



**HAL**  
open science

# Développement de nouvelles stratégies de thérapie génique pour le syndrome de Leigh

Robin Reynaud-Dulaurier

► **To cite this version:**

Robin Reynaud-Dulaurier. Développement de nouvelles stratégies de thérapie génique pour le syndrome de Leigh. Neurobiologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV018 . tel-03696533

**HAL Id: tel-03696533**

**<https://theses.hal.science/tel-03696533>**

Submitted on 16 Jun 2022

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Neurosciences - Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Robin REYNAUD-DULAURIER**

Thèse dirigée par **Pr Elena MORO**

et co-encadrée par **Dr Michaël DECRESSAC**, INSERM

préparée au sein du **Laboratoire Grenoble Institut des  
Neurosciences**

dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## **Développement de nouvelles stratégies de thérapie génique pour le syndrome de Leigh**

Thèse soutenue publiquement le **23 mars 2022**

devant le jury composé de :

**Monsieur Uwe SCHLATTNER**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes,  
Examineur

**Madame Agnès RÖTIG**

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM délégation Ile-de-France,  
Rapporteuse

**Monsieur Jean-Christophe ROUX**

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation PACA-Corse,  
Rapporteur

**Madame Isabelle MARTY**

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM délégation Auvergne-Rhône-  
Alpes, Présidente











## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer le travail réalisé pendant ma thèse. Merci à Agnès Rötig et Jean Christophe Roux de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce manuscrit. Merci à Uwe Schlattner d'avoir mis à profit son expertise pour me donner de précieux conseils lors de mes CSI et d'avoir accepté le rôle d'examineur lors de ma soutenance. Merci aussi à Isabelle Marty d'avoir endossé ce rôle, mais également pour son accompagnement précieux lors de la rédaction de ma thèse.

Je remercie également les autres membres de mon CSI, Frédéric Saudou et Mireille Albrieux de m'avoir apporté leurs conseils scientifiques et leur accompagnement personnel tout au long de ma thèse.

Ensuite, j'aimerais remercier particulièrement Michaël Decressac de m'avoir apporté l'opportunité unique de réaliser cette thèse. J'ai appris énormément grâce à ces trois années passées dans ton équipe, à la fois scientifiquement et personnellement. Je pense que je n'oublierai jamais cette expérience. Merci également pour ton aide sur la relecture de ce manuscrit. Je remercie également Mathilde Decressac pour tous les moments partagés ensemble dans le labo et dans le bureau. Enfin, je remercie Elena Moro d'avoir dirigé cette thèse ainsi que toutes les personnes que j'ai pu croiser dans l'équipe.

Au sein du laboratoire, je remercie toute l'équipe d'Alain Buisson dans laquelle j'ai fait mes premiers pas dans cet institut pendant mes stages de Master. C'est vous qui m'avez donné l'envie de faire de la neuro et je vous en remercie. Merci à Vasile Stupar, Nora Collomb et Anthony Delalande pour votre aide pendant les manip d'ultrasons. Merci également à Béatrice pour toutes les constructions qu'elle a réalisées, mais aussi tous les conseils qu'elle m'a donnés. Merci à toutes les personnes avec qui j'ai passé du temps en production virale, c'était long mais le temps passait plus vite avec vous. La liste pourrait être très longue mais pour être sûr de n'oublier personne, je remercie tous ceux que j'ai côtoyés pendant ces trois années au sein de l'institut. Je n'ai rencontré que des gens toujours disponibles, prêts à échanger et j'ai beaucoup aimé travailler dans un tel environnement. En dehors de l'institut, je remercie toutes les personnes avec qui nous

avons collaboré pendant ces trois ans. Merci à l'équipe de Johan Auwerx avec Giorgia Benegiamo et l'équipe d'Enrico Maria Surace avec Elena Marrocco pour leur collaboration qui nous a permis de publier un beau papier.

Un grand merci aux collègues qui sont aussi des copains et avec qui j'ai partagé beaucoup de choses dans l'institut et en dehors. Camille, Charlotte, Rémi, Adrien, Raph vous vous reconnaissez.

Un merci tout particulier à ma chérie qui m'a supporté (dans les deux sens) pendant ces trois ans, tu as toujours été de bons conseils, tu as toujours été là pour me remonter le moral et me motiver, même quand ça n'a pas été facile.

Enfin, merci à mes parents et ma sœur pour les bons moments partagés avec vous qui permettent de décrocher de temps en temps du monde scientifique.

# Table des matières

<b>Abréviations</b>	<b>9</b>
<b>Introduction</b>	<b>10</b>
<b>I. Les vecteurs viraux adéno-associés et leur utilisation en thérapie génique</b>	<b>10</b>
I.1. Des virus aux vecteurs viraux	10
I.2. Le principe de thérapie génique	15
I.3. Les vecteurs AAV	19
I.4. Les avancées et les challenges de la thérapie génique par les vecteurs AAVs	25
<b>II. La barrière hémato-encéphalique et son impact sur la thérapie génique</b>	<b>32</b>
II.1. Structure et fonctions de la BHE et impact sur la thérapie génique	32
II.2. Les stratégies permettant de pallier à l'imperméabilité de la BHE	36
II.2.a. Les approches chirurgicales pour franchir mécaniquement la BHE	36
II.2.b. Les stratégies pharmacologiques pour augmenter la perméabilité de la BHE	39
II.2.c. L'utilisation de l'AAV9 capable de traverser la BHE	40
II.2.d. Les modifications de la capsid des vecteurs AAV	42
II.2.e. Les ultrasons focalisés: principe et applications	46
<b>III. La mitochondrie et les maladies mitochondriales</b>	<b>50</b>
III.1. La biologie de la mitochondrie	50
III.1.a. L'origine et la structure des mitochondries	50
III.1.b. La génétique mitochondriale	52
III.1.c. Les principales fonctions de la mitochondrie dans la cellule	55
III.1.d. La dynamique mitochondriale intra et intercellulaire	59
III.2. Les maladies mitochondriales	64
III.2.a. Epidémiologie et caractéristiques des maladies mitochondriales	64
III.2.b. La diversité génétique des dysfonctions mitochondriales	65
III.2.c. L'hétérogénéité clinique des maladies mitochondriales	67
III.2.d. Les stratégies thérapeutiques pour les maladies mitochondriales	71
<b>IV. Le syndrome de Leigh</b>	<b>75</b>
IV.1. L'épidémiologie et la génétique du syndrome de Leigh	75
IV.2. La physiopathologie et le diagnostic du syndrome de Leigh	77
IV.3. La prise en charge des patients atteints du syndrome de Leigh	79
IV.4. Les modèles d'étude du syndrome de Leigh	81
IV.4.a. Les modèles cellulaires et non murins du syndrome de Leigh	81
IV.4.b. La délétion du gène <i>NDUFS4</i> chez la souris	83
IV.4.c. Les autres modèles murins du syndrome de Leigh	87
IV.5. Les approches thérapeutiques pré-cliniques	88
IV.5.a. Les approches thérapeutiques non génétiques	88
IV.5.b. Les approches thérapeutiques génétiques	91
<b>Objectifs</b>	<b>94</b>
<b>Résultats</b>	<b>97</b>
<b>I. Etude de la perméabilité de la BHE chez les souris <i>NDUFS4</i></b>	<b>97</b>
I.1. Contexte et résumé de l'étude	97
I.2. Article 1: Blood brain barrier permeability is not affected in a mouse model of severe mitochondrial disease.	99
<b>II. Etude de l'effet d'une thérapie génique par remplacement du gène <i>NDUFS4</i> grâce au vecteur AAV-PHP.B dans un modèle murin du syndrome de Leigh</b>	<b>121</b>
II.1. Contexte et résumé de l'étude	121
II.2. Article 2: Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome.	123

<b>III. Etude de l'effet d'une thérapie génique par combinaison d'un vecteur viral et d'USF dans un modèle murin du SL.</b>	<b>141</b>
III.1. Contexte et résumé de l'étude	141
III.2. Matériel et méthodes	143
III.3. Résultats	148
<b>IV. Etude du transfert intercellulaire de mitochondries dans le contexte de la thérapie génique</b>	<b>161</b>
IV.1. Contexte et résumé de l'étude	161
IV.2. Matériel et méthodes	163
IV.3. Résultats	170
<b>Discussion</b>	<b>181</b>
<b>Annexes</b>	<b>195</b>
Article d'opinion : PHP.B/eB Vectors Bring New Successes to Gene Therapy for Brain Diseases.	195
<b>Références</b>	<b>201</b>

---

## Abréviations

---

**ADN** - Acide désoxyribonucléique

**ARN** - Acide ribonucléique

**ARNr** - Acide ribonucléique ribosomaux

**ARNt** - Acide ribonucléique de transfert

**ATP** - Adénosine triphosphate

**BHE** - Barrière hémato-encéphalique

**ERO** - Espèces réactives de l'oxygène

**FAD/FADH<sub>2</sub>** - Flavine adénine dinucléotide / Dihydroflavine adénine dinucléotide

**GFP** - Protéine fluorescente verte (de l'anglais « Green Fluorescent Protéine »)

**GTP** - Guanosine triphosphate

**IRM** - Imagerie par résonance magnétique

**ITRs** - De l'anglais « inverted terminal repeats »

**kb** - Kilobase

**kDa** - Kilodalton

**KO** - De l'anglais « Knock Out »

**LCR** - Liquide céphalo-rachidien

**LTRs** - De l'anglais « long terminal repeats »

**NAD<sup>+</sup> /NADH** - Nicotinamide adénine dinucléotide / hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide

**NDUFS4** - De l'anglais « NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-sulfur protein 4 »

**scAAV** - Virus adéno-associé auto-complémentaire (de l'anglais « self-complementary AAV »)

**SL** - Syndrome de Leigh

**SNC** - Système nerveux central

**ssAAV** - Virus adéno-associé simple brin (de l'anglais « single-stranded AAV »)

**TNT** - De l'anglais « tunneling nanotubes »

**USF** - Ultrasons focalisés

**Vecteur AAV** - Vecteur viral adéno-associé

---

# Introduction

---

## I. Les vecteurs viraux adéno-associés et leur utilisation en thérapie génique

### I.1. Des virus aux vecteurs viraux

Le terme virus (en latin : poison) était utilisé jusqu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle pour décrire les agents à l'origine des maladies infectieuses, sans qu'on puisse en faire l'observation ou démontrer leur existence. C'est en 1892 que le biologiste Dmitri Ivanovski fait la première démonstration de la présence de particules pathogènes plus petites que les bactéries. En travaillant sur la maladie mosaïque du tabac, il a montré que le filtrat de plantes malades restait infectieux alors que les bactéries étaient retenues par le filtre. Ne mesurant pas l'ampleur de sa découverte, il pensa que l'infection était causée par des toxines bactériennes passant à travers le filtre. C'est en 1898 que ses travaux sont repris par le biologiste hollandais Martinus Beijerinck qui écarte l'hypothèse d'une toxine bactérienne au profit d'un agent qu'il nomma « *contagium vivum fluidum* » (pour fluide vivant contagieux), marquant le début de la virologie. Le virus de la mosaïque du tabac restera un modèle d'étude important car ce sera le premier à être cristallisé puis observé en microscopie électronique dans les années 1930 afin de réaliser son analyse chimique et morphologique (Mokili et al., 2012).

C'est en 1957 qu'André Lwoff, prix Nobel de médecine en 1965, proposa la définition moderne du virus (Lwoff, 1957). Il les définit selon quatre critères, toujours valables aujourd'hui : (1) ils possèdent un seul type d'acide nucléique (acide désoxyribonucléique (ADN) ou acide ribonucléique (ARN)), (2) ils se multiplient à partir de leur matériel génétique grâce à une cellule hôte, (3) ils ne peuvent pas croître ou se diviser et (4) ils ne possèdent pas de métabolisme propre et l'énergie nécessaire à leur répllication est fournie par la cellule hôte.

Fruit de millions d'années d'évolution, la capacité des virus à transduire leur matériel génétique dans une cellule hôte afin de répliquer son propre génome a rapidement été

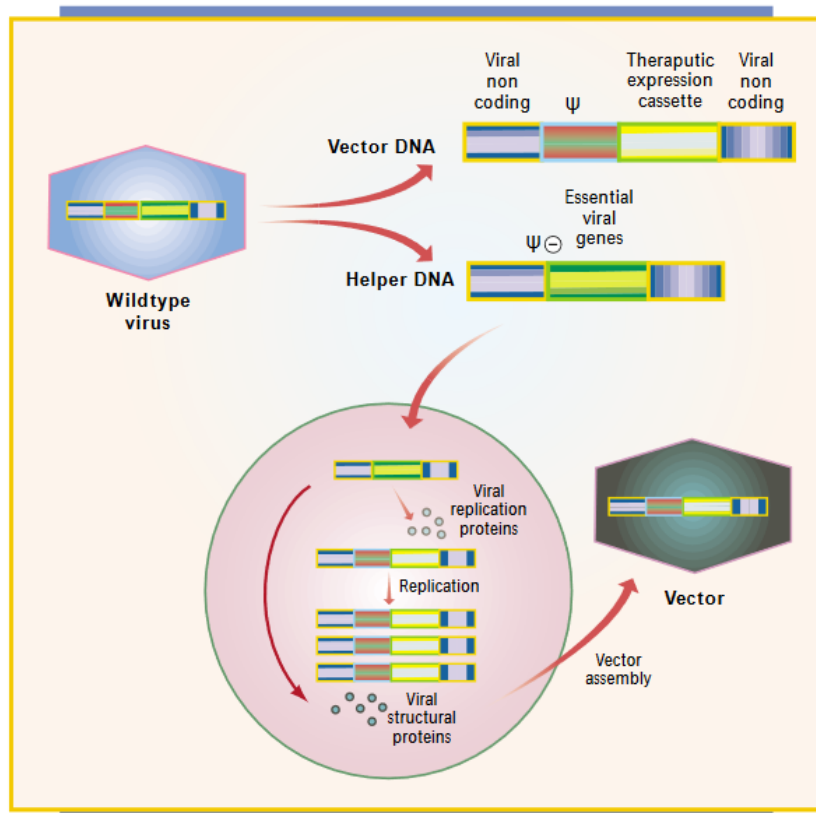
vu comme un avantage pouvant être utilisé à des fins thérapeutiques. Ainsi, des virus ont été transformés en vecteurs viraux par élimination de leurs propriétés pathogènes et conservation de leur capacité d'acheminement et d'expression d'un gène dans l'organisme. Ce concept a été introduit pour la première fois en 1972 par Jackson et ses collaborateurs qui ont modifié le virus simien 40 afin qu'il exprime des gènes non viraux (Jackson et al., 1972). Dans les années 80, de nombreuses équipes ont ainsi dérivé des virus tels que le virus de la vaccine ou les rétrovirus en vecteurs de transgène d'intérêt (Shimotohno et al., 1981; Mackett et al., 1982; Panicali et al., 1982). Sur cette base, de nombreux vecteurs viraux ont été développés depuis.

