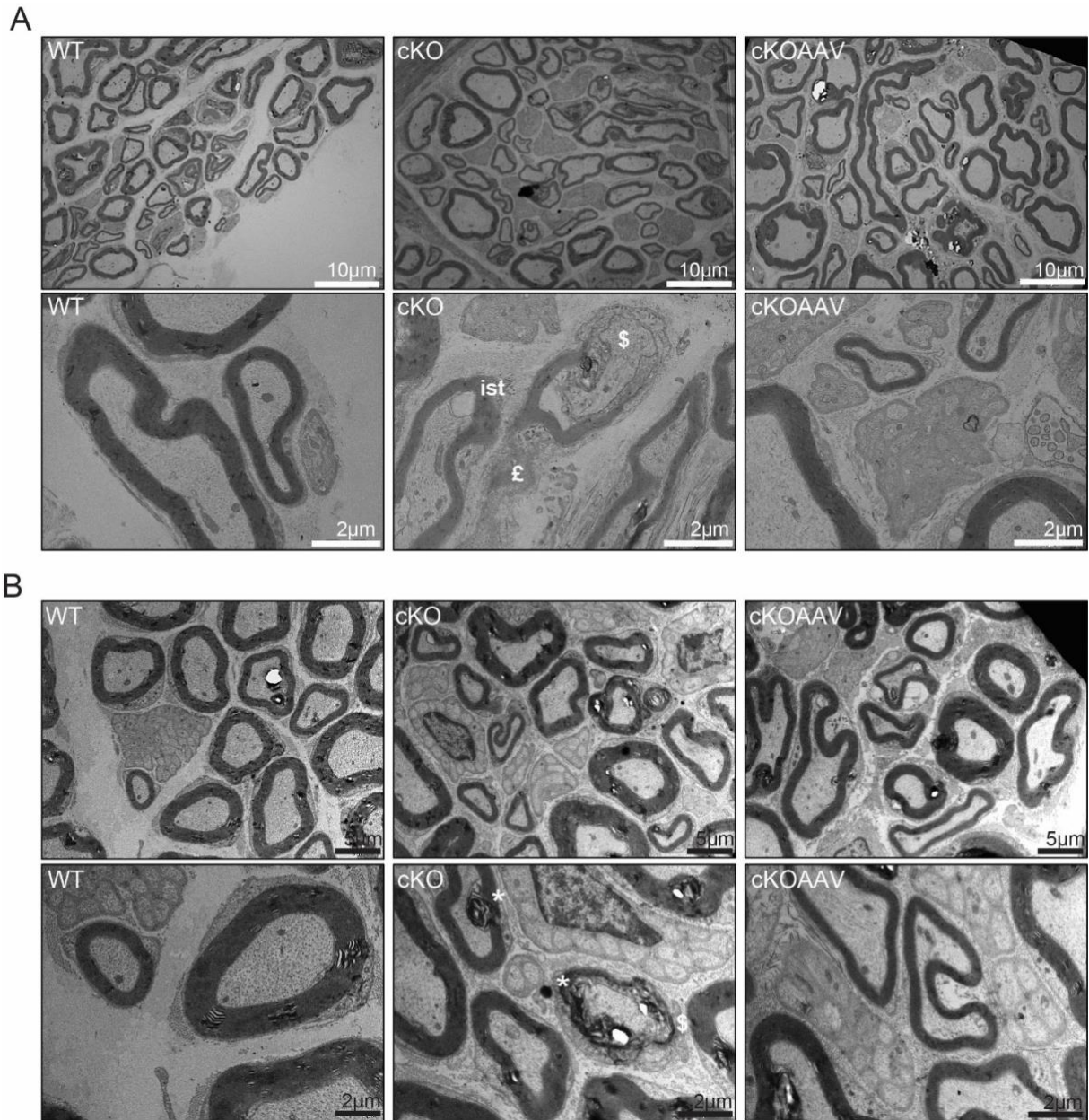


Figure S7: Regeneration process in the sciatic nerve of *Pvalb* cKO animals treated at 7.5 weeks of age.

Ultra-thin sections of sciatic nerves of WT, *Pvalb* cKO untreated and treated at 7.5 weeks and analyzed 1 week (**A**) or 2 weeks (**B**) post injection; ist: inner swelling tongue; £: fibrosis; \$: degeneration; * : myelin debris. Scale bars, indicated sizes.

Table S1: Individual EMG data on characterization cohort

Mice	Sex	Genotype	6.5 weeks		8.5 weeks		10.5 weeks		12.5 weeks	
			Amp M wave	Amp H wave	Amp M wave	Amp H wave	Amp M wave	Amp H wave	Amp M wave	Amp H wave
84	F	WT	3,9	0,4	9,6	0,5	8,4	0,6	6	0,9
86	F	WT	6,9	0,7	3,9	0,5	6,8	1,2	5,7	0,6
87	F	WT	7	1,3	5	1	3,9	0,4	17,7	1,5
97	M	WT	11,8	2,9	9,2	0,8	11,7	0,9	4,8	0,7
98	M	WT	10,9	1,1	8,1	0,6	8,8	0,6	4,6	0,7
110	M	WT	4	0,4	5,3	1	7,7	0,6	7,2	0,4
88	F	KO	8,6	0	9,1	0	10,4	0	3,8	0
89	F	KO	8,4	0,9	3,7	0	4,2	0	12,3	0
90	F	KO	7,7	1,2	4	0	4,4	0	10,5	0
93	M	KO	7,5	0,1	5,4	0	5,4	0	3,5	0
95	M	KO	15,4	1	6,3	0	5,9	0	15	0
109	M	KO	4	0	12,3	0	4	0	11,2	0
111	M	KO	6	0,3	18,7	0	13,3	0	7,3	0

Table S2: ELISA assay on FXN expression

	Mean quantity of frataxin per mg of protein +/- SEM		% of FXN quantity in <i>Pvalb</i> cKO mice compare to WT		FXN level decrease in <i>Pvalb</i> cKO
	WT	<i>Pvalb</i> cKO	WT	<i>Pvalb</i> cKO	
Ce DRG	12.2 +/- 0.6 ng	2.1 +/- 0.2 ng	100%	17.2%	82.80%
Th DRG	25.8 +/- 2.3 ng	7.2 +/- 0.4 ng	100%	27.9%	72.10%
Lu DRG	25.6 +/- 2.1 ng	7.0 +/- 0.6 ng	100%	27.3%	72.70%
Cerebellum	27.8 +/- 0.7 ng	4.6 +/- 0.2 ng	100%	16.5%	83.50%

Table S3: Calculation for determining percentage of FXN expression

	Experimental value	Expected value		Experimental value		Difference between expected value and experimental value	
	WT (<i>Fxn</i> ^{+L3})	Heterozygous without <i>Pvalb</i> Cre expression (<i>Fxn</i> ^{L3L-})		<i>Pvalb</i> cKO (<i>Fxn</i> ^{L3L-} <i>Pvalb</i> Cre)			
	Measured value (in ng of frataxin / mg prot)	Value WT/2 (in ng / mg prot)	Considered % of frataxin in heterozygous tissues	Quantity of frataxin expressed by the tissues (in ng / mg prot)	Equivalent % (vs heterozygotes) expressed by the tissues	Difference between expected value and experimental value (in ng / mg prot)	Equivalent % (vs heterozygotes) expressed by Cre positive cells
Ce DRG	12.2	6.1	100%	2.1	34.4 %	4	65.6 %
Th DRG	25.8	12.9	100%	7.2	55.8 %	5.7	44.2 %
Lu DRG	25.6	12.8	100%	7.0	54.7 %	5.8	45.3%
Cerebellum	27.8	13.9	100%	4.6	33.1 %	9.3	67%

Table S4: Individual EMG data on early-symptomatic treatment cohort

Mice	Sex	Genotype	6.5 weeks		8.5 weeks		10.5weeks		12.5weeks		15.5weeks	
			Amp M wave	Amp H wave	Amp M wave	Amp H wave	Amp M wave	Amp H wave	Amp M wave	Amp H wave	Amp M wave	Amp H wave
32	F	Fxn +/L3	6,4	1,6	7	1,1	5,3	0,9	8,4	1	ND	ND
145	F	Fxn +/L3	3,8	0,4	14,5	0,4	5,4	1,1	5,2	0,3	5,5	1
146	F	Fxn +/L3	7,6	1,6	7,3	1,4	7	0,3	10,4	2,1	7,7	1
141	F	Fxn +/L3	3	0,2	10,5	0,7	10	0,6	16,2	0,7	6,3	0,6
158	M	Fxn L3/L-	5,7	0,2	8,4	1,9	6,8	0,5	4,9	0,3	10,3	0,6
155	M	Fxn +/L3	4	0,3	7,7	0,6	11,3	0,5	3,4	0,5	15,5	0,3
152	M	Fxn +/L3 Pvalb +	7	0,8	14,5	0,2	10,9	0,7	4,9	0,3	2,9	0,2
5	F	Fxn L3/L-	5,1	1	13,2	0,5	14,8	3,1	13,3	0,4	ND	ND
7	F	Fxn L3/L-	11	0,4	10,5	2,3	11,1	0,6	8,1	1,2	ND	ND
16	M	Fxn +/L3	2,7	0	14,1	1,1	5,8	0,4	11,5	0,3	11,1	1,2
25	M	Fxn +/L3	3,9	0,6	4,5	0,6	6,7	1,7	12,2	0,6	5,8	0,8
30	F	Fxn L3/L- Pvalb +	15,4	1	9,6	0,6	15,5	0	5,4	0	ND	ND
34	M	Fxn L3/L- Pvalb +	8,1	0,5	7,6	0,1	4,9	0	9,9	0	ND	ND
151	F	Fxn L3/L- Pvalb +	6,2	0	5,8	0	5,7	0	2,6	0	16,1	0
143	F	Fxn L3/L- Pvalb +	17,5	0	10	0,4	11,7	0	10,2	0	6,4	0
153	M	Fxn L3/L- Pvalb +	10	0	1,5	0	1,6	0	7,1	0	10,6	0
154	M	Fxn L3/L- Pvalb +	12	0,3	8	0	7,2	0	7	0	4,2	0
15	M	Fxn L3/L- Pvalb +	9,8	0,5	11,1	0	12,5	0	12,5	0	6,2	0
37	M	Fxn L3/L- Pvalb +	10	0	3,9	0	3,6	0	ND	ND	12,7	0
58	F	Fxn L3/L- Pvalb +	9,7	1,2	12,9	0,6	11,6	0,7	ND	ND	5,4	0
142	F	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	11,5	0,9	9,3	0,5	7,4	0,4	12,5	2,9	3	0,7
149	F	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	4,8	1,1	8,8	0,4	6,1	0,5	10,4	1,1	13,3	0,7
156	M	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	9,1	0,6	4	0,2	9,4	0,9	4,4	0,4	7,5	1
157	M	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	4,9	0,7	5	1,3	3	0,3	5	0,2	6,6	0,1
159	M	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	6,3	0,8	8,7	2,2	6,4	0,6	10,3	0,7	4,6	0,6
6	F	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	7,4	0,7	10,1	1,2	12	3,2	6,4	0,6	ND	ND
8	F	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	8,7	0,6	11	0,9	13,3	0,6	9,7	0,8	ND	ND
39	M	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	2,1	0,4	8,2	2,5	4,5	0,9	ND	ND	4,3	1,1
62	M	Fxn L3/L- Pvalb + AAV	11,6	1,2	9	2	14,1	1,2	ND	ND	16,1	1

ND: not determined because mouse would not sleep

Table S6: Stereotaxic coordinates for injection

Injection site	Stereotaxic coordinates from the Bregma		
	Antero-posterior (AP)	Medio-lateral (ML)	Dorso-ventral (DV)
Striatum 1st injection site	+0.5mm	+2.2mm	-3.3mm
Striatum 2nd injection site	+0.5mm	-2.2mm	-3.3mm
White matter of the cerebellum	-6.48mm	0mm	-2.5mm

Table S7: List of antibodies used

	Antibodies	Application	Used Concentration	Species	Reference	Company
primary antibodies	Anti HA-TAG	IF	1: 250	rabbit	C29F4	Cell Signalling Technology
	Anti Calbindin	IF	1: 500	rabbit	CB38-A	Swant swiss Antibodies
	Anti MBP	IF	1: 200	mouse	SMI-94	Calbiochem
	Anti NF-200	IF	1: 200	chicken	ab4680	Abcam
	Anti TfR1	IF	1: 500	rabbit	ab84036	Abcam
	Anti GFAP	IF	1: 500	guinea pig	173004	Synaptic systems
	Anti frataxin polyclonal	WB	1: 1,000	rabbit	R1250	IGBMC
	Anti frataxin monoclonal	WB	1: 1,000	mouse	4F9	IGBMC
	Anti GAPDH	WB	1: 20,000	mouse		IGBMC
Anti lipoic acid	WB	1: 5,000	rabbit	437695	Calbiochem	
secondary antibodies	Biotinylated Anti-Rabbit IgG	IF	1: 500	goat	BA-1000	Vector laboratories
	Anti-Rabbit IgG 488	IF	1: 1,000	goat	A-11008	Life Technologies
	Anti-Mouse IgG 594	IF	1: 1,000	goat	A-11005	Life Technologies
	Anti-Chicken IgG 488	IF	1: 1,000	donkey	703-545-155	Interchim SA
	Anti-Rabbit IgG 594	IF	1: 1,000	goat	A-11037	Life Technologies
	Anti-Guinea pig IgG 488	IF	1: 1,000	goat	A-11073	Life Technologies
	Peroxydase Anti-mouse IgG	WB	1: 5,000	goat	115-035-046	Jackson ImmunoResearch
	Peroxydase Anti-rabbit IgG	WB	1: 5,000	goat	115-035-146	Jackson ImmunoResearch

Supplemental results:

Validation of expression of Pvalb-Cre transgene

As endogenous parvalbumin expression is not restricted to the proprioceptive sensory neurons (<http://mouse.brain-map.org/gene/show/19056>) and behavioral analysis clearly showed that the *Pvalb* cKO develop a cerebellar/cortical phenotype, in addition to the sensory neuropathy, we evaluated the tissue specificity and the temporal expression of the *Pvalb-Cre* transgene in *Pvalb^{tm1(Cre)Arbr/J}* transgenics using the ROSA26/LacZ reporter stain. LacZ expression was analyzed at several time points: E14.5, E17.5, P8, P40 and 21.5 weeks. While no LacZ staining was detected at E14.5, positive LacZ in DRG was observed at E17.5 (Figure S2A-B). By p8, approximately 15% of DRG neurons were positive for LacZ (Figure S2C) and in a similar manner in cervical, thoracic and lumbar DRG (Figure S2D-F respectively). Therefore, the *Pvalb-Cre* expression in the DRG starts between E14 and E17.5 as described previously²¹ and is fully expressed by p8. No LacZ staining was detected in peripheral nerves. In the central nervous system, no LacZ staining was seen at p8. At p40, LacZ staining was specifically detected in Purkinje cells (Figure S2G-H). At 21.5 weeks, positive LacZ staining was detected in the interposed nucleus, a deep central grey nucleus (Figure S2G), in interneurons in the cortex (Figure S2I), few positive cells in the hippocampus (Figure S2J), strong staining in the majority of the red nucleus (Figure S2K), superior olivary complex and the pontine grey (Figure S2L). No LacZ positive staining was detected in any peripheral tissues at any time point analyzed.

Quantification of frataxin expression

WT animals are +/L3 for the frataxin allele, meaning that they express 100% of frataxin in all tissues. *Pvalb* cKO animals are heterozygous for the frataxin locus (*Fxn^{L3/L-}*) in all cells except the cells expressing the Cre recombinase which are homozygous for the depletion (*Fxn^{L-/L-}*). Thus, we expect 50% of frataxin expression in the heterozygous cells (*Fxn^{L3/L-}*) and no expression in the knocked-out cells (*Fxn^{L-/L-}*). By measuring frataxin levels in the heterogeneous tissues of interest (DRG and cerebellum), we can determine the amount/percentage of frataxin expressed by the Cre positive cells (Expected values in heterozygotes animals – experimental values in *Pvalb* cKO animals).

Example for calculation in lumbar DRG (other tissues are in table S2 and S3):

25.6ng of frataxin per mg of protein were experimentally measured in WT lumbar DRG. Therefore, we expect 12.8 ng of frataxin per mg of protein in heterozygous lumbar DRG without *Pvalb-Cre* expression (considered as 100%). Upon *Pvalb-Cre* expression 7.0 ng of frataxin were measured (~55%). Thus, the Cre positive cells express 5.8 ng of frataxin per mg of protein ($12.8 - 7.0 = 5.8$), approximately 45%.

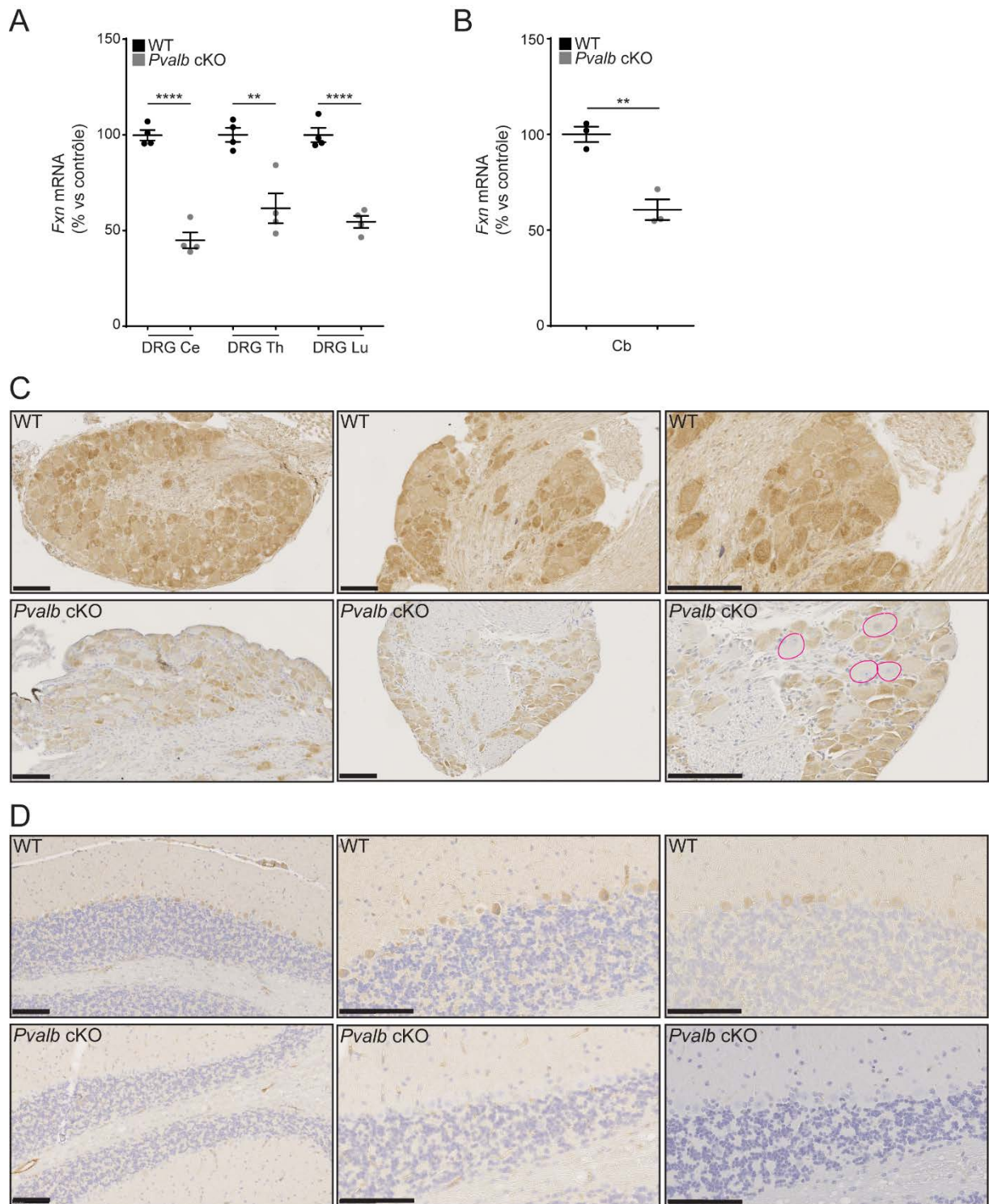


Figure 42 : Absence de corrélation entre les quantités d'ARNm *Fxn* et de FXN produites dans les DRG et le cervelet.

(A) Expression d'ARNm *Fxn* dans des DRG cervicaux (Ce), thoraciques (Th) et lombaires (Lu) à 7,5 semaines, n = 4. (B) Expression d'ARNm *Fxn* dans le cervelet de souris WT et *Pvalb* cKO à 20,5 semaines, n = 3. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM (les WT étant à 100%) et les valeurs individuelles. * p<0,05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001 ; ****p<0.0001. (C-D) Immunohistochimies anti-FXN dans des DRG lombaires (C) et des cervelets (D) d'animaux WT et *Pvalb* cKO à 11,5 semaines (contre-coloration à l'hématoxyline). Les cercles roses entourent les larges neurones des DRG présentant une absence de marquage. Barre de taille, 100 μ m.

2.4. Résultats complémentaires au manuscrit

2.4.1. Expression du gène *Fxn* et de la frataxine

Grâce à une approche de type ELISA, nous avons observé une baisse de de 72 à 83% de frataxine dans les DRG, indiquant une expression de 44 à 66% de la frataxine totale des DRG par les neurones proprioceptifs (Piguet, de Montigny et al., 2018 Figure 1E et F). En parallèle de la mesure des niveaux de frataxine par approche ELISA et par Western Blot (Piguet, de Montigny et al., 2018 Figure S1F et G), les niveaux de transcrits *Fxn* ont été évalués dans les DRG et le cervelet par qRT-PCR (Figure 42A et B). Dans les DRG *Pvalb* cKO, et ce pour l'ensemble des temps évalués (de 3,5 à 18,5 semaines), les résultats obtenus par qRT-PCR sont similaires et fluctuent entre 48 et 60% d'expression du gène *Fxn* par rapport aux contrôles ($Fxn^{+/L3}$). Ainsi, l'ARNm *Fxn* n'est pas drastiquement diminué dans les DRG *Pvalb* cKO comme au niveau protéique. En effet la baisse de 50% de l'ARNm *Fxn* présentée par les animaux *Pvalb* cKO, dans les trois sections des DRG est attendu (souris hétérozygotes pour le gène *Fxn* : $Fxn^{L3/L-}$) (Figure 42A). Il semblerait donc que l'ensemble des cellules des DRG expriment la même quantité de transcrit *Fxn*. Les neurones proprioceptifs ne représentant que 7,5% des cellules, nous ne détectons pas l'absence du transcrit dans ces cellules de par la dilution du signal. Il n'y a donc pas de corrélation entre les quantités d'ARNm *Fxn* et de protéine FXN produites dans les cellules des DRG. Il en est de même dans le cervelet, les cellules de Purkinje (CP) et les noyaux gris profonds expriment 67% de la frataxine mais nous n'observons qu'une diminution de 40% de l'ARNm *Fxn* (Figure 42B), supposant une absence de corrélation.

J'ai tenté de valider le déficit de l'activité SDH (Piguet, de Montigny et al., 2018 Figure 3A) spécifiquement dans les neurones déplétés en frataxine, donc supposément les neurones proprioceptifs par différentes approches, par exemple des immunofluorescences anti-FXN sur des coupes de DRG adjacentes aux coupes utilisées pour le marquage histoenzymatique SDH, mais sans succès. En effet, la quantité de frataxine exprimée dans le système nerveux étant faible par rapport au cœur par exemple, nous n'arrivions pas à détecter la frataxine endogène par immunomarquage. Récemment, un marquage anti-FXN par immunohistochimie a été mis au point dans le laboratoire par N. Vaucamps, avec un anticorps anti-FXN monoclonal (clone 4F9). Les résultats présentés dans la figure 42C et D correspondent aux premiers tests de marquage dans les DRG et le cervelet de souris WT et *Pvalb* cKO âgées de 11,5 semaines. Certains larges neurones des DRG *Pvalb* cKO présentent une absence de marquage FXN (Figure 42C, neurones cerclés en rose), alors

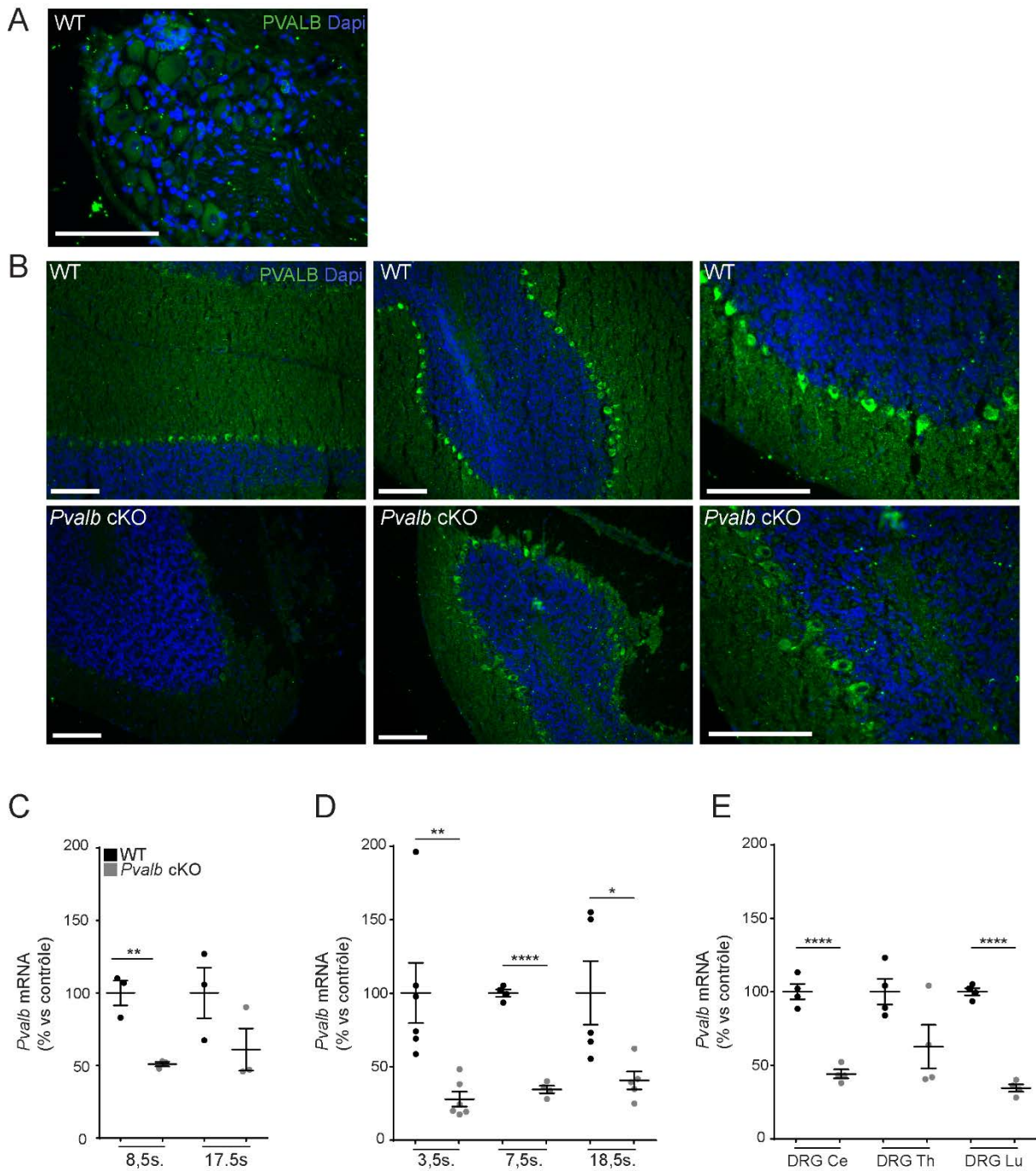


Figure 43 : Dérégulation de l'expression de la parvalbumine dans les souris *Pvalb* cKO.

(A) Absence de marquage spécifique pour la parvalbumine (PVALB) dans des DRG WT à 7,5semaines. Carre de taille, 100µm (B) Images représentatives d'immunofluorescences PVALB dans des cervelets de souris WT et *Pvalb* cKO à 13,5semaines. Barre de taille, 100µm. (C) Expression de l'ARNm *Pvalb* dans des cervelets de souris WT et *Pvalb* cKO à 8,5 et 17,5semaines, n = 3. (D) Expression de l'ARNm *Pvalb* dans des DRG lombaires WT et *Pvalb* cKO à 3,5 ; 7,5 et 18,5semaines, n = 6 à 3,5s, 4 à 7,5s et 5 à 18,5s. (E) Expression de l'ARNm *Pvalb* dans des DRG cervicaux, thoraciques et lombaires WT et *Pvalb* cKO à 7,5 semaines, n = 6. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM (les WT étant à 100%) et les valeurs individuelles. * p<0,05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001 ; ****p<0.0001.

que l'ensemble des neurones WT sont positifs à la frataxine mais avec différentes intensités de marquage. Il serait intéressant de quantifier les neurones négatifs pour la frataxine dans les DRG *Pvalb* cKO ainsi que les différents niveaux d'expression des neurones WT. Dans les cervelets WT, les cellules de Purkinje expriment la majorité de la frataxine (les noyaux gris profonds n'étaient pas sur les coupes immuno-marquées) (**Figure 42D**). Bien que le marquage soit relativement faible dans les souris WT, les cellules de Purkinje *Pvalb* cKO sont négatives pour la frataxine. Au vu des niveaux d'expression de frataxine observés par ELISA dans le système nerveux (DRG et cervelet : entre 25 et 30ng/mg de protéines totales) par rapport au cœur (150ng/mg de protéines totales) on ne s'attend pas à un marquage très fort dans les souris contrôles. Ces premiers résultats d'IHC semblent corrélés avec les résultats d'ELISA aussi bien dans les DRG que dans le cervelet.

2.4.2. Dérégulation de l'expression de la parvalbumine

Le seul marqueur spécifique aux neurones proprioceptifs adultes dans les DRG est la parvalbumine (PVALB). Les autres marqueurs neuronaux des DRG sont synthétisés dans différentes populations, tel que TrkC qui est synthétisé dans les neurones proprioceptifs ainsi que les neurones mécanoréceptifs. J'ai donc cherché à établir des immunofluorescences anti-PVALB (en partie pour la validation du déficit SDH spécifiquement dans les neurones proprioceptifs). Malgré plusieurs protocoles testés, je n'arrive pas à détecter correctement la parvalbumine dans les coupes de DRG (**Figure 43A**). Ceci est probablement dû à la quantité de protéine exprimée dans les DRG (trop faible pour être détectée) puisque l'anticorps détecte la protéine endogène sur des coupes de cervelet (**Figure 43B**). Je n'arrive pas non plus à détecter la protéine par Western Blot (non présenté). A 13,5 semaines chez les souris WT, l'ensemble des cellules de Purkinje (CP) expriment bien la parvalbumine (**Figure 43B**). Au niveau des cervelets des souris *Pvalb* cKO, les CP, relativement désorganisées, sont également positives à la parvalbumine mais avec un signal fluorescent moins intense, indiquant une diminution de l'expression de la protéine. Cette diminution d'expression est également retrouvée au niveau transcriptionnel. En effet, dans les cervelets, à 8,5 semaines les souris *Pvalb* cKO expriment 50% de transcrit *Pvalb* par rapport aux contrôles (**Figure 43C**). A 17,5 semaines cette diminution est également présente mais non significative de par une large variabilité entre échantillons. Il en est de même dans les DRG lombaires à différents âges avec une diminution de l'ARNm *Pvalb* encore plus forte (**Figure 43D**), 30 à 40% d'expression *Pvalb* dans les DRG *Pvalb* cKO par rapport aux WT. En regardant les différents niveaux des DRG (ce, th et lu), à 7,5 semaines, la diminution de l'expression du

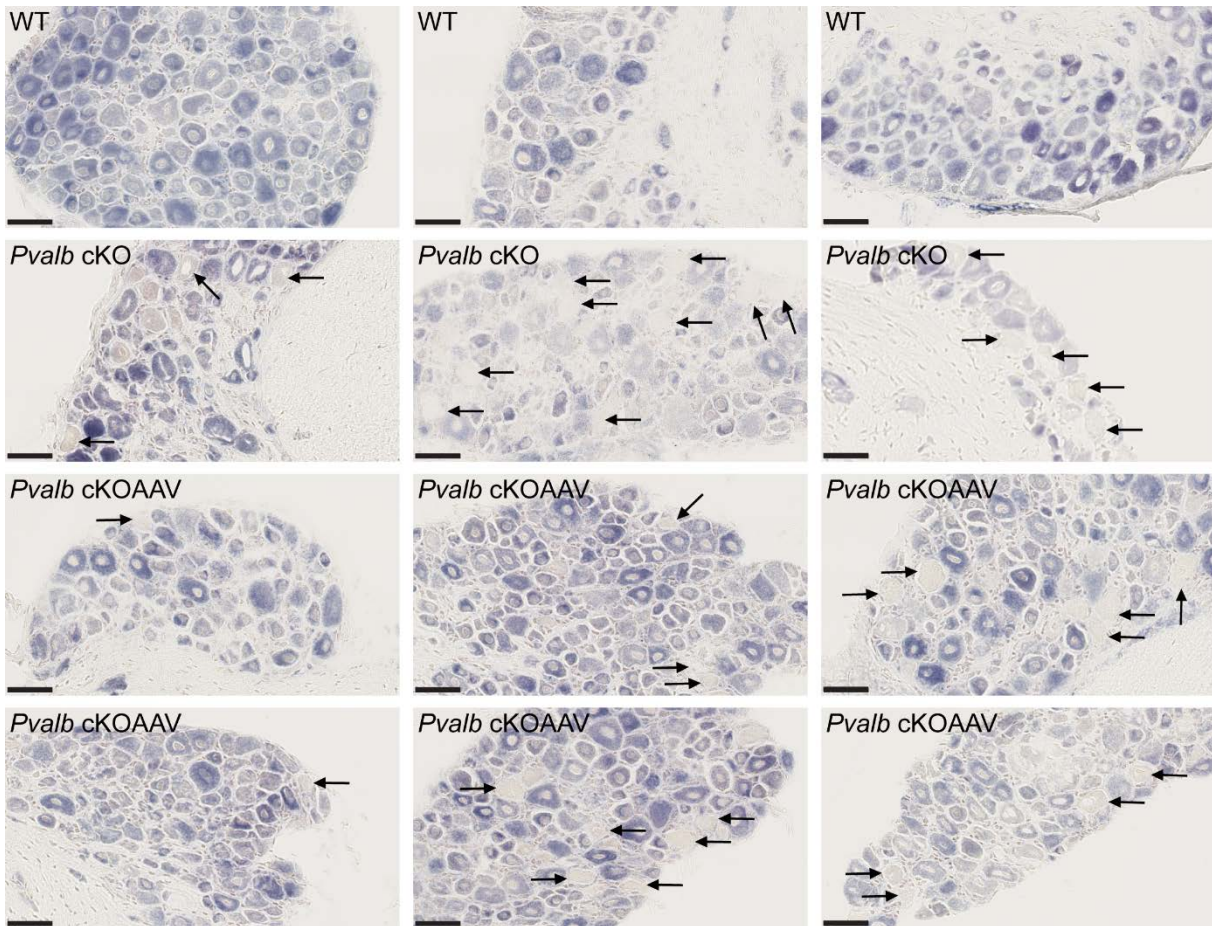


Figure 44 : Déficit sévère de l'activité SDH à des temps tardifs dans les animaux *Pvalb* cKO et correction partielle suite au traitement post-symptomatique des souris.

Images représentatives de marquages histoenzymatiques SDH de souris WT, *Pvalb* cKO non traitées (*Pvalb* cKO) et traitées (*Pvalb* cKOAAV) dans les DRG Lu à 18,5 semaines. Barre de taille, 50µm.

transcrit *Pvalb* est significative dans les DRG cervicaux et lombaires mais pas dans les DRG thoraciques *Pvalb* cKO (**Figure 43E**, 44% de *Pvalb* exprimés dans les DRG Ce *Pvalb* cKO par rapport aux contrôles, 63% dans les DRG Th et 34% dans les DRG Lu). La forte variabilité entre échantillons (DRG Th *Pvalb* cKO à 7,5 semaines) provient probablement de la variabilité entre animaux mais également d'un biais induit par l'expérimentateur au moment de la dissection technique des DRG et de la séparation des sections cervicales, thoraciques et lombaires. L'expression résiduelle de parvalbumine dans les neurones proprioceptifs des DRG *Pvalb* cKO à des temps tardifs (**Figure 43D**, 18,5 semaines) permet de supposer qu'une partie au moins des neurones proprioceptifs bien que complètement déficients sont encore présents, ce qui pourrait expliquer la large variabilité entre échantillons.

2.4.3. Déficit des protéines à centres Fe-S à des temps tardifs dans les DRG *Pvalb* cKO et correction partielle chez les *Pvalb* cKOOAV

A 5,5 et 8,5 semaines des déficits de l'activité SDH dans certains neurones ont été observés avec 7 à 8% de neurones SDH négatifs dans les DRG lombaires des animaux *Pvalb* cKO (Piguet, de Montigny et al., 2018, **Figure 3A** et **B**). A 8,5 semaines, une semaine post traitement, les résultats SDH n'étaient pas différents entre souris *Pvalb* cKO traitées et non traitées (Piguet, de Montigny et al., 2018, **Figure 6E**). L'activité SDH a également été évaluée à des temps tardifs dans les DRG lombaires de souris WT et *Pvalb* cKO non traitées et traitées à 7,5 semaines, âge auquel le déficit Fe-S est déjà présent (**Figure 44**). A 18,5 semaines, les DRG des souris *Pvalb* cKO sont très friables et leur coupe au cryostat est, de ce fait, compliquée en comparaison aux DRG lombaires WT et *Pvalb* cKOOAV. Nous avons donc peu de coupes *Pvalb* cKO utilisables et donc ces résultats sont à exploiter précautionneusement. Ce manque d'intégrité de la structure des DRG résulte probablement des dégénérescences massives des neurones proprioceptifs et de leurs axones. En comparaison aux DRG WT, les DRG *Pvalb* cKO présentent des neurones négatifs pour l'activité SDH (**Figure 44**, flèches noires). A cet âge-tardif, même si il y a probablement une perte de certains neurones proprioceptifs, certains, bien que totalement dégénérés et non fonctionnels, sont encore présents (malgré l'absence de frataxine depuis le jour embryonnaire E17,5). Ce point est intéressant pour les approches de TG chez les patients. Pour les souris traitées, la structure des DRG est intègre et similaire aux WT, mais certains neurones présentent encore une absence d'activité SDH (**Figure 44**). Les neurones SDH négatifs n'ont pas été quantifiés, mais visuellement, il semblerait qu'il y en ait moins que

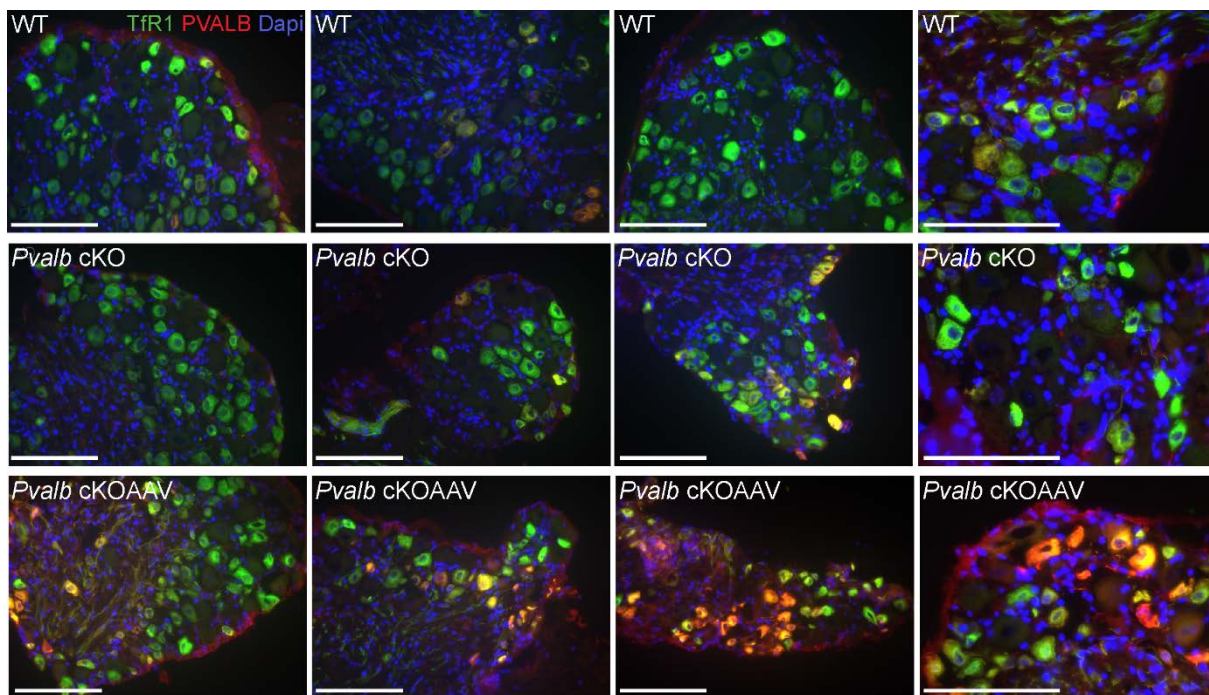


Figure 45 : Expression de TfR1 dans de nombreux neurones des DRG WT, *Pvalb* cKO et *Pvalb* cKOAAV et surexpression de la parvalbumine dans les neurones proprioceptifs des souris traitées.

Images représentatives d'immunofluorescences TfR1 (vert) et Pvalb (rouge) dans des DRG de souris WT, *Pvalb* cKO non traitées et traitées âgées de 8,5s (une semaine post traitement). Barres de taille, 100µm.

dans les souris non traitées ainsi que dans les DRG *Pvalb* cKOAAV à 8,5 semaines. La correction des neurones proprioceptifs des DRG n'est donc pas totale, mais suffisante puisque l'ataxie sensitive est parfaitement corrigée avec des ondes sensibles similaires à celles de souris WT dans les analyses électrophysiologiques (EMG) (([Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 5D](#)).

2.4.4. Evaluation du métabolisme du fer dans les DRG

En parallèle de l'analyse de la dérégulation du métabolisme du Fer dans les cervelets, l'expression de TfR1 a été évaluée dans les DRG lombaires. Les résultats sont similaires à 5,5 semaines (données non présentées) et à 8,5 semaines (**Figure 45**). De nombreux neurones des DRG WT expriment fortement TfR1 (en comparaison aux cellules du cervelet). Si, comme dans les cellules de Purkinje déficientes en frataxine, il y a une dérégulation du métabolisme du fer dans les DRG, je ne suis pas en mesure de détecter une différence d'expression de TfR1 dans les neurones proprioceptifs *Pvalb* cKO (qui ne représentent que 15% des neurones des DRG). Pour essayer de palier à cela et pour distinguer les neurones proprioceptifs des autres neurones, j'ai essayé de co-marquer les DRG pour TfR1 et PVALB (bien que l'anticorps anti-PVALB ne soit pas efficace dans les DRG, section 2.4.2 et Figure 43) (**Figure 45**) mais sans succès.

De manière intéressante, une semaine après traitement post-symptomatique, à 8,5 semaines, aucune différence pour le récepteur à la transferrine n'est observée, entre les souris *Pvalb* cKO traitées, non traitées et WT, mais, les neurones proprioceptifs *Pvalb* cKOAAV surexpriment la parvalbumine (**Figure 45**). Par rapport aux DRG WT et *Pvalb* cKO, il y a probablement suffisamment de protéine PVALB exprimée par les neurones pour être détectée par l'anticorps anti-PVALB. Cette surexpression de la parvalbumine peut traduire une réponse générale des neurones proprioceptifs une semaine après injection du vecteur viral.

Les niveaux protéiques de TfR1 ainsi que de FRTL (une autre cible de IRP1 lorsque celui-ci joue un rôle de facteur de transcription, identifiée comme sous-exprimée dans les modèles non-neuronaux de l'AF, Introduction, Chapitre 1, paragraphe 5) ont été analysés par Western Blot sur des extraits totaux. Encore une fois, due à la dilution des signaux, aucune différence n'est observée (données non présentées). De plus, l'anticorps anti-FRTL que nous avons au laboratoire ne fonctionne pas en immunofluorescence, aussi bien dans le cervelet que dans les DRG (données non présentées).

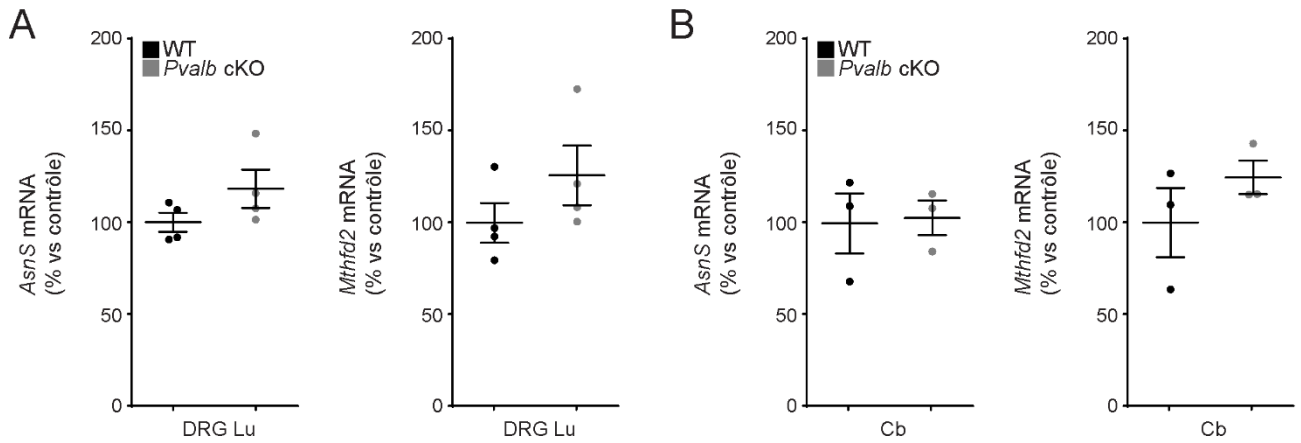


Figure 46 : Les DRG et le cervelet n'expriment pas différemment les gènes *Mthfd2* et *AsnS*.

(A) Expression des ARNm *AsnS* et *Mthfd2* dans des DRL lombaires de souris WT et *Pvalb* cKO de 7,5 semaines, n = 4. (B) Expression des ARNm *AsnS* et *Mthfd2* dans les cervelets de souris WT et *Pvalb* cKO de 17,5 semaines, n = 3. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM (les WT étant à 100%) et les valeurs individuelles.

2.4.5. Gènes de stress classiquement associés à la déficience en frataxine

Dans les modèles non neuronaux de l'AF, suite à la déplétion en frataxine et au déficit des protéines à centre Fe-S, une réponse au stress se met en place dans les cellules avec par exemple la forte surexpression de gènes tel que *AsnS* et *Mthfd2* (Seznec et al., 2005). Ces gènes sont activés en réponse à un stress du réticulum endoplasmique ou à un stress lié à la dépravation en acide aminés. Dans les DRG lombaires et le cervelet des souris *Pvalb* cKO, les niveaux d'expression de ces gènes sont similaires aux contrôles (**Figure 46**). Comme pour les autres données obtenues sur des extraits totaux, l'absence de différence entre mutants et contrôles ne permet pas de conclure quand à une absence de réponse au stress due à la potentielle dilution des signaux.

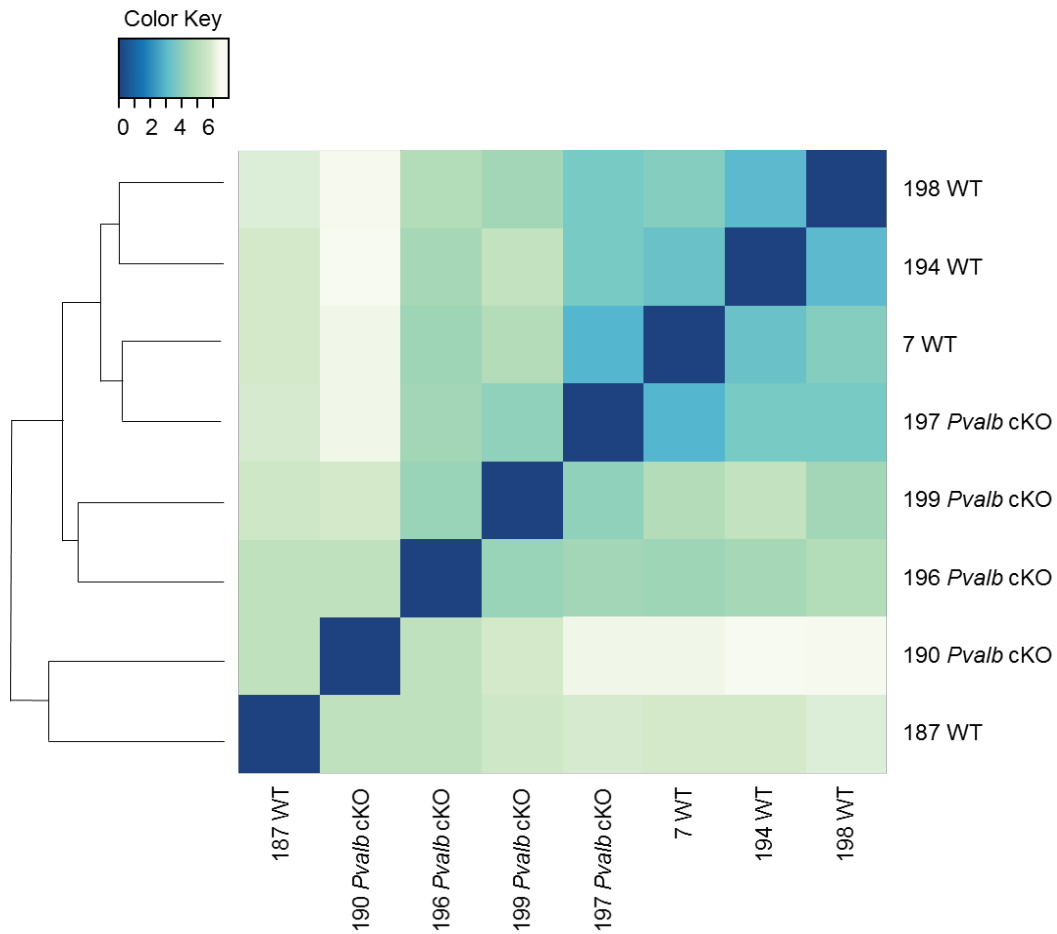


Figure 47 : RNAseq, matrice de corrélation des échantillons présentant les similarités générales du profil d'expression. L'intensité de couleur indique la corrélation entre échantillons : corrélation totale avec le bleu marine et corrélation faible avec le vert clair.

3. Résultats complémentaires pour la caractérisation du modèle et l'étude de la neurophysiopathologie

3.1. Mort prématurée des souris *Pvalb* cKO

Entre 21,5 et 22,5 semaines, l'ensemble des souris *Pvalb* cKO meurt prématurément. Pour comprendre les causes de la perte des animaux, nous les avons observés par vidéo-surveillance. À partir de 21,5 semaines les souris *Pvalb* cKO souffrent de crises d'épilepsie intenses et fatales. Ces crises d'épilepsie spontanées peuvent être expliquées par l'atteinte des interneurons du cortex cérébral résultant de la déplétion tardive de la FXN suite à l'expression de la Cre Recombinase (manuscrit [Figure S21](#)). Les crises d'épilepsie ne faisant pas partie du tableau clinique des patients AF, nous n'avons pas étudié cette atteinte plus en détail. Une autre observation que nous avons faite dans ce cadre est une tendance accrue des souris *Pvalb* cKO à développer des convulsions et faire des crises d'épilepsies lors de l'euthanasie par injection létale de kétamine/xylazine, aux stades très tardifs de la maladie (18,5 semaines et plus).

3.2. Analyse du transcriptome des DRG *Pvalb* cKO

Afin de comprendre les mécanismes pathologiques liés à la déplétion en frataxine dans les neurones proprioceptifs des DRG, dès le début de mon projet de thèse, le transcriptome des DRG à 7,5 semaines a été analysé par séquençage haut débit (RNAsequencing). L'analyse RNAseq ayant été entreprise avant l'obtention des résultats démontrant des atteintes des DRG lombaires et non cervicaux et thoraciques, le transcriptome a été déterminé sur l'entièreté des DRG (Ce, Th et Lu). Le séquençage des ARNm a été effectué par la plateforme de séquençage de l'IGBMC (Genomeast) et les données brutes ont été analysées par C. Keime. Pour l'analyse générale des données de séquençage, l'expression des gènes a été quantifiée. La matrice de corrélation des échantillons, présentant les similarités générales du profil d'expression entre les échantillons, est présentée dans la **figure 47**. Sur cette figure, nous pouvons observer que la corrélation entre les échantillons, en particulier entre les souris de même groupe (WT et *Pvalb* cKO) n'est pas assez satisfaisante. Par exemple, les souris 187 WT et 190 *Pvalb* cKO forment un groupe à part. Ces différences pourraient être expliquées par un biais introduit lors de la dissection notamment au niveau des conditions qui n'étaient pas similaires. En effet, les souris 187 WT et 190 *Pvalb* cKO ont été disséquées par F. Piguet et les individus du groupe

Gènes associés aux dommages axonaux et à la régénérescence axonale (RAG)			
Gène	Différence d'expression	P-value	Rôles ou potentiels rôles décrits dans la littérature
<i>Sprr1a</i>	↑ 8,7x	4,39.10 ⁻²²	RAG régulé par ATF3 (Hunt et al, 2012), favorise la croissance des neurites (Bonilla et al, 2002).
<i>Arf3</i>	↑ 3x	1,26.10 ⁻²⁰	Un des RAG majeurs (Hunt et al, 2012, Ma et al, 2015), favorise la croissance des neurites (Seiffers et al, 2006).
<i>Pappa2</i>	↑ 2,1x	4,03.10 ⁻⁵	Régulateur spécifique d'IGFBP5 qui joue un rôle dans la maintenance axonale (Simon et al, 2015).
<i>Ccl2</i>	↑ 1,62x	0,049	Médiateur de l'interaction neurones-macrophages requise dans l'amplification et la maintenance de la régénérescence axonale en réponse à des lésions nerveuses (Kwon et al, 2015).
<i>Nfs</i>	↑ 1,59x	1,42.10 ⁻⁸	Surexpression du gène en cas de dommages axonaux (Zaho et al, 2018).
<i>Smim3</i>	↑ 1,49x	0,003	Surexpression du gène en cas de dommages axonaux (Zaho et al, 2018)
<i>Serp1nb1a</i>	↑ 1,43x	6,12.10 ⁻⁵	Surexpression du gène en cas de dommages axonaux (Zaho et al, 2018).
<i>Gadd45a</i>	↑ 1,37x	0,01	Marqueur de dommages axonaux périphériques (Befort et al, 2003; Zaho et al, 2018).
<i>Sema6a</i>	↑ 1,27x	0,039	Surexpression du gène en cas de dommages axonaux (Zaho et al, 2018).
<i>Stmn4</i>	↑ 1,25x	0,04	Désassemblage des microtubules (Patodia et Raivich, 2012) et interaction avec STAT3 pour promouvoir la croissance axonale (Jablonska et al, 2014).
<i>Irga7</i>	↑ 1,10x	0,007	RAG régulé par cJUN (Van Kesteren et al, 2011).
Gènes codants pour des protéines de structures de la myéline et associées à la gaine de myéline			
Gène	Différence d'expression	P-value	Rôles ou potentiels rôles décrits dans la littérature
<i>Gjb1</i>	↑ 1,59x	0,016	Gjb1 code pour la Connexin 32, protéine exprimée par les cellules de Schwann myélinisantes. Cx32 forme des jonctions entre les couches de myélines (Vavlitou et al, 2010)
<i>Mbp</i>	↑ 1,52x	0,015	Code pour MBP, la protéine basique de la myéline.
<i>Mag</i>	↑ 1,45x	0,008	Code pour MAG, glycoprotéine associée à la myéline.
<i>Ncmap</i>	↑ 1,34x	0,043	Code pour NCMAP, glycoprotéine associée à la myéline non-compacte.

Tableau 8 : Gènes dérégulés dans les DRG de souris *Pvalb* cKO à 7,5s jouant un rôle dans la régénérescence axonale suite aux dommages axonaux périphériques ainsi que dans la myéline.

Gènes identifiés comme dérégulés avec l'analyse transcriptomique des DRG, n = 3. RAG : *Regeneration Associated Genes*

WT (7, 194 et 198) et ceux du groupe *Pvalb* cKO (196, 197 et 199) l'ont été par moi-même. Les conditions de dissection, n'ont pas été tout à fait similaires. F. Piguet prélevait les DRG avec les racines dorsales et les prolongements (contenant les axones des DRG et les cellules gliales), alors que je coupais systématiquement au plus près du ganglion (corps cellulaires des neurones principalement).

En considérant l'ensemble des échantillons ($n = 4$), 47 gènes seulement étaient exprimés différemment de manière significative (26 surexprimés et 21 sous-exprimés). Nous avons donc choisi de ne pas prendre en compte les échantillons 187 et 190 pour l'analyse globale de RNAseq ($n = 3$ pour l'analyse). Pour les six échantillons analysés la corrélation n'est pas parfaite (**Figure 47**) et moins de 200 gènes sont différemment exprimés. En fixant une limite de différence d'expression à $\pm 1.2x$, 69 gènes sont surexprimés et 23 sous-exprimés de manière significative ($p\text{-value} \leq 0.05$). Cependant dans cette liste de 92 gènes, nombre d'entre eux (35 gènes) ont été détectés avec très peu de « reads » lors du séquençage rendant leur analyse difficile et peu fiable. Cette liste de gènes différemment exprimés étant relativement courte, je n'ai pas réussi, en utilisant des logiciels d'analyse bio-informatique tel que DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b), à identifier des voies clairement dérégulées dans les souris *Pvalb* cKO. Ce faible nombre de gènes exprimés différemment dans les DRG *Pvalb* cKO par rapport aux contrôles était un résultat inattendu aux vues de l'atteinte sévère de ces animaux à 7,5 semaines. Cependant il peut être expliqué par la proportion minoritaire des neurones proprioceptifs affectés dans notre modèle d'étude (7,5% des cellules du DRG) et le fait que seuls les neurones des DRG lombaires sont affectés, diluant ainsi considérablement les signaux pathologiques pour l'ensemble des analyses sur extraits totaux.

De manière surprenante, le gène *Fxn* n'est pas identifié comme sous-exprimé dans cette analyse transcriptomique alors que nous savons que la protéine FXN est déplétée (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 1E) dans les neurones exprimant la Cre Recombinase. En alignant les « reads » obtenus par séquençage sur IGV, pour l'ensemble des exons du gène *Fxn* le nombre de « reads » est similaire à l'exception de l'exon 4 (excisé sous l'action de la Cre Recombinase) pour lequel moins de « reads » sont détectés dans les souris *Pvalb* cKO. L'ARNm *Fxn* est donc transcrit mais sans l'exon 4 dans les cellules positives à la parvalbumine, menant à une absence de frataxine et il est transcrit à 50% sans l'exon 4 dans les autres cellules ($Fxn^{L3/L-}$). En accord avec les résultats présentés dans la section 2.4.2 des résultats, le gène *Pvalb* est identifié comme dérégulé dans les souris *Pvalb* cKO. Plus précisément, il est significativement sous-exprimé de 2 fois, correspondant à l'expression d'environ 50% d'ARNm identifiée par qRT-PCR pour les DRG totaux.

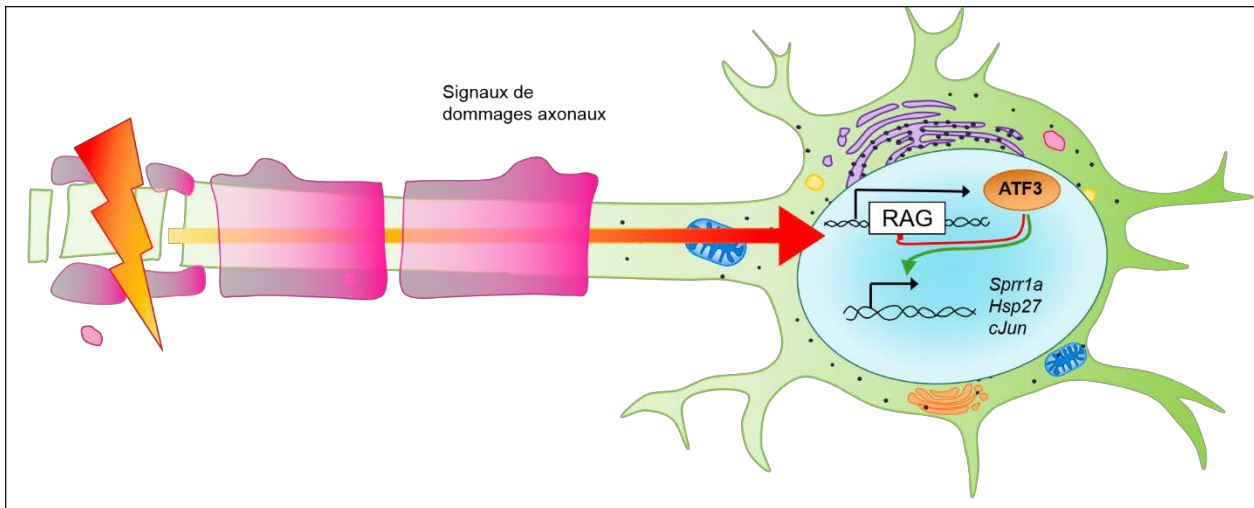


Figure 48 : Schéma général d'activation de gènes associés à la régénéscence (RAG) en réponse aux dommages axonaux dans le système nerveux périphérique.

En cas de dommages axonaux, une réponse cellulaire globale se met en place dans les corps cellulaires des neurones avec l'activation de nombreux RAG, dont ATF3. Ce facteur de transcription active ensuite l'expression d'autre gène (*Sprr1a*, *Hsp27* et *cJun*) et peut s'auto-réprimer. Dans les neurones sains, les RAG sont très faiblement exprimés.

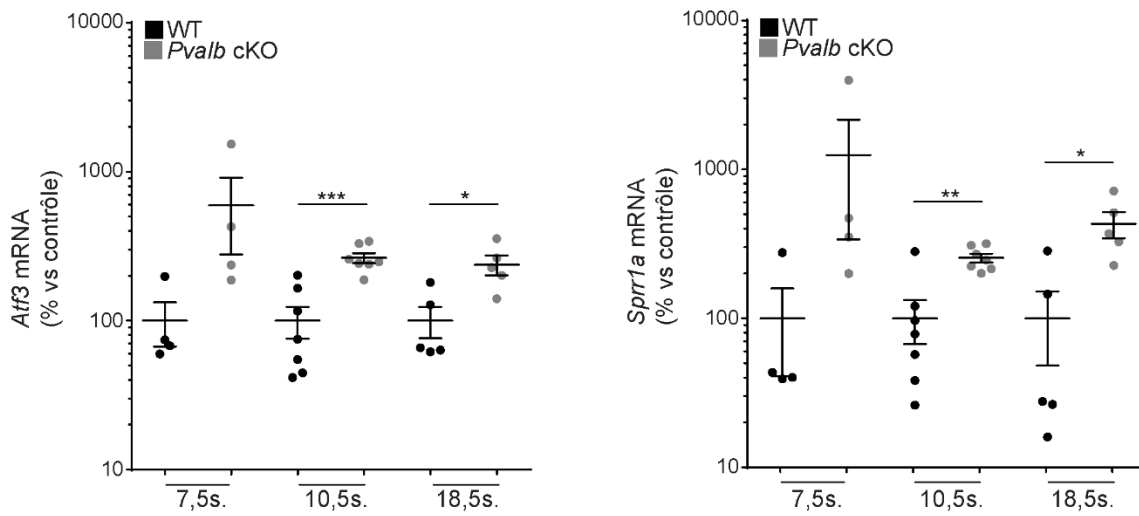
Les logiciels d'analyse ne permettant pas d'identifier de voies dérégulées dans les résultats RNAseq en raison de la courte liste de gènes identifiés comme différentiellement exprimés, j'ai analysé manuellement la liste de gènes différentiellement exprimés. Il en ressort un enrichissement de gènes exprimés en réponse à la neurodégénérescence axonale et à la neuropathie sensitive ainsi que des gènes codant des protéines de la gaine de myéline. Ces gènes sont présentés dans le **tableau 8**.