Le principe de transformation d'un virus en vecteur viral est commun quel que soit le virus utilisé. Le génome viral est constitué de séquences *trans* codant pour les protéines virales et de séquences *cis*, régulatrices de l'expression des gènes. Bien qu'il existe parfois quelques chevauchements, ces deux types de séquences sont spatialement séparées sur le génome viral et c'est cette propriété qui est exploitée pour générer les vecteurs viraux (**figure 1**). Les séquences *trans* et *cis* sont ajoutées dans des cellules productrices sous la forme de molécules d'acides nucléiques distinctes pour prévenir la reconstitution de particules virales par recombinaisons. Les gènes viraux codés par les séquences *trans* peuvent être apportés soit par un ou plusieurs plasmides, soit par un virus 'helper', soit être exprimés par les cellules productrices. Ces séquences ne contiennent pas de signal d'emballage. Le transgène d'intérêt est inséré entre les séquences *cis* qui quant à elles, possèdent un signal d'emballage. L'ensemble est ensuite apporté au sein des mêmes cellules. Les séquences *cis* contenant le transgène sont répliquées à partir des protéines synthétisées par les séquences *trans*. Ces dernières synthétisent également les protéines virales structurales. Ces protéines reconnaissent le signal d'emballage présent uniquement sur les séquences *cis* ce qui permet l'assemblage de vecteurs viraux contenant le transgène d'intérêt et dépourvus de gènes viraux endogènes (Kay et al., 2001).

Les vecteurs viraux peuvent être définis par trois caractéristiques communes. (1) Ils possèdent une capsid et/ou une enveloppe protéique emballant le matériel génétique et définissant le tropisme cellulaire ou tissulaire du vecteur viral. La capsid et/ou l'enveloppe peuvent être identiques au virus sauvage ou avoir été modifiées afin



d'ajouter des propriétés supplémentaires au vecteur viral. (2) Ils contiennent un transgène d'intérêt chargé par exemple - de remplacer un gène défectueux, - d'inactiver un gène muté devenu toxique, - d'ajouter des propriétés exogènes, - d'éditer le génome. (3) Ils possèdent une cassette de régulation composée d'un amplificateur, d'un promoteur et d'éléments de régulation qui contrôlent spatialement et temporellement l'expression du transgène. (Bulcha et al., 2021).

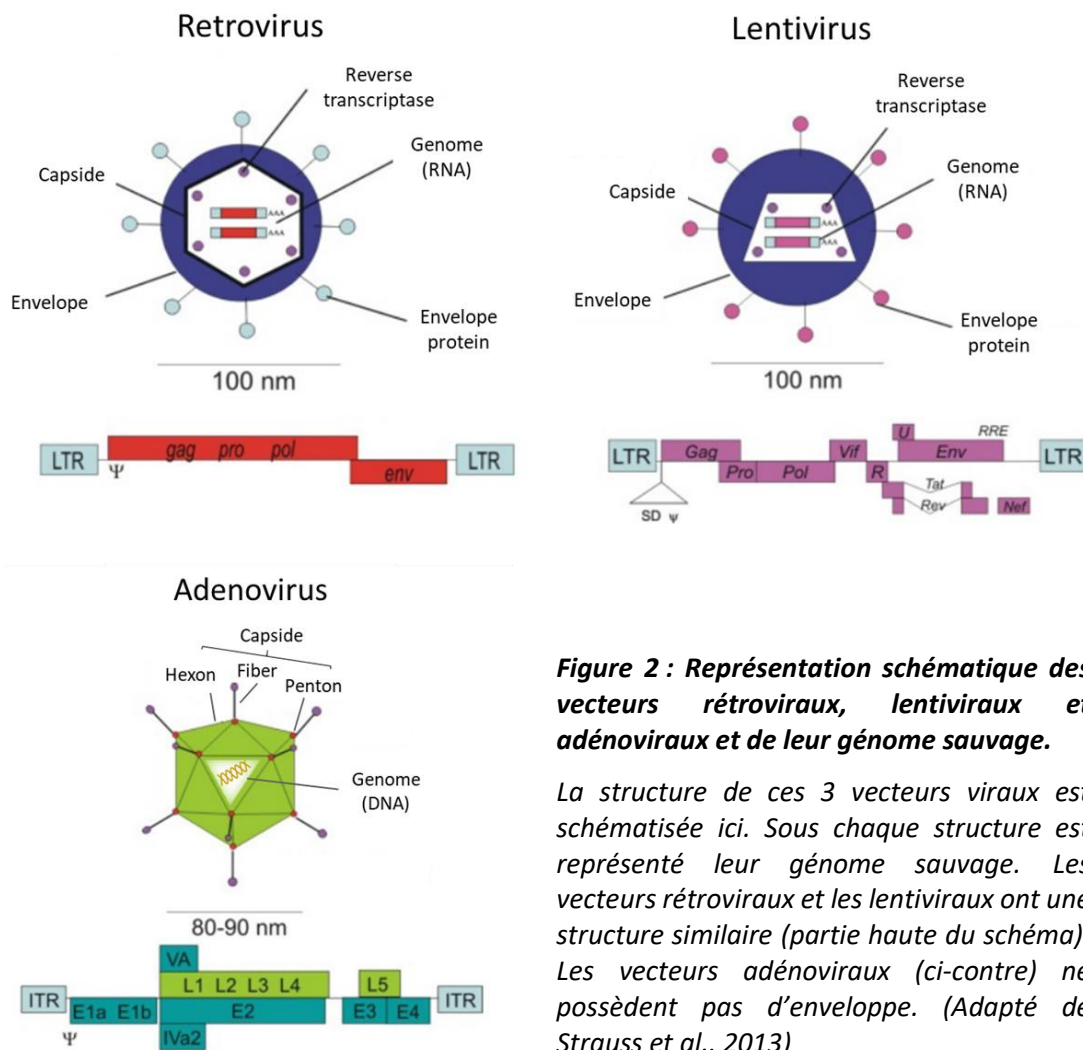


**Figure 1 : Stratégie de conception d'un vecteur viral à partir d'un virus.**

Le génome du virus sauvage (wildtype virus) peut être décomposé en deux type de séquence. Les gènes des séquences trans sont apportés par le « helper DNA ». Elles ne possèdent pas le signal d'emballage ( $\psi$ ). Le transgène d'intérêt est inséré dans la séquence cis (« vector DNA ») qui contient le signal  $\psi$ . Une fois dans un système cellulaire (cercle rouge), des vecteurs viraux contenant uniquement le transgène d'intérêt et dépourvu de séquences virales endogènes sont ainsi synthétisés. (Adapté de Kay et al., 2001)

Les principaux vecteurs viraux sont dérivés des rétrovirus, des lentivirus, des adénovirus et des virus adéno-associés (**figure 2**). Les vecteurs AAV (vecteur viral adéno-associé) sont des éléments centraux de ma thèse et ils seront détaillés dans la partie I.3. L'utilisation d'autres virus comme celui de l'herpès simplex et les poxvirus est possible mais plus rare et ne sera pas détaillée ici.

Les vecteurs rétroviraux sont des particules sphériques d'environ 100 nm de diamètre possédant une enveloppe et une capside, le tout contenant 2 molécules d'ARN identiques (**figure 2**). Les séquences virale *gag*, *pol* et *env* codant respectivement pour les protéines de la capside, la reverse transcriptase et les glycoprotéines de l'enveloppe sont éliminées et apportées séparément sous la forme de deux plasmides (*gagpol* et *env*). Elles sont remplacées par le transgène d'intérêt d'une longueur maximale de 7,5 kb (Bulcha et al., 2021). Lors du processus d'infection, les glycoprotéines de l'enveloppe interagissent avec des récepteurs membranaires spécifiques de la cellule hôte. Les deux membranes lipidiques fusionnent, le transgène est rétro transcrit en ADN qui s'intègre ensuite dans le génome. Les vecteurs rétroviraux ne transduisent que les cellules prolifératives car l'ADN ne peut entrer dans le noyau qu'en cas de dissolution de la membrane nucléaire, événement limité à la prophase de la mitose.



**Figure 2 : Représentation schématique des vecteurs rétroviraux, lentiviraux et adénoviraux et de leur génome sauvage.**

La structure de ces 3 vecteurs viraux est schématisée ici. Sous chaque structure est représenté leur génome sauvage. Les vecteurs rétroviraux et les lentiviraux ont une structure similaire (partie haute du schéma). Les vecteurs adénoviraux (ci-contre) ne possèdent pas d'enveloppe. (Adapté de Strauss et al., 2013)

Les lentivirus sont un sous-genre de la famille des rétrovirus. Les vecteurs lentiviraux se différencient par deux caractéristiques : la possibilité d'intégrer un transgène de taille supérieure (jusqu'à 17 kb) et la capacité d'infection des cellules non prolifératives en plus des cellules prolifératives (Kumar et al., 2001). La plupart des vecteurs lentiviraux sont basés sur le virus de l'immunodéficience humaine mais d'autres tels que le virus de l'immunodéficience félin ou simien ou le virus de l'anémie infectieuse équestre ont également été utilisés (Naldini et al., 1996 a). En ce qui concerne les vecteurs lentiviraux dérivés du virus de l'immunodéficience humaine, leur mode d'infection est similaire à celui des vecteurs rétroviraux mais leur mode de production diffère de par la complexité génétique du virus. En plus des protéines codées par les gènes *gag*, *pol* et *env*, plusieurs protéines accessoires doivent être synthétisées pour assurer la production des vecteurs lentiviraux. Les gènes codant pour la protéine transactivatrice de la transcription (*tat*) et la protéine de régulation de l'expression du virion (*rev*) sont donc ajoutés sur un même plasmide, en plus des gènes *gag* et *pol* (**figure 2**). Etant donné la sélectivité de l'enveloppe glycoprotéique du virus de l'immunodéficience humaine pour le récepteur CD4<sup>+</sup>, le gène *env* est remplacé par VSV-G, codant pour la glycoprotéine G des virus de la stomatite vésiculaire, offrant un plus large tropisme cellulaire aux vecteurs lentiviraux (Naldini et al., 1996 b; Zufferey et al., 1997).

Le développement des vecteurs lentiviraux auto-inactivants a permis de limiter le risque d'insertion mutationnelle, de dérégulation de la transcription ou de l'épissage du génome des cellules hôtes lié au caractère intégratif de ces vecteurs viraux (Zufferey et al., 1998; Moiani et al., 2012). Il a été montré que l'utilisation de vecteurs lentiviraux auto-inactivants diminuait de trois fois le risque d'induire une modification délétère du génome de l'hôte comparé aux vecteurs rétroviraux classiques (Modlich et al., 2009).

Les adénovirus sont des particules d'environ 100 nm de diamètre ne possédant pas d'enveloppe. Ils possèdent une capsid contenant un ADN double brin linéaire, flanqué par deux répétitions terminales inversées (ITRs) et un signal d'empaquetage (**figure 2**). L'ADN adénoviral code pour 35 protéines. Le génome peut être décomposé en quatre unités transcriptionnelles dites précoces : E1, E2, E3, E4, impliquées dans la synthèse de protéines nécessaires à la réplication de l'ADN viral et les séquences dites tardives L1 à L5, nécessaires à la production des protéines d'assemblage du virus. Plusieurs générations

de vecteurs adénoviraux ont été développées en supprimant de plus en plus de gènes adénoviraux endogènes, en particulier ceux responsables de la réplication du virus. Seul le gène E1 avait été supprimé pour les vecteurs adénoviraux de première génération puis E2, E3, et E4 ont été éliminés dans la deuxième génération (Gorziglia et al., 1999; Danthinne et al., 2000). La nécessité de produire des vecteurs viraux plus sûrs et possédant une capacité de transduction supérieure a conduit à développer une troisième génération de vecteurs adénoviraux où toutes les séquences codant pour des protéines virales endogènes ont été éliminées pour ne conserver que les séquences ITRs et le signal d’empaquetage. Leur production est donc dépendante de la présence d’un virus ‘helper’ contenant les gènes manquants et nécessaires à la synthèse des particules virales (Parks et al., 1996). Ces vecteurs viraux également appelés vecteurs de haute capacité peuvent contenir un transgène de 37kb. Ils présentent une immunogénicité moins importante et une meilleure efficacité de transduction des cellules cibles (Ricobaraza et al., 2020).

Les vecteurs adénoviraux possèdent des avantages significatifs par rapport aux vecteurs rétroviraux. Ils sont capables de transduire à la fois les cellules mitotiques et post-mitotiques avec une meilleure efficacité et ils possèdent un large tropisme cellulaire. Leur ADN ne s’intègre pas dans le génome de l’hôte et reste sous forme épisomale, limitant le risque d’insertion mutationnelle (Rauschhuber et al., 2012).

En 1978, 3 ans après son prix Nobel de médecine pour la découverte de la reverse transcriptase et des mécanismes d’infection des rétrovirus, David Baltimore déclara que d’ici 5 ans, les vecteurs viraux seraient utilisés pour pratiquer des thérapies géniques chez l’humain (Bouard et al., 2009). Il faudra cependant attendre 12 ans pour que le premier essai clinique de thérapie génique soit conduit (Rosenberg et al., 1990).