3.3. Dommages axonaux et régénérescence axonale

3.3.1. Activation de l'expression de gènes associés à la régénérescence

Le SNP, à l'inverse du CNS, est capable de régénérescence suite à des lésions nerveuses. En réponse aux dommages axonaux périphériques, un large programme de régénérescence est mis en place dans les cellules des DRG avec l'expression de très nombreux gènes spécifiques associés à la régénérescence, appelés RAG (*regeneration associated genes*) (**Figure 48**) (Kiryu-Seo and Kiyama, 2011). Les RAG peuvent coder pour différentes familles de protéines (cytosquelette, adhésion cellulaire, croissance axonale, facteurs trophiques et leurs récepteurs ou encore des facteurs de transcription). Certains de ces facteurs de transcription, tel que cJUN, ATF3 et STAT3, sont décrits comme des « *hub genes* » c'est-à-dire des RAG centraux et majeurs qui activent l'expression d'autres RAG et régulent le programme global de régénérescence (Kiryu-Seo and Kiyama, 2011; Tedeschi, 2012). Bien que tous les RAG ne soient pas encore connus, de nouveaux candidats sont régulièrement identifiés par des analyses transcriptomiques (Chandran et al., 2016; Zhao et al., 2018). Généralement, ces gènes sont exprimés par les neurones dont les axones sont endommagés mais les cellules de Schwann alentours peuvent également en exprimer. Dans les résultats de séquençage, j'ai pu identifier onze gènes décrits dans la littérature comme activés en réponse aux dommages axonaux (soit 20% des gènes différentiellement exprimés $\pm 1.2x$ avec un nombre de « reads » suffisants). Ces gènes et les différences d'expression, ainsi que leur rôle, sont présentés dans le **Tableau 8**. Ces onze RAG sont surexprimés dans les souris *Pvalb* cKO mais pour la plupart d'entre eux la différence d'expression est relativement faible, probablement du fait de la déficience des fibres proprioceptives uniquement et du mélange des DRG cervicaux, thoraciques et lombaires donc de la dilution du signal.

A



B

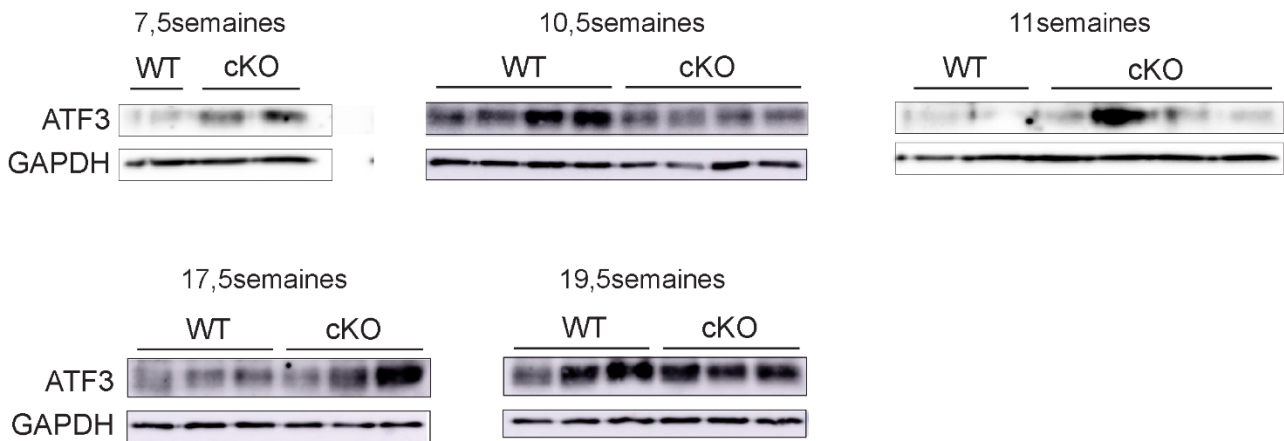


Figure 49 : Expression des RAG *Aff3* et *Sprr1a* dans les DRG lombaires des souris *Pvalb* cKO en réponse aux dommages axonaux.

(A) Expression d'*Aff3* et *Sprr1a* dans des DRG lombaires à 7,5 ; 10,5 et 18.5 semaines, n = 4 ; 7 et 5 selon l'âge respectivement. Les données sont représentées avec la moyenne ±SEM et les valeurs individuelles, graphique en échelle logarithmique. * p<0,05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001. (B) Expression protéique d'ATF3 à différents âges dans les DRG lombaires de souris WT et *Pvalb* cKO. ATF3 : 21kDa, GAPDH : 37kDa.

3.3.2. Le facteur de transcription ATF3 et ses gènes cibles

De manière intéressante, les deux gènes dont les expressions sont les plus modifiées sont *Spr1* et *Atf3*, respectivement surexprimés 8,7x et 3x. ATF3 est l'un des RAG centraux (hub gene) qui, au contraire des autres facteurs de transcription majeurs de la régénérescence, est uniquement régulé au niveau transcriptionnel (Hunt et al., 2012). Les gènes cibles principaux d'ATF3 sont *Spr1a*, *Hsp27* et *cJun*, mais ce facteur de transcription est également capable d'auto-répression (Figure 48). SPRR1a a été décrit comme jouant un rôle dans le croissance axonale (Bonilla et al., 2002) mais la fonction précise de la protéine n'est pas connue. La surexpression de ces deux gènes a été validée à 7,5 semaines dans des DRG lombaires de souris *Pvalb* cKO (Figure 49A). Cette surexpression ne semble cependant pas significative vu la large variabilité observée entre les différents échantillons. J'ai ensuite analysé l'expression de ces 2 gènes RAG à différents temps afin d'avoir une idée de la cinétique d'expression du facteur de transcription et de son gène cible. Avant 7,5 semaines, ils ne sont pas exprimés (évaluation à 3,5 et 5,5 semaines) et à 8,5 semaines leur expression reste variable (données non présentées). À partir de 10,5 semaines et jusqu'à 18,5 semaines *Atf3* et *Spr1a* sont significativement surexprimés dans les souris *Pvalb* cKO, avec peu de variabilité entre les échantillons (Figure 49A). Les échantillons WT, présentent, quant à eux, une variabilité d'expression. De manière intéressante, on observe une corrélation parfaite entre l'expression d'*Atf3* et de *Spr1a*, plus *Atf3* est exprimé, plus *Spr1a* l'est aussi. Les autres gènes cibles d'ATF3, *Hsp27* et *cJun*, ne présentent aucune différence d'expression entre souris WT et *Pvalb* cKO. Les niveaux protéiques d'ATF3 dans des DRG lombaires à différents âges ont ensuite été évalués par Western Blot (Figure 49B). De par une faible expression de la protéine, sa détection par WB est complexe et une forte variabilité d'expression entre les échantillons (WT et *Pvalb* cKO) ne permet pas de tirer de conclusion quant à la synthèse différentielle de la protéine. L'analyse par qRT-PCR étant plus sensible, nous sommes en mesure de détecter le signal de surexpression alors que la dilution des signaux pathologiques (7,5% des cellules sont affectées) limite l'analyse de la protéine. Pour pallier à cette dilution du signal, j'ai testé différents protocoles d'immunofluorescence anti-ATF3 sur des coupes de DRG mais je n'ai rien obtenu de positif. Dans des neurones sains, ces gènes sont exprimés à des niveaux très bas voire sont non exprimés. La variabilité entre souris WT peut être due à l'état des souris au moment des dissections. En effet, dans des conditions de régénérescence classique, ces réponses se mettent en place et s'éteignent rapidement. Ainsi on peut supposer que si la souris WT s'est légèrement blessée avant la dissection l'expression d'*Atf3* et *Spr1a* est affectée. Dans la

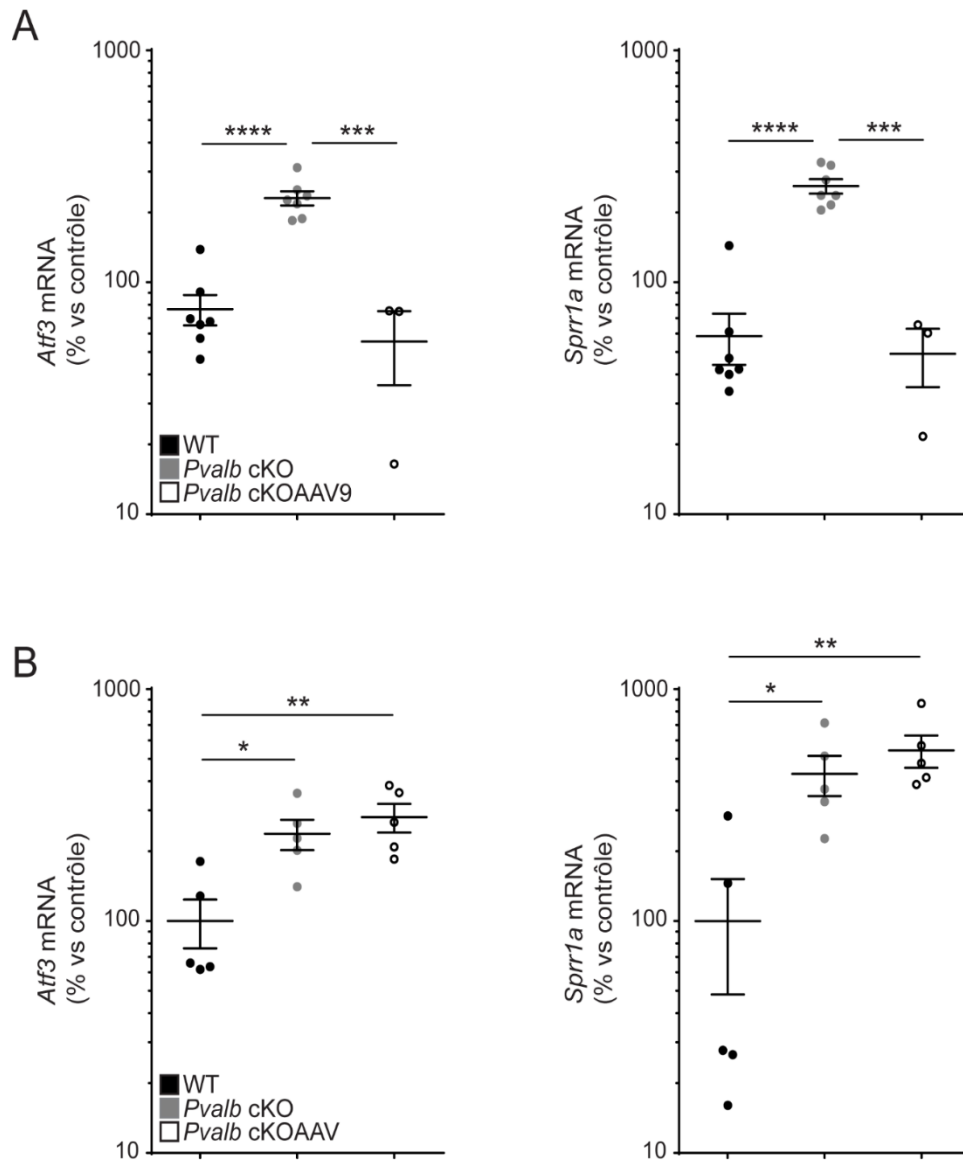


Figure 50 : Expression des RAG *Atf3* et *Sprr1a* dans les DRG suite aux traitements pré-symptomatique à 3,5 semaines et post-symptomatique à 7,5 semaines.

(A) Expression d'*Atf3* et *Sprr1a* dans les DRG de souris WT, *Pvalb* cKO non traitées et traitées à 3,5 semaines âgées de 17,5 semaines, n = 7, 6 et 3 respectivement par groupe. (B) Expression d'*Atf3* et *Sprr1a* dans les DRG lombaires de souris WT, *Pvalb* cKO non traitées et traitées à 7,5 semaines et sacrifiées à 18,5 semaines, n = 5. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM et les valeurs individuelles, graphique en échelle logarithmique. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

littérature, l'activation du RAG ATF3 et de ses gènes cibles est validée par l'analyse des transcrits et rarement par les niveaux protéiques.

Nous pouvons donc conclure que l'absence de frataxine conduit à des dégénérescences axonales et une neuropathie qui entraînent la surexpression de certains gènes associés à la régénérescence. Pour les autres RAG, des hybridations *in situ* et immunofluorescences seront nécessaires pour valider leur surexpression et contourner le problème de dilution des signaux.

Les niveaux d'expression de ces deux gènes ont également été évalués dans les DRG de souris *Pvalb* cKO traitées par thérapie génique. Suite au traitement pré-symptomatique à 3,5 semaines, ces deux RAG ne sont pas activés et leur expression est similaire à celle des WT à l'âge d'analyse soit 17,5 semaines (**Figure 50A**). A l'inverse, dans les DRG lombaires des souris traitées à 7,5 semaines et sacrifiées à 18,5 semaines, l'expression d'*Atfr3* et *Sprr1a* est au même niveau que dans les DRG *Pvalb* cKO non traitées (**Figure 50B**). L'expression de ces RAG n'est pas inattendue. En effet, à 7,5 semaines, le processus de régénérescence s'active en réponse aux dégénérescences des neurones et à la neuropathie sensitive. A l'instar des souris *Pvalb* cKO non traitées dans lesquelles les déficiences progressent et sont trop sévères pour une régénérescence axonale, dans les souris traitées la régénérescence est efficace, comme observée en microscopie électronique avec une structure normale des nerfs sciatiques (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 6G). Le fait que l'expression soit encore supérieure aux souris WT peut traduire une correction non totale au niveau moléculaire avec des fibres traitées et d'autres fibres qui dégénèrent légèrement. Cependant cette correction partielle est suffisante pour des phénotypes comportementaux et physiologiques normaux.

3.4. Neuropathie moléculaire présentée par les souris *Pvalb* cKO

Dans les résultats du RNAseq, accompagnant la surexpression de RAG en réponses aux dommages axonaux, on observe une surexpression de gènes codants pour des protéines de structure de la gaine de myéline ou associées à la gaine de myéline (**Tableau 8**). La surexpression de gènes codant pour des protéines de la myéline (*Mbp*, *Mpz*, *Mag* et *Pmp22*) dans les DRG n'a pas pu être mise en évidence par qRT-PCR (données non présentées). En effet, dans le RNAseq (technique particulièrement sensible) la surexpression de ces gènes est faible (entre 1,59 et 1,34x) et les P-value, bien que significatives, sont relativement élevées pour une analyse transcriptomique. Cependant, comme nous observons une perte de la sensibilité après stimulation du nerf sciatique

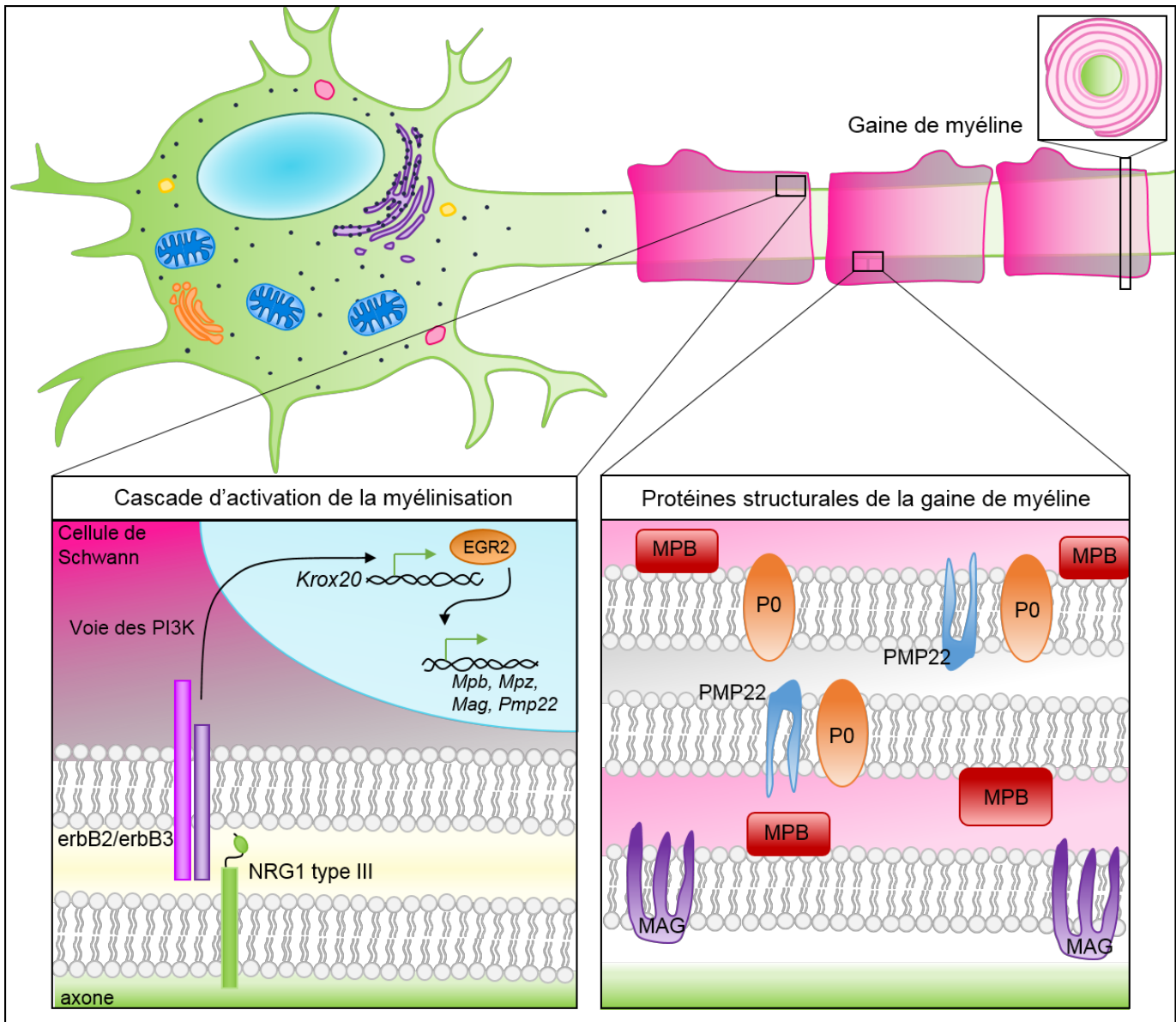


Figure 51 : La gaine de myéline dans le système nerveux périphérique.

Les cellules de Schwann myélinisantes forment la gaine de myéline autour des axones avec un ratio 1 :1. Pour la formation de la gaine de myéline, les axones de plus de 1µm expriment le facteur NRG1 type III à leur surface (schéma de gauche). Lors d'un contact avec une cellule de Schwann, NRG1 type III se lie aux récepteurs dimérisés erbB2/erbB3 et la voie de signalisation des PI3K est activée dans les CS. Cette voie de signalisation conduit à l'expression du facteur de transcription majeur de la myélinisation EGR2 (encodé par *Krox20*) qui active l'expression des gènes *Mbp*, *Mpz*, *Mag* ou encore *Pmp22*. Ces gènes codent pour les protéines structurales de la myéline (schéma à droite). MBP et MAG sont retrouvés dans le PNS et dans le CNS alors que P0 (*Mpz*) et PMP22 sont spécifiques du PNS.

(Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 1D) et une neuropathie progressive (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 2F), les nerfs sciatiques ont été analysés au niveau moléculaire, plus précisément au niveau de la myéline et de la réponse des cellules de Schwann (CS).

Dans le PNS, les cellules de Schwann différenciées myélinisent les axones d'un diamètre supérieur à 1 μm en enroulant leur membrane autour de l'axone en cercles concentriques (Salzer, 2015). Une CS myélinise un axone (ratio 1 :1) et les axones sont myélinisés par plusieurs CS. Il y a une corrélation positive entre le diamètre de l'axone myélinisé et l'épaisseur de la gaine de myéline. Pour les axones inférieurs à 1 μm de diamètre, une CS non myélinisante encercle plusieurs axones, formant un support trophique et métabolique essentiel et correspondant aux Remak Bundle. Classiquement, les axones de plus de 1 μm de diamètre expriment en leur surface la neuréguline 1 type III (NRG1 type III), élément clé d'initiation de la myélinisation (Taveggia et al., 2005). L'épaisseur de la myéline dépend de la quantité de facteur NRG1 type III exprimée par les neurones. Les CS expriment en leur surface les récepteurs dimérisés erbB2/erbB3 qui interagissent avec NRG1 type III lorsque l'axone et la CS sont à proximité l'un de l'autre (**Figure 51**). Cette interaction active la voie des PI3K dans les CS menant à l'expression de *Krox20* codant pour le facteur de transcription EGR2. EGR2 est le régulateur majeur de la myélinisation dans le SNP et conduit à la transcription des gènes codant pour les protéines de structure de la myéline (*Mbp*, *Mpz*, *Mag*, *Pmp22*) et les composants biosynthétiques de la synthèse des lipides de la myéline (**Figure 51**, partie de gauche) (Salzer, 2015). La maintenance du phénotype myélinique des CS nécessite l'expression continue de *Krox20* et l'activation constante de cette cascade moléculaire. Si le contact entre l'axone et la cellule de Schwann est rompu, en cas de dommage axonal par exemple, cette voie de signalisation s'éteint, entraînant la dédifférenciation de la CS qui exprime alors le marqueur de dédifférenciation p75. Au niveau de sa structure la gaine de myéline est composée de nombreux lipides et de protéines spécifiques (**Figure 51**, partie de droite). MBP (myelin basic protein) est la protéine majeure de la myéline et agit comme un velcro moléculaire entre les différentes couches formées par les membranes adjacentes de CS. P0, codé par le gène *Mpz*, entraîne la compaction de la myéline alors que MAG est une protéine de la myéline non compacte.

Aux vues de l'ensemble des résultats précédents, la formation et la maintenance de la gaine de myéline ont été évaluées dans les nerfs sciatiques des souris *Pvalb* cKO par rapport aux souris contrôles. Dans un premier temps, à 5,5 semaines, on observe une dérégulation de l'expression des gènes de la myéline chez les souris mutantes avec la surexpression significative de *Krox20* et de ces gènes cibles : *Mpz*, *Mag*, *Pmp22* et *Mbp*

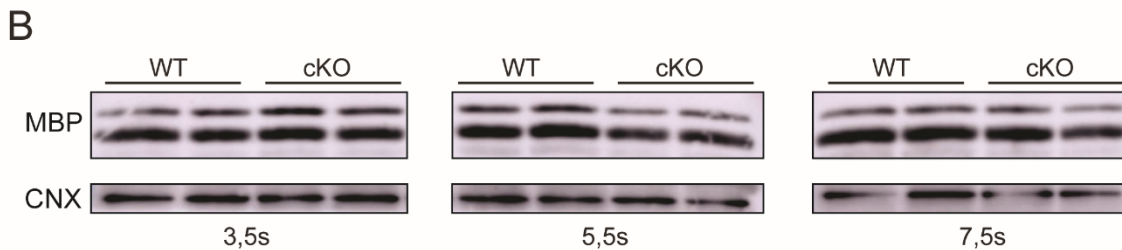
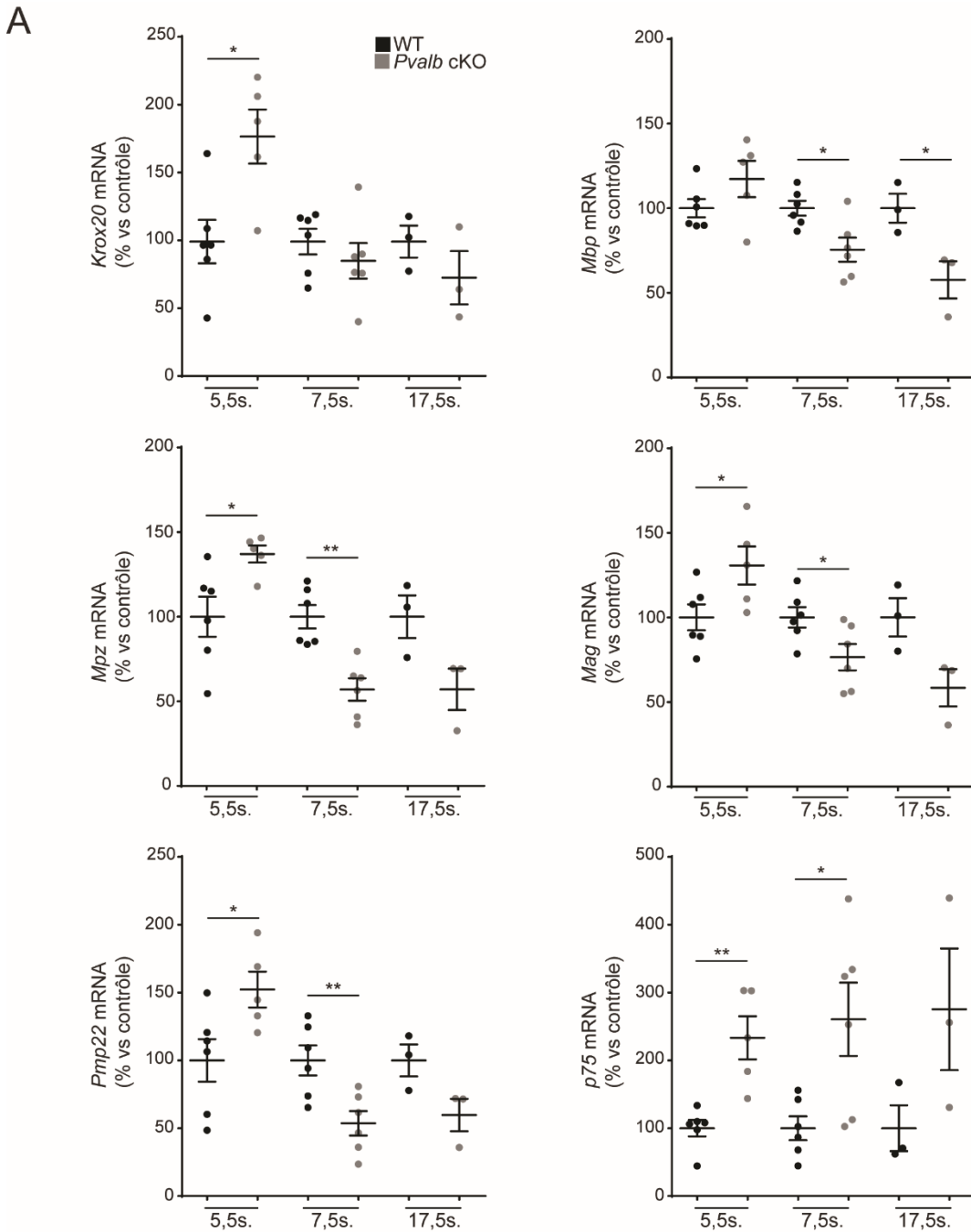


Figure 52 : La neuropathie est associée à des déficiences dans l'expression de gènes de la myéline.

(A) Expression de *Krox20*, *Mbp*, *Mpz*, *Mag*, *Pmp22* et *p75* dans des nerfs sciatiques à 5,5 ; 7,5 et 17,5 semaines, n = 5 à 5,5 et 7,5s et n = 3 à 17,5s. (B) Expression de MBP (différents isoformes : 18,5 et 21kDa) à 3,5 ; 5,5 et 7,5 semaines dans des nerfs sciatiques de souris WT et *Pvalb* cKO. CNX (90kDa) est utilisé comme contrôle interne. Les données sont représentées avec la moyenne ± SEM et les valeurs individuelles. * p < 0,05 ; ** p < 0.01.

(tendance non significative pour ce dernier gène) (**Figure 52A**). Ensuite, à 7,5 semaines le profil d'expression de ces gènes est inversé : *Krox20* n'est plus surexprimé par les CS *Pvalb* cKO (tendance à une diminution de l'expression mais non significative) et les gènes codants pour les protéines de structure de la myéline sont significativement sous-exprimés (*Mbp*, *Mpz*, *Mag* et *Pmp22*) (**Figure 52A**). Ces derniers profils d'expression sont similaires à 17,5 semaines mais avec moins d'échantillons analysés. Pour les trois âges analysés, le marqueur de dédifférenciation p75 est largement surexprimé dans les nerfs *Pvalb* cKO par rapport aux contrôles, avec une forte variabilité (**Figure 52A**). Les niveaux protéiques de MBP ont ensuite été analysés à différents temps (3,5 ; 5,5 ; et 7,5 semaines) dans les nerfs sciatiques des souris *Pvalb* cKO et WT mais aucune différence d'expression n'a pu être mise en évidence (**Figure 52B**). Au niveau histologique dans les nerfs sciatiques *Pvalb* cKO les fibres sensibles sont affectées mais les larges fibres motrices sont intactes (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 2F). Sachant que l'épaisseur de la myéline est fonction du diamètre de l'axone, il est possible que l'absence de différence de quantité de protéine MBP observée par Western Blot dans les nerfs sciatique résulte de la dilution du signal émis par les cellules de Schwann qui myélinisent les fibres proprioceptives et de la forte expression de MBP par les cellules de Schwann entourant les fibres motrices (gaine de myéline très épaisse). En effet, à l'âge d'analyse les gaines de myélines autour des axones sont déjà formées et les protéines résident dans cette gaine. De manière inverse, lorsque cette gaine de myéline est en place, les gènes codant pour les protéines de structures ne sont que peu transcrits, nous permettant d'observer les différences au niveau de leur expression dans les souris *Pvalb* cKO (**Figure 52A**). Entre 5,5 et 7,5 semaines il y a donc un changement de profil dans l'expression de ces gènes traduisant une aggravation des dysfonctionnements en accord avec la neuropathie progressive. Ainsi les défauts histologiques des nerfs sciatiques corrélaient avec des déficiences moléculaires chez les souris *Pvalb* cKO.

4. Isolement des neurones proprioceptifs pour leur analyse spécifique

Les analyses et interprétations moléculaires pour le modèle *Pvalb* cKO sont compliquées en raison de la dilution des signaux, nos cellules d'intérêt représentant seulement 7,5% des cellules du DRG et 15% des neurones sensitifs. En effet, travailler sur des extraits totaux d'ARNm ou de protéines ne permet pas d'identifier la majorité des dysfonctionnements moléculaires qui mènent aux phénotypes décrits dans le manuscrit. Très peu de gènes sont différentiellement exprimés dans le RNAseq et les gènes validés par qRT-PCR comme dérégulés sont ceux présentant une très forte sur/sous-expression. Pour les niveaux protéiques, il en est de même, par exemple pour la SDH, nous observons une diminution de l'activité enzymatique SDH dans quelques neurones (marquages histoenzymatiques) mais la mesure de l'activité SDH sur extraits totaux ne permet pas d'identifier cette déficience et les niveaux protéiques par Western Blot restent similaires (la SDH est déstabilisée en absence de Fe-S, données non présentées). Ces éléments limitent donc l'étude et la compréhension de la neurophysiopathologie de l'AF.