## I.2. Le principe de thérapie génique

Le concept de thérapie génique pourrait être résumé en une définition simple : l’introduction d’un nouveau matériel génétique dans une cellule dans le but d’induire un bénéfice thérapeutique. Il est cependant bien plus complexe et cela pourrait être illustré par une citation d’un pionnier de la thérapie génique, James Wilson, qui déclara après qu’un décès soit survenu suite à un essai clinique : « We were drawn into the simplicity of the concept. You just put the gene in » (Raper et al., 2003). Littéralement : « Nous avons

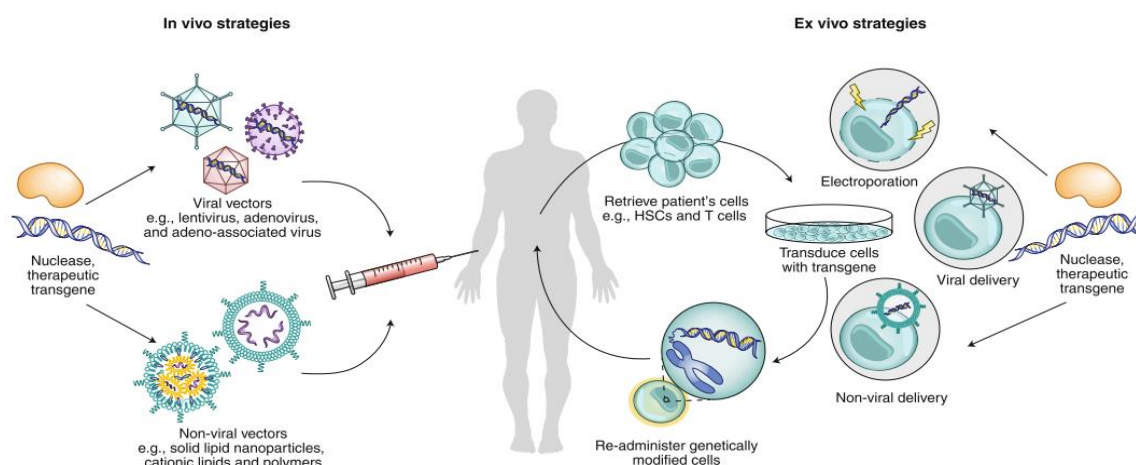
été attirés par la simplicité du concept : remplacer le gène ». La manipulation du génome n'est pas un acte anodin et la stratégie de thérapie génique peut et doit donc être adaptée aux circonstances.

Il existe deux types de stratégie de thérapie génique : *ex vivo* et *in vivo* (**figure 3**). Le choix de la stratégie est conditionné par différents paramètres : le type cellulaire/tissulaire ciblé en fonction de la pathologie, la durée d'expression du transgène dans l'organisme, les caractéristiques du transgène. Le choix de la stratégie doit également prendre en compte la méthode qui sera utilisée pour délivrer le matériel génétique à une cellule cible.

La thérapie génique *ex vivo* consiste à récupérer des cellules dont on souhaite modifier le génome, les cultiver puis les modifier génétiquement avant de les réinjecter (**figure 3, partie droite**). Cette stratégie est employée principalement pour des maladies impliquant des cellules sanguines (cellules matures ou cellules souches) car ce sont les plus faciles à prélever (Naldini, 2011).

Le premier succès de thérapie génique *ex vivo* était par exemple basé sur un transfert de gènes dans des lymphocytes T de patients atteints d'immunodéficiência causée par un déficit en adénosine désaminase (connus sous le nom de bébés bulles) (Blaese et al., 1995). Les lymphocytes étaient prélevés et modifiés à l'aide d'un vecteur rétroviral pour exprimer le gène codant pour l'adénosine désaminase. Après la réinjection de ces cellules, les patients présentaient une amélioration progressive et persistante de l'expression du gène et du nombre de lymphocyte T. Le développement des vecteurs lentiviraux a apporté une solution à la fois plus sûre et plus efficace pour le transfert de gènes *in vitro*. Ces vecteurs viraux assurent une persistance à long terme des cellules du greffon et une expression du transgène jusqu'à 6 ans pour les plus longs suivis (Ferrua et al., 2019). Des résultats démontrant l'efficacité de ces vecteurs viraux ont été obtenus chez des patients atteints de maladies sanguines comme la  $\beta$ -thalassémie mais aussi dans des pathologies lysosomales comme la leucodystrophie (Biffi et al., 2013; Thompson et al., 2018). La thérapie génique *ex vivo* implique principalement des vecteurs viraux mais d'autres méthodes peuvent être employée pour apporter le transgène dans les cellules. L'électroporation est par exemple une technique permettant l'entrée du matériel génétique grâce à la perméabilisation des membranes cellulaires par un courant électrique (Zhao et al., 2010).

La thérapie génique *ex vivo* explore également d'autres stratégies au moyen de cellules souches pluripotentes afin d'apporter des solutions thérapeutiques pour les maladies musculaires ou neurologiques mais ces types de pathologies restent principalement ciblées par la thérapie génique *in vivo* (Filareto et al., 2013; Gowing et al., 2017).



**Figure 3 : Les deux stratégies de thérapie génique.**

Les modifications du génome peuvent être effectuées *in vivo* (partie gauche du schéma) par administration d'un vecteur (viral ou non) contenant le matériel génétique ou *ex vivo* (partie droite du schéma) par prélèvement, modification génétique et ré-administration de cellules au patient (van Haasteren et al., 2020).

La stratégie de thérapie génique *in vivo* consiste à administrer le matériel génétique dans la circulation sanguine, dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou directement dans l'organe ciblé (*in situ*) (figure 3, partie gauche). Dans ce cas, les vecteurs servent de moyen de transport pour le matériel génétique afin de le délivrer aux cellules cibles. Les vecteurs sont donc les éléments clés de la thérapie génique *in vivo* et ils doivent être adaptés à la pathologie et à la méthode d'administration. Comme pour la thérapie *ex vivo* les vecteurs peuvent être de deux types, viraux ou non viraux.

Les techniques de délivrance non virales sont attractives de par leur facilité de production et leur faible immunogénicité (Gardlík et al., 2005). Dans sa forme la plus ancienne et la plus simple, le matériel génétique était délivré via des molécules d'ADN ou d'ARN nues injectées localement en intramusculaire (Wolff et al., 1990). Un essai clinique démontrant la sécurité de cette technique avait été mené chez des patients atteints de cardiopathie ischémique (Losordo et al., 2002). Un plasmide codant pour le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) avait été injecté dans le cœur via un cathéter. Quelques

résultats positifs comme l'amélioration des capacités physiques avaient été montrés mais cette méthode reste cependant peu développée à cause de la faible capacité de transduction et la durée d'expression limitée du transgène.

Une approche non virale alternative consiste à utiliser des complexes de lipides ou de polymères cationiques. L'interaction électrostatique avec le matériel génétique chargé négativement permet de le protéger de la dégradation. La charge positive du complexe lipidique permet l'interaction avec la membrane plasmique et l'entrée dans la cellule cible (Al-Dosari et al., 2009). Cette technique a été plutôt étudiée pour les pathologies respiratoires et vasculaires (Porteous et al., 1997; Laitinen et al., 2000). Pour l'instant, le stade de développement des outils non viraux n'est pas suffisant pour délivrer efficacement un gène de façon systémique comme en témoigne leur faible pourcentage d'utilisation (5%) pour les essais de thérapie génique (source : base de données « *Advanced Therapy Medicinal Product* »).

La thérapie génique *in vivo* est donc en majorité basée sur l'utilisation de vecteurs viraux. Les vecteurs rétroviraux sont très peu utilisés à cause de leur faible efficacité *in vivo*, leur importante immunogénicité, l'incapacité de transduire des cellules post-mitotiques et leur risque d'insertion non contrôlée dans le génome. Le choix d'un vecteur viral intégratif *in vivo* se portera donc plutôt sur les vecteurs lentiviraux. Leurs principaux avantages sont de transduire à la fois les cellules mitotiques et post mitotiques, de permettre une expression stable à long terme du transgène et de présenter un plus faible niveau d'immunogénicité (Nayerossadat et al., 2012). Leur bon tropisme pour les cellules neuronales en fait un candidat potentiel pour le traitement des maladies neurodégénératives ce qui a été évalué dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington (De Almeida et al., 2001; Azzouz et al., 2002; Dodart et al., 2005). Bien que des résultats démontrant l'efficacité de cette approche aient été obtenus, la principale limitation de cette stratégie est la localisation très ciblée de l'effet thérapeutique. La faible diffusion du transgène dans le cerveau est une limite de la méthode d'administration intraparenchymale, la seule méthode d'injection possible étant donné l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) aux vecteurs lentiviraux.

Les vecteurs adénoviraux sont avantageux de par leur large tropisme tissulaire, leur non-intégration dans le génome et leur capacité de transporter un transgène de grande taille. Leur première utilisation *in vivo* visait à délivrer le gène codant pour l'alpha-1-antitrypsine dans le poumon ou le foie chez le rat (Rosenfeld et al., 1991; Jaffe et al., 1992). La démonstration de l'efficacité de ce vecteur viral a conduit à l'utiliser pour le traitement de maladies monogéniques telles que la mucoviscidose avec l'injection intranasale d'un vecteur adénoviral transportant le gène *CFTR* (pour "régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique") (Zabner et al., 1993). Par la suite, il a été démontré que la capsid des vecteurs adénoviraux possède une forte capacité d'activation du système immunitaire innée, ce qui en plus de provoquer une diminution de la délivrance et de l'expression du transgène pouvait conduire à des réponses inflammatoires potentiellement fatales (Raper et al., 2003; Muruve, 2004). Cette limitation a provoqué une réduction de l'utilisation des vecteurs adénoviraux pour le transfert de gène *in vivo* et a conduit à détourner leur utilisation en d'autres applications. L'immunogénicité des vecteurs adénoviraux a donc été exploitée à des fins thérapeutiques pour développer des vaccins ou des traitements anti-cancéreux (Zhang et al., 2018; Folegatti et al., 2020).

Enfin, depuis une dizaine d'années, ce sont les vecteurs AAVs qui sont au centre de l'attention pour de nombreuses applications de thérapie génique *in vivo*.

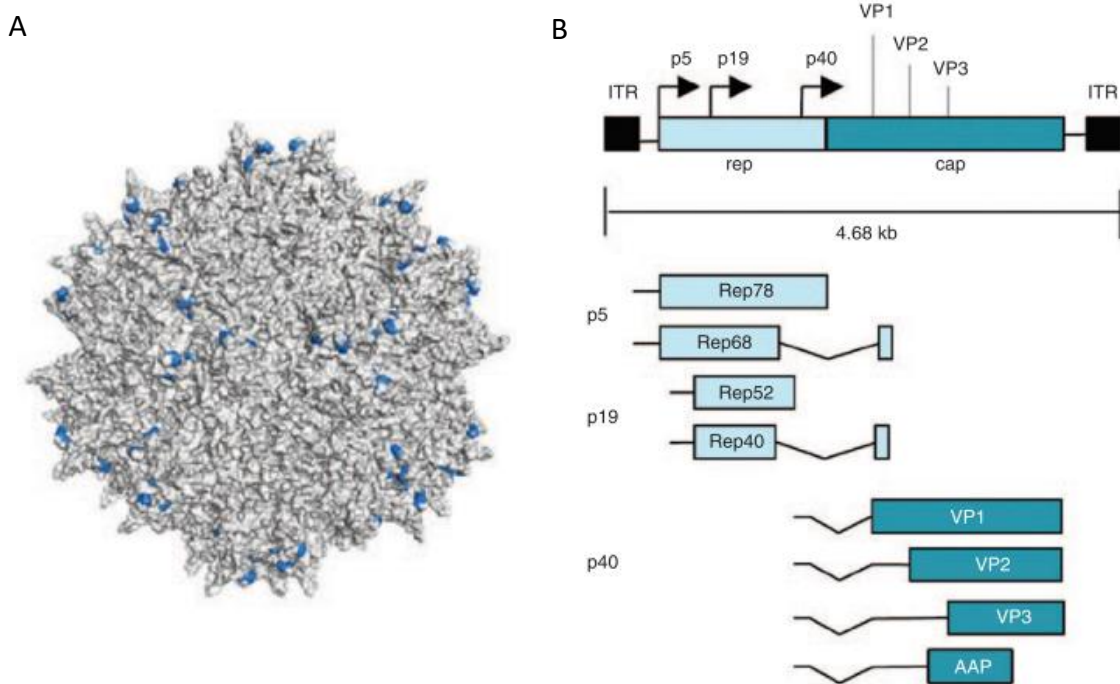
### I.3. Les vecteurs AAV

C'est en 1965, en observant des adénovirus de singe en microscopie électronique qu'une équipe américaine a mis en évidence pour la première fois des petites particules d'environ 240 Å, associées aux adénovirus nommées AAV (Atchison et al., 1965). Les AAVs ont été peu après isolés à partir de tissus humains (Blacklow et al., 1967, 1968). Ces virus ne possédant pas d'enveloppe appartiennent au genre des *Dependovirus* dans la famille des *Parvoviridae*. Le nom *dependovirus* fait référence au fait que la capacité d'infection de ces virus *dépend* de la présence d'un autre virus (adénovirus ou virus de l'herpès). Leur génome, contenu dans une capsid (**figure 4A**), est constitué d'un ADN simple brin d'environ 4,7kb qui peut correspondre soit au brin positif, soit négatif. Il est flanqué par deux séquences ITRs en forme de T qui servent d'origine de réplication et qui possèdent



un signal d’empaquetage (**figure 4B**). Son génome est constitué de 3 gènes : le gène *rep* code pour quatre protéines nécessaires à la réplication virale : Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Le gène *cap* code pour les trois sous-unités de la capside : VP1, VP2 et VP3. Enfin, le gène *AAP* code pour la protéine d’activation de l’assemblage. La séquence d’acide aminé de la capside détermine le sérotype du virus. Au total, 12 sérotypes et plus de 100 variants des AAVs ont été identifiés, 9 sérotypes ont été décrits chez l’humain (AAV1 à 9) et 3 ont été isolés chez les primates non humain (AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.43) (Wang et al., 2019 b; Li et al., 2020).

Les vecteurs AAVs sont constitués des mêmes capsides que leurs homologues sauvages. Cependant ils encapsident un génome où seules les séquences ITRs sont conservées, les gènes viraux endogènes étant éliminés et remplacés par le transgène thérapeutique d’intérêt. L’élimination complète des séquences virales sauvages permet de maximiser la taille du transgène, de diminuer l’immunogénicité et la toxicité des vecteurs AAVs (Samulski et al., 1989).