Ainsi, nous pouvons nous poser la question : quels sont les événements et dysfonctionnements moléculaires dans les neurones proprioceptifs qui mènent à la neurodégénérescence et à la neuropathie à la suite de la déplétion en frataxine et au déficit des centres Fe-S ? Pour identifier la signature moléculaire des neurones proprioceptifs et ne pas avoir de problème de dilution, notre but est d'isoler spécifiquement ces neurones déplétés en frataxine et les analyser par NGS aussi bien à des temps précoces que tardifs pour l'identification des événements primaires et secondaires respectivement. Pour cela, j'ai dans un premier temps généré un modèle murin permettant de sélectionner les neurones proprioceptifs des autres cellules. Ensuite, après avoir établi la technique d'isolement de ces cellules, les différentes populations ont été analysées pour valider l'approche dans le but d'effectuer de nouvelles analyses transcriptomiques.

4.1. Souris *Pvalb* cKO *mT/mG*

Afin d'isoler spécifiquement les neurones proprioceptifs (déplétés en frataxine) des autres cellules (non déplétées en frataxine) des DRG, nous utilisons la souris reporter double-fluorescente *mT/mG* (Muzumdar et al., 2007). Cette souris exprime une Tomato membranaire (mTomato) dans l'ensemble des cellules grâce à une construction *mT/mG*. Cette construction est composée du gène codant pour la mTomato, entouré de sites LoxP, suivi d'un gène codant pour une GFP membranaire (mGFP). Ainsi, sous l'action de la Cre

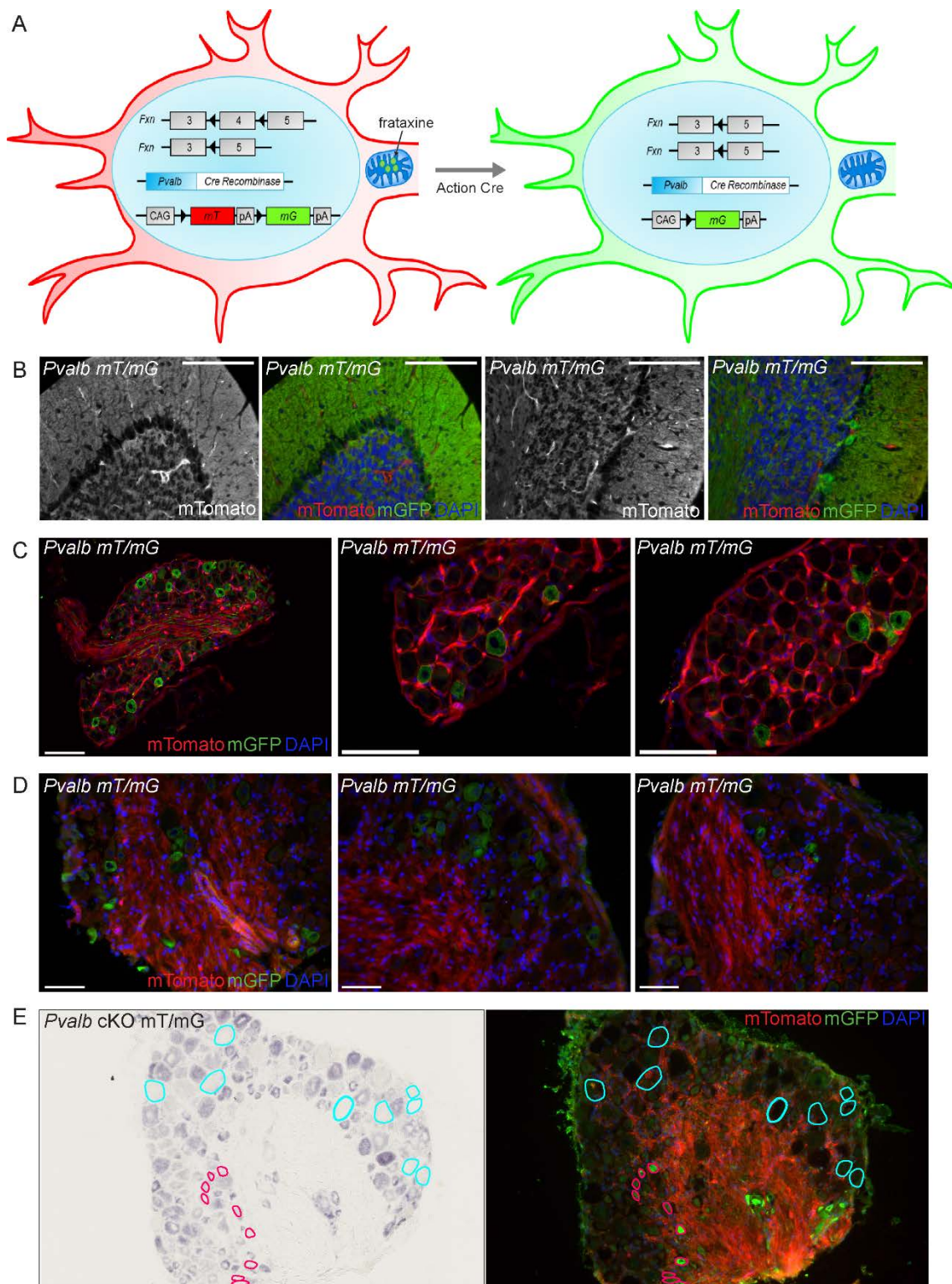


Figure 53 : Génération d'une souris reporter double fluorescente : *Pvalb* cKO *mT/mG*.

(A) Chez les souris *Pvalb* cKO *mT/mG*, sans activité de la Cre, la frataxine est exprimée ainsi qu'une mTomato. Sous l'action de la Cre, l'exon 4 du gène *Fxn* et le gène *mT* sont excisés menant à l'expression d'une mGFP et une absence de frataxine dans les mitochondries. (B) Images représentatives de cervelet de souris *Pvalb* *mT/mG* à 15 semaines avec tissus fixés avant dissection. Barres de taille, 100µm. (C-D) Images représentatives de DRG *Pvalb* *mT/mG* à 15 semaines avec tissus fixés avant dissection (C) et à 8,5 semaines sans fixation des tissus (D). Barres de taille, 100µm. (E) Coupes adjacentes de DRG de souris *Pvalb* cKO *mT/mG* de 8,5 semaines avec à gauche un marquage histoenzymatique SDH et à droite une immunofluorescence anti-GFP et la fluorescence endogène pour la Tomato. Les cercles bleus correspondent aux neurones SDH négatifs reportés sur l'image de droite et les cercles roses correspondent aux neurones GFP positifs reportés sur l'image de gauche.

Recombinase, le gène *mTomato* est excisé et le gène *mGfp* s'exprime (**Figure 53A**). Une souris *Pvalb* cKO portant cette construction *mTmG*, appelée *Pvalb* cKO *mT/mG* ci-après a été générée (souris *Fxn*^{L3/L-} ; *Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J} ; *Gt(ROSA)26Sor*^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}) (**Figure 53A**). Ces souris présentent les mêmes phénotypes que les souris *Pvalb* cKO. Dans les DRG de ces souris, les cellules n'exprimant par la Cre Recombinase expriment la frataxine (souris hétérozygotes donc 50% de FXN) ainsi que la mTomato (cellules FXN+, GFP-) et à l'inverse les cellules exprimant la Cre Recombinase (promoteur *Pvalb* donc uniquement les neurones proprioceptifs) sont négatives pour la frataxine et expriment la mGFP (FXN-, GFP+). Dans cette étude, le contrôle que nous utilisons est une souris *Pvalb* cWT *mT/mG* (souris *Fxn*^{+L3} ; *Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J} ; *Gt(ROSA)26Sor*^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}) afin d'avoir également l'expression de la mGFP dans les neurones proprioceptifs contrôles.

Dans un premier temps j'ai analysé les fluorescences mTomato et mGFP chez des souris *Pvalb* *mT/mG* (*Pvalb*^{tm1(Cre)Arbr/J} ; *Gt(ROSA)26Sor*^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}). Cette souris *mT/mG* n'est pas utilisable pour l'étude du SNC, la mTomato est très peu exprimée et très instable et la mGFP très diffuse avec un bruit de fond important, rendant l'étude sur coupes histologiques délicate (**Figure 53B**). Cependant, au niveau des cellules de Purkinje on remarque une absence totale d'expression Tomato (**Figure 53B**). Dans le PNS pour les DRG, on observe une expression de la mTomato dans la plupart des cellules et une expression mGFP, remplaçant la mTomato, uniquement dans certains larges neurones, pour des coupes issus de tissus fixés pendant 24 heures dans la PFA avant dissection des DRG (**Figure 53C**). Au contraire, sans fixation des tissus avant dissection les fluorescences mTomato et mGFP sont très instables, diffuses et il semblerait aspécifique pour la mGFP (**Figure 53D**) (même avec une immunofluorescence anti-GFP). L'utilisation de cette souris au niveau histologique est donc délicate.

Néanmoins, dans le but de valider le déficit de l'activité SDH spécifiquement dans les neurones proprioceptifs déplétés en frataxine chez les souris *Pvalb* cKO (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 3A), j'ai essayé de combiner le marquage histoenzymatique SDH et les propriétés fluorescentes de la souris *Pvalb* cKO *mT/mG*. Les neurones proprioceptifs de ces souris (*PVALB* positifs) devraient être mGFP positifs et SDH négatifs. Cependant, le co-marquage histoenzymatique SDH et fluorescence (endogène ou immunofluorescence anti-GFP) ne fonctionne pas. J'ai donc essayé de faire des marquages histoenzymatiques SDH et des immunofluorescences anti-GFP sur des coupes adjacentes mais, je n'arrive pas à faire de corrélation entre les neurones SDH négatifs et les cellules mGFP positives (**Figure 53E**, cercles bleus et roses). Cette absence de corrélation provient vraisemblablement du fait que l'activité histoenzymatique SDH nécessite des tissus non fixés

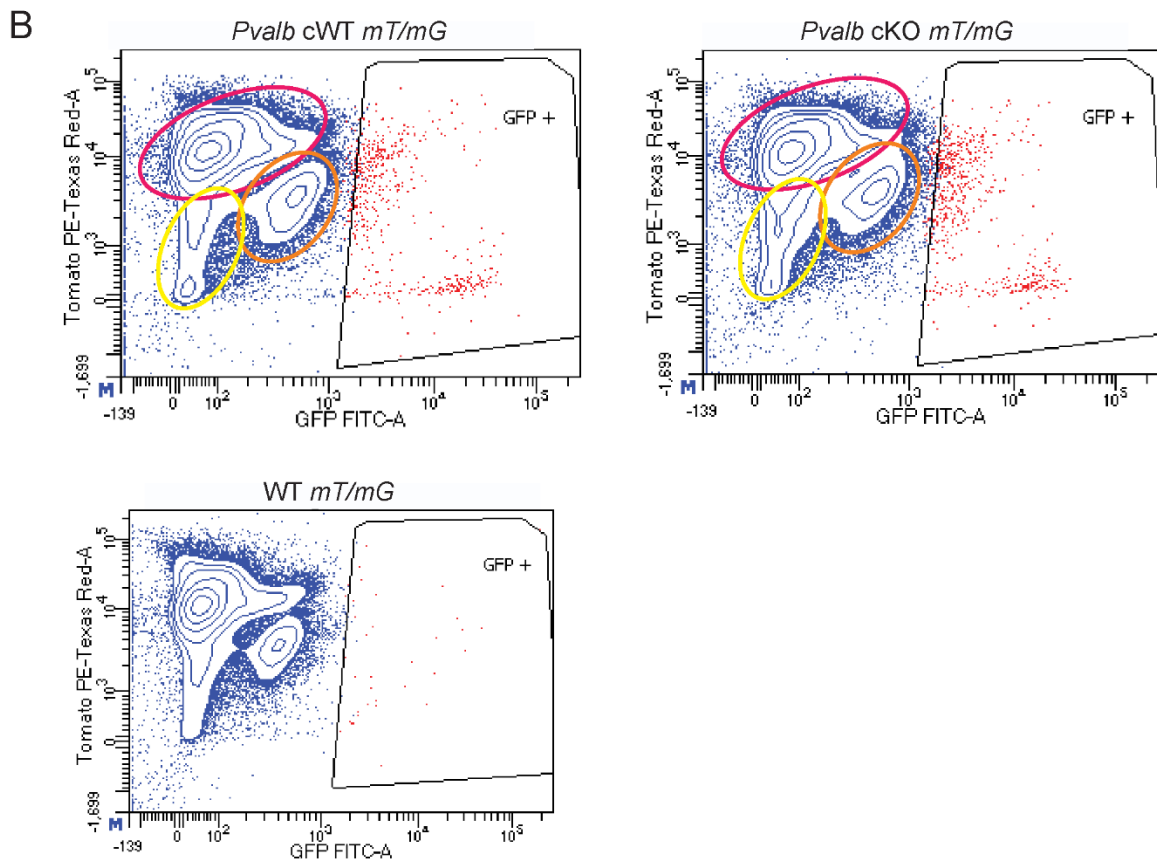
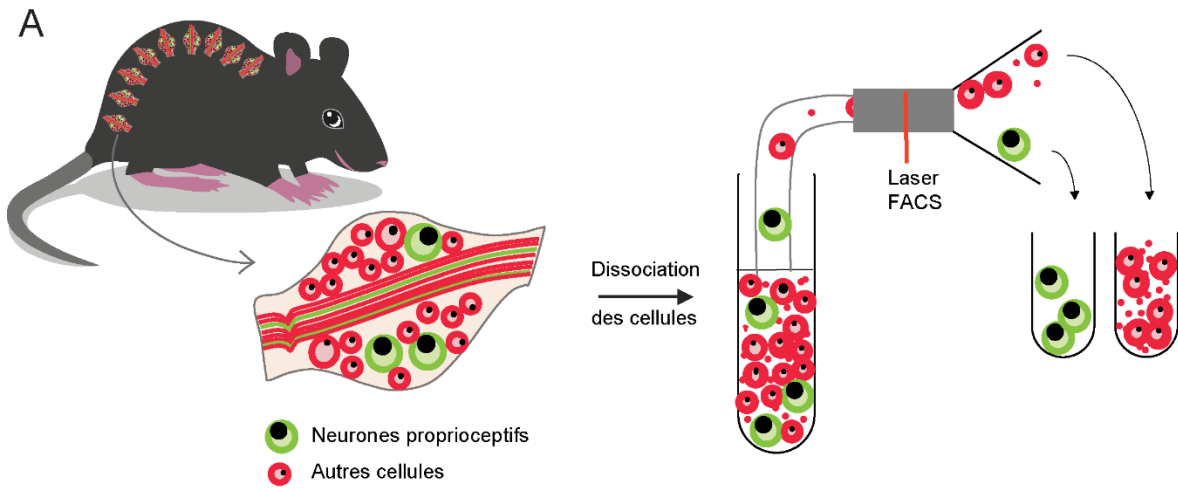


Figure 54 : Isolation des neurones proprioceptifs des DRG de souris *Pvalb Fxn mT/mG* par FACS.

(A) Schéma de la technique développée pour isoler les neurones proprioceptifs des autres cellules des DRG. Après dissection des DRG, les cellules sont dissociées et triées par FACS. (B) Profils représentatifs de FACS des cellules GFP positives (en rouge) et GFP négatives (en bleu) sur des DRG dissociés *Pvalb* cWT *mT/mG* et *Pvalb* cKO *mT/mG* et le contrôle négatif WT *mT/mG* . Les cercles roses, oranges et jaunes indiquent différentes populations de cellules GFP négatives.

présentant donc des fluorescences mTomato et mGFP instables et aspécifique (pour la mGFP).

4.2. Isolement par FACS des neurones proprioceptifs des souris *Pvalb* cKO *mT/mG*

Bien que l'utilisation de la souris *Pvalb* cKO *mT/mG* pour des analyses histologiques soit limitée, la cytométrie de flux étant plus sensible en termes de détection de fluorescence, j'ai testé l'isolement de neurones proprioceptifs (dissociation des DRG puis cytométrie de flux) (**Figure 54A**). Après différents essais de dissociation des DRG, j'ai établi un protocole de dissociation efficace avec peu de perte des cellules (adapté d'un protocole publié en ligne de M. Hoshi). Les cellules ont ensuite été triées par FACS (*Fluorescence activated cell sorting*). Les différents tests de dissociation et de FACS réalisés jusqu'à présent ont été effectués sur des animaux *Pvalb* cKO *mT/mG* et leur contrôles *Pvalb* cWT *mT/mG* ainsi que des animaux WT *mT/mG* (contrôle négatif) de 7,5 semaines. La technique établie et les profils de FACS obtenus sont présentés dans la **figure 54**. Pour l'ensemble des souris mutantes et contrôles les profils de FACS et les quantités de cellules isolées sont relativement similaires (à l'exception de deux souris *Pvalb* cKO *mT/mG*) (**Figure 54B**, **Tableau 9**). Une mince population de cellules GFP positives est identifiée (**Figure 54B**, cellules rouges). En moyenne, nous arrivons à en isoler 800, ce qui représente moins de 1,5% des cellules totales triées (**Tableau 9**). Les neurones proprioceptifs correspondant à 7,5% des cellules des DRG, on pourrait s'attendre à isoler d'avantage de neurones GFP positifs. Cependant, nous avons choisi d'être stringent pour la sélection et l'isolement des cellules GFP positives afin d'avoir le meilleur enrichissement possible expliquant le faible pourcentage GFP+. De manière intéressante, dans l'ensemble des échantillons, on observe trois groupes de cellules dans la population GFP- (**Figure 54B**, cercles roses, oranges et jaunes). Ces différentes populations peuvent correspondre aux différents types de neurones autre que les proprioceptifs c'est-à-dire les neurones nociceptifs et mécanoréceptifs ainsi qu'aux cellules non neuronales des DRG. Pour de futurs tris, l'isolement spécifique de ces différentes populations (en fonction de leur taille) permettrait d'évaluer à quel groupe elles correspondent. Il semble donc que cette technique soit bien reproductible entre les échantillons (à l'exception des deux échantillons avec un profil de FACS différents grisés dans le **Tableau 9**).

Souris 7,5 semaines	Nombre total de cellules	Nombre de cellules GFP-	Nombre de cellules GFP+	Pourcentage de cellules GFP+
WT <i>mT/mG</i>	60250	60250	contrôles négatifs	
	64500	64500		
	93200	93200		
	92000	92000		
<i>Pvalb</i> cWT <i>mT/mG</i>	6150	6000	150	2,3%
	14130	12900	1230	9,1%
	96080	95200	880	1,0%
	35400	34900	500	1,5%
	82270	81600	670	0,8%
<i>Pvalb</i> cKO <i>mT/mG</i>	139600	138700	900	0,7%
	10800	9700	1100	10,7%
	52050	51200	850	1,7%
	54055	53135	920	1,8%
	76850	75950	900	1,3%
	106270	105500	770	0,8%
	106860	105740	1120	1,1%
	76380	75500	880	1,2%
	55450	54850	600	1,1%
	67000	66500	500	0,8%

Tableau 9 : Résultats d'isolation des cellules GFP+ par FACS avec le nombre de cellules GFP positives et GFP négatives pour chaque échantillon et le pourcentage de cellules GFP+. Les cellules grisées correspondent à des échantillons avec un profil de FACS légèrement différent des autres.

4.3. Validation des populations isolées par FACS

Bien que peu de cellules GFP+ soit isolées par FACS, la quantité de matériel obtenue est suffisante pour analyser les différents groupes de cellules au niveau transcriptomique. J'ai donc évalué les niveaux d'expression de certains marqueurs dans les différentes populations pour valider l'enrichissement en neurones proprioceptifs dans les populations GFP positives (**Figure 55**). Les différentes populations de cellules que nous obtenons après le tri des cellules sont :

WT *mT/mG* GFP- : l'ensemble des cellules dissociées des DRG (contrôle négatif).

Pvalb cWT *mT/mG* GFP- : cellules de DRG cWT sans les neurones proprioceptifs.

Pvalb cWT *mT/mG* GFP+ : neurones proprioceptifs contrôles.

Pvalb cKO *mT/mG* GFP- : cellules de DRG cKO sans les neurones proprioceptifs.

Pvalb cKO *mT/mG* GFP+ : neurones proprioceptifs mutants.

Les niveaux d'expression de *Gfp*, *Fxn*, *Pvalb* et *TrkA* (marqueur des neurones nociceptifs) ont été évalués par qRT-PCR (**Figure 55**). Pour les marqueurs *Fxn* et *TrkA* le contrôle avec la moyenne fixée à 100% est la population *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP-. Au contraire, pour les marqueurs *Gfp* et *Pvalb* la population *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP+ correspond au contrôle avec la moyenne fixée à 100%.

Pour l'expression *Gfp*, comme attendu, les populations *Pvalb* cKO *mT/mG* GFP+ et *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP+ expriment le gène (**Figure 55**). On détecte également une légère expression dans les populations GFP-. On peut l'expliquer par la sélection stringente des cellules GFP+ (en moyenne moins de 2% des cellules isolées) et donc la présence de cellules GFP+ dans ces populations. Cependant l'expression dans le contrôle négatif est aberrante, en effet trois échantillons sont au même niveau que les *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP+, on peut donc se poser la question d'une non-spécificité des oligonucléotides GFP utilisés. L'échantillon représenté en rouge présente une expression différente des autres échantillons pour les gènes *Fxn* et *TrkA*, je suppose donc qu'il y a eu une contamination ou un problème lors de l'extraction des ARNm ou au cours de la reverse transcription.

Pour l'expression *Fxn* les résultats sont encourageants. En effet, sur les dix souris *Pvalb* cKO *mT/mG*, sept échantillons GFP+ présentent une absence totale de *Fxn* et les trois autres échantillons expriment une quantité réduite d'ARNm *Fxn* (20, 19 et 12%) (**Figure 55**). Dans la population contrôle *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP+ on retrouve les 50% de transcrits *Fxn* attendus (44% en moyenne) avec une différence significative par rapport aux cellules mutantes GFP+. La population *Pvalb* cKO *mT/mG* GFP- (attendue à 50% d'expression de *Fxn*) fluctue entre 44 et 70% d'expression de *Fxn* avec de la variabilité mais une différence

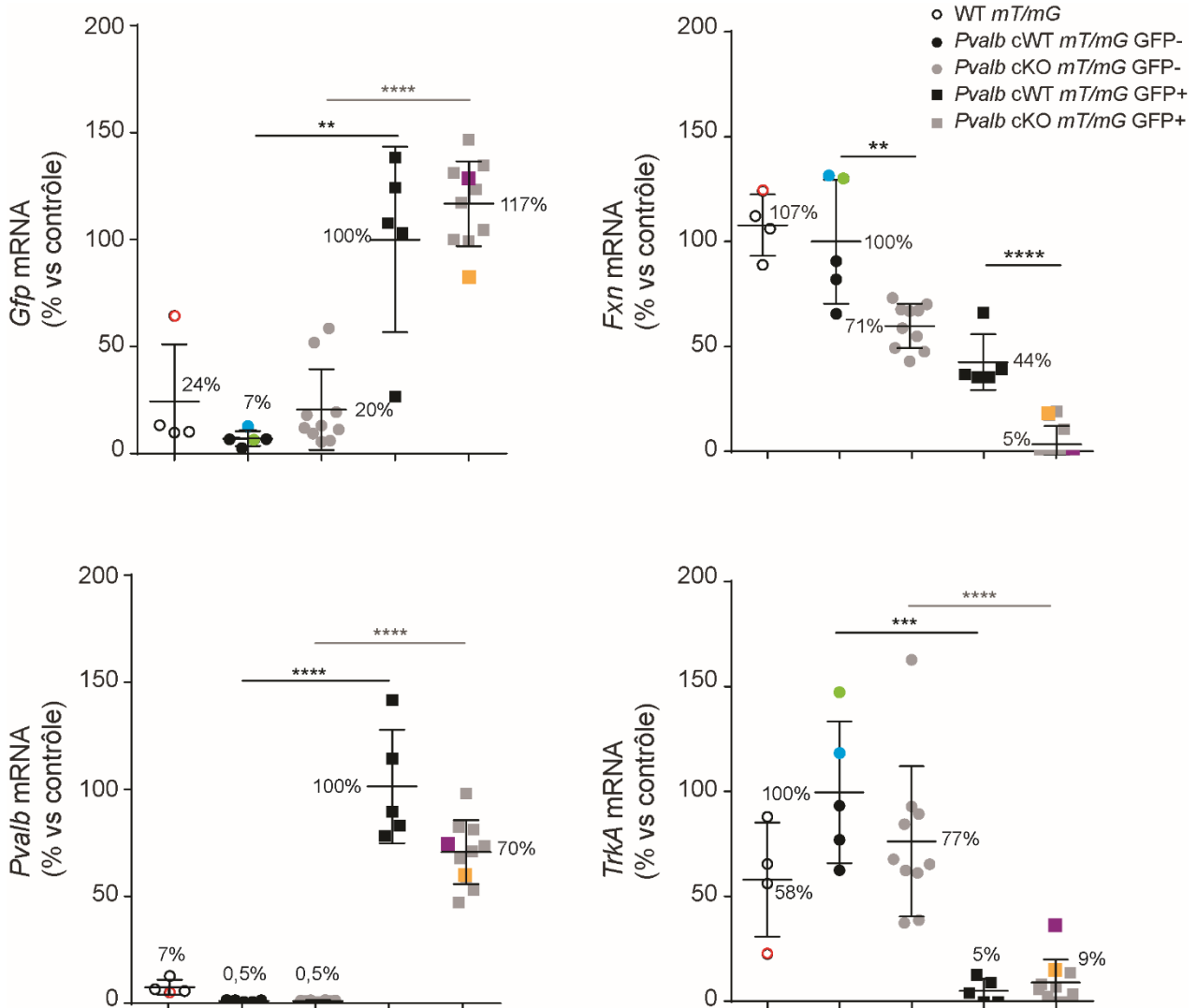


Figure 55 : Validation moléculaire de l'isolation des neurones proprioceptifs des autres cellules des DRG.

(A) Expression du transgène *Gfp*, du gène *Fxn* et des marqueurs de neurones proprioceptifs (*Pvalb*) et nociceptifs (*TrkA*) dans les populations de cellules isolées par FACS (GFP+ et GFP-) de souris *Pvalb* cKO *mT/mG* et *Pvalb* cWT *mT/mG*. Les échantillons WT *mT/mG* correspondent aux contrôles négatifs du FACS. $n = 4$ WT *mT/mG*, $n = 5$ *Pvalb* cWT *mT/mG* et $n = 10$ *Pvalb* cKO *mT/mG*. Les données sont représentées avec la moyenne \pm SEM et les valeurs individuelles. Pour les niveaux d'ARNm *GFP* et *Pvalb*, la moyenne des échantillons *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP+ a été fixée à 100%. Pour les niveaux d'ARNm *Fxn* et *TrkA*, la moyenne des échantillons *Pvalb* WT *mT/mG* GFP- a été fixée à 100%. Les chiffres à côté des barres d'erreur indiquent la moyenne des échantillons du groupe. Pour le groupe WT *mT/mG*, le point rouge correspond au même échantillon, il en est de même pour le groupe *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP- avec les points verts et bleus. Les échantillons du groupe *Pvalb* cKO *mT/mG* GFP+ présentant des profils de FACS différents sont représentés en orange et violets. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

significative par rapport au contrôle GFP-, dans lequel de la variabilité est également observée.

Enfin les profils des marqueurs de neurones proprioceptifs (*Pvalb*) et nociceptifs (*TrkA*) sont inversement corrélés (**Figure 55**). En effet le marqueur *Pvalb* est uniquement exprimé par les populations *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP+ et *Pvalb* cKO *mT/mG* GFP+ alors que le marqueur *TrkA* est faiblement exprimé par ces populations mais il est fortement exprimé par les cellules GFP. Pour l'expression de *TrkA* dans les *Pvalb* cKO *mT/mG* GFP+, les deux échantillons qui présentent une plus forte expression (15 et 36%) sont les deux échantillons grisés dans le tableau 9 (en orange et violet dans la **figure 55**). Le contrôle négatif WT *mT/mG* exprime *TrkA* à des niveaux différents entre les échantillons et exprime faiblement le gène *Pvalb*.

Les résultats obtenus pour l'ensemble de ces marqueurs valident donc notre approche visant à isoler spécifiquement les neurones proprioceptifs avec d'un côté les neurones proprioceptifs *Fxn*-, *Pvalb*+, *TrkA*-, *GFP*+ et de l'autre une population mixte *Fxn*+, *Pvalb*-, *TrkA*+, *GFP*- pour les animaux *Pvalb* cKO *mT/mG*. Pour les deux échantillons *Pvalb* cKO *mT/mG* grisés dans le Tableau 9, avec des profils de FACS différents on observe un enrichissement/diminution dans les marqueurs d'intérêts mais avec probablement des contaminations de cellules GFP- dans la population GFP+ (en orange et violet dans la **figure 55**). Les échantillons marqués en bleu et vert dans le groupe *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP- expriment fortement les ARNm *Fxn* et *TrkA*, que l'on pourrait expliquer par une plus faible contamination par des cellules GFP positives par rapport aux autres échantillons de ce groupe. Mis à part pour les échantillons présentant un profil de FACS différents, je proposerai que la variabilité puisse être attribuée aux difficultés techniques encourues pour faire la qPCR en raison de la faible quantité de matériel. Ainsi, malgré ces variabilités entre les échantillons d'un même groupe, la technique semble reproductible. Pour une analyse NGS, nous aurons suffisamment de matériel après l'isolement des cellules et nous pourrons nous baser sur la qualité des profils de FACS pour valider ou non l'analyse transcriptomique de ces échantillons.

4.4. Stratégie expérimentale pour l'analyse NGS

Dans le but d'identifier les signatures moléculaires des neurones proprioceptifs déplétés en frataxine ainsi que les réponses des cellules voisines, une analyse transcriptomique des différentes populations isolées par cette technique va être effectuée. Plus précisément, pour cette analyse NGS, deux âges vont être analysés pour caractériser les signatures précoces

Age	Génotype			Nombre (n)	Groupe
3,5s	<i>Pvalb</i> cKO <i>mT/mG</i>	GFP+	neurones proprioceptifs	8	1
	<i>Pvalb</i> cWT <i>mT/mG</i>	GFP+	neurones proprioceptifs	8	2
	<i>Pvalb</i> cKO <i>mT/mG</i>	GFP-	cellules des DRG sans les neurones proprioceptifs	8	3
	<i>Pvalb</i> cWT <i>mT/mG</i>	GFP-	cellules des DRG sans les neurones proprioceptifs	8	4
7,5s	<i>Pvalb</i> cKO <i>mT/mG</i>	GFP+	neurones proprioceptifs	8	5
	<i>Pvalb</i> cWT <i>mT/mG</i>	GFP+	neurones proprioceptifs	8	6
	<i>Pvalb</i> cKO <i>mT/mG</i>	GFP-	cellules des DRG sans les neurones proprioceptifs	8	7
	<i>Pvalb</i> cWT <i>mT/mG</i>	GFP-	cellules des DRG sans les neurones proprioceptifs	8	8

Tableau 10 : Echantillons prévus pour l'analyse transcriptomique des neurones proprioceptifs isolés. Une analyse de 64 séquences est prévue.

et tardives de la maladie et évaluer sa progression. Nous allons donc effectuer les analyses RNAseq à 3,5 semaines, âge auquel les souris présentent les premiers défauts de coordination et les premiers signes de neuropathie et, à 7,5 semaines lorsqu'elles présentent une perte de l'onde sensitive, une neuropathie sévère et des DRG en dégénérescence (**Figure 39**). Les différents échantillons prévus pour cette analyse transcriptomique ainsi que leur nombre sont présentés dans le **tableau 10**. Pour l'analyse des données, afin d'identifier les voies spécifiquement affectées dans les neurones proprioceptifs suite à l'absence de frataxine le groupe 1 sera analysé par rapport au groupe 2 (réponses précoces) et le groupe 5 par rapport au groupe 6 (réponses tardives) (*Pvalb* cKO *mT/mG* GFP+ vs *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP+ aux deux âges) (**Tableau 10**). La réponse des cellules environnantes et tissulaire à l'absence de frataxine dans les neurones proprioceptifs sera évaluée en comparant les groupes 3 et 4 à 3,5 semaines ainsi que 7 et 8 à 7,5 semaines (*Pvalb* cKO *mT/mG* GFP- vs *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP- aux deux âges). Enfin la comparaison des résultats pour les souris de même génotype au même âge mais GFP + et GFP- (groupes 1-3 et 5-7, *Pvalb* cKO *mT/mG* GFP+ vs *Pvalb* cKO *mT/mG* GFP- et *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP+ vs *Pvalb* cWT *mT/mG* GFP- respectivement) apportera des précisions sur les mécanismes moléculaires affectés dans l'AF. Les voies moléculaires identifiées comme dérégulées en réponse à l'absence de frataxine seront ensuite validées au niveau transcriptomique par qRT-PCR sur des échantillons isolés par FACS et au niveau protéique par immunofluorescences sur des coupes de DRG *Pvalb* cKO et contrôles. Cependant, je pense que la faible quantité de matériel obtenu après isolement des neurones proprioceptifs par FACS ne permettra pas d'évaluer les niveaux protéiques par Western Blot ou faire des analyses protéomiques pas spectrométrie de masse.

Discussion



Dans un premier temps, je discuterai les résultats obtenus pour la caractérisation du modèle *Pvalb* cKO et l'étude de la neurophysiopathologie de l'ataxie de Friedreich. Puis, dans un deuxième temps, je discuterai les résultats de l'approche de thérapie génique ainsi que des considérations plus générales sur les approches thérapeutiques pour l'AF. Je partirai de la discussion de l'article co-signé avec F. Piguet. Je ne reprendrai pas l'entièreté de la discussion mais je développerai d'avantage certains éléments et je discuterai également les résultats supplémentaires que j'ai obtenus.

1. La neurophysiopathologie de l'ataxie de Friedreich et le modèle murin *Pvalb* cKO

1.1. Modèle souris *Pvalb* cKO

Nous avons généré et caractérisé un nouveau modèle murin conditionnel avec une déplétion totale de la frataxine dans les cellules exprimant la parvalbumine, qui récapitule la ganglionopathie et la neuropathie sensitive de l'AF. La figure 39 résume les différentes atteintes comportementales, physiologiques, histologiques et moléculaires observées chez les souris *Pvalb* cKO.

Ce nouveau modèle présente de nombreux avantages pour l'étude de l'AF, en reproduisant certains symptômes décrits chez les patients. Il est également pertinent pour l'évaluation d'approches thérapeutiques. Les souris développent rapidement une ataxie proprioceptive progressive et une neuropathie sensitive, associées à la déficience en frataxine. Jusqu'à 8 semaines, ces atteintes sensibles sont uniques, conférant donc une fenêtre d'étude spécifique. De manière très intéressante, la perte de l'onde sensitive, mesurée par électromyogramme, est un évènement précoce de l'atteinte sensitive, non dépendante de l'absence des neurones. Les neurones sensitifs sont encore présents mais l'on observe déjà un défaut électrophysiologique (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 1D, 2B). À l'ataxie sensitive s'additionne, à partir de 8 semaines, une ataxie cérébelleuse qui résulte de la déplétion de la frataxine dans les cellules de Purkinje et les noyaux gris profonds du cervelet. Cependant, ce modèle conditionnel, bien que robuste, ne remplit pas l'ensemble des critères du modèle « idéal » de l'AF et présente des limitations. Tout d'abord, les cellules dans laquelle la Cre-Recombinase est exprimée présentent une absence totale de frataxine, au contraire des patients, qui expriment des taux résiduels d'une frataxine fonctionnelle. Les effets observés dans notre modèle sont donc probablement beaucoup plus drastiques et sévères que les effets résultants de la diminution transcriptionnelle du gène. De plus, nous observerons les défauts uniquement liés aux cellules déplétées en frataxine, les

autres cellules étant hétérozygotes pour la frataxine. Ce modèle ne permet donc pas de comprendre le rôle des cellules de Schwann dans les DRG dans l'AF par exemple. Cette composante gliale est considérée comme jouant un rôle dans l'AF, soit en apportant un soutien aux neurones (les cellules satellites des patients exprimeraient plus de frataxine que cellules satellites contrôles dans les DRG (Koeppen et al., 2016)), soit en aggravant le phénotype (perte du support trophique). Cependant, les résultats obtenus avec les souris *Pvalb* cKO tendent à montrer que les dysfonctions des neurones proprioceptifs peuvent se produire de manière autonome en absence de frataxine. Idéalement, des modèles murins possédant de très grandes expansions GAA ou des co-cultures de neurones sensitifs et de cellules de Schwann, différenciées d'iPSC de patients, permettraient d'évaluer cette composante gliale. Ensuite, avec la Cre Recombinase sous le contrôle du promoteur parvalbumine, la frataxine est déplétée dans les interneurons du cortex (tardivement par rapport à la pathologie proprioceptive) menant à des crises d'épilepsies et une mort prématurée des souris (non spécifique de l'AF). Cette mort prématurée représente l'une des limites principales, si ce n'est la limite majeure de ce modèle. En effet, chez les souris mutantes, jusqu'à 21 semaines, seuls les DRG lombaires présentent des déficiences (tendance à une perte neuronale, déficit de l'activité SDH) alors que les neurones des DRG cervicaux et thoraciques sont intacts (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 2B, 3A, S3C). On peut se demander si avec la progression de la maladie (après 21 semaines), des dégénérescences aux niveaux des DRG cervicaux et thoraciques seraient également observées (reproduisant l'atteinte des membres inférieurs précédant celle des membres supérieurs chez les patients). En parallèle, cette mort précoce nous empêche d'évaluer la possible dégénérescence des afférences des neurones sensitifs des DRG, dans les faisceaux et tractus de la moelle épinière. Enfin, et comme tout modèle d'étude murin, il y a de nombreuses différences entre l'Homme et la souris. En effet, le contexte génétique n'est pas le même et des différences au niveau de certains tissus existent. Par exemple, dans les DRG la quantité de cellules satellites est dépendante de la taille du DRG. Les DRG de souris contiennent donc moins de cellules satellites que les DRG humains (Koeppen et al., 2016). L'étude des cellules satellites, de leur prolifération et de leur rôle est donc limitée dans les modèles souris de l'AF.

1.2. La spécificité cellulaire de l'AF et les niveaux de frataxine

Une grande question dans le domaine de l'AF concerne la spécificité tissulaire et cellulaire de la maladie, et en particulier dans le système nerveux se pose la question

pourquoi les larges neurones proprioceptifs sont primairement et spécifiquement affectés par rapport aux autres neurones des DRG (neurones nociceptifs et mécanoréceptifs). De même, pourquoi les neurones du noyau dentelé du cervelet (noyau naturellement riche en fer) dégénèrent et s'atrophient ?

Pour tenter d'expliquer les spécificités tissulaires et cellulaires du SN de l'AF, souvent la longueur des axones des neurones proprioceptifs est évoquée (axones allant des DRG aux récepteurs sensitifs dans la périphérie). Cependant, au sein même des DRG, les axones des neurones mécanoréceptifs et nociceptifs sont tout aussi longs si ce n'est plus que les axones proprioceptifs, et ne sont pas affectés. La longueur des axones n'est donc pas suffisante pour expliquer la spécificité cellulaire de l'AF dans les DRG. Certains résultats obtenus dans ce travail, sur les niveaux d'expression de la frataxine, peuvent apporter des réponses. Les neurones proprioceptifs des DRG expriment 44 à 66% de la frataxine totale des DRG alors qu'ils représentent seulement 7,5% des cellules des DRG (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 1E). En revanche, au niveau de l'expression de l'ARNm *Fxn*, l'expression de transcrite observée correspond à l'expression attendue dans le cas de souris hétérozygotes (50% d'ARNm *Fxn*), l'ensemble des cellules exprimerait donc la même quantité d'ARNm *Fxn* (Figure 42). Les mêmes observations sont faites pour le cervelet où les cellules de Purkinje et les noyaux gris profonds sont déplétés en frataxine. Ainsi, il n'y a pas de corrélation entre les quantités d'ARNm *Fxn* et de frataxine produites. On peut donc supposer que la frataxine est régulée traductionnellement ou post-traductionnellement, de manière différente selon les cellules, en fonction de leurs besoins spécifiques. Cette large expression de la frataxine par les neurones proprioceptifs pourrait donc refléter un important besoin en frataxine pour leur activité. Ce besoin peut participer à l'explication de la spécificité cellulaire de l'AF et peut partiellement expliquer la vulnérabilité de ces neurones face au déficit en frataxine. Les différences d'expression de la frataxine entre les cellules des DRG sont en accord avec des résultats obtenus sur des coupes de DRG humains avec un marquage frataxine (Koeppen et al., 2016) Figure 6). Les auteurs décrivent une majorité de frataxine exprimée par les neurones, avec différentes intensités de marquage entre neurones et très peu par les cellules non-neuronales. Nos résultats semblent démontrer que parmi les neurones, la frataxine est majoritairement synthétisée par les larges neurones proprioceptifs (parvalbumine positifs).

Les questions qui se posent suite à cette observation sont évidentes :

- Pourquoi les neurones proprioceptifs ont besoin de plus de frataxine que les autres cellules des DRG ?
- Nécessitent-ils plus de centres Fe-S ?

- Une protéine à centres Fe-S est-elle spécifique de ces neurones ou du moins plus importante dans ces larges neurones ?
- Un composé nécessitant la frataxine pour sa synthèse ou son activité est-il enrichi dans les neurones proprioceptifs ?

L'expression spécifique des certaines protéines, ou l'enrichissement de telles protéines dans les neurones proprioceptifs, ne serait pas surprenante. En effet, il est de plus en plus démontré que les neurones proprioceptifs composent un groupe de neurones bien spécifique dans les DRG avec des marqueurs moléculaires spécifiques et peu de chevauchements avec les marqueurs des autres types de neurones ([Usoskin et al., 2014](#)). L'approche d'isolement des neurones proprioceptifs et leur analyse spécifique par séquençage haut débit pourrait apporter des réponses ou des pistes à ces questions, aussi bien en comparant les groupes de neurones proprioceptifs (GFP positifs) contrôles et mutants, qu'en comparant les différentes populations contrôles entre elles.

De plus, nous détectons une plus grande quantité de frataxine dans les DRG lombaires et thoraciques que dans les DRG cervicaux. Cette différence reflète-elle également un besoin plus important en frataxine ? Aux temps où nous effectuons nos expériences, seuls les DRG lombaires dégénèrent. Dans cette optique, la longueur des axones des neurones et leur sollicitation pourraient jouer un rôle dans la dégénérescence primaire des sections lombaires. En effet, les pattes antérieures des souris vont être beaucoup plus mobilisées que le reste du corps et par conséquent les neurones lombaires plus stimulés que les neurones thoraciques. Il en est de même chez les patients AF avec l'atteinte des membres inférieurs avant les membres supérieurs.

Dans le cas d'expansions GAA, une forte instabilité, avec une tendance à l'augmentation des triplets GAA, a été décrite dans les DRG ([De Biase et al., 2007a](#)). Cette instabilité pose la question du caractère progressif de l'ataxie sensitive. Cependant, les souris *Pvalb* cKO développent aussi une ataxie sensitive progressive malgré une absence totale en frataxine dans les neurones proprioceptifs. L'aspect progressif ne peut donc pas être uniquement expliqué par l'instabilité du GAA, mais résulte probablement d'une combinaison de différents facteurs.

1.3. Eléments de la neurophysiopathologie de l'AF identifiés avec ce nouveau modèle murin

1.3.1. Survie des neurones en absence de frataxine

Nos résultats montrent que dans le cas d'une déplétion totale en frataxine, à terme, l'ensemble des neurones dégénère et meurt, mais avec des temps de survie différents selon les neurones. Les neurones proprioceptifs semblent particulièrement résistants, ils développent rapidement un phénotype mais survivent longtemps dans les DRG. En effet, la frataxine est déplétée au stade embryonnaire E17,5 et jusqu'à 7,5 semaines, malgré une onde sensitive atteinte puis perdue, les neurones sont présents. Après 10,5 semaines, une tendance à une perte des neurones est observée mais, différents résultats tendent à prouver que certains neurones proprioceptifs, bien que complètement déficients, résident encore dans les DRG à des temps tardifs (marquage histo-enzymatique SDH à 18,5 semaines (Figure 44), expression tardive de l'ARNm *Pvalb* (Figure 43), expression des RAG (Figure 49)). À ces stades tardifs, certains neurones déficients sont encore présents mais la structure des DRG n'est plus intègre (DRG friables et difficiles à couper), probablement en raison de l'atteinte sévère des axones de ces neurones (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 2F). Notons que la mécanoréception et la nociception ne sont pas atteintes dans nos souris et les neurones sont totalement intègres malgré la structure abimée des DRG. Si on peut faire un parallèle du modèle murin avec l'espèce humaine, ces résultats sont très encourageants quant à la problématique cruciale de la présence des neurones proprioceptifs chez les patients au moment du diagnostic. En effet, à l'heure du diagnostic, la majorité des patients présente une perte sévère de la proprioception. Nos résultats tendent à montrer que même en absence complète de frataxine, et étant très affectés, les neurones proprioceptifs sont particulièrement résistants et survivent relativement longtemps dans les DRG. Cette résistance neuronale face à la mort cellulaire est un point central pour le développement d'approches thérapeutiques visant à augmenter les niveaux de frataxine dans les cellules. La question de neurodégénérescence et atrophie ou de problèmes neurodéveloppementaux et d'hypoplasie des larges neurones sensitifs des DRG est donc capitale. Il était communément accepté par les cliniciens de l'AF que la perte des larges neurones résulte de phénomènes de neurodégénérescence et d'atrophie. Des hypothèses d'origine neurodéveloppementale sont de plus en plus proposées (Koeppen et al., 2016, 2017) en raison d'absence de différences de taille des larges neurones dans différentes nécropsies, indépendamment de l'âge de début de la maladie et de l'âge de décès des patients. À mon avis, cette conclusion

est trop rapide par rapport aux analyses menées pour réfuter totalement l'hypothèse de neurodégénérescence. Etant donné que l'absence totale de frataxine est létale à des stades embryonnaires pour l'ensemble des organismes évalués, il est fortement probable que l'expression résiduelle de frataxine entraîne des défauts de développement de certaines structures. Cependant, avec une origine uniquement développementale, il semblerait difficile que les patients puissent marcher correctement, pratiquer des activités sportives et mener une vie normale avant l'apparition des symptômes. Les neurones proprioceptifs sont peut-être plus sensibles en raison d'une composante neurodéveloppementale, puis des déficiences neurodégénératives mènent à leur atrophie et à leur mort. Suite à ces observations et résultats, il convient donc de s'interroger sur le stade de la maladie auquel la mort neuronale survient mais également le temps de résistance que présentent ces neurones. Pour tenter d'y répondre, la genèse et l'étude de modèles murins avec une très large expansion pathogénique GAA seraient idéales et ce en analysant les DRG pendant le développement embryonnaire puis à la naissance. Pour ces études, ces souris doivent être générées et présenter des phénotypes sévères au niveau des DRG. De plus, l'utilisation de marqueurs spécifiques des neurones proprioceptifs sera essentielle pour l'analyse de ces DRG. L'approche d'isolement des neurones proprioceptifs et leur analyse spécifique permettront peut-être d'identifier de nouveaux marqueurs. Le marqueur Runx3, spécifique des neurones proprioceptifs au cours du développement pourrait également être utilisé ([Marmigère and Ernfors, 2007](#)). La souris FRDAkd pourrait aussi apporter des réponses sur l'atrophie ou l'hypoplasie des DRG en administrant la doxycycline à des souris gestantes et en analysant les embryons à différents stades embryonnaires ainsi qu'à la naissance. Pour la suite de cette discussion je partirai du principe que l'atteinte des neurones proprioceptifs résulte majoritairement d'une neurodégénérescence et qu'ils sont encore présents à la naissance.

Les autres neurones déplétés totalement en frataxine dégèrent également mais ils survivent moins longtemps que les neurones proprioceptifs (cellules de Purkinje ou interneurons du cortex). Les neurones des DRG seraient donc plus résistants à l'absence de frataxine que les autres neurones du SN. Une composante qui pourrait participer à la résistance particulière de ces neurones, du moins au ralentissement de leur déclin, est la capacité de régénérescence du SNP par rapport au SNC avec l'activation de gènes associés à la régénérescence (RAG).

1.3.2. Activation secondaire de gènes de régénérescence dans les DRG

En réponse à des dommages axonaux dans le SNP, un programme global se met en place dans les DRG pour initier et permettre une régénérescence axonale. L'un des RAG majeurs, *Atf3*, a été identifié comme surexprimé dans les DRG lombaires des souris *Pvalb* cKO, ainsi que l'un de ses gènes cibles, *Spr1a* (Figure 49). Dans la littérature, la surexpression du gène *Atf3* est considérée comme un signe de l'activation de ce facteur de transcription (Hunt et al., 2012; Seiffers et al., 2006). De plus, l'expression de son gène cible, *Spr1a*, est exactement corrélée aux niveaux d'expression d'*Atf3*, me permettant de proposer qu'ATF3 est actif dans les DRG dont les neurones proprioceptifs sont déficients en frataxine. À ce jour, peu d'informations sont connues sur le complexe de régulation d'ATF3, mais il est exprimé en cas de dommages axonaux, blessures ou neuropathie. L'expression d'ATF3 peut être activée par SOX11 ou cJUN mais pas nécessairement dans les neurones sensitifs primaires (Hunt et al., 2012). Ainsi, nous pouvons nous interroger sur le mécanisme moléculaire précis entraînant cette réponse secondaire dans les DRG des souris *Pvalb* cKO.

Les RAG ont besoin d'être exprimés de manière coordonnée pour mener à une régénérescence axonale efficace. L'expression isolée d'un RAG, même un RAG central comme ATF3, n'est pas suffisante (Chandran et al., 2016; Seiffers et al., 2006). Dans les DRG des souris *Pvalb* cKO, les autres RAG n'ont pu être identifiés ou validés comme surexprimés. Deux hypothèses quant à cette absence de surexpression sont possibles : en raison de la faible proportion des neurones proprioceptifs dans les DRG, les signaux sont trop dilués pour être détectés, mais il se pourrait aussi que l'ensemble des RAG ne soit pas activé ou que très légèrement. En effet, dans notre modèle murin, les nerfs dégénèrent partiellement, puisque seules les fibres proprioceptives sont affectées. Au contraire, lors d'une lésion de nerf, toutes les fibres, ou presque, vont dégénérer et émettre des signaux de dommages jusqu'à leur corps cellulaires afin d'activer les voies de régénérescence. Je pense que l'absence de détection d'expression d'autres RAG résulte d'une combinaison de ces deux hypothèses, activation partielle du programme RAG et dilution des signaux. Ces réponses se mettent en place de manière secondaire pour palier à la neuropathie sensitive à partir de 7,5 semaines. À défaut de mener à une régénérescence totale, elles permettent probablement un ralentissement du phénotype et confèrent une forme de résistance aux neurones proprioceptifs qui meurent tardivement. Ces éléments identifiés démontrent l'importance de travailler sur des modèles animaux afin de pouvoir étudier les mécanismes physiologiques globaux.

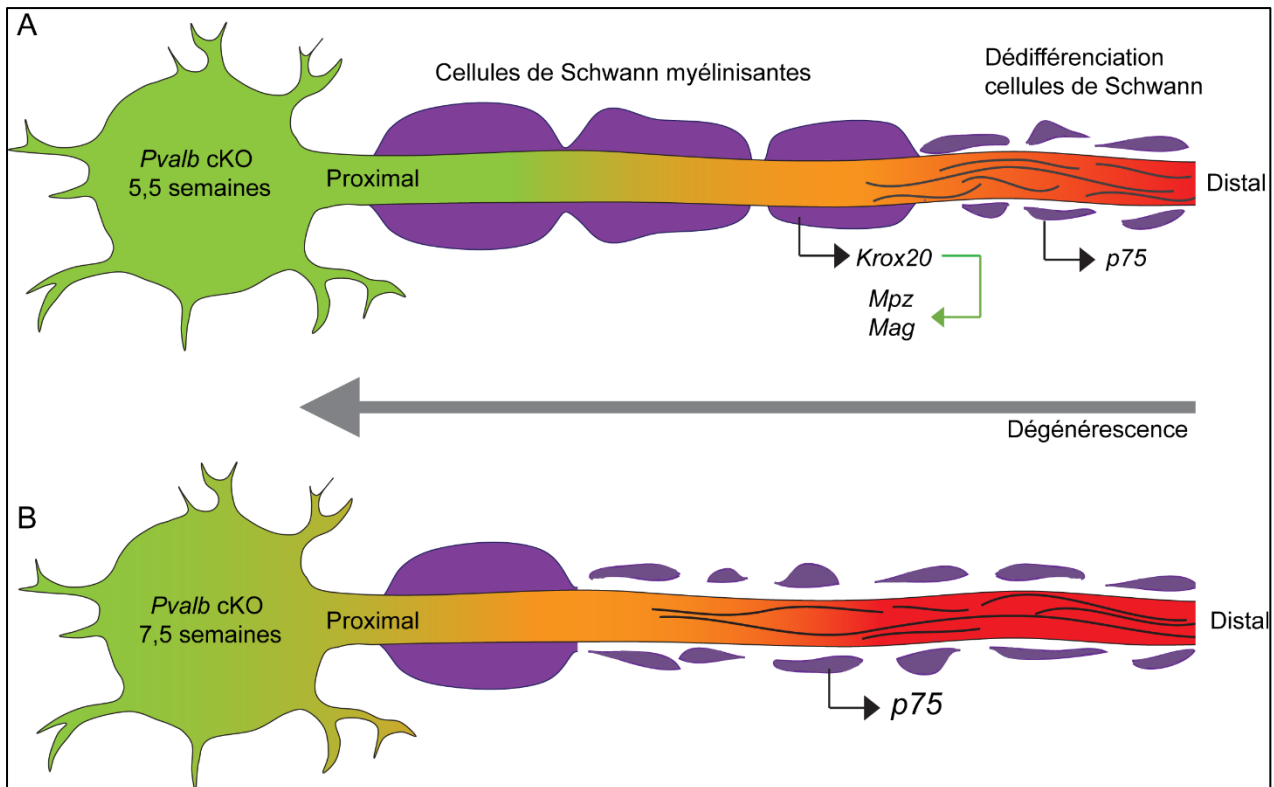


Figure 56 : Modèle potentiel du mécanisme de dégénérescence des axones du nerf sciatique des souris *Pvalb* cKO.

Les axones des neurones proprioceptifs des DRG des souris *Pvalb* cKO à 5,5 semaines (A) et 7,5 semaines (B) sont représentés. La dégénérescence progresse de la région distale vers la région proximale de l'axone. (A) A la suite de dommages axonaux (axone en rouge), les contacts avec les cellules de Schwann sont rompus, entraînant leur dédifférenciation et donc, l'expression du marqueur *p75*. Au niveau des régions dans lesquelles les axones dégénèrent mais le contact n'est pas encore perdu (en orange), les cellules de Schwann surexpriment les gènes codant les protéines structurales de la myéline (*Mpz*, *Mag*) en activant le facteur de transcription EGR2 (*Krox20*). Avec la progression de la neuropathie (B), la majorité des cellules de Schwann sont dédifférenciées et expriment le marqueur *p75*.

Dans le SNC, non capable de régénérescence, ces RAG ne sont pas exprimés en cas de dommages axonaux. Des études sont menées afin d'identifier des molécules capables d'initier ce programme de régénérescence dans le CNS, en mobilisant une large gamme de voies de signalisation. Chandran et al. ont identifié l'ambroxol comme un composé capable de promouvoir la régénérescence dans le SNC (Chandran et al., 2016). De telles approches seraient-elles envisageables pour l'AF ? Dans le cas où des molécules efficaces pour activer les processus de régénérescence du SNC seraient identifiées, pourraient-elles améliorer la neuropathie sensitive, ou au moins la ralentir ?

1.3.3. Neuropathie sensitive progressive

Une neuropathie sensitive est observée par microscopie électronique et des dérégulations de l'expression de gènes, en accord avec ce phénotype progressif sont détectées dans les nerfs sciatiques des souris *Pvalb* cKO (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 2E et Figure 52). Je proposerai ici un modèle potentiel du mécanisme de dégénérescence progressive pouvant expliquer ces résultats moléculaires (Figure 56).

Les dégénérescences de nerfs procèdent toujours de la région distale vers la région proximale de l'axone. Chez les souris *Pvalb* cKO, à 5,5 semaines, les dommages axonaux sont localisés dans les régions distales des axones des neurones proprioceptifs, où le contact entre l'axone et les cellules de Schwann est perdu, conduisant à la dédifférenciation des CS qui expriment alors *p75*. Dans les régions adjacentes, vers la zone proximale, les axones, bien que déficients, sont encore en contact avec les CS myélinisantes. Ces dernières, pour soutenir les axones défaillants, surexpriment alors le facteur de transcription EGR2 (gène *Krox20*) qui active l'expression des gènes codant pour les protéines de structure de la myéline (Figure 56A). Plus tard, avec la progression des phénotypes, la neuropathie sensitive est de plus en plus sévère et la dégénérescence se propage le long du nerf, vers les corps cellulaires des DRG. La majorité des contacts axones-cellules de Schwann se perd, les CS dédifférenciées expriment alors *p75* et l'expression de gènes codant pour les protéines de structure de la myéline est réduite (Figure 56B). Ce modèle est une proposition de mécanisme permettant de relier la neuropathie sensitive observée au niveau de la structure des nerfs sciatiques et la neuropathie moléculaire.

1.3.4. Diminution de l'expression de l'ARNm *Pvalb*

Les expressions de l'ARNm *Pvalb* dans les DRG et le cervelet des souris *Pvalb* cKO diminuent (Figure 43). Cette diminution est-elle une réponse directe des cellules face à l'absence de frataxine ? Elle pourrait aussi résulter de la dégénérescence globale des neurones proprioceptifs qui exprimeraient alors moins ce marqueur spécifique. Ainsi, quelle est la signification pour les cellules de la sous-expression de la parvalbumine ? La parvalbumine est une protéine impliquée dans la signalisation du calcium (fixation du calcium) et est donc importante pour de nombreux processus tels que la régulation du cycle cellulaire, la production de seconds messagers ou encore l'organisation des microtubules (Cates et al., 1999). On peut donc se demander si la diminution de l'expression de la parvalbumine entrainerait une dérégulation de l'homéostasie du calcium, qui amplifierait alors la dégénérescence des neurones. Une souris Knock-out pour la parvalbumine a été générée. Elle développe des phénotypes associés aux troubles du spectre autistique (Wöhr et al., 2015), ce qui ne correspond pas avec les phénotypes ataxiques développés par les souris *Pvalb* cKO. Un point qui mérite cependant d'être souligné est l'augmentation à la susceptibilité à des crises épileptiques chez ces souris KO pour la parvalbumine. La mort prématurée de nos souris *Pvalb* cKO résulte-t-elle d'un défaut dans l'expression de la parvalbumine ?

1.3.5. Physiopathologie acceptée de l'AF

Les analyses des DRG, après de nombreuses mises au point des dissections et des expériences, ont permis de mettre en avant et valider certains éléments physiopathologiques de l'AF dans les larges neurones des DRG et dans les cellules de Purkinje du cervelet. Jusqu'à présent, très peu d'informations concernant les atteintes moléculaires dans les neurones des DRG étaient disponibles. Classiquement des larges vacuoles, reliées à de l'autophagie étaient décrites dans les neurones des DRG. Dans les neurones déplétés en frataxine du modèle *Pvalb* cKO, j'ai pu mettre en évidence un déficit des protéines à centres Fe-S, suivi d'une dérégulation du métabolisme du fer (dans les cellules de Purkinje). Des défauts mitochondriaux sont observés menant ensuite à une mort cellulaire (plus ou moins rapide selon les neurones). Il semblerait donc que les premiers éléments affectés résultant de la perte de la frataxine soient similaires dans les différents tissus atteints dans l'AF, neuronaux et non-neuronaux. Certains mécanismes secondaires, liés à l'absence de

frataxine, seraient ensuite spécifiques aux tissus et aux types cellulaires, avec la dérégulation d'éléments propres au tissu en question.

Déficit des protéines à centres Fe-S

Au niveau des DRG, un déficit de la succinate déshydrogénase (SDH) est mis en évidence dans 8% des neurones (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 3B). Je n'ai malheureusement pas réussi à prouver expérimentalement que ce sont bien les neurones proprioceptifs (parvalbumine positifs) qui dégénèrent, en raison de difficultés techniques. Entre 5,5 et 8,5 semaines le même pourcentage de neurones déficients au niveau de l'activité SDH est observé (8%) mais avec une différence dans l'intensité du signal (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 3A, S4E). À 8,5 semaines, les neurones sont complètement « blancs » à la suite du marquage histo-enzymatique alors qu'à 5,5 semaines ils sont légèrement plus foncés. Même si un biais expérimental résultant de la coupe des DRG ou du marquage pourrait expliquer ces différences, on peut également proposer une progression dans le déficit de l'activité de la SDH au cours du temps. Cette dernière hypothèse se confirme avec la progression du phénotype dans les cellules de Purkinje déficientes pour l'activité SDH entre 13,5 et 18,5 semaines, du moins pour les cellules de Purkinje encore présentes à 18,5 semaines (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 3C). Il est difficile de porter des conclusions pour les DRG à 18,5 semaines en raison de la structure très affectée des organes. Ces marquages histo-enzymatique ont permis de mettre en avant le déficit des centres Fe-S dans un nombre très faible de cellules dans les DRG et le cervelet, mais, je pense qu'elle présente des limites en termes de seuil minimal requis pour observer une activité SDH. De plus, l'analyse visuelle ne permet probablement pas de mettre en avant toutes les différences. Enfin, les intensités hétérogènes du marquage histo-enzymatique SDH entre les neurones des DRG contrôles indiquent des niveaux d'activité variés de l'enzyme, reflétant probablement des besoins différents des neurones.

La SDH est une protéine à centres Fe-S parmi de nombreuses autres protéines à centres Fe-S, mitochondriales, cytosoliques ou nucléaires. Le chaîne respiratoire mitochondriale est donc affectée dans les mitochondries des neurones (le cycle de Krebs probablement aussi) et nous observons des mitochondries qui dégénèrent (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 2E) . La question qui se pose est donc de savoir à quel point l'impact de l'absence de la frataxine sur les protéines à centres Fe-S cytosoliques et nucléaires joue sur le phénotype neurologique de l'AF, avec les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN avec l'hélicase XPD, l'ADN polymérase ϵ , dans la traduction avec ABCE1 ou encore dans le métabolisme des nucléotides et acides aminés ?

Dérégulation du métabolisme du fer

J'ai pu mettre en évidence une dérégulation du métabolisme du fer dans les cellules de Purkinje du cervelet avec l'augmentation de l'expression du récepteur responsable de l'import du fer dans les cellules TfR1, probablement à la suite de la stabilisation de son ARNm par IRP1, non coordonné à un centre Fe-S. Par contre, je n'ai pas réussi à montrer cette dérégulation par immunofluorescence dans les neurones proprioceptifs des DRG en raison d'une expression de TfR1 dans de nombreux neurones sensitifs. Ces mécanismes résultant du déficit en frataxine sont donc observés dans les cellules non neuronales ainsi que dans les neurones du cervelet. On peut donc supposer que le mécanisme est similaire dans les neurones proprioceptifs des DRG. Une immunofluorescence anti-TfR1 sur des coupes de DRG fixés de souris *Pvalb* cKO *mT/mG* et contrôles (*Pvalb* cWT *mT/mG*) permettrait probablement mettre en évidence cette dérégulation.

Accumulation de fer ?