**Figure 4 : Structure et organisation du génome des virus adéno-associés.**

*A : Représentation de la structure de la capside d'un virus adéno associé de sérotype 2. Les acides aminés colorés en bleu permettent la liaison à l'héparane sulfate. B : Structure du génome des virus adéno-associés. Le génome d'environ 4,7 kb, flanqué par 2 séquences ITRs code pour 8 protéines. P5, p19 et p40 représentent les promoteurs à partir desquels sont exprimés les différents gènes. (Adapté de Gaj et al., 2015)*

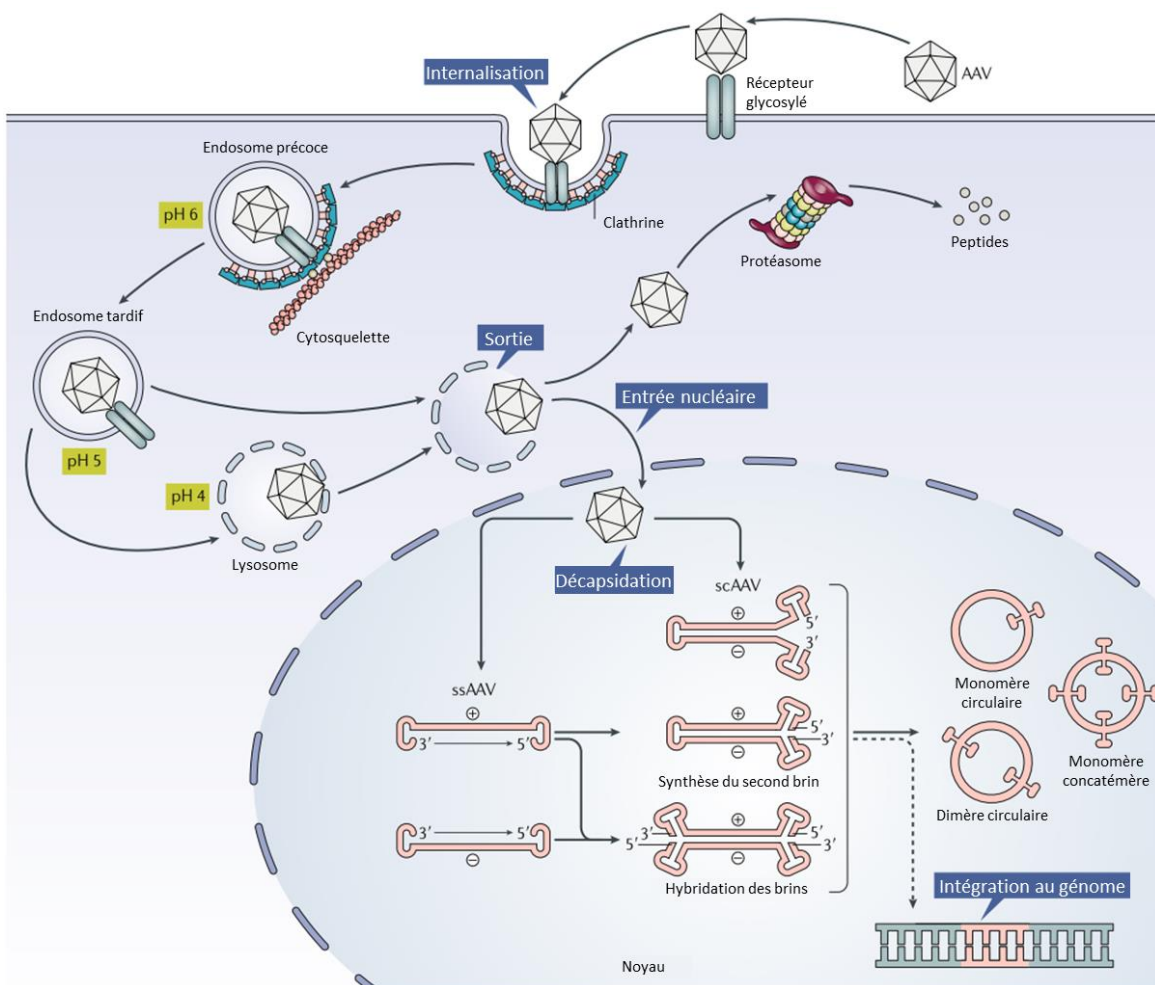
La voie de transduction des vecteurs AAVs dans la cellule est schématisée dans la **figure 5**. La première étape est la liaison des protéines de la capsid à un récepteur membranaire. Ces récepteurs sont des glycanes et leur nature varie en fonction du sérotype de l'AAV. Le premier récepteur identifié, le protéoglycane à héparane sulfate, permet la liaison des AAVs de sérotype 2 et 3 aux membranes cellulaires (**figure 54A**) (Summerford et al., 1998). Par la suite d'autres récepteurs ont été décrits et c'est sur cette base que les AAVs ont été classés en trois groupes : ceux se liant à l'héparane sulfate (AAV2, 3 et 6), ceux se liant à l'acide sialique (AAV1, 4, 5 et 6) et celui se liant au galactose (AAV9). Les récepteurs nécessaires à la fixation des AAV7 et 8 reste encore inconnue (Agbandje-McKenna et al., 2011).

En plus de ces récepteurs, l'entrée dans la cellule nécessite l'interaction avec un ou plusieurs co-récepteur(s) en fonction du sérotype. Parmi ceux qui ont été identifiés, le récepteur de la laminine est par exemple indispensable pour l'entrée des vecteurs AAVs de sérotype 2, 3, 8 et 9 (Robert Cronin, Nicholas Dias, Yung Peng, 2017).

Après interaction avec le récepteur et le co-récepteur, les vecteurs AAVs sont internalisés par la voie endosomale par un processus dépendant des clathrines. Les régions VP1 et VP2 opèrent ensuite un changement de conformation suite à l'acidification du pH de l'endosome qui conduit à la sortie du vecteur AAV dans le cytosol (**figure 5**). Ici, il peut être dégradé par le protéasome ou entrer dans le noyau par les pores nucléaires et libérer son génome (Nicolson et al., 2014). Le mécanisme d'entrée dans le noyau n'est pas complètement élucidé mais des études montrent que des régions situées sur les protéines VP1 et VP2 serviraient de signal de localisation nucléaire (Berry et al., 2016).

Une fois dans le noyau, la capsid est dégradée par un mécanisme encore inconnu, qui semble être dépendant du sérotype (Thomas et al., 2004). L'ADN simple brin est libéré et doit être converti en ADN double brin soit par synthèse du brin complémentaire à partir de la séquence ITR de l'extrémité 3' du brin matrice, soit par combinaison des brins positifs et négatifs empaquetés dans des particules différentes. Pour supprimer cette étape limitante, des vecteurs auto-complémentaires (nommés vecteurs scAAVs pour "*self-complementary AAVs*") ont été développés (Ferrari et al., 1996; McCarty et al., 2003). Ces vecteurs viraux sont produits par association des deux brins du génome en une seule molécule d'ADN simple brin contenant des séquences répétées et inversées. Les séquences complémentaires sont séparées par une séquence ITR mutée et une séquence

ITR sauvage est présente à chaque extrémité du génome. Après la décapsidation, la molécule d'ADN se replie de part et d'autre de la séquence ITR mutée et les bases complémentaires s'apparient pour former la molécule d'ADN double brin (**figure 5**). Cette propriété diminue cependant la taille du transgène pouvant être inséré de moitié (environ 2,2 kb) par rapport aux vecteurs AAVs simple brin. L'ADN double brin est ensuite stabilisé sous forme circulaire (appelée épisomale). Il a été montré que les vecteurs AAVs pouvaient s'intégrer dans le génome cellulaire mais la fréquence estimée est relativement faible (0,1% – 0,5%) (McCarty et al., 2004).



**Figure 5 : Cycle de vie des vecteurs AAV.**

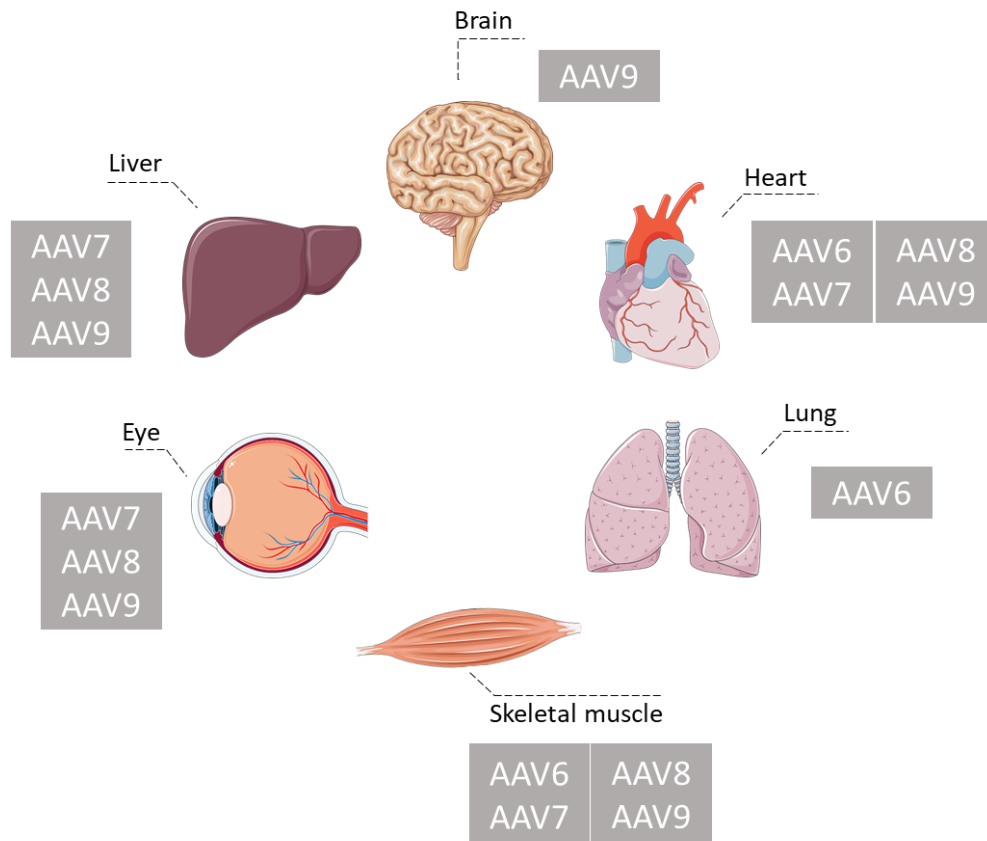
Le processus de transduction cellulaire des vecteurs AAVs nécessite 5 étapes clés : (1) l'internalisation dans la cellule par liaison à des récepteurs spécifiques et endocytose. (2) La sortie de la particule virale dans le cytoplasme puis (3) l'entrée dans le noyau et la libération de l'ADN contenu dans la capsid. (4) Enfin l'ADN simple brin est converti en ADN double brin et reste sous forme épisomale dans le noyau. Dans de très rares cas, il peut être intégré au génome de la cellule hôte (Adapté de Wang et al., 2019).

L'efficacité de transduction d'un type cellulaire ou tissulaire dépend du sérotype du vecteur AAV (Grimm et al., 2006). Cette propriété nommée le tropisme a été évaluée pour les principaux sérotypes de vecteurs AAVs (1 à 9) lors d'une étude de référence (Zincarelli et al., 2008). Cette étude a comparé la distribution et l'évolution de l'expression de la luciférase *in vivo* après injection de la même dose ( $1.10^{11}$  génomes viraux (gv)/souris), par la même voie d'injection (intraveineuse) et chez des souris adultes du même âge (8 semaines), pour chaque vecteur viral. Les résultats obtenus ont montré que tous les sérotypes, à l'exception des vecteurs AAV3, sont capables de transduire le foie. C'est également dans cet organe que le niveau d'expression du transgène est le plus haut. En deuxième position sont retrouvés les muscles squelettiques inférieurs qui ne sont cependant pas transduits par tous les sérotypes (principalement les vecteurs AAV6, 7, 8 et 9). De façon générale, ce sont les sérotypes 8 et 9 qui présentent le tropisme le plus large mais c'est avec le sérotype 9 que l'expression du transgène est la plus forte.

Ces résultats sont corroborés par d'autres études s'intéressant à certains sérotypes ou une voie d'injection spécifique. Des études ont par exemple montré que les vecteurs AAV8 et 9 permettaient une transduction efficace du foie et du cœur, après une injection intraveineuse ou extraveineuse (intrapéritonéale ou sous cutanée) (Nakai et al., 2005; Inagaki et al., 2006). Il a également été montré que ces deux sérotypes possèdent la meilleure efficacité de transduction des muscles squelettiques lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse alors que le vecteur AAV6 est le plus efficace après une injection intramusculaire (Blankinship et al., 2004; Wang et al., 2005; Inagaki et al., 2006). Le transfert de gènes dans la rétine qui n'avait pas été étudié par Zincarelli et ses collaborateurs est favorisé par l'utilisation de vecteurs AAV7, 8 ou 9 après des injections locales (subrétinales) (Lebherz et al., 2008). L'efficacité de transduction du cerveau a été évaluée pour de nombreux sérotypes en exploitant différentes stratégies d'administrations ce qui sera détaillé dans le paragraphe II.2. La **figure 6** résume les cibles préférentielles des principaux sérotypes de vecteurs AAVs.

D'un point de vue pratique, la méthode de production standard des vecteurs AAVs est la triple transfection de cellules HEK293T. Elle consiste à co-transfecter le plasmide contenant le transgène flanqué par les séquences ITRs avec un plasmide codant pour les gènes *rep* et *cap* et un troisième (helper) qui fournit les gènes adénoviraux nécessaires et

suffisants à la production des vecteurs AAVs (Matsushita et al., 1998; Xiao et al., 1998). Pour l'utilisation en recherche pré-clinique la production des vecteurs AAVs s'effectue avec des cellules HEK adhérentes.



**Figure 6 : Synthèse des cibles privilégiées des principaux sérotypes de vecteurs AAVs.**

Les sérotypes naturels de vecteurs AAV ont des tropismes différents en fonction des protéines exprimées à la surface de leur capsid. Leurs organes cibles préférentiels sont résumés ici. (Généré avec Servier Medical Art).