Dans ce modèle, je n'ai pas pu mettre en évidence une accumulation de fer en parallèle de la dérégulation du métabolisme du fer, aussi bien dans les cervelets que les DRG. Si accumulation de fer il devait y avoir, on peut probablement relier l'absence de détection à la cinétique des évènements. En effet, dans le modèle murin CRISPR-Cas9 avec la frataxine déplétée dans les neurones du cortex, l'accumulation de fer est un évènement tardif de la pathologie (Chen et al., 2016b). Ainsi, dans notre modèle, au niveau des neurones, il se pourrait que les cellules meurent à la suite du déficit en frataxine avant que l'on puisse détecter une accumulation de Fer.

Évènements pathologiques primaires et secondaires résultant de la déplétion en frataxine

L'atteinte proprioceptive spécifique, développée par les souris *Pvalb* cKO, résulte de la déplétion de la frataxine dans les neurones proprioceptifs des DRG. Étant les neurones primairement affectés dans l'AF (avec les neurones du noyau dentelé du cervelet), il est essentiel de les étudier pour comprendre la neurophysiopathologie de l'AF. Cependant, les analyses sur des DRG de souris sont relativement complexes, de la dissection des animaux aux techniques expérimentales utilisées, puisque ces neurones proprioceptifs ne représentent que 15% des neurones du DRG et 7,5% des cellules totales. De nombreuses techniques ont dû être mises au point au cours de ma thèse mais il a tout même été difficile d'identifier les voies physiopathologiques affectées à la suite de déplétion en frataxine. Les

analyses NGS ouvrent des pistes d'analyse pour comprendre les événements pathologiques. Néanmoins, nous avons probablement effectué le séquençage du transcriptome des souris *Pvalb* cKO trop tôt au cours de la caractérisation du modèle, sans avoir eu assez de recul. En effet, l'analyse RNAseq a été réalisée sur des ARNm de DRG totaux alors que seuls les DRG lombaires présentent un phénotype (élément identifié ultérieurement). De plus, la faible proportion des neurones proprioceptifs (parvalbumine positifs) entraîne une importante dilution des signaux des gènes différenciellement exprimés. Au vu de l'importance des centres Fe-S dans de nombreux processus cellulaires (mitochondriaux, cytosoliques et nucléaires), de nombreuses voies sont probablement dérégulées en absence totale de frataxine mais les signaux émis par les neurones proprioceptifs sont masqués dans notre modèle *Pvalb* cKO. J'ai donc mis au point une technique d'isolement des neurones proprioceptifs pour leur analyse spécifique.

1.4. Isolement des neurones proprioceptifs pour leur analyse spécifique

À partir des souris *Pvalb* cKO *mT/mG*, les populations isolées par FACS, neurones proprioceptifs déplétés en frataxine d'un côté et le reste des cellules des DRG de l'autre, semblent relativement pures (Figure 55). Les analyses transcriptomiques de ces populations devraient donc apporter des résultats particulièrement intéressants pour la compréhension des mécanismes moléculaires de l'AF dans les neurones proprioceptifs, mais aussi pour l'étude des réponses des cellules avoisinantes. Ces analyses devraient donc nous fournir un tableau général des voies moléculaires affectées primairement (à 3,5 semaines) et secondairement (à 7,5 semaines), en absence de frataxine, qui mènent à un dysfonctionnement puis à la mort des cellules. Jusqu'à présent, aucune étude sur des neurones proprioceptifs isolés n'a été effectuée. On peut s'attendre à observer de nombreuses dérégulations en raison de la sévérité du phénotype des souris et de l'importance des centres Fe-S et donc de la frataxine pour les cellules. Logiquement, des voies de signalisation, spécifiques des mitochondries, devraient être dérégulées. En effet, la chaîne respiratoire est affectée de manière primaire et des défauts mitochondriaux sont observés dans certains neurones des DRG. De plus, certaines protéines à centres Fe-S étant impliquées dans la réparation de l'ADN, on peut également envisager d'observer des défauts dans ces processus cellulaires, ou encore dans les voies de biosynthèse des nucléotides.

Cet isolement des larges neurones déplétés en frataxine, nous permettra également d'analyser l'activation d'autres RAG à 7,5 semaines (le programme n'étant pas activé à 3,5

semaines) et donc de déterminer si le programme est activé dans sa globalité. On pourra également évaluer l'expression des gènes de stress classiquement observés comme surexprimés dans les modèles murins conditionnels de l'AF (Seznec et al., 2005). Aux vues de la faible quantité de matériel isolé à partir de l'isolement des neurones proprioceptifs, il nous sera possible de valider des dérégulations au niveau de l'expression des gènes (par qRT-PCR) sur ces extraits, mais difficilement au niveau protéique par Western Blot. Les déficiences protéiques seront donc évaluées par immunofluorescences sur des coupes de DRG de souris *Pvalb* cKO.

En parallèle, ces différents éléments seront analysés et validés dans des cultures primaires de neurones sensitifs murins. Ces cultures primaires ont été établies dans le laboratoire et sont en cours de caractérisation (projet de thèse d'Olivier Griso). Elles sont générées à partir d'embryon de souris portant les allèles conditionnels pour la frataxine (*Fxn*^{L3/L3}) au stade embryonnaire E13,5 et l'infection des neurones, mis en culture, avec un AAV9-Cre permet de dépléter la frataxine.

L'étude des voies identifiées comme dérégulées serait également très intéressante chez la souris FRDAkd (inductible à la doxycycline) ainsi que la comparaison de nos données transcriptomiques obtenues sur les neurones proprioceptifs isolés avec les résultats obtenus par les auteurs dans les DRG (Chandran et al., 2017). Dans cette étude, les auteurs ne fournissent pas la liste détaillées des gènes dérégulés mais les noms des voies moléculaires identifiées (réponse immunitaire, lysosome et phagocytose, endocytose et transport vésiculaire, cascade de signalisation p53, liaisons aux nucléosides et nucléotides, mitochondrie, etc.). La comparaison de l'ensemble des données sera, je pense, très enrichissante pour la compréhension moléculaire de l'AF et les spécificités liées aux neurones proprioceptifs. Pour compléter notre approche, il serait idéal de valider les voies affectées dans des modèles possédant une expansion GAA menant à une diminution de l'expression de la frataxine, aussi bien des neurones sensitifs différenciés à partir d'iPSC en adaptant les nouveaux protocoles de différenciation (Alshawaf et al., 2018) que dans des modèles murins avec une expansion pathogénique GAA très longue pour être dans un contexte physiologique. Une souris portant un YAC *FXN* humain contenant plus de 800 répétitions GAA sur un fond génétique KO pour la frataxine est désormais disponible au Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/strain/030395>) et une colonie est en cours de génération dans notre animalerie. Si ces souris présentent des taux fortement réduits de frataxine, menant à des phénotypes robustes, nous pourrions analyser les voies identifiées comme dérégulées par immunofluorescences et immunohistochimies pour les niveaux protéiques ou par hybridation *in situ* pour l'évaluation de l'expression des gènes. Certains

éléments, identifiés comme spécifique à la pathologie de l'AF, pourront alors servir de biomarqueurs moléculaires pour les essais thérapeutiques dans les différents modèles d'études.

De plus la comparaison des groupes contrôles de cellules isolées entre eux, nous permettra peut-être d'identifier des spécificités propres aux neurones proprioceptifs. Récemment, une analyse NGS de neurones sensitifs de DRG et de ganglions trigéminaux isolés par FACS, à partir de souris Adviline-EGFP, a été publiée (Lopes et al., 2017). Sous la dépendance de ce promoteur, l'ensemble des neurones sensitifs est positif à la GFP, permettant leur isolement des cellules non-neurales pour une analyse spécifique. Ces résultats pourront servir de points de comparaisons avec nos résultats sur les neurones proprioceptifs (GFP+) et le reste des cellules (GFP-) *Pvalb* cWT *mT/mG*.

Dans le cas où cette approche d'étude ne donnerait pas de résultats concluants, la microdissection et l'analyse transcriptomique ou protéomique de cellules de Purkinje du cervelet seraient envisageables pour le modèle *Pvalb* cKO (Ruegsegger et al., 2016). Cependant, cette approche est à considérer en fonction de la question posée au départ. En effet, si l'on cherche à identifier les mécanismes moléculaires menant à l'ataxie proprioceptive, je ne pense pas que l'étude des cellules de Purkinje soit adaptée. Le CNS et le PNS sont différents au niveau de nombreux éléments tel que la myélinisation ou la capacité de régénérescence, ainsi nous verrions les mécanismes communs mais pas forcément les mécanismes uniques aux neurones proprioceptifs des DRG.

L'ensemble de ces éléments montre à l'évidence l'importance des recherches sur différents modèles d'étude, animaux et cellulaires, pour la compréhension des atteintes pathologiques moléculaires et cellulaires d'une maladie.

2. Thérapie génique pour l'AF

Le modèle *Pvalb* cKO nous a permis d'établir la preuve de concept de l'efficacité d'une approche de thérapie génique neuronale pour l'ataxie de Friedreich, avec la capacité de prévenir l'apparition des phénotypes avec un traitement pré-symptomatique et de reverser l'ataxie sensitive avec un traitement post-symptomatique. De nombreuses analyses précliniques chez des mammifères de grande taille seront nécessaires avant de pouvoir envisager des essais cliniques chez des patients. Des entreprises biotechnologiques sont en train d'effectuer ces analyses précliniques afin d'optimiser le vecteur ainsi que la méthode d'injection. Je suis bien consciente que des essais cliniques chez l'Homme ne seront pas initiés dans l'immédiat mais pour certaines parties de cette discussion, je me permettrai de me projeter dans un futur où ces essais cliniques sont proches.

2.1. Approche pré-symptomatique de TG pour le modèle *Pvalb* cKO

Le traitement précoce, à 3,5 semaines des souris *Pvalb* cKO avec une administration intraveineuse d'AAV9-hFXN permet de prévenir l'apparition des phénotypes sensitifs (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 4). En théorie, ces résultats ne sont pas surprenants, mais ils démontrent que l'AAV9-hFXN est capable de transduire les neurones proprioceptifs des DRG, qui expriment alors la frataxine après une injection IV. Bien que le vecteur soit capable de traverser la BHE, les neurones corticaux ne sont, cependant, pas suffisamment transduits pour empêcher le développement de l'atteinte cérébrale et la mort prématurée des animaux des suites de crises d'épilepsie. Cette mort prématurée ne nous permet donc pas d'évaluer l'expression à long terme du vecteur et la correction de l'atteinte sensitive.

Dans le cas où, un jour, une thérapie génique serait disponible pour les patients, la question du diagnostic précoce de l'AF (à la naissance par exemple) se posera, afin de prévenir potentiellement l'apparition des symptômes.

2.2. Approche post-symptomatique de Tg pour le modèle *Pvalb* cKO

Pour l'approche de TG post-symptomatique, avec le traitement à 7,5 semaines, deux éléments sont à distinguer : les atteintes sensitives (avec la ganglionopathie et la neuropathie sensitive) d'une part et les atteintes cérébelleuse et cérébrale d'autre part. L'administration intraveineuse d'AAV9-hFXN permet une réversion rapide de la neuropathie sensitive, mise en place à la suite de la déplétion en frataxine. Cette réversion traduit une

plasticité impressionnante des neurones proprioceptifs des DRG, déjà déficients au moment de l'injection du vecteur. Étant donné la capacité de régénérescence du PNS, on pouvait s'attendre à une plasticité des neurones sensitifs mais nous ne nous attendions pas à une amélioration des phénotypes comportementaux et électrophysiologiques dès une semaine après traitement. Pour l'approche de TG cardiaque dans le modèle MCK, une semaine après traitement, des améliorations physiologiques étaient également observées (Perdomini et al., 2014). Cette rapidité de correction nous permet de proposer (comme pour l'approche cardiaque) que dans un système déplété en frataxine, une expression très faible de FXN est suffisante pour induire des effets bénéfiques aux cellules. En effet, à la suite de l'injection, le vecteur thérapeutique à ADN simple brin doit transduire les cellules, rejoindre le noyau, synthétiser le brin complémentaire pour ensuite exprimer la frataxine. Ces différentes étapes nécessitent du temps, nous ne nous attendions donc pas à une telle rapidité de correction des phénotypes. Les patients AF présentant une expression résiduelle de frataxine, on pourra s'attendre à ce que les effets thérapeutiques mettent plus de temps à apparaître au niveau de l'amélioration des symptômes de la maladie.

La surexpression de la parvalbumine observée par immunofluorescence dans les DRG, une semaine après traitement, traduit une réponse des cellules (Figure 45). Nous ne savons cependant pas si la surexpression de ce marqueur a un lien direct dans la correction des phénotypes ou si elle reflète simplement l'activation des cellules. Une semaine après traitement, les techniques utilisées pour la mesure de l'activité SDH ne m'ont pas permis de mettre en avant une amélioration de l'activité dans les neurones proprioceptifs des DRG. Comme nous observons une amélioration des phénotypes comportementaux et physiologiques (EMG), je pense que cette absence de détection des signaux SDH résulte de la limite de sensibilité de la technique histo-enzymatique employée. En effet, il serait logique que la chaîne respiratoire de la mitochondrie soit fonctionnelle aux vues des améliorations observées chez les animaux traités. À 18,5 semaines, certains neurones des DRG des souris *Pvalb* cKO traitées sont encore SDH négatifs mais la structure des DRG est totalement intacte (Figure 44) et à cet âge-là, l'onde sensitive des souris, évaluée par EMG, est totalement normalisée et l'ataxie proprioceptive est corrigée (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 5). Ainsi, le vecteur AAV9-hFXN ne transduit probablement pas tous les neurones proprioceptifs (d'où la présence de neurones SDH négatifs) mais suffisamment pour avoir une correction physiologique et comportementale de l'atteinte proprioceptive. Il semblerait donc que tous les neurones proprioceptifs n'ont pas besoin d'être corrigés pour avoir un fonctionnement global normalisé. Ainsi il devient intéressant de déterminer quel est le seuil de transduction nécessaire pour obtenir une réversion des phénotypes ?

Des analyses de dose-réponses permettront de répondre à cette question et permettront de déterminer la dose de vecteur à injecter, sur un modèle murin comme le modèle *Pvalb* cKO mais également de transposer les résultats pour les mammifères de grande taille comme les primates non-humains. Le choix de sérotype viral et la nature du promoteur utilisé en amont du gène thérapeutique seront également essentiels. Cette non-transduction de tous les neurones proprioceptifs, pourrait également expliquer l'expression persistante des RAG dans les DRG à des temps tardifs (Figure 50). En revanche, l'ultrastructure des nerfs sciatiques des souris *Pvalb* cKO traitées est similaire à la structure des nerfs contrôles, traduisant des axones sains (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 6G). Ainsi, des substances neurotrophiques pourraient-elles être échangées dans les nerfs permettant une correction structurale totale ? Le programme RAG mis en place permet-il de corriger ces fibres encore déficientes ? L'activation de ce programme de régénérescence axonale peut aussi participer à la rapidité de correction de la neuropathie sensitive à la suite de l'administration du vecteur apportant la frataxine humaine.

Au niveau du modèle murin inductible FRDAkd, le retrait de doxycycline, permettant la réexpression de la frataxine, ne permet pas de reverser totalement la ganglionopathie et la neuropathie sensitive, les phénotypes étant seulement partiellement corrigés (Chandran et al., 2017). Cette différence par rapport à notre modèle peut s'expliquer par le fait que dans la souris FRDAkd, l'expression de la frataxine est diminuée, voire éteinte dans l'ensemble des cellules des DRG, alors que seuls les neurones proprioceptifs sont affectés dans les DRG des animaux *Pvalb* cKO.

Concernant les atteintes cérébelleuses et cérébrales, les injections intraparenchymales d'AAVrh10-hFXN permettent une correction partielle des cellules de Purkinje. Cette correction partielle s'explique par la diffusion limitée du vecteur dans le cervelet, empêchant la transduction de l'ensemble des cellules de Purkinje, (démontrée par les marquages immuno-histochimiques HA, histoenzymatiques SDH et les immunofluorescences TfR1 et GFAP (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 6)). Cette correction partielle permet de stabiliser le phénotype jusqu'à 9,5 semaines puis, une aggravation est observée, avec de nombreux tremblements, mais jamais de manière aussi sévère que chez les souris *Pvalb* cKO non traitées (Piguet, de Montigny et al., 2018, Figure 5B). Malgré des injections IP d'AAVrh10-hFXN dans le striatum des animaux, la composante cérébrale n'est pas corrigée et conduit à la mort prématurée des souris à 21 semaines des suites de crises d'épilepsie.

2.3. Approche de thérapie génique pour l'AF en général

Nos résultats démontrent le potentiel d'une approche de thérapie génique *in vivo* en utilisant des AAV pour traiter l'atteinte neuronale de l'ataxie de Friedreich. De nombreuses étapes précliniques, sur des modèles murins et sur des modèles mammifères de grande taille, seront néanmoins indispensables avant toute approche clinique chez des patients AF.

De manière générale, pour les approches de thérapie génique, Cheever et al. ont proposé un guide des bonnes pratiques (Cheever et al., 2015) :

- les effets précis du traitement doivent être clairement définis au départ afin de conduire rigoureusement les expériences et analyser au mieux les données : qu'attend-on de la thérapie ?
- il faut savoir s'arrêter au cours de l'optimisation du protocole et du vecteur c'est à dire définir quand s'arrêter pour avoir le bon vecteur thérapeutique.
- les bons modèles animaux doivent être utilisés, pour les approches précliniques, dans le contexte de la maladie visée, du choix du vecteur, et de l'intervention thérapeutique Concernant la preuve de concept de l'efficacité de la TG, l'effet thérapeutique doit être majeur et robuste chez les animaux modèles utilisés. En effet, l'efficacité de la thérapie sera probablement réduite chez les patients en raison de la production du vecteur, de la réponse immunitaire et de l'hétérogénéité de la population. En parallèle, le choix des modèles mammifères de grande taille est essentiel pour définir le choix de la voie d'administration du vecteur, l'accès chirurgical et étudier la réponse de l'hôte au transgène et au vecteur.
- l'ensemble des résultats, positifs comme négatifs, doit être communiqué à la communauté scientifique, aussi bien les résultats du secteur de recherche public que du secteur privé.

Pour le lancement et la continuité des essais cliniques, les agences sanitaires (FDA aux Etats-Unis et EMA en Europe) regardent la sûreté de l'approche thérapeutique, la dose de vecteur employée, la fabrication de ce dernier, ainsi que l'efficacité de la TG avec comme toile de fond la question centrale : les effets bénéfiques sont-ils supérieurs aux risques encourus dans l'approche thérapeutique ?

Je ne considérerai ici que quelques éléments à évaluer dans les études précliniques chez des modèles murins et mammifères de grande taille pour le développement d'une approche de TG pour l'AF. Des entreprises biotechnologiques travaillent actuellement sur ces éléments, je me baserai donc sur des résultats de l'entreprise Voyager THERAPEUTICS, publiés sur leur site internet voyagertherapeutics.com, qui espère

observer une amélioration de l'équilibre, de la marche, de la sensibilité, de la coordination, de la force et de la capacité fonctionnelle chez les patients AF.

2.3.1. Optimisation du vecteur et voie d'administration

À la dose utilisée dans notre étude (5×10^{13} vg/kg) avec une injection intraveineuse, l'AAV9-hFXN transduit suffisamment les neurones sensitifs des DRG pour observer une correction des phénotypes. Néanmoins, en sera-t-il de même chez les mammifères de grande taille ? Les questions sont nombreuses. Comment le vecteur sera-t-il distribué dans l'organisme ? Quelle dose de vecteur permettra une transduction suffisante chez les patients pour avoir un effet bénéfique ?

Les injections intraparenchymales ne permettant pas de transduire l'ensemble des neurones des régions ciblées, et imposent des procédures chirurgicales lourdes. Ainsi, quelle sera la méthode d'administration la plus efficace pour cibler les tissus d'intérêts de la maladie ? L'AF étant une maladie multi-systémique il serait intéressant d'administrer en IV des vecteurs capables de passer la BHE et capables de transduire efficacement le SN, tel que les vecteurs PhP.eB (pour l'encéphale) ou PhP.S (pour la composante spinocérébelleuse de l'AF), à la condition où ces vecteurs peuvent transduire les régions du SNC touchées dans l'AF, tel que le noyau dentelé du cervelet (Chan et al., 2017).

L'entreprise Voyager THERAPEUTICS est en cours de recherche et sélection du meilleur vecteur candidat à la suite d'optimisations de la capsid, du promoteur et des caractéristiques du transgène FXN (vecteur VY-FXN01). Ces vecteurs optimisés sont testés sur le modèle murin *Pvalb* cKO à différentes doses pour évaluer leur efficacité ainsi que sur des primates pour déterminer la sécurité du vecteur, sa biodistribution et l'expression du transgène par des injections intraveineuse ou intrathécale. Les premiers résultats sont disponibles sur le site internet de Voyager THERAPEUTICS (https://www.voyagertherapeutics.com/wp-content/uploads/2017/10/ESGCT_slides.pdf).

Chez les primates, une injection IV du vecteur optimisé, capable de passer efficacement la BHE, permet une expression du transgène dans de nombreuses régions du SN dont le noyau dentelé du cervelet, les motoneurones de la moelle épinière, les neurones du tronc cérébral ou encore le cortex moteur. Ces résultats offrent donc la possibilité d'une approche IV pour l'AF. De plus, au niveau des DRG des primates injectés, ce vecteur optimisé permet des expressions de frataxine 10x supérieures à celle mesurée après une injection IV d'AAV9. Par ailleurs, ce vecteur est plus efficace dans la correction des phénotypes du modèle *Pvalb* cKO que l'AAV9-hFXN utilisé pour notre preuve de concept. À

haute dose, la capacité forte de passage de la BHE de ce vecteur, permet, en parallèle de l'administration IP d'AAVrh10-hFXN, de corriger l'ataxie cérébelleuse menant à la survie des souris traitées avec une expression durable du transgène pendant 10 mois. Ce vecteur optimisé semble donc très prometteur pour une approche clinique de TG.

À la suite d'injection IT d'AAVrh10 chez des primates, l'entreprise décrit également une forte expression de la frataxine dans les ganglions sensitifs et dans différents groupes de neurones de la moelle épinière (à tous les niveaux de la moelle) ainsi qu'une expression relativement faible dans le noyau dentelé.

Il serait intéressant d'évaluer ces approches de TG (l'AAV9-hFXN et surtout le vecteur optimisé de l'entreprise Voyager THERAPEUTICS) dans le modèle murin FRDAkd avec une diminution de l'expression de la frataxine suite à l'administration de doxycycline (Chandran et al., 2017). En effet, cette souris présentant des phénotypes neurologiques et cardiaques de l'AF, l'efficacité de l'approche de TG pourrait donc être évaluée pour ces deux aspects majeurs de l'AF dans un même modèle.

2.3.2. Toxicité et réponse immunitaire

Les doses de vecteurs utilisées dans notre approche thérapeutique de génèrent pas de toxicité. Cependant les souris ne sont pas les modèles animaux les plus adaptés pour étudier la toxicité du vecteur, du transgène ainsi que de la réponse immunitaire. Des études précliniques sur les mammifères de grande taille permettront d'évaluer les risques de toxicité ou d'activation du système immunitaire en réponse au vecteur ou au transgène. L'utilisation de vecteurs recombinants, dont la population est peu séropositive pour l'AAV sauvage de départ (par exemple l'AAV9, au contraire de l'AAV2 ou de l'AAV5) est idéale pour les approches de TG. Il sera tout de même important de tester la séropositivité des patients avant le traitement et l'utilisation d'immunosuppresseurs sera à considérer, dès le début du traitement pour éviter le développement d'une réponse immunitaire contre la capsid ou plus tard, si des signes inflammatoires sont observés. Les organismes ne devraient pas développer de réponses immunitaires contre le transgène puisque la frataxine bien que résiduelle est fonctionnelle chez les patients AF.

2.3.3. Risques d'administration intraveineuse d'AAV à haute dose ?

Récemment, une équipe du Dr J. Wilson rapporte une toxicité sévère et dangereuse à la suite d'injections IV de hautes doses d'un variant de l'AAV9 (AAVhu68) exprimant la

protéine SMN chez des mammifères de grande taille (Hinderer et al., 2018). Des injections IV de doses élevées (2×10^{14} vg/kg) chez trois primates et trois cochons ont entraîné une hépatotoxicité sévère nécessitant l'euthanasie d'un des singes, une axonopathie sans signes cliniques chez les singes et des signes cliniques d'ataxie et de perte de la proprioception chez les cochons. Les mécanismes de toxicité n'ont pas été identifiés mais cette publication a fait office de sonnette d'alarme dans la communauté scientifique de la thérapie génique. Cependant, plusieurs scientifiques ont soulevé des limitations dans la validité de cette étude (Flotte and Büning, 2018). Elle a été réalisée sur un petit nombre d'animaux (3 singes et 3 cochons) avec la même dose de vecteur pour tous les animaux, ne permettant pas d'analyser un effet dose-réponse. Le sérotype utilisé, l'AAVrh68, est un variant de l'AAV9 (différence de deux acides aminés) et les préparations de cet AAVrh68 peuvent potentiellement contenir des contaminations. Flotte et Büning conseillent de ne pas réagir trop vivement à cette publication sans l'ignorer pour autant. Rappelons que l'essai clinique en cours pour l'amyotrophie spinale (SMA), basé sur l'administration IV d'AAV9 exprimant la protéine humaine SMN, permet une amélioration clinique sans précédent chez les jeunes patients (Introduction Chapitre 2 paragraphe 2.4.2) (Mendell et al., 2017). Au regard de l'efficacité de cette thérapie et de la balance bénéfice/risque, les essais cliniques SMA sont toujours en cours.

Néanmoins cette récente publication de l'équipe du Dr Wilson rappelle l'importance des études précliniques chez les mammifères de grande taille, et, au cours de ces études, des attentions particulières devront être apportées aux DRG afin d'exclure une potentielle toxicité. De plus, les administrations de fortes doses de vecteurs recombinants AAV de pureté clinique sont à considérer précautionneusement. Enfin, il est évident, et ces exemples le prouvent, que le partage et la publication de l'ensemble des données collectionnées au cours d'essais précliniques et cliniques sont capitaux.

2.3.4. Quels patients AF pour un essai clinique ?

Dans le cas de la validation de l'ensemble des approches précliniques, le design de l'essai clinique est essentiel. Les questions suivantes seront alors primordiales :

- Quels patients choisir pour pouvoir observer un potentiel effet dans une fenêtre de temps raisonnable sur un échantillonnage faible de patients ?
- Quel stade de la maladie sera le plus adapté pour une première approche de TG ?
- Jusqu'à quels stades de la maladie les symptômes seront-ils réversibles ou à défaut stabilisés ?

- Quelle cohorte de patients sera la plus adaptée ? Les patients correspondant à une population très hétérogène, il sera essentiel de connaître leur histoire naturelle et d'utiliser des biomarqueurs précis pour évaluer les effets thérapeutiques de l'approche.

2.3.5. Coûts et financements de thérapies géniques ?

Suite à la mise sur le marché de thérapies géniques et les succès de nombreux essais cliniques, les questions du coût et du financement de ces thérapies sont soulevées et discutées. En effet, à l'heure actuelle, le prix de ces approches thérapeutiques présente une importante limite à leur développement. Par exemple, la première thérapie génique mise sur le marché, Glybera (pour le déficit en lipoprotéine lipase), était vendue à 1 million d'euros et le médicament Strimvelis (thérapie génique pour l'ADA-SCID) coûte 850000 dollars (environ 726000 €). Ces montants très élevés reflètent le coût de la recherche préclinique, de la production et l'administration du vecteur. Les approches pharmacologiques classiques représentent également des coûts élevés mais dispersés sur la durée de la vie des patients (pour les maladies incurables). Par exemple, en Angleterre la prise en charge d'un patient AF coûte entre 13000 et 21000€ par an (Giunti et al., 2013). À l'inverse, un traitement par thérapie génique sera unique permettant la relativisation du coût à long terme. Néanmoins, à ce jour, les modalités de remboursement standards ne sont pas adaptées pour payer de telles sommes. Dans le cas de mise sur le marché de thérapies géniques, les systèmes de financement et de remboursements seront donc à revoir. De plus, en fonction du système de santé du pays, la question de l'accessibilité à de telles thérapies pour l'ensemble des patients n'est pas anodine (ou plus fort encore...).

2.4. Les approches thérapeutiques de l'AF en général

Je discuterai ici brièvement de mes considérations concernant les approches thérapeutiques de l'AF de manière plus générale.

Dans une optique où les approches précliniques et cliniques de TG, en apportant le gène *FXN* ne seraient pas concluantes, ou si la surexpression de frataxine serait toxique et difficile à contrôler, il pourrait être envisageable, mais plus complexe également, d'apporter par thérapie génique le système CRISPR-Cas9 contre l'expansion GAA. L'expansion GAA n'entraînant pas la production d'ARN ou de protéines toxiques, l'apport direct du gène

thérapeutique FXN est, à mon avis, plus logique et moins risqué qu'une approche CRISPR-Cas9 en raison des risques de coupures « off-target » dans le génome qu'apporte ce dernier système.

Si une approche de thérapie génique pour l'ataxie de Friedreich est un jour accessible aux patients, à la suite de toutes les validations précliniques et même si elle est efficace, je m'interroge avec toutes les précautions d'usage sur le fait qu'elle puisse corriger l'ensemble des atteintes et symptômes des patients. Malgré une administration systémique du vecteur, l'ensemble des organes et tissus ne sera pas ciblé. Il ne faut donc pas perdre de vue que les patients pourront développer d'autres atteintes, comme par exemple les souris MCK traitées avec l'AAVrh10-hFXN en IV qui développent des phénotypes musculaires tardifs après la correction de l'atteinte cardiaque. La combinaison d'un traitement par TG et d'un traitement pharmacologique sera alors appropriée.

De plus, quels patients auront accès à ces traitements de TG coûteux ? Jusqu'à quel stade de la maladie, un effet thérapeutique pourra être observé ? Il serait bien utopique de penser qu'au cours des prochaines décennies, l'ensemble des patients AF pourra bénéficier d'un traitement par thérapie génique.

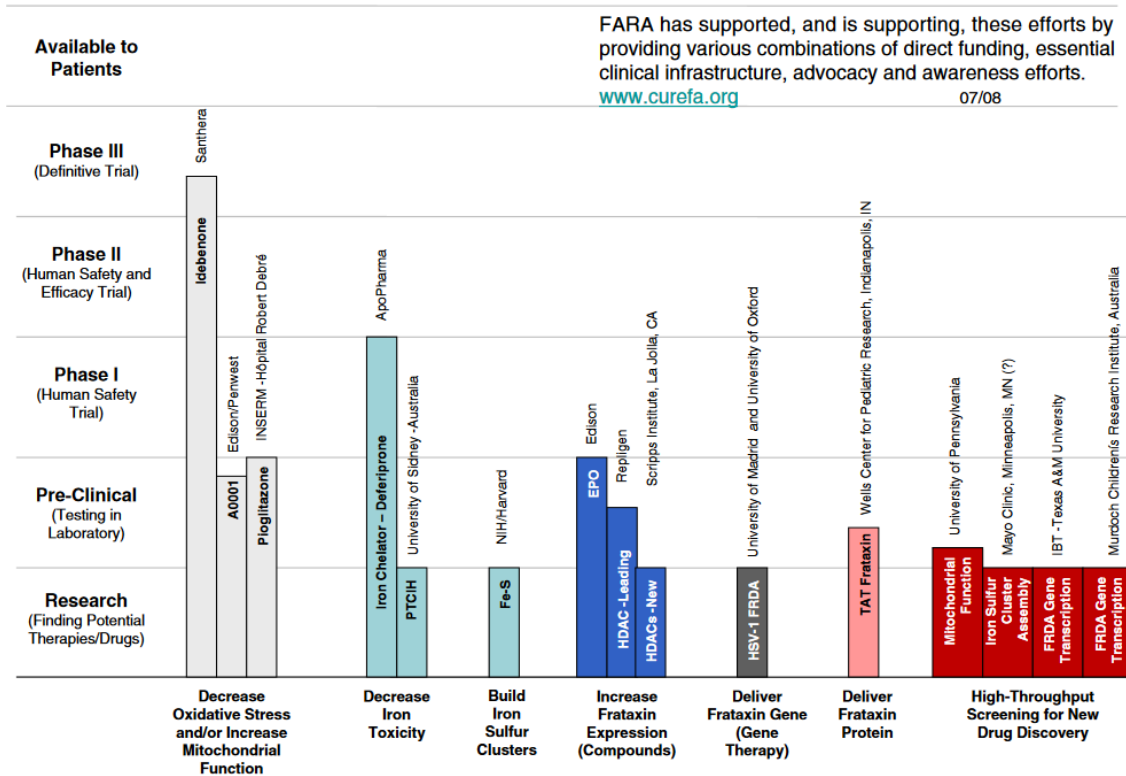
Ainsi, bien que la TG semble particulièrement prometteuse pour l'AF, le développement des autres approches thérapeutiques reste capital. Pour ces approches pharmacologiques, les molécules doivent pouvoir passer la BHE afin de cibler le SNC et particulièrement le noyau dentelé du cervelet et elles doivent également pouvoir accéder aux DRG et aux nerfs dans le SNP.