Cependant, le besoin de quantité importante de vecteurs AAVs pour les utilisations cliniques a conduit à optimiser cette production. Les cellules ont donc été adaptées afin de pouvoir être cultivées et transfectées en suspension dans des bioréacteurs et d'augmenter ainsi le rendement de production (Grieger et al., 2016; Blessing et al., 2019). Dans cette optique, une stratégie alternative mais encore moins répandue consiste à utiliser des cellules d'insectes (Sf9) modifiées afin d'exprimer de façon stable les gènes *rep* et *cap*. L'infection de ces cellules avec un baculovirus exprimant le transgène d'intérêt entre les 2 ITRs suffit ensuite à produire des vecteurs AAVs avec un rendement supérieur par rapport aux autres systèmes de production. Il a cependant été observé que les

particules virales produites avec cette méthode possédaient une efficacité de transduction moindre (Mietzsch et al., 2014). Cette méthode continue donc d'être optimisée car en plus de produire de grandes quantités de vecteurs viraux, elle permet de diminuer la quantité d'ADN bactérien contaminant issu des plasmides utilisés dans le système impliquant les cellules HEK (Kondratov et al., 2017; Mietzsch et al., 2017).

Quelle que soit la méthode de production, la purification est une étape cruciale pour séparer les vecteurs viraux des débris cellulaires ou des acides nucléiques contaminants issus des étapes de productions préalables. Là encore le degré de pureté nécessaire varie en fonction de l'utilisation. La purification sur un gradient de iodixanol est une méthode simple et délivrant des vecteurs AAVs suffisamment purs pour être utilisés dans les laboratoires de recherche (Zolotukhin et al., 1999). Récemment, une nouvelle méthode a été décrite afin de raccourcir la procédure tout en conservant des rendements comparables (Negrini et al., 2020). Pour des productions à plus grande échelle, des purifications en plusieurs étapes impliquant des méthodes de chromatographie d'affinité sont utilisées (Davidoff et al., 2004). En plus d'améliorer la pureté, l'optimisation de ces méthodes permet de séparer les particules virales contenant le transgène d'intérêt des particules vides, augmentant l'efficacité des vecteurs viraux (Nass et al., 2018).

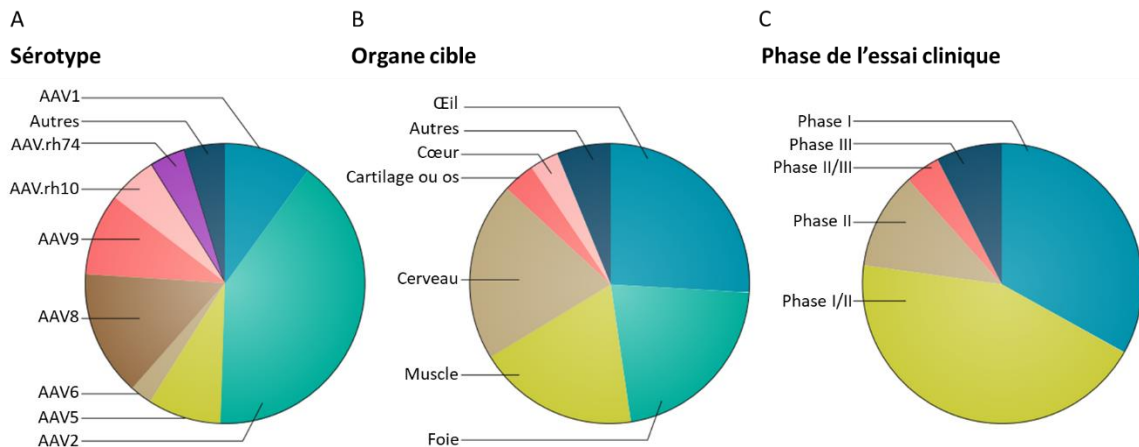
## I.4. Les avancées et les challenges de la thérapie génique par les vecteurs AAVs

La première vectorisation de l'AAV pour délivrer un gène *in vitro* a été réalisée en 1984 (Hermonat et al., 1984). L'amélioration des systèmes de production des vecteurs AAVs les rendant plus sûrs et plus efficaces a permis de les tester pour la première fois *in vivo* sur des lapins en 1993 (Flotte et al., 1993). Un an plus tard, il a été démontré qu'un gène délivré par un vecteur AAV pouvait être exprimé à long terme chez le mammifère (Kaplitt et al., 1994). Pendant de nombreuses années, seulement 5 sérotypes d'AAVs avaient été décrits et les vecteurs AAV2 étaient au centre de l'attention pour les applications pré-cliniques et cliniques. En 1998, l'AAV6 a été identifié puis les sérotypes 7, 8 et 9 ont été successivement découverts par l'équipe de James Wilson (Rutledge et al., 1998; Gao et al., 2002, 2004). Ces découvertes ont permis d'augmenter les possibilités thérapeutiques en adaptant le sérotype utilisé à l'organe ciblé.

Les poumons sont une cible historique dans le développement de la thérapie génique par les vecteurs AAVs. Cet organe était par exemple la cible du premier essai clinique de thérapie génique *in vivo* réalisé en 1996 chez des patients atteints de mucoviscidose (Flotte et al., 1996). L'injection locale d'un vecteur AAV2 codant pour le gène *CFTR* ne mettaient pas en avant d'effet significatif sur l'amélioration du niveau d'inflammation des voies aériennes mais a permis de mettre en évidence la sécurité et l'utilité de ces vecteurs viraux en tant qu'outil de délivrance d'un gène thérapeutique (Wagner et al., 1998, 2002). Pour cette raison et aussi car ils ont été les premiers à être produits et commercialisés à grande échelle, les vecteurs AAV2 ont été des plus utilisés en clinique (Forsayeth et al., 2011) (**figure 7A**). Depuis, peu de progrès ont été réalisés et le transfert de gènes dans le poumon reste étudié au niveau pré-clinique.

Le foie est un organe particulièrement attractif pour le développement de stratégies de thérapie génique via les vecteurs AAVs (**figure 7B**) pour plusieurs raisons : (1) c'est un organe largement impliqué dans la biosynthèse de protéines sanguines ou d'hormones. (2) il est possible de cibler efficacement cet organe par des injections intraveineuses (Manno et al., 2006; Nathwani et al., 2006, 2011). (3) Malgré la nature non intégrative des vecteurs AAVs et la capacité de régénérescence de ce tissu, des études ont montré que le transgène était exprimé à long terme dans des modèles animaux et chez l'humain (Niemeyer et al., 2009; Nathwani et al., 2014).

Dans un essai clinique déterminant dans le domaine de la thérapie génique *in vivo*, un vecteur AAV2 exprimant le gène codant pour le facteur IX de coagulation sanguine (*FIX*) a été injecté en intraveineux chez des patients atteints d'hémophilie B. Les résultats furent les premiers à montrer que la restauration de l'expression d'un gène chez l'humain conduisait à un effet thérapeutique (Manno et al., 2006). La découverte de l'AAV8 et de sa capacité à transduire le foie avec une efficacité 10 à 100 fois supérieurs aux autres phénotypes a conduit à un autre essai clinique démontrant l'efficacité et la sécurité de l'administration intraveineuse d'un vecteur AAV8 codant pour *FIX* (Gao et al., 2002; Nathwani et al., 2014). Ces succès ont ouvert la voie à de nouvelles pistes de recherche pour des pathologies où il est pertinent de transférer un gène dans le foie comme les pathologies métaboliques et les maladies lysosomales (Alexander et al., 2008; Colella et al., 2018).



**Figure 7 : Récapitulatif des essais cliniques de thérapie génique impliquant des vecteurs AAV.**

*A : Sérotypes des capsides utilisées dans les essais cliniques avec les vecteurs AAV2 étant majoritaires mais les sérotypes 8 et 9 de plus en plus utilisés. B : Les principaux organes ciblés par les vecteurs AAVs. C : Les différentes phases des essais cliniques. La phase I pour les études de tolérance et toxicité. La phase II pour l'étude de l'efficacité. La phase III permet de confirmer l'efficacité sur un plus grand nombre de volontaires malades. La phase IV (ou phase de pharmacovigilance) consiste à suivre l'utilisation du médicament tout le long de son utilisation. Ici certaines phases sont regroupées car ces essais sont principalement tournés vers le traitement de maladies rares et sont donc réalisés avec un nombre limité de volontaire. La phase I et II sont donc souvent regroupées en une seule où la sécurité et l'efficacité sont testées en parallèle sur des malades (adapté de Wang et al., 2019).*

Les yeux sont la cible d'un quart des essais cliniques impliquant des vecteurs AAVs (**figure 7B**). Le transfert de gènes dans cet organe a largement été étudié pour le traitement de l'amaurose congénitale de Leber. Cette maladie génétique de la rétine est diagnostiquée chez l'enfant et conduit à une perte de la vision progressive pour évoluer jusqu'à une cécité totale. La mutation du gène *RPE65*, identifiée à l'origine chez le chien puis chez les patients peut être à l'origine de cette maladie. Les études pré-cliniques ont utilisé le modèle canin pour évaluer l'effet thérapeutique de la restauration de l'expression de ce gène grâce à des vecteurs AAVs de plusieurs sérotypes (1, 2, 4 et 5) injectés localement dans l'œil (Acland et al., 2005; Le Meur et al., 2007). Ces études ont mis en évidence la sécurité et l'efficacité de cette approche, avec un niveau d'expression du transgène dans les cellules de la rétine similaire entre les sérotypes. Ce traitement conduisait à une restauration de la vision durable (jusqu'à un an de suivi), en particulier si l'injection avait lieu dans les stades précoces de la maladie. Suite à ces résultats, cette approche a été utilisée chez des patients. Dans les différentes études cliniques, les patients ne présentaient pas d'effets indésirables graves mais l'amélioration de l'acuité visuelle



n'était pas systématique (Bainbridge et al., 2008; Maguire et al., 2008; Simonelli et al., 2009). D'autres questionnements persistent comme par exemple l'âge auquel doit être mis en place le traitement ou la persistance de l'effet thérapeutique (Maguire et al., 2009; Bainbridge et al., 2015; Jacobson et al., 2015). En 2017, l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) a néanmoins autorisé la mise sur le marché du Luxturna, le premier médicament de thérapie génique basé sur l'utilisation d'un vecteur AAV2 codant pour le gène *RPE65*. Cette stratégie continue donc d'être évaluée pour étudier les bénéfices à long terme et trouver des moyens pour les améliorer (Wang et al., 2020 b).

De par le tropisme naturel des AAVs pour le cœur et les muscles squelettiques, ces deux organes sont des cibles privilégiées pour l'étude et le développement de la thérapie génique *in vivo* (**figure 7B**). En ce qui concerne le cœur, il a par exemple été montré que la délivrance intraveineuse d'un vecteur AAV1 exprimant le gène *SERCA2 $\alpha$*  prévenait les dysfonctionnements du cœur chez un modèle porcin d'insuffisance cardiaque (Kawase et al., 2008). Sur la base de ces résultats, l'étude clinique impliquant le plus de participants a démontré la sécurité de cette approche mais n'a pas mis en évidence de bénéfices thérapeutiques (Greenberg et al., 2016).

La bonne efficacité de transduction du muscle squelettique a été démontré dans des modèles animaux (primates, chiens) de myopathie après l'injection locale de vecteurs AAV1 et AAV6 (Wang et al., 2007; Kota et al., 2009). Une forte expression du transgène d'intérêt dans les muscles a également été rapportée après l'injection intraveineuse d'un vecteur AAV8 ou 9 dans un modèle canin de myopathie de Duchenne (Yue et al., 2015; Le Guiner et al., 2017). La sécurité et l'amélioration fonctionnelle et histologique durable du phénotype pathologique suite à cette thérapie ont ensuite été confirmées avec un suivi jusqu'à 30 mois post injection (Duan, 2018). Sur la base des résultats encourageants obtenus en pré-clinique, des essais cliniques ont été conduits chez des patients atteints de différentes formes de myopathie (myopathie de Duchenne, myopathie congénitale myotubulaire) en utilisant différents sérotypes (AAV1, AAV8, AAV9) et différents transgènes (Aguti et al., 2018). Toutes les études soulèvent le potentiel thérapeutique d'une telle stratégie pour les maladies musculaires. Cependant, bien que la sécurité de cette approche semble validée, la nécessité d'injecter des hautes doses de vecteurs viraux

pour observer un effet thérapeutique conduit à ré-évaluer leur toxicité dans de futures études cliniques (Chiu et al., 2020).

Un des plus gros succès de la thérapie génique *in vivo* a été obtenu dans le cas d'une maladie neuromusculaire, l'amyotrophie spinale. A l'origine, des études pré-cliniques utilisant un vecteur AAV9 pour restaurer l'expression du gène de survie de motoneurones (SMN) ont été réalisées chez des modèles murins de l'amyotrophie spinale. Une simple injection de ce vecteur par voie intraveineuse ou intramusculaire permettait d'augmenter la survie des animaux jusqu'à plus de 200 jours contre 20 jours pour des animaux non traités (Foust et al., 2010; Benkhalifa-Ziyyat et al., 2013). Ces résultats prometteurs ont été validés par la suite dans des modèles porcins et de primates non humains (Passini et al., 2014; Duque et al., 2015). Sur la base de nombreuses démonstrations chez l'animal, l'équipe de Brian Kaspar a mené un essai clinique sur 15 patients atteints d'amyotrophie spinale. Les résultats ont montré que la restauration de l'expression du gène SMN par un vecteur AAV9 n'induisait pas d'effet secondaire grave. Concernant l'effet thérapeutique, tous les patients étaient en vie à l'âge de 20 mois alors que le pourcentage de survie mesuré dans une cohorte non traitée était de 8% à cet âge. Les patients traités avec la dose la plus haute présentaient une amélioration importante des performances motrices (Mendell et al., 2017). Cet essai clinique représente à ce jour l'une des meilleures démonstrations du potentiel thérapeutique de la thérapie génique *in vivo*. En 2019, la FDA autorisa la mise sur le marché du Zolgensma, le premier médicament de thérapie génique injectable en intraveineux, pour les patients atteints d'amyotrophie spinale. Son prix de plus de 2 millions de dollars par dose en fait le médicament le plus cher du monde, créant ainsi des controverses éthiques également valables pour les autres médicaments de thérapie génique (Kent et al., 2017).