Les approches ciblant la frataxine (gène *FXN*, expression du gène *FXN* ou protéine FXN) sont, à mon avis, les plus encourageantes afin de corriger les conséquences directes de la maladie. Parmi ces approches, l'utilisation d'oligonucléotides dirigés contre le GAA sont plus sûres et très prometteuses. En effet, les inhibiteurs d'HDAC, augmentent l'expression de la frataxine en ouvrant la chromatine, des risques « off-target » restent cependant présents. Les approches visant la fonction mitochondriale générale, les thérapies symptomatiques et antioxydantes seront probablement également utiles en combinaison avec les approches visant la frataxine.

À ce jour, bien que l'ensemble des éléments de l'AF ne soit pas connu et qu'aucun traitement ne soit accessible aux patients, de nombreuses recherches de qualité dans les secteurs académiques et privés ont permis de grandes avancées ces dernières années, allant de la compréhension du rôle de la frataxine dans les cellules au développement

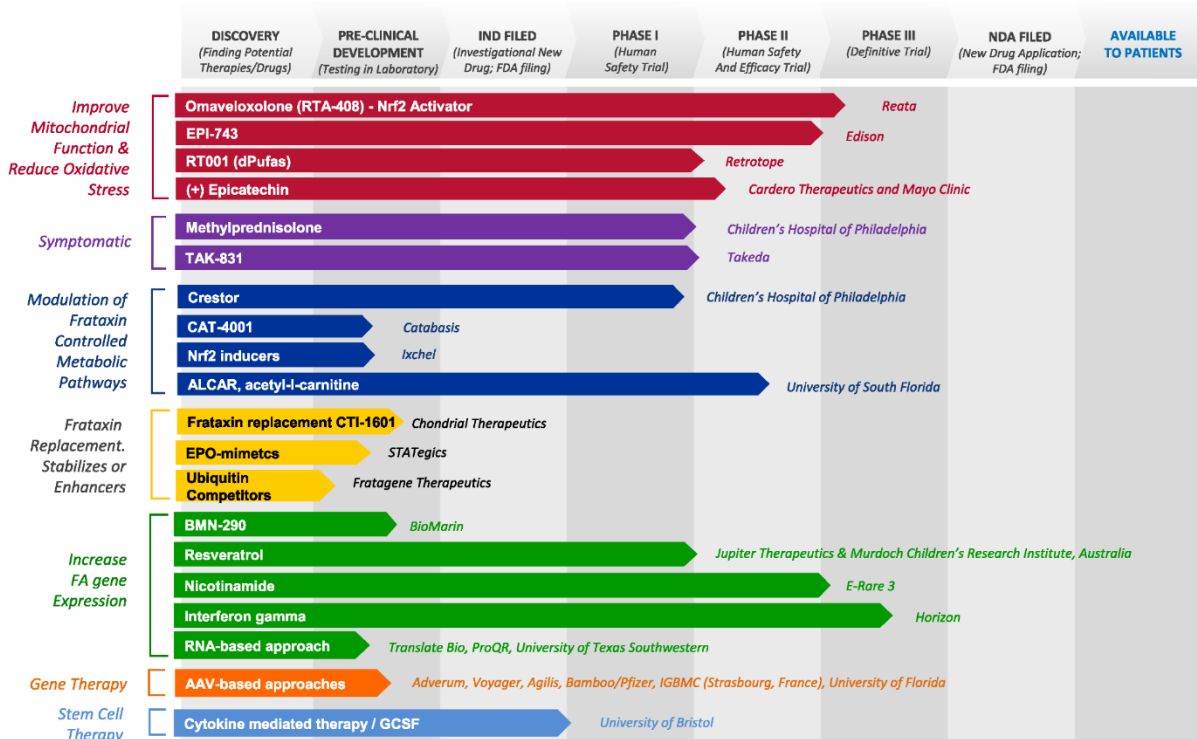
A

FARA Friedrich's Ataxia Pipeline



B

FRIEDREICH'S ATAXIA TREATMENT PIPELINE



FARA Friedrich's Ataxia Research Alliance

© 2017 Friedrich's Ataxia Research Alliance. All Rights Reserved.

Figure 57 : Pipelines des traitements en cours de développement pour l'AF en 2008 et 2017.

La comparaison de ces deux pipelines met en évidence les progrès dans la recherche préclinique et clinique de l'AF entre juillet 2008 (A) et décembre 2017 (B) (Issu de <http://www.curefa.org/pipeline>).

d'approches thérapeutiques en passant par la génération de modèles d'études et la compréhension des mécanismes pathologiques. La **Figure 57** présente les pipelines FARA des approches thérapeutiques pour l'AF en juillet 2008 et en décembre 2017. L'analyse de la figure rend clairement compte des avancées effectuées dans le développement de ces approches. Sur une échelle de temps, le gène responsable de l'ataxie de Friedreich a été identifié en 1996, il y a 22 ans et depuis, les avancées effectuées dans le domaine sont considérables. Mon travail y apporte également une modeste contribution.

Les échelles de temps ne sont malheureusement pas les mêmes pour les chercheurs et les patients. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées et la poursuite des efforts dans tous les domaines de la recherche, dont en premier lieu la TG, qui contribueront à envisager un meilleur confort de vie des patients voire un jour la guérison de l'AF, sont donc des beaux objectifs. Des défis scientifiques passionnants sont à relever dans les mois et années à venir dans les communautés scientifiques et médicales.

Matériel et méthodes



Je décrirai ici les différents éléments du matériel et méthodes ne figurant pas dans le manuscrit (Piguet, de Montigny et al., 2018).

1. Extraction des ARN et qRT-PCR

Les ARN des DRG et cervelets sont extraits avec du TRI Reagent® (Molecular Research Center) selon le protocole du fournisseur. Les tissus sont homogénéisés dans le TRI Reagent® en utilisant des tubes Precellys® (contenant des billes en céramiques) et un appareil Precellys 24 (Bertin instruments). Les ADN complémentaires (ADNc) sont obtenus par réverse transcription avec le kit Transcriptor® (Roche®). Les PCR quantitatives sont réalisées sur une machine Lightcycler 480 II (Roche®). Les quantifications sont réalisées avec la *Gapdh* comme contrôle interne et les couples d'oligonucléotides utilisés pour les différents gènes sont présentés dans le **tableau 11**.

2. Extractions protéiques, Western Blot et anticorps utilisés

Pour les Western Blot anti-ATF3, 20 µg de protéines extraites de DRG sont chargées dans les gels et les protéines présentes sur la membrane sont détectées avec le kit de révélation West Femto maximum sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific). Pour les Western Blot anti-MBP, les protéines des nerfs sciatiques sont extraites avec un tampon de lyse contenant du SDS (95 mM NaCl, 25 mM Tris-HCL pH8, 10 mM EDTA pH8, 10% SDS, PhosphoSTOP, cOMplete, NaV 1 :1000, NaF 1 :1000) et 20 µg de protéines sont chargées dans les gels.

Les anticorps utilisés pour les immunofluorescences et les Western Blot sont présentés dans le **tableau 12**.

3. RNA sequencing et analyse des données brutes

L'analyse RNAseq a été effectuée par la plateforme de séquençage de l'IGBMC (GenomEast). Les bibliothèques ont été préparées avec le protocole standard pour les ARNm (*Stranded mRNA-seq/standard quantity*) et séquencées sur le séquenceur HiSeq2500, selon les instructions d'Illumina. Les résultats bruts ont été analysés par Céline Keime. Les séquences ont été alignées sur le génome murin mm10 (en utilisant Tophat v2.0.10 et bowtie2 v2.1.0 aligner), l'expression des gènes a été quantifiée en utilisant HTSeq v0.5.4p3 et les gènes ont été annotés avec Ensembl.

Nom du gène	Séquence 5' vers 3'	
	Forward	Reverse
<i>AsnS</i>	ATTACGACAGTTCGGGCATC	TCTCAGTTCGAGACCGTGTG
<i>Atf3</i>	AAACACCTCTGCCATCGGATGTC	TCTTTCTGCAGGCACTCTGTCTTC
<i>Gapdh</i>	TTGTGATGGGTGTGAACCAC	TTCAGCTCTGGGATGACCTT
<i>Gfp</i>	GACGACGGCAACTACAAGA	GCTTGTCGGCCATGATATAGA
<i>Krox20</i>	AGGGAGTTGACTGTCACTCCAAGA	AACGGAAAGGGCTAGCAGACCATA
<i>Mag</i>	TCCAGGGAGCACACCGACT	TGGAGCTCTCCGTGACATTCTT
<i>Mbp</i>	CGCCACAATAACGTGAGGGTAAG	CAAACACTCCCGTGGGACAATCT
<i>Mpz</i>	CCTCTCAGGTCACGCTCTATGTCT	AGCCAGCAGTACCGAATCAG
<i>Mthfd2</i>	AATTTGGGCTTTGCAGTGAC	ACACTCCCAAAGAGCAGCTG
<i>P75</i>	CGCTGACAACCTCATTCTGTCTA	TTTTGCTTGCAGCTGTTCCATCTC
<i>Pmp22</i>	AGGCGGCCGGTTTTACATCA	TGTAGATGGCCGCTGCACTCAT
<i>Pvalb</i>	CTGCTTGGTACTGAGTGCTCATGT	ACTCAACCCCTTCCCTTCCCTT
<i>Sprr1a</i>	ATCCTGCTTATGAGTCCCATTGCC	TCAGGAGCCCTTGAAGATGAGGAT
<i>TrkA</i>	CCGAGGTCTCTGTCCAAGTC	GAGAAGGGGATGCACCAAT

Tableau 11 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les qPCR.

Anticorps	Application	Concentration utilisée	Espèce	Référence	Fournisseur
Anti PVALB	IF	1:1000	Lapin	PV27	Swan swiss Antibodies
Anti PVALB	IF	1:500	Lapin	PV27	Swan swiss Antibodies
Anti AT3	WB	1:250	Souris	DR1086	Merck
Anti MBP (Smi-94)	WB	1:1000	Souris	NE1018	Merck
Anti CNX	WB	1:1000	Lapin	C-4731	Sigma Aldrich

Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés pour les immunofluorescences et les Western Blot des résultats supplémentaires au manuscrit.

4. Souris *Pvalb Fxn mT/mG*

Génotype des différentes souris utilisées:

Pvalb mT/mG : *Pvalb^{tm1(Cre)Arbr/J}* ; *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}*

Pvalb cKO mT/mG : *Fxn^{L3/L-}* ; *Pvalb^{tm1(Cre)Arbr/J}* ; *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}*

Pvalb cWT mT/mG : *Fxn^{+L3}* ; *Pvalb^{tm1(Cre)Arbr/J}* ; *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}*

WT *mT/mG* : *Fxn^{+L3}* ; *Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J}*

5. Isolement des neurones proprioceptifs des souris *Pvalb cKO mT/mG* et de leurs contrôles

Adapté du protocole du Dr M. Hishi, disponible sur internet.

Au cours de la dissection et de la dissociation des DRG, il faut travailler au maximum à l'obscurité pour ne pas éteindre la fluorescence GFP endogène.

5.1. Matériel nécessaire pour la dissociation des DRG pour un tri par FACS

- HBSS 1x (- CaCl₂, - MgCl₂) (gibco ®, 14175-053)
- HEPES Buffer Solution (M) (gibco ®, 15630-056)
- Papain (Worthington, LS-003126)
- DMEM/F-12 (1 :1) (gibco ®, 11320-074)
- DNaseI recombinant, RNase-free (Roche, 04716728001)
- Collagenase (Sigma Aldrich, C0130)
- RNase inhibitor (RNaseIn Life Technologies, 40units/ul)
- PBS 1x (+ MgCl₂ + CaCl₂)
- Filtre filcon, sterile, syringe type, 50µm (BD Biosciences 050-47S)

5.2. Dissection des souris

Les souris sont euthanasiées avec une injection intrapéritonéale de kétamine-xylazine (300/13 mg/kg) et perfusée avec 10mL de PBS 1x. La tête de la souris est coupée et l'animal est fixé sur le ventre. La peau et les muscles du dos sont enlevés pour accéder à la colonne vertébrale. L'animal est alors placé sous une loupe binoculaire et les vertèbres sont coupées à droite et à gauche de la moelle épinière, jusqu'à la queue de cheval. La

moelle épinière est ensuite délicatement retirée en coupant les racines dorsales avec des ciseaux fins. Les DRG, alors visibles et accessibles, sont prélevés avec une pince fine et une paire de micro ciseaux, collectés dans 1mL de solution HBSS, HEPES 10mM (solution filtrée) et maintenu sur glace jusqu'à la fin des dissections (dans des tubes eppendorf de 1,5 mL).

5.3. Dissociation des DRG et FACS

5.3.1. Première étape de dissociation

À la fin des dissections, les tubes contenant les DRG sont centrifugés à 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C et le maximum de surnageant est enlevé en utilisant une pipette P1000. Les DRG sont ensuite incubés dans 1 mL d'une solution de papaïne (15unités/mL de papaïne dans une solution HBSS, HEPES 10mM filtrée) à 37°C pendant 20 minutes. Cette dissociation chimique est suivie d'une dissociation mécanique avec la pipette P1000 puis la P200 avec des mouvements de vas et viens. À cette étape, les DRG sont fragilisés mais non totalement dissociés. L'activité de la papaïne est ensuite inhibée avec l'ajout de 500 µL de DMEM/F12 + 10% sérum bovin foetal (FCS, *foetal cow serum*) (solution filtrée).

5.3.2. Deuxième étape de dissociation et lavages

Après une homogénéisation à la P1000, les tubes sont centrifugés à 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Après avoir enlevé le surnageant à la pipette, 250 µL de DMEM/F12 + 10% FCS (filtrés) sont ajoutés aux DRG. Après une homogénéisation à la P1000, 750 µL d'une solution de collagénase/DNaseI (collagénase 2 mg/mL, DNaseI 1 :50^{ème}, dissout dans une solution DMEM/F12 + 10% FCS) sont ajoutés dans les tubes (concentration finale de la collagénase : 1,5 mg/mL). Suite à l'homogénéisation à la P1000, les DRG sont incubés à 37°C pendant 20 minutes. Une trituration des neurones à la P1000 et à la P200 permet ensuite de dissocier complètement les DRG. Les cellules sont centrifugées à 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant est délicatement enlevé à la pipette (30 µL sont laissés pour ne pas perturber le culot cellulaire) et 1 mL de DMEM/F12 + 10% FCS (filtré) est ajouté aux cellules. Après une homogénéisation, les tubes sont centrifugés à 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est enlevé (en laissant 30µL sur le culot) et 500 µL de PBS + 5% FCS (filtré) contenant 0,1unités/µL de RNase inhibitor sont ajoutés. Après une homogénéisation à la pipette, les tubes sont centrifugés (2000 rpm,

5 minutes, 4°C) et le surnageant est enlevé. Ces étapes de lavages avec la solution PBS, 10% FCS, RNase inhibitor sont répétées deux fois (trois lavages au total). Au cours du dernier lavage, les cellules se dispersent très facilement. Après la dernière centrifugation, 300µL de PBS, 5% FCS, 0,1unités/µL RNase inhibitor sont ajoutés aux tubes. Après homogénéisation, les cellules sont filtrées (filtre filcon) et collectées dans des tubes de FACS (BD biosciences 352063).

5.3.3. Isolement des cellules GFP+ et GFP- par FACS et analyse des échantillons

Les cellules dissociées et filtrées sont isolées avec le trieur de cellules BD FACSAria Fusion dans le service de cytométrie en flux à l'IGBMC (taille de la buse : 100 µm). La population de cellules GFP+ est encerclée et les populations GFP+ et GFP- sont triées et isolées dans des tubes contenant un tampon RLT + β-mercaptoéthanol (kit d'extraction de l'ARN RNeasy Micro Quiagen), 75 µL pour les cellules GFP+ et 300µL pour les cellules GFP-. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les ARN sont extraits en suivant le protocole du fabricant. L'étape de reverse transcription est effectuée sur 11 µL d'ARN avec le kit Superscript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) et les ADNc sont conservés à -20°C. Les PCR quantitatives sont ensuite effectuées sur une machine Lightcycler 480 II (Roche ®) en diluant les ADNc GFP+ au 1 :10^{ème} et les ADNc GFP- au 1 :15^{ème} ou 1 :20^{ème}. Les quantifications sont réalisées avec la *Gapdh* comme contrôle interne et les couples d'oligonucléotides utilisés pour les différents gènes sont présentés dans le **tableau 11**.

Références



- Abeti, R., Uzun, E., Renganathan, I., Honda, T., Pook, M.A., and Giunti, P. (2015). Targeting lipid peroxidation and mitochondrial imbalance in Friedreich's ataxia. *Pharmacol. Res.* *99*, 344–350.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J.M., King, R., et al. (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* *88*, 580–590.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Ismail, O., Varshney, D., Lymperi, S., Sandi, C., Trabzuni, D., and Pook, M. (2008). The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 735–746.
- Alshawaf, A.J., Viventi, S., Qiu, W., D'Abaco, G., Nayagam, B., Erlichster, M., Chana, G., Everall, I., Ivanusic, J., Skafidas, E., et al. (2018). Phenotypic and Functional Characterization of Peripheral Sensory Neurons derived from Human Embryonic Stem Cells. *Sci. Rep.* *8*, 603.
- Anheim, M., Tranchant, C., and Koenig, M. (2012a). The Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias. *N. Engl. J. Med.* *366*, 636–646.
- Anheim, M., Mariani, L.L., Calvas, P., Cheuret, E., Zagnoli, F., Odent, S., Seguela, C., Marelli, C., Fritsch, M., Delaunoy, J.P., et al. (2012b). Exonic deletions of FXN and early-onset friedreich ataxia. *Arch. Neurol.* *69*, 912–916.
- Anjomani Virmouni, S., Ezzatizadeh, V., Sandi, C., Sandi, M., Al-Mahdawi, S., Chutake, Y., and Pook, M.A. (2015). A novel GAA-repeat-expansion-based mouse model of Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* *8*, 225–235.
- Arnold, P., Boulat, O., Maire, R., and Kuntzer, T. (2006). Expanding view of phenotype and oxidative stress in Friedreich's ataxia patients with and without idebenone. *Schweizer Arch. Fur Neurol. Und Psychiatr.* *157*, 169–176.
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997). Regulation of Mitochondrial Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of Frataxin. *Science* (80-.). *276*, 1709–1712.
- Bankiewicz, K.S., Eberling, J.L., Kohutnicka, M., Jagust, W., Pivrotto, P., Bringas, J., Cunningham, J., Budinger, T.F., and Harvey-White, J. (2000). Convection-enhanced delivery of AAV vector in Parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp. Neurol.* *164*, 2–14.
- Beaudin, M., Klein, C.J., Rouleau, G.A., and Dupré, N. (2017). Systematic review of autosomal recessive ataxias and proposal for a classification. *Cerebellum & Ataxias* *4*, 3.
- Befort, K., Karchewski, L., Lanoue, C., and Woolf, C.J. (2003). Selective up-regulation of the growth arrest DNA damage-inducible gene Gadd45 alpha in sensory and motor neurons after peripheral nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 911–922.
- Beilschmidt, L.K., and Puccio, H.M. (2014). Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie* *100*, 48–50.
- Beilschmidt, L.K., De Choudens, S.O., Fournier, M., Sanakis, I., Hograindleur, M.A., Clémancey, M., Blondin, G., Schmucker, S., Eisenmann, A., Weiss, A., et al. (2017). ISCA1 is essential for mitochondrial Fe4S4 biogenesis in vivo. *Nat. Commun.* *8*.
- Benini, M., Fortuni, S., Arcuri, G., Testi, R., Rufini, A., Alfedi, G., Malisan, F., Toschi, N., and

- Serio, D. (2017). E3 Ligase RNF126 Directly Ubiquitinates Frataxin , Promoting Its Degradation : Identification of a Potential Therapeutic Target for Friedreich Ataxia. *Cell Rep.* *18*, 2007–2017.
- Bessis, N., GarciaCozar, F.J., and Boissier, M.C. (2004). Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* *11*, S10–S17.
- Bevan, A.K., Duque, S., Foust, K.D., Morales, P.R., Braun, L., Schmelzer, L., Chan, C.M., McCrate, M., Chicoine, L.G., Coley, B.D., et al. (2011). Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders. *Mol. Ther.* *19*, 1971–1980.
- De Biase, I., Rasmussen, A., Endres, D., Al-Mahdawi, S., Monticelli, A., Coccozza, S., Pook, M., and Bidichandani, S.I. (2007a). Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich’s ataxia patients. *Ann. Neurol.* *61*, 55–60.
- De Biase, I., Rasmussen, A., Monticelli, A., Al-Mahdawi, S., Pook, M., Coccozza, S., and Bidichandani, S.I. (2007b). Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics* *90*, 1–5.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T., and Patel, P.I. (1998). The GAA Triplet-Repeat Expansion in Friedreich Ataxia Interferes with Transcription and May Be Associated with an Unusual DNA Structure. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 111–121.
- Boddaert, N., Hanh, K., Quan, L., Rötig, A., Leroy-willig, A., Gallet, S., Sidi, D., Thalabard, J., Munnich, A., and Cabantchik, Z.I. (2007). Selective iron chelation in Friedreich ataxia : biologic and clinical implications Selective iron chelation in Friedreich ataxia : biologic and clinical implications. *Blood* *110*, 401–408.
- Bonilla, I.E., Tanabe, K., and Strittmatter, S.M. (2002). Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. *J. Neurosci.* *22*, 1303–1315.
- Bürk, K. (2017). Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum & Ataxias* *4*, 4.
- Bürk, K., Schulz, S.R., and Schulz, J.B. (2013). Monitoring progression in Friedreich ataxia (FRDA): The use of clinical scales. *J. Neurochem.* *126*, 118–124.
- Butler, J.S., and Napierala, M. (2015). Friedreich’s ataxia--a case of aberrant transcription termination? *Transcription* *6*, 33–36.
- Cai, K., Frederick, R.O., Tonelli, M., and Markley, J.L. (2017). Mitochondrial Cysteine Desulfurase and ISD11 Coexpressed in Escherichia coli Yield Complex Containing Acyl Carrier Protein. *ACS Chem. Biol.* *12*, 918–921.
- Calmels, N., Schmucker, S., Wattenhofer-Donzé, M., Martelli, A., Vaucamps, N., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Bouton, C., Koenig, M., and Puccio, H. (2009). The first cellular models based on frataxin missense mutations that reproduce spontaneously the defects associated with Friedreich ataxia. *PLoS One* *4*.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich’s Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. *Science* (80-.). *271*, 1423–1427.
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Fauchoux, B., Trouillas, P., et al. (1997). Frataxin is reduced in Friedreich

- ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1771–1780.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., et al. (2009). Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science* (80-). 326, 818–823.
- Casarrubea, D., Viatte, L., Hallas, T., Vasanthakumar, A., Eisenstein, R.S., Schümann, K., Hentze, M.W., and Galy, B. (2013). Abnormal body iron distribution and erythropoiesis in a novel mouse model with inducible gain of iron regulatory protein (IRP)-1 function. *J. Mol. Med.* 91, 871–881.
- 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 Michael. *Methods Mol Biol.* 1382, 133–149.
- Cates, M.S., Berry, M.B., Ho, E.L., Li, Q., Potter, J.D., and Phillips, G.N. (1999). Metal-ion affinity and specificity in EF-hand proteins: Coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin. *Structure* 7, 1269–1278.
- Cearley, C.N., and Wolfe, J.H. (2006). Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* 13, 528–537.
- Cearley, C.N., Vandenberghe, L.H., Parente, M.K., Carnish, E.R., Wilson, J.M., and Wolfe, J.H. (2008). Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Mol. Ther.* 16, 1710–1718.
- Chamberlain, S., Shaw, J., Rowland, A., Wallis, J., South, S., Nakamura, Y., von Gabain, A., Farrall, M., and Williamson, R. (1988). Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature* 334, 248–250.
- Chan, K.Y., Jang, M.J., Yoo, B.B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.L., Sánchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S.K., Deverman, B.E., et al. (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* 20, 1172–1179.
- Chandran, V., Coppola, G., Nawabi, H., Omura, T., Versano, R., Huebner, E.A., Zhang, A., Costigan, M., Yekkirala, A., Barrett, L., et al. (2016). A Systems-Level Analysis of the Peripheral Nerve Intrinsic Axonal Growth Program. *Neuron* 89, 956–970.
- Chandran, V., Gao, K., Swarup, V., Versano, R., Dong, H., Jordan, M.C., and Geschwind, D.H. (2017). Inducible and reversible phenotypes in a novel mouse model of Friedreich's ataxia. *Elife* 6, 1–41.
- Cheever, T.R., Berkley, D., Braun, S., Brown, R.H., Byrne, B.J., Chamberlain, J.S., Cwik, V., Duan, D., Federoff, H.J., High, K.A., et al. (2015). Perspectives on Best Practices for Gene Therapy Programs. *Hum. Gene Ther.* 26, 127–133.
- Chen, K., Lin, G., Haelterman, N.A., Ho, T.S.Y., Li, T., Li, Z., Duraine, L., Graham, B.H., Jaiswal, M., Yamamoto, S., et al. (2016a). Loss of frataxin induces iron toxicity, sphingolipid synthesis, and Pdk1/Mef2 activation, leading to neurodegeneration. *Elife* 5, 1–24.
- Chen, K., Ho, T.S.Y., Lin, G., Tan, K.L., Rasband, M.N., and Bellen, H.J. (2016b). Loss of frataxin activates the iron/sphingolipid/PDK1/Mef2 pathway in mammals. *Elife* 5, 1–14.
- Choudhury, S.R., Harris, A.F., Cabral, D.J., Keeler, A.M., Sapp, E., Ferreira, J.S., Gray-

- Edwards, H.L., Johnson, J.A., Johnson, A.K., Su, Q., et al. (2016). Widespread central nervous system gene transfer and silencing after systemic delivery of novel AAV-AS vector. *Mol. Ther.* *24*, 726–735.
- Choudhury, S.R., Hudry, E., Maguire, C.A., Sena-Esteves, M., Breakefield, X.O., and Grandi, P. (2017). Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology* *120*, 63–80.
- Chutake, Y.K., Costello, W.N., Lam, C., and Bidichandani, S.I. (2014a). Altered nucleosome positioning at the transcription start site and deficient transcriptional initiation in friedreich ataxia. *J. Biol. Chem.* *289*, 15194–15202.
- Chutake, Y.K., Lam, C., Costello, W.N., Anderson, M., and Bidichandani, S.I. (2014b). Epigenetic promoter silencing in friedreich ataxia is dependent on repeat length. *Ann. Neurol.* *76*, 522–528.
- Clark, E., Butler, J.S., Isaacs, C.J., Napierala, M., and Lynch, D.R. (2017). Selected missense mutations impair frataxin processing in Friedreich ataxia. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *4*, 575–584.
- Codazzi, F., Hu, A., Rai, M., Donatello, S., Scarzella, F.S., Mangiameli, E., Pelizzoni, I., Grohovaz, F., and Pandolfo, M. (2016). Friedreich ataxia-induced pluripotent stem cell-derived neurons show a cellular phenotype that is corrected by a benzamide HDAC inhibitor. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 4847–4855.
- Colella, P., Ronzitti, G., and Mingozzi, F. (2018). Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* *8*, 87–104.
- Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., and Ollagnier De Choudens, S. (2013). Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe₄S₄ cluster assembly. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 733–740.
- Coppola, G., Marmolino, D., Lu, D., Wang, Q., Cnop, M., Rai, M., Acquaviva, F., Coccozza, S., Pandolfo, M., and Geschwind, D.H. (2009). Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPAR γ pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 2452–2461.
- Corben, L.A., Kashuk, S.R., Akhlaghi, H., Jamadar, S., Delatycki, M.B., Fielding, J., Johnson, B., Georgiou-Karistianis, N., and Egan, G.F. (2014). Myelin paucity of the superior cerebellar peduncle in individuals with Friedreich ataxia: An MRI magnetization transfer imaging study. *J. Neurol. Sci.* *343*, 138–143.
- Cossee, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J.-L., and Koenig, M. (1997). Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: Founder effect and premutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 7452–7457.
- Cossée, M., Dürr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschütter, A., et al. (1999). Friedreich's ataxia: Point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.* *45*, 200–206.
- Cossée, M., Puccio, H., Gansmuller, a, Koutnikova, H., Dierich, a, LeMeur, M., Fischbeck, K., Dollé, P., and Koenig, M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1219–1226.
- Delatycki, M.B., and Corben, L.A. (2012). Clinical Features of Friedreich Ataxia. *J. Child Neurol.* *27*, 1133–1137.

- Delatycki, M.B., Paris, D.B., Gardner, R.J., Nicholson, G. a, Nassif, N., Storey, E., MacMillan, J.C., Collins, V., Williamson, R., and Forrest, S.M. (1999). Clinical and genetic study of Friedreich ataxia in an Australian population. *Am. J. Med. Genet.* 87, 168–174.
- 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.
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.-I., Ristow, M., and Shoelson, S.E. (2000). Crystal Structure of Human Frataxin. *J. Biol. Chem.* 275, 30753–30756.
- Dürr, A., Cossée, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J.L., Brice, A., and Koenig, M. (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *New* 335, 1169–1175.
- Emond, M., Lepage, G., and Vanasse, M. (2000). Clinical / Scientific Notes Increased levels of plasma. 1752–1753.
- Faggianelli, N., Puglisi, R., Veneziano, L., Romano, S., Frontali, M., Vannocci, T., Fortuni, S., Testi, R., and Pastore, A. (2015). Analyzing the Effects of a G137V Mutation in the FXN Gene. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 1–8.
- Filla, A., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G., and Coccozza2, S. (1996). The Relationship between Trinucleotide (GAA) Repeat Length and Clinical Features in Friedreich Ataxia. *Am. J. Hum. Genet* 59, 554–560.
- Flotte, T.R., and Büning, H. (2018). Severe Toxicity in non-human primates and piglets with systemic high-dose administration of AAV9-like vectors: Putting Patients First. *Hum. Gene Ther.* 29, hum.2018.021.
- Fogel, B.L., and Perlman, S. (2007). Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive spinocerebellar degenerations. *Lancet Neurol.* 6, 245–257.
- Folker, J., Murdoch, B., Cahill, L., Delatycki, M., Corben, L., and Vogel, A. (2010). Dysarthria in Friedreich's ataxia: A perceptual analysis. *Folia Phoniatr. Logop.* 62, 97–103.
- Fortuna, F., Barboni, P., Liguori, R., Valentino, M.L., Savini, G., Gellera, C., Mariotti, C., Rizzo, G., Tonon, C., Manners, D., et al. (2009). Visual system involvement in patients with Friedreich's ataxia. *Brain* 132, 116–123.
- Foury, F., and Cazzalini, O. (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. 411, 373–377.
- 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. *Nat. Biotechnol.* 27, 59–65.
- Fox, N.G., Chakrabarti, M., McCormick, S.P., Lindahl, P.A., and Barondeau, D.P. (2015). The Human Iron-Sulfur Assembly Complex Catalyzes the Synthesis of [2Fe-2S] Clusters on ISCU2 That Can Be Transferred to Acceptor Molecules. *Biochemistry* 54, 3871–3879.
- Friedreich, N. (1863). Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 26, 391–419.
- Fujita, R., Agid, Y., Trouillas, P., Seck, A., Tommasi-Davenas, C., Driesel, A.J., Olek, K., Grzeschik, K.H., Nakamura, Y., Mandel, J.L., et al. (1989). Confirmation of linkage of Friedreich ataxia to chromosome 9 and identification of a new closely linked marker.