Les vecteurs AAVs ont suscité un attrait majeur ces dernières années et leur utilisation dans les programmes cliniques, bien que récents et donc encore en phase I ou II pour la plupart (**figure 7C**), ne cesse d'augmenter avec une nette tendance à favoriser les sérotypes 8 et 9 (Kuzmin et al., 2021). L'augmentation de l'utilisation de ces vecteurs viraux a mis en évidence de nombreux avantages mais aussi des limitations. Afin d'exploiter le potentiel complet des vecteurs AAVs, certains défis continuent d'être des thèmes centraux de la recherche tels que : l'immunogénicité, l'efficacité de transduction,

la génotoxicité, la persistance de l'expression des gènes (Colella et al., 2018).

L'immunogénicité est provoquée par le fait que la capsid des vecteurs AAVs est identique ou presque à celle des virus sauvages. La réponse immunitaire est donc déclenchée de la même manière que si l'hôte avait été exposé au virus, d'autant plus que l'humain est un hôte naturel des virus adéno-associés et possède donc déjà des anticorps dirigés contre certains sérotypes (allant de 4% de la population pour l'AAV5 à 70% pour l'AAV2) (Monteilhet et al., 2010). La réaction immunitaire diminue donc l'efficacité et la sécurité des vecteurs AAVs et empêche la ré-administration d'une seconde dose. Différentes stratégies sont étudiées pour faire face à ce problème comme par exemple l'administration d'un traitement immunosuppresseur de façon transitoire ou la modification du sérotype utilisé, bien que cette solution puisse altérer le tropisme et donc l'efficacité du traitement (Jiang et al., 2006; Wang et al., 2007). L'équipe de Frederico Mingozzi travaille sur cette question et a démontré qu'il était possible d'améliorer l'efficacité de transduction et de permettre la ré-administration des vecteurs AAVs grâce à des traitements avec des endopeptidases contre les immunoglobulines G (Leborgne et al., 2020) ou des nanoparticules contenant de la rapamycine (Meliani et al., 2018).

L'efficacité de transduction est un paramètre clé permettant d'atteindre des niveaux d'expression du transgène suffisant pour délivrer un effet thérapeutique sans effet secondaires graves liés une dose trop élevée de vecteur viral. Plusieurs axes de recherche se concentrent sur ce défi : (1) l'identification ou la modification des capsides afin de déterminer celles qui permettent une meilleure efficacité de transduction de l'organe cible (Gabriel et al., 2013; Vercauteren et al., 2016). (2) L'optimisation des méthodes de délivrance afin de les adapter à chaque famille de pathologies (Igarashi et al., 2013; Zabaleta et al., 2017). (3) Enfin, l'optimisation des méthodes de production pour synthétiser des particules virales fonctionnelles et éliminer les particules vides (Nass et al., 2018; Wang et al., 2019 a).

La génotoxicité des vecteurs AAVs est limitée par leur caractère non intégratif. Comme pour toute thérapie génique ce paramètre doit cependant être considéré, d'autant plus que des études ont rapporté des cas d'insertion dans le génome chez la souris. Ces études ont montré que l'insertion provoquait des mutations à l'origine d'hépatocarcinomes (Donsante et al., 2007; Chandler et al., 2015). Ce paramètre doit donc être suivi avec

attention bien que les études effectuées chez des primates non humains et les nombreux essais cliniques réalisés chez l'humain n'ont jamais recensé d'événements de ce type (Gil-Farina et al., 2016).

La persistance de l'expression des gènes peut être vue comme une limitation pour deux raisons : la perte d'expression des gènes non désirée à cause de la division cellulaire et inversement, le caractère irréversible du processus de thérapie génique. Dans le premier cas, il a été montré que malgré la non-intégration du génome des vecteurs AAVs, le transgène était exprimé de façon stable pendant plus de 8 ans chez le chien et 7 ans chez l'humain (Niemeyer et al., 2009; Colella et al., 2018). Il a été montré que des stratégies d'insertions stables et contrôlées du génome des vecteurs AAVs permettaient d'augmenter la durée d'expression du transgène et d'améliorer l'effet thérapeutique (Wang et al., 2012; Barzel et al., 2015). Le développement d'outils permettant de ré-administrer le vecteur viral représenterait cependant la meilleure solution pour faire face à la perte d'expression du transgène (Meliani et al., 2018; Leborgne et al., 2020).

Inversement, l'irréversibilité du processus de thérapie génique peut constituer une limitation en cas d'expression trop importante du transgène et d'apparition d'effets secondaires. Ainsi, des méthodes sont développées pour contrôler l'expression du transgène dans le temps. Parmi ces outils, le système Tet-ON/Tet-OFF permet de conditionner l'expression d'un gène à l'administration d'une tétracycline (Chtarto et al., 2003).

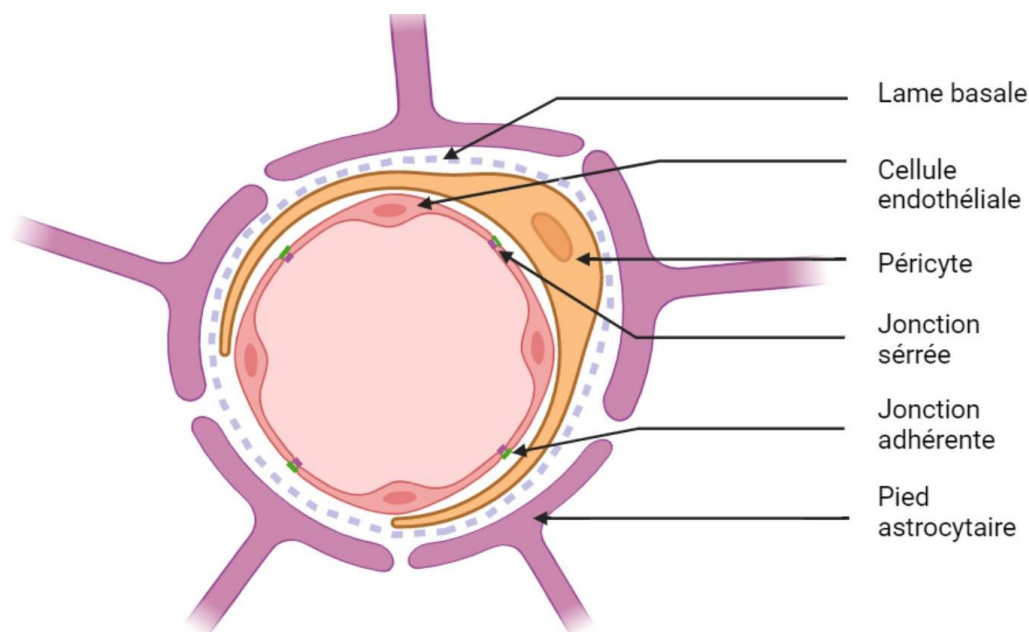
Un autre défi majeur que nous allons développer plus précisément concerne les pathologies impliquant le système nerveux central (SNC). En effet, le cerveau est protégé par différentes barrières physiques telles que le crâne ou la BHE, rendant compliqué l'accès aux vecteurs viraux.

## II. La barrière hémato-encéphalique et son impact sur la thérapie génique

### II.1. Structure et fonctions de la BHE et impact sur la thérapie génique

La BHE est une barrière semi-perméable constituée par les vaisseaux sanguins qui régule l'homéostasie dans tout le SNC. Elle est présente chez tous les mammifères et constitue la plus large interface d'échange entre le sang et le SNC.

Structurellement, la BHE est constituée de cellules endothéliales caractérisées par leur absence de fenestrations. Ces cellules sont polarisées, la face apicale est située dans la lumière du vaisseau et la face basale est fixée sur une lame basale. Des jonctions serrées (occludines, claudines) et des jonctions adhérentes (cadhérines, nectines) situées entre les cellules endothéliales assurent l'imperméabilité de la BHE en bloquant le passage paracellulaire (**figure 8**). Des péricytes entourent les cellules endothéliales et régulent (1) l'angiogenèse en modifiant l'architecture des vaisseaux, (2) la phagocytose en éliminant des métabolites toxiques du SCN, (3) le flux sanguin par régulation de la taille des capillaires et (4) la neuroinflammation en contrôlant l'entrée des globules blancs dans le



**Figure 8 : Schéma de la BHE.**

*Ce schéma regroupe les cellules et les molécules constituant la BHE. (Généré avec Biorender)*

parenchyme cérébral. Des pieds astrocytaires forment un réseau péri-vasculaire continue pour assurer un niveau d'imperméabilité supérieur. Ils contribuent au maintien de la structure en resserrant les jonctions serrées. Enfin, des cellules microgliales et des neurones peuvent également participer à la mise en place et à la maintenance de la BHE. Cette structure n'est pas figée et elle peut être modulée selon la taille et la localisation des vaisseaux. Dans les vaisseaux les plus larges, les péricytes peuvent par exemple être remplacés par une couche de cellules musculaire lisse (Abbott et al., 2006). Le niveau d'expression des jonctions serrées et adhérentes peut également varier d'une région à l'autre. Il a par exemple été montré que l'occludine et la cadhérine sont moins exprimée dans les cellules endothéliales de la moelle épinière que dans celles du cerveau (Bartanusz et al., 2011).

Contrairement à ce qui pourrait être suggéré par le terme de barrière, cette structure n'est pas totalement imperméable aux échanges entre la circulation sanguine et le SNC. Les molécules gazeuses ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) ou les molécules de petites tailles à tendance lipophile (moins de 500 Dalton) peuvent traverser les cellules endothéliales par diffusion (S. Hersh et al., 2016). Les molécules hydrophiles ou de plus hauts poids moléculaires peuvent être échangées de deux manières. La première implique l'expression de canaux ou de transporteurs spécifiques sur les cellules endothéliales. Ces protéines peuvent être présentes sur un seul pôle ou être exprimées des deux côtés des cellules. L'orientation de ces transporteurs conditionne la destination et le sens de déplacement des molécules. La deuxième voie d'échange à travers la BHE est la transcytose. Ce mécanisme nécessite l'interaction entre une molécule et un récepteur du côté apical des cellules endothéliales puis leur internalisation par endocytose. Les vésicules contenant le récepteur et son ligand sont ensuite transportées dans le cytoplasme et exocytées du côté basal. Les molécules peuvent également être transportées dans le sens inverse grâce aux transporteurs ABC (pour « *ATP-binding cassette* »). Ces protéines membranaires sont exprimées sur la membrane apicale des cellules endothéliales et peuvent intercepter et expulser les molécules dans la circulation sanguine par un mécanisme ATP-dépendant (Abbott et al., 2006).

Sur la base de cette structure unique, la BHE contribue à l'homéostasie et à la protection du SNC vis-à-vis du milieu sanguin par 5 fonctions principales.

Tout d'abord, elle fournit un environnement stable et propice à la communication neuronale en régulant la concentration ionique et l'apport en nutriments et en métabolites. Des canaux et transporteurs ioniques spécifiques assurent le maintien de concentrations optimales pour l'activité synaptique. La pompe sodium/potassium permet par exemple de conserver des concentrations élevées en sodium et des concentrations basses en potassium dans le cerveau par rapport à la circulation sanguine. Les taux de calcium et d'ion bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) sont également régulés par des canaux spécifiques afin de contrôler respectivement l'excitabilité neuronale et le pH (Hladky et al., 2016). L'apport des nutriments et des métabolites est lui aussi conditionné par l'expression de récepteurs ou de canaux à la surface des cellules endothéliales. Le glucose, principale source d'énergie du SNC, est par exemple importé par les canaux GLUT1 et les acides aminés par les canaux LAT1. D'autres molécules comme l'insuline peuvent être importées par transcytose (Abbott et al., 2006).

La deuxième fonction de la BHE est la régulation de la concentration en neurotransmetteurs. Ces derniers étant utilisés à la fois par le SNC et le système nerveux périphérique, la BHE assure le maintien de deux fractions distinctes afin qu'ils soient utilisés en même temps par les deux systèmes (Bernacki et al., 2008). La BHE protège également le SNC des fluctuations de concentrations en neurotransmetteur. Le sang contient par exemple une quantité de glutamate qui varie significativement selon la prise alimentaire et un transfert incontrôlé de ce neurotransmetteur excitateur dans le cerveau pourrait induire des effets neurotoxiques (Kadry et al., 2020).

La troisième fonction de la BHE est de limiter l'entrée dans le cerveau de macromolécules et de cellules présentes dans la circulation sanguine. En ce qui concerne les protéines plasmatiques circulantes telles que l'albumine, la prothrombine ou le plasminogène, leur entrée dans le cerveau peut initier des cascades de régulation cellulaires conduisant à des réactions gliales et à la mort cellulaire (Abbott et al., 2010). Il a récemment été montré que le vieillissement induisait une augmentation de leur transport dans le cerveau par transcytose (Senatorov et al., 2019; Yang et al., 2020 a). Ces résultats suggèrent que l'augmentation progressive de perméabilité de la BHE pourrait participer au développement de pathologies neurodégénératives. Dans le cas des cellules sanguines, la restriction de leur passage à travers la BHE a pour principale conséquence l'existence d'un

système immunitaire propre au SNC. En conditions physiologiques, les cellules immunitaires sont transférées dans le cerveau durant le développement embryonnaire et deviennent des cellules microgliales, spécialisées dans la réponse immunitaire du SNC. La migration contrôlée de cellules sanguines vers le SNC tout au long de la vie est un élément clé de la régulation immunitaire. Cependant lors des processus pathologiques à l'origine d'inflammation, les jonctions serrées entre les cellules endothéliales peuvent être dégradées. Cela induit l'entrée incontrôlée de cellules immunitaires circulantes vers le parenchyme cérébral qui peut être à l'origine de pathologies chroniques telles que la sclérose en plaques (Kadry et al., 2020).

La quatrième fonction de la BHE est la protection du SNC vis-à-vis des substances neurotoxiques endogènes ou exogènes circulant dans le sang. Cette fonction est assurée par les transporteurs ABC qui relarguent dans la circulation les molécules potentiellement toxiques qui entrent dans le cytoplasme des cellules endothéliales. Les péricytes et les pieds astrocytaires peuvent également contribuer à cette fonction lorsque la protection assurée par les cellules endothéliales est défectueuse (Kadry et al., 2020). Paradoxalement, ce mécanisme efficace pour éviter l'entrée de substances neurotoxiques constitue une limitation dans le développement d'agents thérapeutiques pour les pathologies impliquant le SNC. Une analyse de la base de données « *Comprehensive Medicinal Chemistry Database* » a montré que seulement 5% des molécules pharmaceutiques présentes sur le marché étaient capables de traverser la BHE. Cette limitation peut également être illustrée par le pourcentage de succès des essais cliniques pour les molécules thérapeutiques à destination du SNC qui est 12 fois inférieur aux autres molécules (Whelan et al., 2021).

Enfin, la BHE empêche l'entrée des virus dans le SNC afin de maintenir l'homéostasie et de prévenir l'entrée de molécules et cellules pro-inflammatoires. Les cellules endothéliales jouent un rôle essentiel dans cette fonction. En plus de former une structure étanche grâce aux jonctions serrées, elles expriment des protéines membranaires capables de reconnaître des motifs moléculaires exprimés par les virus. Cette interaction induit des cascades de signalisation activant des gènes antiviraux (Chen et al., 2021).

Dans le cadre de la thérapie génique, la BHE représente donc une contrainte majeure pour l'acheminement des vecteurs AAVs de la circulation vers le SNC. Comme pour les virus, le



transport paracellulaire est limité par les jonctions serrées et adhérentes. Ensuite, la diffusion à travers les membranes n'est pas possible à cause de leur taille trop importante (environ 25nm). Enfin, le transfert des vecteurs AAVs par transcytose est un mécanisme envisagé pour certains sérotypes naturels qui seront décrits par la suite mais leur efficacité de transduction reste très limitée (Liu et al., 2021 a). Cette imperméabilité de la BHE aux vecteurs viraux a des conséquences sur l'efficacité de la délivrance des gènes dans le SNC. Ceci représente un challenge qui reste d'actualité et qui a vu le développement de diverses approches expérimentales pour pallier à cette problématique. On peut les séparer en cinq catégories, chacune présentant des avantages et inconvénients qui sont détaillés dans les paragraphes suivants.

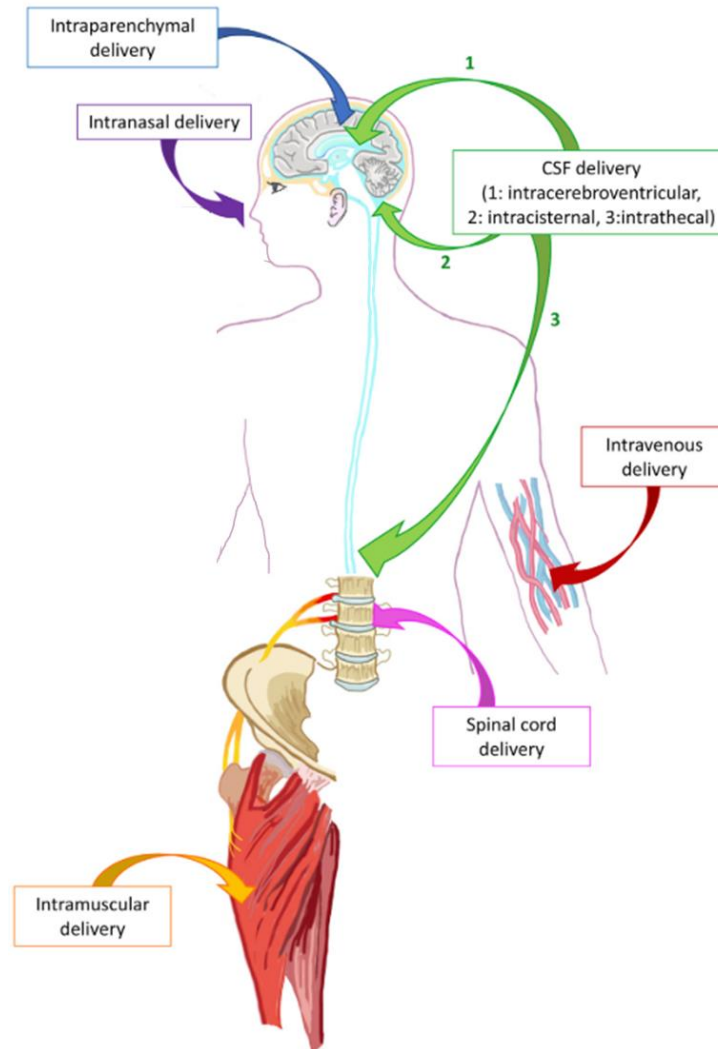
## II.2. Les stratégies permettant de pallier à l'imperméabilité de la BHE

### II.2.a. Les approches chirurgicales pour franchir mécaniquement la BHE

L'un des moyens permettant de délivrer un vecteur AAV dans le SNC est l'utilisation de voies d'injections différentes de la circulation sanguine.

L'injection stéréotaxique est la méthode la plus utilisée dans les études pré-cliniques et cliniques pour délivrer les vecteurs AAVs dans le parenchyme cérébral (**figure 9**) (Hudry & Vandenberghe, 2019). Cette méthode permet de concentrer le vecteur viral dans la zone ciblée afin de limiter sa dispersion et son éventuelle immunogénicité dans des régions qui ne nécessitent pas l'apport du transgène. Cet aspect pouvant être décrit comme un atout représente aussi la principale limitation de cette méthode d'injection. Il a en effet été estimé que les vecteurs AAVs peuvent diffuser dans le parenchyme cérébral à une distance d'environ 1 à 3mm du site d'injection (Saraiva et al., 2016). Cette distance peut ainsi convenir lorsque les défauts sont limités à une structure cérébrale de cette taille mais elle est insuffisante dans le cas où des régions plus grandes sont atteintes par la pathologie. A titre d'exemple, il faudrait une centaine de sites d'injection pour couvrir toute la surface du cerveau humain (Hinderer, Bell, et al., 2018). A cela viennent s'ajouter les risques engendrés par la procédure chirurgicale très invasive. L'accès au cerveau étant

limité par la boîte crânienne, cette méthode d'injection nécessite de perforer le crâne. En plus des potentielles infections virales ou bactériennes, cette procédure peut être à l'origine d'hémorragies ou d'œdème (Hudry et al., 2019).



**Figure 9 : Synthèse des principales voies d'injections des vecteurs AAVs.**

Ce schéma regroupe les différentes voies d'injections des vecteurs AAVs permettant de pallier à l'imperméabilité de la BHE. La voie intraveineuse est quant à elle limitée par la capacité des vecteurs viraux à traverser la BHE (adapté de Hudry & Vandenberghe, 2019).

Une deuxième méthode consiste à injecter les vecteurs viraux dans le LCR. Ce liquide biologique dans lequel baigne tout le SNC circule dans l'espace sous arachnoïdien et dans les cavités et ventricules du cerveau. Le LCR est séparé du tissu nerveux par une seule couche de cellules épendymaires qui est moins sélective que la BHE et n'empêche pas l'accès à de nombreux sérotypes (AAV1, 2, 4, 5, 8, 9, rh10) (Hudry & Vandenberghe, 2019). Les voies d'injections intracébroventriculaire (dans le ventricule cérébral), intrathécale

(sous l'arachnoïde) et intracisternale (dans la cisterna magna) sont les trois méthodes qui permettent d'atteindre le LCR (**figure 9**). Une étude menée chez le macaque montre que l'injection intracisternale permet une meilleure transduction du SNC que l'injection intrathécale (Hinderer et al., 2014). Cela peut représenter un challenge technique car les injections dans la cisterna magna sont très peu pratiquées en clinique contrairement à l'espace intrathécales qui est déjà ciblé en routine lors des ponctions lombaires (Hudry et al., 2019). Globalement, cette méthode d'injection permet aux vecteurs viraux de transduire le SNC sur de larges régions mais le pourcentage de cellules exprimant le transgène reste limité. Il a par exemple été estimé que l'injection intrathécale d'un vecteur AAV chez le primate transduisait seulement 2% des cellules SNC (Gray et al., 2013). Ce résultat peut être expliqué par le fait que les molécules injectées dans le LCR sont rapidement transférées dans la circulation sanguine (Pardridge, 2020). Des résultats thérapeutiques ont cependant été observés sur plusieurs modèles murins de mucopolysaccharidose après injection du vecteur viral dans le LCR (Wolf et al., 2011; Hinderer et al., 2016). Dans ces cas, il est suggéré que les vecteurs AAVs transduisent principalement les cellules épendymaires et que ces dernières agissent comme des machineries de production et de sécrétion des enzymes dans le tissu cérébral (Hudry et al., 2019). Il a été cependant démontré que l'expression du transgène diminue avec l'âge, probablement à cause du renouvellement des cellules épendymaires (Hocquemiller, Giersch, Audrain, Parker, & Cartier, 2016).

D'autres méthodes d'injections peuvent être envisagées dans le cas où le vecteur viral ou la protéine codée par ce vecteur peuvent être rétro-transportées à travers les circuits nerveux innervant la cible d'injection (**figure 9**). Sur ce principe, l'injection intranasale peut être envisagée pour cibler le cerveau dans le cas des maladies lysosomales, où l'enzyme thérapeutique peut être transportée par les nerfs trijumeaux et olfactifs innervant la cavité nasale (Wolf et al., 2012). L'injection intramusculaire peut également être un moyen d'atteindre à distance le SNC. Il a par exemple été montré que les vecteurs AAV de sérotypes 6 et 9 sont capables de transduire des motoneurons de la moelle épinière après une injection intramusculaire chez des rongeurs (Towne et al., 2010; Benkhelifa-Ziyyat et al., 2013).

La voie d'administration est donc un facteur critique dont le choix est conditionné par le

type de pathologie. Pour les maladies impliquant une grande partie du SNC ou les pathologies affectant le SNC ainsi que d'autres organes, les approches chirurgicales sont limitées par la faible diffusion du vecteur viral. Pour ce type de pathologies, l'injection intraveineuse est la méthode la moins invasive et celle permettant la diffusion du vecteur viral la plus large étant donné la large distribution du réseau vasculaire dans l'organisme. Cependant, pour cibler le SNC, cette voie d'injection est entièrement dépendante de la capacité des vecteurs viraux à traverser la BHE. Cette approche nécessite donc d'utiliser des moyens chimiques ou physiques pour perméabiliser transitoirement la BHE ou requière une modification de la capsidie des vecteurs viraux afin qu'ils soient transportés à travers les cellules endothéliales.

### II.2.b. Les stratégies pharmacologiques pour augmenter la perméabilité de la BHE

L'utilisation de molécules pharmacologiques permettant de perméabiliser transitoirement la BHE a été la première stratégie mise en place pour faire entrer des agents thérapeutiques dans le SNC. C'est au début des années 70 qu'il a été montré pour la première fois que l'injection d'une solution hyperosmotique permet le passage dans le cerveau de bleu Evans, un colorant qui en condition physiologique ne peut pas traverser la BHE (Rapoport et al., 1972). L'hyperosmolarité de la solution induit des échanges d'eau entre le parenchyme cérébral et la circulation sanguine ce qui conduit à une vasodilatation des vaisseaux. Ce phénomène induit un stress mécanique sur les jonctions serrées, facilitant le passage paracellulaire de molécules (Rapoport, 2000). Des solutions hyperosmotiques contenant de l'arabinose, de l'urée et plus largement du mannitol ont été utilisées pour perméabiliser la BHE et faire passer des agents thérapeutiques tels que des agents anticancéreux, des anticorps ou des vecteurs viraux (S. Hersh et al., 2016). Il a par exemple été montré que l'injection d'une solution de mannitol suivi de l'injection intraveineuse d'un vecteur AAV2 conduisait l'expression du transgène dans des neurones et des cellules gliales chez la souris (Fu et al., 2003). Plus tard, une étude a montré que cette approche pouvait ralentir la progression de la maladie dans un modèle murin de maladie lysosomale (McCarty et al., 2009).

Malgré ces résultats positifs, le pourcentage de tissu transduit par le vecteur viral est

faible et aléatoirement réparti dans le cerveau. Dans l'étude de Fu et ses collaborateurs, le tronc cérébral et le cervelet concentrent 50% des cellules transduites alors que d'autres régions ne présentent aucune expression du transgène (Fu et al., 2003). En plus des limitations dans l'efficacité de cette méthode, sa sécurité est également discutée. Il a été montré que la perturbation de l'homéostasie dans le cerveau pouvait provoquer des œdèmes potentiellement fatals (Rapoport, 2000). De plus, l'augmentation non sélective de la perméabilité de la BHE provoque l'entrée de molécules circulatoires potentiellement neurotoxiques telle que l'albumine (S. Hersh et al., 2016).

La translation en clinique de cette méthode est donc limitée par le manque de sécurité et de reproductibilité. Une stratégie alternative consiste à augmenter le passage transcellulaire des vecteurs AAVs afin qu'ils traversent la BHE sans agir sur son intégrité.

### II.2.c. L'utilisation de l'AAV9 capable de traverser la BHE

La découverte de l'AAV9 a permis de démontrer pour la première fois qu'un sérotype naturel d'AAVs a la capacité de traverser la BHE (Foust et al., 2009; Yang et al., 2014). Le processus exact de transport à travers la BHE n'est pas encore connu mais l'hypothèse principale repose sur un passage par transcytose ne nécessitant pas une modification de la perméabilité de la BHE (Merkel et al., 2017).