Genomics 4, 110–111.

Fuss, J.O., Tsai, C.L., Ishida, J.P., and Tainer, J.A. (2015). Emerging critical roles of Fe-S clusters in DNA replication and repair. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853, 1253–1271.

Galea, C.A., Huq, A., Lockhart, P.J., Tai, G., Corben, L.A., Yiu, E.M., Gurrin, L.C., Lynch, D.R., Gelbard, S., Durr, A., et al. (2016). Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* 79, 485–495.

Gellera, C., Castellotti, B., Mariotti, C., Mineri, R., Seveso, V., DiDonato, S., and Taroni, F. (2007). Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics* 8, 289–299.

Giunti, P., Greenfield, J., Stevenson, A.J., Parkinson, M.H., Hartmann, J.L., Sandtmann, R., Piercy, J., O'Hara, J., Casas, L.R., and Smith, F.M. (2013). Impact of Friedreich's Ataxia on health-care resource utilization in the United Kingdom and Germany. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 1–12.

Greene, E., Mahishi, L., Entezam, A., Kumari, D., and Usdin, K. (2007). Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res.* 35, 3383–3390.

Grieger, J.C., and Samulski, R.J. (2012). Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications (Elsevier Inc.).

Groh, M., Lufino, M.M.P., Wade-Martins, R., and Gromak, N. (2014). R-loops Associated with Triplet Repeat Expansions Promote Gene Silencing in Friedreich Ataxia and Fragile X Syndrome. *PLoS Genet.* 10.

György, B., Fitzpatrick, Z., Crommentuijn, M.H.W., Mu, D., and Maguire, C.A. (2014). Naturally enveloped AAV vectors for shielding neutralizing antibodies and robust gene delivery *in vivo*. *Biomaterials* 35, 7598–7609.

Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J.-L., Fraser, C.C., Cavazzana-Calvo, M., et al. (2003). A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 348, 255–256.

Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M., and et. al. (2008). Insertional Oncogenesis in 4 patients after retroviral-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118, 3132–3142.

Hanauer, A., Chery, M., Fujita, R., Driesel, A.J., Gilgenkrantz, S., and Mandel, J.L. (1990). The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 133–137.

Harding, A.E. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104, 589–620.

Haugen, A.C., Di Prospero, N.A., Parker, J.S., Fannin, R.D., Chou, J., Meyer, J.N., Halweg, C., Collins, J.B., Durr, A., Fischbeck, K., et al. (2010). Altered gene expression and DNA damage in peripheral blood cells from Friedreich's ataxia patients: Cellular model of pathology. *PLoS Genet.* 6.

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010). Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* 142, 24–38.

- Herman, D., Jenssen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S.L., and Gottesfeld, J.M. (2006). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.* 2, 551–558.
- Hick, A., Wattenhofer-Donze, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J.P., Vaucamps, N., Gall, D., Lambot, L., Andre, C., Reutenauer, L., et al. (2013). Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* 6, 608–621.
- Hinderer, C., Katz, N., Buza, E.L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L., and Wilson, J.M. (2018). Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an AAV vector expressing human SMN. *Hum. Gene Ther. X*, hum.2018.015.
- Hocquemiller, M., Giersch, L., Audrain, M., Parker, S., and Cartier, N. (2016). Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Hum. Gene Ther.* 27, 478–496.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13.
- Hudry, E., Martin, C., Gandhi, S., György, B., Scheffer, D.I., Mu, D., Merkel, S.F., Mingozi, F., Fitzpatrick, Z., Dimant, H., et al. (2016). Exosome-associated AAV vector as a robust and convenient neuroscience tool. *Gene Ther.* 23, 380–392.
- Hunt, D., Raivich, G., and Anderson, P.N. (2012). Activating Transcription Factor 3 and the Nervous System. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 1–17.
- Jablonka, S., Dombert, B., Asan, E., and Sendtner, M. (2014). Mechanisms for axon maintenance and plasticity in motoneurons: Alterations in motoneuron disease. *J. Anat.* 224, 3–14.
- Jasoliya, M.J., McMackin, M.Z., Henderson, C.K., Perlman, S.L., and Cortopassi, G.A. (2017). Frataxin deficiency impairs mitochondrial biogenesis in cells, mice and humans. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2627–2633.
- Jiralerspong, S., Ge, B., Hudson, T.J., and Pandolfo, M. (2001). Manganese superoxide dismutase induction by iron is impaired in Friedreich ataxia cells. *FEBS Lett.* 509, 101–105.
- Kemp, K.C., Cook, A.J., Redondo, J., Kurian, K.M., Scolding, N.J., and Wilkins, A. (2016). Purkinje cell injury, structural plasticity and fusion in patients with Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 53.
- van Kesteren, R.E., Mason, M.R.J., MacGillavry, H.D., Smit, A.B., and Verhaagen, J. (2011). A Gene Network Perspective on Axonal Regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 1–6.
- Khonsari, H., Schneider, M., Al-Mahdawi, S., Chianea, Y.G., Themis, M., Parris, C., Pook, M.A., and Themis, M. (2016). Lentivirus-mediated frataxin gene delivery reverses genome instability in Friedreich ataxia patient and mouse model fibroblasts. *Gene Ther.* 23, 846–856.
- Kim, E., Napierala, M., and Dent, S.Y.R. (2011). Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Res.* 39, 8366–8377.
- Kiryu-Seo, S., and Kiyama, H. (2011). The nuclear events guiding successful nerve

regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 1–11.

Klein, R.L., Dayton, R.D., Tatom, J.B., Henderson, K.M., and Henning, P.P. (2008). AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: Effects of serotype, promoter and purification method. *Mol. Ther.* 16, 89–96.

Koeppen, A.H. (2011). Friedreich's ataxia: Pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* 303, 1–12.

Koeppen, A.H. (2013). Nikolaus Friedreich and degenerative atrophy of the dorsal columns of the spinal cord. *J. Neurochem.* 126, 4–10.

Koeppen, A.H., and Mazurkiewicz, J.E. (2013). Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 78–90.

Koeppen, A.H., Ramirez, R.L., Becker, A.B., and Mazurkiewicz, J.E. (2016). Dorsal root ganglia in Friedreich ataxia: satellite cell proliferation and inflammation. *Acta Neuropathol. Commun.* 4, 46.

Koeppen, A.H., Becker, A.B., Qian, J., and Feustel, P.J. (2017). Friedreich ataxia: Hypoplasia of spinal cord and dorsal root ganglia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 76, 101–108.

Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O., and Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* 16, 345–351.

Kumar, S.R., Markusic, D.M., Biswas, M., High, K.A., and Herzog, R.W. (2016). Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 3, 16034.

Kumari, D., and Usdin, K. (2012). Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clin. Epigenetics* 4, 2.

Kumari, D., Biacsi, R.E., and Usdin, K. (2011). Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in Friedreich ataxia cells. *J. Biol. Chem.* 286, 4209–4215.

Kwon, M.J., Shin, H.Y., Cui, Y., Kim, H., Thi, A.H.L., Choi, J.Y., Kim, E.Y., Hwang, D.H., and Kim, B.G. (2015). CCL2 Mediates Neuron-Macrophage Interactions to Drive Proregenerative Macrophage Activation Following Preconditioning Injury. *J. Neurosci.* 35, 15934–15947.

Lamarche, J.B., Côté, M., and Lemieux, B. (1980). The Cardiomyopathy of Friedreich's Ataxia Morphological Observations in 3 Cases. *Can. J. Neurol. Sci. / J. Can. Des Sci. Neurol.* 7, 389–396.

Leone, P., Shera, D., McPhee, S.W.J., Francis, J.S., Kolodny, E.H., Bilaniuk, L.T., Wang, D.J., Assadi, M., Goldfarb, O., Goldman, H.W., et al. (2012). Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Sci. Transl. Med.* 4, 1–14.

Li, K., Besse, E.K., Ha, D., Kovtunovych, G., and Rouault, T.A. (2008). Iron-dependent regulation of frataxin expression: Implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2265–2273.

Li, L., Voullaire, L., Sandi, C., Pook, M.A., Ioannou, P.A., Delatycki, M.B., and Sarsero, J.P. (2013). Pharmacological Screening Using an FXN-EGFP Cellular Genomic Reporter Assay for the Therapy of Friedreich Ataxia. *PLoS One* 8.

Li, L., Matsui, M., and Corey, D.R. (2016). Activating frataxin expression by repeat-targeted nucleic acids. *Nat. Commun.* 7, 1–8.

- Li, Y., Lu, Y., Polak, U., Lin, K., Shen, J., Farmer, J., Seyer, L., Bhalla, A.D., Rozwadowska, N., Lynch, D.R., et al. (2015a). Expanded GAA repeats impede transcription elongation through the FXN gene and induce transcriptional silencing that is restricted to the FXN locus. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 6932–6943.
- Li, Y., Polak, U., Bhalla, A.D., Rozwadowska, N., Butler, J.S., Lynch, D.R., Dent, S.Y.R., and Napierala, M. (2015b). Excision of expanded GAA repeats alleviates the molecular phenotype of friedreich's ataxia. *Mol. Ther.* *23*, 1055–1065.
- Libri, V., Yandim, C., Athanasopoulos, S., Loyse, N., Natisvili, T., Law, P.P., Chan, P.K., Mohammad, T., Mauri, M., Tam, K.T., et al. (2014). Epigenetic and neurological effects and safety of high-dose nicotinamide in patients with Friedreich's ataxia: an exploratory, open-label, dose-escalation study. *Lancet* *384*, 504–513.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature* *460*, 831–838.
- Liu, J., Verma, P.J., Evans-Galea, M. V., Delatycki, M.B., Michalska, A., Leung, J., Crombie, D., Sarsero, J.P., Williamson, R., Dottori, M., et al. (2011). Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Friedreich Ataxia Patients. *Stem Cell Rev. Reports* *7*, 703–713.
- Lopes, D.M., Denk, F., and McMahon, S.B. (2017). The Molecular Fingerprint of Dorsal Root and Trigeminal Ganglion Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* *10*, 1–11.
- Lu, C., Schoenfeld, R., Shan, Y., Tsai, H.J., Hammock, B., and Cortopassi, G. (2009). Frataxin deficiency induces Schwann cell inflammation and death. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* *1792*, 1052–1061.
- Lykken, E.A., Shyng, C., Edwards, R.J., Rozenberg, A., and Gray, S.J. (2018). Recent progress and considerations for AAV gene therapies targeting the central nervous system. *J. Neurodev. Disord.* *10*, 1–10.
- Majowicz, A., Maczuga, P., Kwikkers, K.L., van der Marel, S., van Logtenstein, R., Petry, H., van Deventer, S.J., Konstantinova, P., and Ferreira, V. (2013). Mir-142-3p target sequences reduce transgene-directed immunogenicity following intramuscular adeno-associated virus 1 vector-mediated gene delivery. *J. Gene Med.* *15*, 219–232.
- Manno, C.S., Arruda, V.R., Pierce, G.F., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., 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.
- Marieb, E.N., and Hoehn, K. (2015). *Anatomie et Physiologie Humaines*.
- Marmigère, F., and Ernfors, P. (2007). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 114–127.
- Marmolino, D., Manto, M., Acquaviva, F., Vergara, P., Ravella, A., Monticelli, A., and Pandolfo, M. (2010). PGC-1alpha down-regulation affects the antioxidant response in friedreich's ataxia. *PLoS One* *5*, 1–11.
- Martelli, A., and Puccio, H. (2014). Dysregulation of cellular iron metabolism in Friedreich ataxia: From primary iron-sulfur cluster deficit to mitochondrial iron accumulation. *Front. Pharmacol.* *5* *JUN*, 1–11.
- Martelli, A., Wattenhofer-donzé, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe - S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 2651–2658.

- Martelli, A., Napierala, M., and Puccio, H. (2012). Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis. Model. Mech.* *5*, 165–176.
- Martelli, A., Schmucker, S., Reutenauer, L., Mathieu, J.R.R., Peyssonnaud, C., Karim, Z., Puy, H., Galy, B., Hentze, M.W., and Puccio, H. (2015). Iron Regulatory Protein 1 Sustains Mitochondrial Iron Loading and Function in Frataxin Deficiency. *Cell Metab.* *21*, 311–322.
- Mayor, H.D., Jamison, R.M., Jordan, L.E., and Melnick, J.L. (1965). Structure and Composition of a Small Particle Prepared from a Simian Adenovirus. *J. Bacteriol.* *90*, 235–242.
- McCabe, D.J.H., Ryan, F., Moore, D.P., McQuaid, S., King, M.D., Kelly, A., Daly, K., Barton, D.E., and Murphy, R.P. (2000). Typical Friedreich's ataxia without GAA expansions and GAA expansions without typical Friedreich's ataxia. *J. Neurol.* *247*, 346–355.
- McCarty, D.M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol. Ther.* *16*, 1648–1656.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* *377*, 1713–1722.
- Merienne, N., and Déglon, N. (2015). Gene silencing approaches for the treatment of Huntington's disease | Approches de gene silencing pour le traitement de la maladie de Huntington. *Medecine/Sciences* *31*.
- Miller, J.L., Rai, M., Frigon, N.L., Pandolfo, M., Punnonen, J., and Spencer, J.R. (2017). Neuropharmacology Erythropoietin and small molecule agonists of the tissue-protective erythropoietin receptor increase FXN expression in neuronal cells in vitro and in Fxn-deficient KIKO mice in vivo. *Neuropharmacology* *123*, 34–45.
- Milne, S.C., Campagna, E.J., Corben, L.A., Delatycki, M.B., Teo, K., Churchyard, A.J., and Haines, T.P. (2012). Retrospective study of the effects of inpatient rehabilitation on improving and maintaining functional independence in people with friedreich ataxia. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* *93*, 1860–1863.
- Milne, S.C., Corben, L.A., Roberts, M., Murphy, A., Tai, G., Georgiou-Karistianis, N., Yiu, E.M., and Delatycki, M.B. (2018). Can rehabilitation improve the health and well-being in Friedreich's ataxia: a randomized controlled trial? *Clin. Rehabil.* *32*, 630–643.
- Miranda, C.J., Santos, M.M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossée, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J., et al. (2002). Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett.* *512*, 291–297.
- Montermini, L., Richter, A., Morgan, K., Justice, C.M., Julien, D., Castellotti, B., Mercier, J., Poirier, J., Capozzoli, F., Bouchard, J.P., et al. (1997). Phenotypic variability in friedreich ataxia: Role of the associated GAA triplet repeat expansion. *Ann. Neurol.* *41*, 675–682.
- Murlidharan, G., Samulski, R.J., and Asokan, A. (2014). Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* *7*, 1–9.
- Musco, G., Stier, G., Kolmerer, B., Adinolfi, S., Martin, S., Frenkiel, T., Gibson, T., and Pastore, A. (2000). Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: Solution structure of frataxin. *Structure* *8*, 695–707.
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A Global Double-Fluorescent Cre Reporter Mouse. *Genesis* *45*, 593–605.

- Naldini, L. (2009). Medicine. A comeback for gene therapy. *Science* 326, 805–806.
- Nash, K., Chen, W., and Muzyczka, N. (2008). Complete In Vitro Reconstitution of Adeno-Associated Virus DNA Replication Requires the Minichromosome Maintenance Complex Proteins. *J. Virol.* 82, 1458–1464.
- Pandolfo, M. (2009). Friedreich ataxia: The clinical picture. *J. Neurol.* 256, 3–8.
- Pandolfo, M., and Pastore, A. (2009). The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J. Neurol.* 256, 9–17.
- Parent, A., Elduque, X., Cornu, D., Belot, L., Le Caer, J.P., Grandas, A., Toledano, M.B., and D’Auréaux, B. (2015). Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nat. Commun.* 6.
- Parkinson, M.H., Boesch, S., Nachbauer, W., Mariotti, C., and Giunti, P. (2013). Clinical features of Friedreich’s ataxia: Classical and atypical phenotypes. *J. Neurochem.* 126, 103–117.
- Patodia, S., and Raivich, G. (2012). Role of Transcription Factors in Peripheral Nerve Regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 1–15.
- Paupé, V., Dassa, E.P., Goncalves, S., Auchère, F., Lönn, M., Holmgren, A., and Rustin, P. (2009). Impaired nuclear Nrf2 translocation undermines the oxidative stress response in Friedreich ataxia. *PLoS One* 4.
- Payne, R.M. (2011). The heart in Friedreich’s Ataxia: Basic findings and clinical implications. *Prog. Pediatr. Cardiol.* 31, 103–109.
- Penaud-Budloo, M., François, A., Clément, N., and Ayuso, E. (2018). Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 8, 166–180.
- Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., and Pook, M.A. (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *J. Neurochem.* 126, 65–79.
- Perdomini, M., Belbellaa, B., Monassier, L., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Cartier, N., Crystal, R.G., Aubourg, P., and Puccio, H. (2014). Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich’s ataxia. *Nat. Med.* 20, 542–547.
- Pierce, E.A., and Bennett, J. (2015). The Status of *RPE65* Gene Therapy Trials: Safety and Efficacy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, a017285.
- Piguet, F., Alves, S., and Cartier, N. (2017). Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Hum. Gene Ther.* 28, 988–1003.
- Piguet, F., de Montigny, C., Vaucamps, N., Reutenauer, L., Eisenmann, A., and Puccio, H. (2018). Rapid and complete reversal of sensory ataxia by gene therapy in a novel model of Friedreich ataxia. *Mol. Ther.* 26, 1–13.
- Pook, M.A., Al-Mahdawi, S., Carroll, C.J., Cossée, M., Puccio, H., Lawrence, L., Clark, P., Lowrie, M.B., Bradley, J.L., Cooper, J.M., et al. (2001). Rescue of the Friedreich’s ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics* 3, 185–193.
- Di Prospero, N.A., Baker, A., Jeffries, N., and Fischbeck, K.H. (2007). Neurological effects of high-dose idebenone in patients with Friedreich’s ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 6, 878–886.

- Puccio, H. (2009). Multicellular models of Friedreich ataxia. *J. Neurol.* 256, 18–24.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27, 181–186.
- Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje-Mckenna, M., and Asokan, A. (2011). Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. *Mol. Ther.* 19, 1070–1078.
- Punga, T., and Bühler, M. (2010). Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol. Med.* 2, 120–129.
- Rai, M., Soragni, E., Jenssen, K., Burnett, R., Herman, D., Coppola, G., Geschwind, D.H., Gottesfeld, J.M., and Pandolfo, M. (2008). HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. *PLoS One* 3.
- Ramnani, N. (2006). The primate cortico-cerebellar system: Anatomy and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 511–522.
- Renaud, M., Tranchant, C., Martin, J.V.T., Mochel, F., Synofzik, M., van de Warrenburg, B., Pandolfo, M., Koenig, M., Kolb, S.A., Anheim, M., et al. (2017). A recessive ataxia diagnosis algorithm for the next generation sequencing era. *Ann. Neurol.* 82, 892–899.
- Ristow, M., Mulder, H., Pomplun, D., Schulz, T.J., Müller-Schmehl, K., Krause, A., Fex, M., Puccio, H., Müller, J., Isken, F., et al. (2003). Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of β cell mass. *J. Clin. Invest.* 112, 527–534.
- Roche, B., Agrebi, R., Huguenot, A., Ollagnier de Choudens, S., Barras, F., and Py, B. (2015). Turning *Escherichia coli* into a Frataxin-Dependent Organism. *PLoS Genet.* 11, 1–22.
- Rossi, M., Anheim, M., Durr, A., and Klein, C. (2018). The Genetic Nomenclature of Recessive Cerebellar Ataxias. 0, 1–21.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sis, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulfur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* 17, 215–217.
- Rouault, T.A. (2012). Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* 5, 155–164.
- Rouault, T.A. (2015). Iron-sulfur proteins hiding in plain sight. *Nat. Chem. Biol.* 11, 442–445.
- Rouault, T.A., and Maio, N. (2017). Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* 292, 12744–12753.
- Ruegsegger, C., Stucki, D.M., Steiner, S., Angliker, N., Radecke, J., Keller, E., Zuber, B., Rüegg, M.A., and Saxena, S. (2016). Impaired mTORC1-Dependent Expression of Homer-3 Influences SCA1 Pathophysiology. *Neuron* 89, 129–146.
- Rustin, P., Von Kleist-Retzow, J.C., Chantrel-Groussard, K., Sidi, D., Munnich, A., and Rötig, A. (1999). Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: A preliminary study. *Lancet* 354, 477–479.
- Salzer, J.L. (2015). Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, 1–26.

- Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z., and Festenstein, R. (2003). DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* *422*, 909–913.
- Schmucker, S., and Puccio, H. (2010). Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 103–110.
- Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., and Puccio, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 3521–3531.
- Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donzé, M., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2011). Mammalian frataxin: An essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/ NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One* *6*, 1–12.
- Schnackerz, K.D., Dobritzsch, D., Lindqvist, Y., and Cook, P.F. (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase: A flavoprotein with four iron-sulfur clusters. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* *1701*, 61–74.
- Sehara, Y., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Katakai, Y., Ono, F., Takino, N., Ito, M., Ozawa, K., and Muramatsu, S. (2017). Persistent Expression of Dopamine-Synthesizing Enzymes 15 Years After Gene Transfer in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* *28*, 74–79.
- Seiffers, R., Allchorne, A.J., and Woolf, C.J. (2006). The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth. *Mol. Cell. Neurosci.* *32*, 143–154.
- Selvadurai, L.P., Harding, I.H., Corben, L.A., and Georgiou-Karistianis, N. (2018). Cerebral abnormalities in Friedreich ataxia: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *84*, 394–406.
- Seznec, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., Procaccio, V., Patel, M., Drapier, J.C., Koenig, M., et al. (2005). Friedreich ataxia: The oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 463–474.
- Shan, Y., Schoenfeld, R.A., Hayashi, G., Napoli, E., Akiyama, T., Iodi Carstens, M., Carstens, E.E., Pook, M.A., and Cortopassi, G.A. (2013). Frataxin Deficiency Leads to Defects in Expression of Antioxidants and Nrf2 Expression in Dorsal Root Ganglia of the Friedreich's Ataxia YG8R Mouse Model. *Antioxid. Redox Signal.* *19*, 1481–1493.
- Shen, Y., McMackin, M.Z., Shan, Y., Raetz, A., David, S., and Cortopassi, G. (2016). Frataxin deficiency promotes excess microglial DNA damage and inflammation that is rescued by PJ34. *PLoS One* *11*, 1–18.
- Simon, C.M., Rauskolb, S., Gunnarsen, J.M., Holtmann, B., Drepper, C., Dombert, B., Braga, M., Wiese, S., Jablonka, S., Pühringer, D., et al. (2015). Dysregulated IGFBP5 expression causes axon degeneration and motoneuron loss in diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol.* *130*, 373–387.
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2004). Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia. *J. Neurosci.* *24*, 1987 LP-1995.
- Solbach, K., Kraff, O., Minnerop, M., Beck, A., Schöls, L., Gizewski, E.R., Ladd, M.E., and Timmann, D. (2014). Cerebellar pathology in Friedreich's ataxia: Atrophied dentate nuclei with normal iron content. *NeuroImage Clin.* *6*, 93–99.
- Soragni, E., and Gottesfeld, J.M. (2016). Translating HDAC inhibitors in Friedreich's ataxia.

Expert Opin. Orphan Drugs 4, 961–970.

Soragni, E., Miao, W., Iudicello, M., Jacoby, D., De Mercanti, S., Clerico, M., Longo, F., Piga, A., Ku, S., Campau, E., et al. (2014). Epigenetic Therapy for Friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* 76, 489–508.

Strawser, C., Schadt, K., Hauser, L., McCormick, A., Wells, M., Larkindale, J., Lin, H., and Lynch, D.R. (2017). Pharmacological therapeutics in Friedreich ataxia: the present state. *Expert Rev. Neurother.* 17, 895–907.

Sturm, B., Stupphann, D., Kaun, C., Boesch, S., Schranzhofer, M., Wojta, J., Goldenberg, H., and Scheiber-Mojdehkar, B. (2005). Recombinant human erythropoietin: Effects on frataxin expression in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 711–717.

Tai, G., Corben, L.A., Yiu, E.M., Milne, S.C., and Delatycki, M.B. (2018). Progress in the treatment of Friedreich ataxia. *Neurol. Neurochir. Pol.* 52, 129–139.

Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R.M., Loeb, J.A., Shrager, P., et al. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* 47, 681–694.

Tedeschi, A. (2012). Tuning the Orchestra: Transcriptional Pathways Controlling Axon Regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 4, 1–12.

Thierbach, R., Schulz, T.J., Isken, F., Voigt, A., Mietzner, B., Drewes, G., von Kleist-Retzow, J.C., Wiesner, R.J., Magnuson, M.A., Puccio, H., et al. (2005). Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3857–3864.

Tomassini, B., Arcuri, G., Fortuni, S., Sandi, C., Ezzatizadeh, V., Malisan, F., Al-mahdawi, S., Pook, M., Casali, C., Condo, I., et al. (2012). Interferon gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2855–2861.

Tsai, C.L., and Barondeau, D.P. (2010). Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* 49, 9132–9139.

Tsou, A.Y., Paulsen, E.K., Lagedrost, S.J., Perlman, S.L., Mathews, K.D., Wilmot, G.R., Ravina, B., Koeppen, A.H., and Lynch, D.R. (2011). Mortality in Friedreich Ataxia. *J. Neurol. Sci.* 307, 46–49.

Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P. V, et al. (2014). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* 18, 145–153.

Vankan, P. (2013). Prevalence gradients of Friedreich's Ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *J. Neurochem.* 126, 11–20.

Vavlitou, N., Sargiannidou, I., Markoullis, K., Kyriacou, K., Scherer, S.S., and Kleopa, K.A. (2010). Axonal pathology precedes demyelination in a mouse model of X-linked demyelinating/type I Charcot-Marie Tooth neuropathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 945–958.

Vazzola, V., Losa, A., Soave, C., and Murgia, I. (2007). Knockout of frataxin gene causes embryo lethality in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 581, 667–672.

- Verma, I.M., and Weitzman, M.D. (2005). GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 711–738.
- Van Vranken, J.G., Jeong, M.Y., Wei, P., Chen, Y.C., Gygi, S.P., Winge, D.R., and Rutter, J. (2016). The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *Elife* *5*, 1–11.
- Vyas, P.M., Tomamichel, W.J., Pride, P.M., Babbey, C.M., Wang, Q., Mercier, J., Martin, E.M., and Payne, R.M. (2012). A TAT-frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 1230–1247.
- Wilson, J.M. (2009). Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* *96*, 151–157.
- Wöhr, M., Orduz, D., Gregory, P., Moreno, H., Khan, U., Vörckel, K.J., Wolfer, D.P., Welzl, H., Gall, D., Schiffmann, S.N., et al. (2015). Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. *Transl. Psychiatry* *5*, e525.
- Yang, W., Tu, Z., Sun, Q., and Li, X.-J. (2016). CRISPR/Cas9: Implications for Modeling and Therapy of Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* *9*, 28–31.
- Yiu, E.M., Tai, G., Peverill, R.E., Lee, K.J., Croft, K.D., Mori, T.A., Brigitte, B.S., Prashberger, M., Vogel, A.P., Rance, G., et al. (2015). An open-label trial in Friedreich ataxia suggests clinical benefit with high-dose resveratrol, without effect on frataxin levels. *J. Neurol.* 1344–1353.
- Ylä-Herttuala, S. (2016). ADA-SCID Gene Therapy Endorsed by European Medicines Agency for Marketing Authorization. *Mol. Ther.* *24*, 1013–1014.
- Yoon, H., Knight, S.A.B., Pandey, A., Pain, J., Turkarslan, S., Pain, D., and Dancis, A. (2015). Turning *Saccharomyces cerevisiae* into a Frataxin-Independent Organism. *PLoS Genet.* *11*, 1–28.
- Zhang, H., Yang, B., Mu, X., Ahmed, S.S., Su, Q., He, R., Wang, H., Mueller, C., Sena-Esteves, M., Brown, R., et al. (2011). Several rAAV vectors efficiently cross the blood-brain barrier and transduce neurons and astrocytes in the neonatal mouse central nervous system. *Mol. Ther.* *19*, 1440–1448.
- Zhao, H., Duan, L., Sun, Q., Gao, Y., Yang, Y., Tang, S., Zhao, D., Xiong, Y., Hu, Z., Li, C., et al. (2018). Identification of Key Pathways and Genes in L4 Dorsal Root Ganglion (DRG) After Sciatic Nerve Injury via Microarray Analysis Identification of Key Pathways and Genes in L4 Dorsal Root Ganglion (DRG) After Sciatic Nerve Injury via Microarray. *J. Investig. Surg.* *0*, 1–9.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* *16*, 1073–1080.

Compréhension de la neurophysiopathologie de l'ataxie de Friedreich et développement d'une approche de thérapie génique dans un nouveau modèle murin.

Résumé

L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie mitochondriale caractérisée par une ataxie sensitive et spinocérébelleuse, une cardiomyopathie et du diabète, pour laquelle il n'existe pas de traitement. L'AF résulte de niveaux réduits de frataxine (FXN), une protéine mitochondriale impliquée dans la biosynthèse des centres Fe-S. La neurophysiopathologie précise de la maladie n'est pas identifiée et malgré d'intenses progrès ces dernières années, il n'existait pas de bon modèle pour développer des approches thérapeutiques visant à stopper ou réverser l'atteinte sensitive de l'AF. Nous avons donc généré un nouveau modèle murin qui récapitule l'ataxie sensitive et la neuropathie associée au déficit en FXN. Plusieurs mécanismes moléculaires affectés en absence de FXN dans les neurones proprioceptifs, principalement affectés dans l'AF, ont été identifiés. Nous avons également démontré l'efficacité d'une approche de thérapie génique, basée sur l'utilisation de vecteur adéno-associés (AAV) exprimant la FXN humaine, pour réverser la neuropathie, établissant la preuve de concept du potentiel d'une telle approche pour l'atteinte sensitive de l'AF.

Mots clés : Ataxie de Friedreich, neurophysiopathologie, neurones proprioceptifs, thérapie génique, AAV

Résumé en anglais

Friedreich ataxia (FA) is a rare mitochondrial disease characterized by sensory and spinocerebellar ataxia, hypertrophic cardiomyopathy, and diabetes, for which there is no treatment. FA is caused by reduced levels of frataxin (FXN), an essential mitochondrial protein involved in the biosynthesis of Fe-S clusters. To date, FA precise neuropathophysiology is not identified and despite significant progresses in recent the years, there was no good model to develop therapeutic approaches in order to stop or reverse the sensory ataxia associated to the FA. Thus, we have generated a new neuronal mouse model that recapitulates the sensory ataxia and the neuropathy associated to FXN deficiency. Several molecular mechanisms dysregulated in the absence of FXN in the proprioceptive neurons, primarily affected in FA, were identified. Furthermore, we have demonstrated the efficacy of a gene therapy (GT) approach, based on the delivery of adeno-associated vectors (AAV) expressing the human FXN, to reverse the sensitive neuropathy, thus establishing the preclinical proof of concept for the potential of GT in treating FA sensitive neuropathy.

Key words: Friedreich ataxia, neuropathophysiology, proprioceptive neurons, gene therapy, AAV.