Bien que de nombreuses études mettent en avant la capacité de ce vecteur viral à traverser la BHE, il n'existe pas de consensus clair sur son efficacité de transduction (Duque et al., 2009; Foust et al., 2009; Gray et al., 2011). L'étude de Foust et ses collaborateurs a comparé l'efficacité de transduction d'un vecteur scAAV9 codant pour la GFP (pour « *green fluorescent protein* ») après une injection intraveineuse chez des souris en néonatal ou à l'âge adulte. Cette étude montre que l'injection en néonatale conduit à l'expression de la GFP en majorité dans les motoneurones de la moelle épinière et dans une moindre mesure dans les neurones (11 à 18% selon les régions) et les astrocytes du cerveau. L'injection du vecteur AAV9 chez l'adulte conduit à un profil d'expression différent car la GFP est exprimée presque uniquement dans les astrocytes du cerveau et de la moelle (Foust et al., 2009). Par la suite, une étude réalisée par Duque et ses collaborateurs a mis en évidence des résultats contradictoires car l'injection du vecteur

viral chez des souris à l'âge adulte a permis la transduction des motoneurones (entre 2% et 28% selon les animaux) (Duque et al., 2009). Les résultats obtenus lors de cette étude ont été confirmés par Gray et ses collaborateurs après l'injection du vecteur viral chez des souris adultes. En plus des motoneurones, cette étude montre que le transgène est détecté dans des neurones et dans des astrocytes du cerveau. Le pourcentage de cellules transduites n'a pas été évalué mais les coupes histologiques montrent que celui-ci est toutefois relativement faible (Gray et al., 2011). En conclusion, bien que les études publiées dans la littérature n'exposent pas un consensus strict, toutes s'accordent sur deux points, les vecteurs AAV9 ciblent principalement les cellules de la moelle épinière et l'efficacité de transduction diminue avec l'âge. Ce phénomène n'est pas encore totalement expliqué mais l'hypothèse principale implique le degré de maturité de la BHE. En effet, bien que la BHE soit déjà fonctionnelle chez les nouveaux nés, la quantité de neurones entourant les cellules endothéliales est supérieure à celle des cellules gliales. Ainsi, c'est au cours de la maturation de la BHE que l'augmentation du nombre de pieds astrocytaires ajoute un niveau d'imperméabilité pour les vecteurs viraux (Saraiva et al., 2016; Saunders et al., 2016). Cela pourrait également expliquer le changement de tropisme cellulaire avec l'âge décrit dans l'étude de Foust et ses collaborateurs. En effet, un passage des vecteurs viraux par transcytose à travers les cellules endothéliales favoriserait la transduction des cellules les plus proches. L'utilisation de ces vecteurs viraux dans des études pré-cliniques et cliniques est donc orientée vers les pathologies de la moelle épinière pour lesquelles un diagnostic précoce est possible comme par exemple l'amyotrophie spinale (Foust et al., 2010; Valori et al., 2010; Mendell et al., 2017).

Dans ce contexte, la fenêtre thérapeutique durant laquelle l'injection du vecteur virale permet la meilleure transduction du SNC est limitée aux premiers jours de vie (P0, P1) (Saraiva et al., 2016). Les études pré-cliniques ne sont pas limitées par ce facteur car les modèles animaux peuvent être traités dès la naissance. Par contre, cela n'est pas systématiquement possible chez l'humain dans les cas où la pathologie ne se manifeste pas à la naissance. De plus, le génome de l'AAV reste sous forme épisomale et les divisions cellulaires durant le développement induisent une perte d'expression du transgène. Cette limitation est secondaire pour les pathologies impliquant uniquement le SNC car la grande majorité des cellules sont post-mitotiques, mais elle doit être considérée pour les

pathologies qui affectent d'autres organes présentant une forte capacité de prolifération tels que le l'intestin ou le foie.

Une seconde limitation concerne le type de vecteur AAV utilisé. Une étude montre que les vecteurs ssAAV transduisent seulement 2% des cellules après une injection intraveineuse chez des souris en néonatale (Miyake et al., 2011). Les vecteurs scAAV utilisés dans les études décrites précédemment sont donc plus efficaces mais leur capacité d'empaquetage est réduite de moitié (2,2kb) par rapport à un vecteur AAV simple brin. Cette taille peut être insuffisante pour certains transgènes.

Enfin, il existe une corrélation positive entre la dose de vecteur viral injectée et le pourcentage du tissu transduit (Samaranch et al., 2011). Or, les doses permettant d'obtenir les meilleurs pourcentages de transduction sont proches de celles pour lesquelles il a été mis en évidence des effets hépatotoxiques et la dégénérescence de neurones sensoriels (Hinderer et al., 2018).

La découverte de ce sérotype a permis de mettre en évidence que l'injection intraveineuse d'un vecteur AAV pouvait participer au développement de thérapies géniques pour les pathologies impliquant le SNC. Il est cependant nécessaire de trouver des méthodes permettant d'améliorer le passage des vecteurs viraux à travers la BHE à des doses plus faibles et quel que soit l'âge du sujet. Pour cela, des modifications de la capsid des vecteurs AAVs permettent d'induire une interaction avec un récepteur exprimé par les cellules endothéliales afin d'augmenter leur transfert de la circulation sanguine vers le SNC.

#### II.2.d. Les modifications de la capsid des vecteurs AAV

La nécessité d'améliorer l'efficacité de transduction dans le SNC a introduit un nouvel axe de recherche dans le domaine des vecteurs AAVs, l'ingénierie de la capsid (Lee et al., 2018 b). Les deux principales approches utilisées sont le design rationnel et l'évolution dirigée.

Le design rationnel consiste à augmenter le contrôle et la prédictibilité du comportement des vecteurs AAVs dans l'organisme. Cette approche utilise les connaissances déjà

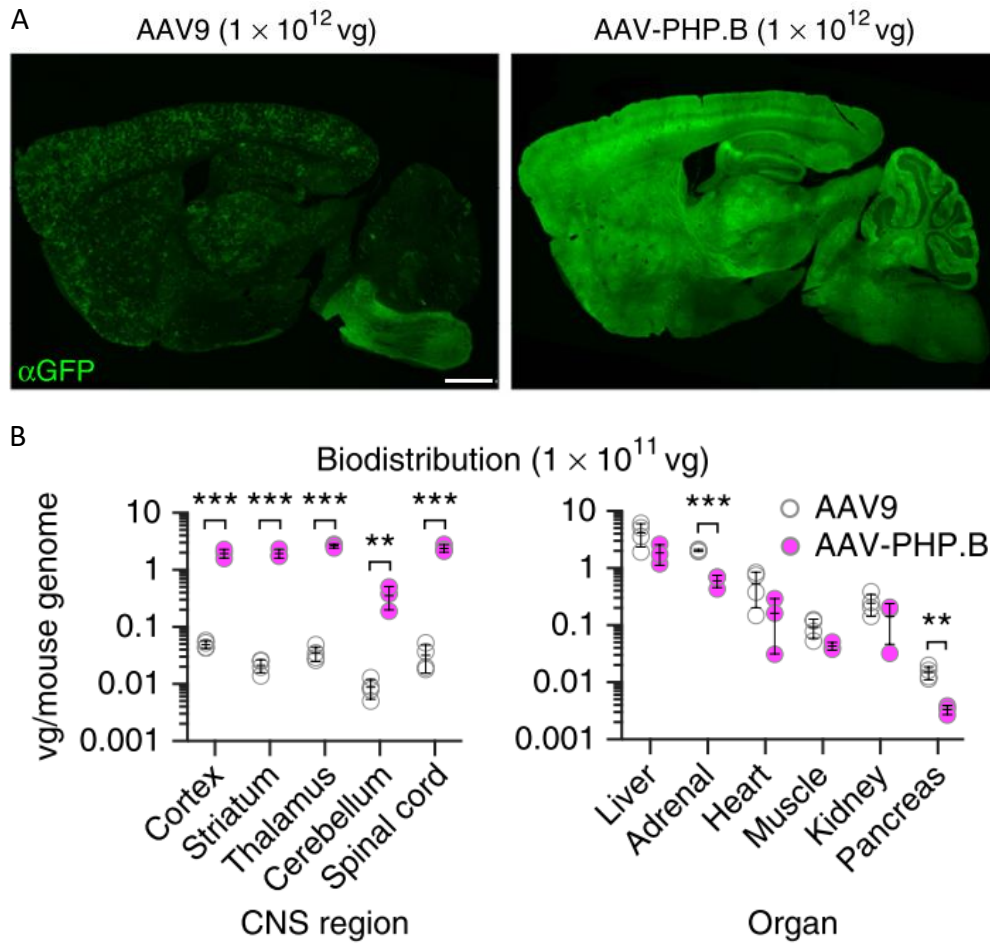
acquises sur la biologie des vecteurs viraux afin d'optimiser leur capsid dans un but déterminé. Le passage de la BHE est donc une des fonctions qui cherchent à être optimisées par le design rationnel. Pour cela, deux stratégies sont utilisées, appliquer une ou plusieurs mutations ponctuelles sur la séquence du gène *cap* ou ajouter une séquence plasmidique non virale d'intérêt (Lee et al., 2018 b). Le but de cette approche est d'améliorer les interactions connues avec des récepteurs présents sur les cellules cibles afin d'augmenter l'internalisation et le transfert des vecteurs viraux par transcytose. Une étude a par exemple utilisé cette approche en modifiant un vecteur AAV2 par ajout d'une séquence codant pour une protéine capable de se lier aux cellules endothéliales du cerveau. Après injection intraveineuse chez des souris adultes, le tropisme du vecteur AAV2 était redirigé vers les cellules endothéliales au détriment des cellules hépatiques (Chen et al., 2009). Le design rationnel est une méthode fiable mais elle est limitée par les connaissances encore insuffisantes sur les mécanismes d'interactions et de transport des vecteurs AAVs à travers la BHE (Wang et al., 2019 b).

La deuxième approche utilisée pour modifier les capsides des vecteurs AAVs est l'évolution dirigée. Contrairement au design rationnel, elle ne nécessite pas de connaissances préalables sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le fonctionnement des vecteurs viraux. Elle consiste à simuler de façon accélérée l'évolution naturelle des capsides. Deux approches sont utilisées, effectuer une multitude de mutations ponctuelles sur la capsid ou croiser de façon aléatoire les séquences des capsides des différents sérotypes. Cette méthode est aussi utilisée pour insérer des séquences peptidiques aléatoires très courtes dans la séquence de la capsid des AAVs (Müller et al., 2003). Les variants peuvent être ensuite criblés *in vivo* afin d'évaluer leur capacité de transduction du SNC. Sur la base de cette stratégie, des variants capables de traverser la BHE avec une meilleure efficacité que les vecteurs AAV9 ont été développés. Parmi ces variants, le vecteur AAV2-BR1 présente un très haut degré de spécificité pour le SNC avec une transduction efficace de l'endothélium vasculaire du cerveau, de la moelle épinière et de la rétine après injection intraveineuse chez la souris adulte. Cependant le niveau de transduction des neurones reste très faible (Körbelin et al., 2016). Contrairement à ce dernier, le vecteur AAV-AS dérivé du vecteur AAV9 présente un meilleur niveau de transduction neuronal mais l'expression du transgène est limitée au



striatum et au cortex (Choudhury et al., 2016). Peu d'applications ont découlé de ces deux vecteurs viraux car le vecteur AAV-PHP.B, développé la même année, a permis une meilleure efficacité de transduction dans tout le SNC (Deverman et al., 2016) (**Figure 10**). Le développement de ce vecteur viral a été réalisé par évolution dirigée de la capsid du vecteur AAV9. Une librairie de fragments de 7 acides aminés de séquence aléatoire a été générée puis insérée dans la séquence *cap* de l'AAV9. Une séquence polyadénylée, flanquée par deux sites lox a également été ajoutée à la séquence *cap*. Pour sélectionner les vecteurs AAV capables de traverser la BHE, les différents variants générés ont été injectés par voie intraveineuse chez des souris exprimant l'enzyme Cre Recombinase sous le contrôle d'un promoteur astrocytaire (GFAP). Une semaine après l'injection, l'ADN a été isolé à partir du cerveau et de la moelle épinière. Les séquences ayant été recombinées par la Cre Recombinase ont été identifiées par PCR et 13 variants ont été conservés. Un second cycle de sélection a été effectué et a permis d'identifier le vecteur AAV.PHP.B qui possédait la meilleure efficacité de transduction du SNC. Pour évaluer plus précisément son tropisme dans le SNC, un vecteur AAV-PHP.B exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CAG (pour « *CMV- $\beta$ -Actin-intron- $\beta$ -Globin* ») a été injecté par voie intraveineuse chez des souris adultes. Les animaux ont été sacrifiés trois semaines après l'injection afin d'évaluer le niveau d'expression de la GFP. Les résultats ont montré que le transgène était exprimé de façon homogène dans tous le SNC avec une efficacité entre 40 et 60 fois supérieure à l'AAV9 selon les régions (**Figure 10A**). L'étude du phénotype des cellules du SNC transduites par le vecteur viral a démontré que le transgène est exprimé à la fois dans les neurones et les astrocytes. Enfin, le niveau de transduction des organes périphériques est comparable à celui du vecteur AAV9 pour le foie, le cœur, les muscles et les reins (**Figure 10B**).

Dans le but d'optimiser la transduction cérébrale, le vecteur AAV-PHP.B a été modifié par la même approche en échangeant aléatoirement des acides aminés de l'heptamère inséré dans sa capsid (Chan et al., 2017). Cette stratégie a permis de générer le variant AAV-PHP.eB possédant une meilleure efficacité de transduction neuronale. L'injection intraveineuse chez la souris adulte d'un vecteur AAV-PHP.eB codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur CAG induit une expression du transgène dans 70% à 80% des neurones dans le cortex le striatum et le cervelet. Le taux de transduction des astrocytes est comparable avec le vecteur AAV-PHP.B (*i.e.* 40% à 70% selon les régions).



**Figure 10 : Comparaison des vecteurs AAV9 et AAV-PHP.B.**

*A : Comparaison du niveau d'expression de la GFP dans le cerveau, 3 semaines après injection intraveineuse de la même dose de vecteur AAV9 ou AAV-PHP.B chez des souris adultes. B : Biodistribution des vecteurs AAV (sérotypé 9 en blanc ou variant PHP.B en rose) dans les zones du CNS sélectionnées (à gauche) et dans les autres organes (à droite) 25 jours après injection intraveineuse chez des souris adultes (Deverman et al., 2016).*

L'analyse de l'expression du transgène dans le foie et du cœur montre que le vecteur AAV-PHP.eB est toutefois moins efficace que le vecteur AAV9 pour transduire ces deux organes (Mathiesen et al., 2020). Ces deux vecteurs AAV ont été les premiers à atteindre un tel niveau de transduction du SNC. Etant donné leur tropisme respectif, l'étendue de la maladie conditionne le choix du vecteur viral. Dans les cas où l'expression du gène doit être restaurée dans tout l'organisme, le vecteur AAV-PHP.B serait à privilégier. Si la pathologie affecte uniquement le SNC, l'utilisation du vecteur AAV-PHP.eB serait plus pertinente.

Une contrainte du développement de nouvelles capsides par évolution dirigée est que les

propriétés du vecteur viral peuvent être limitées à certaines espèces, voire même présenter des différences au sein d'une même espèce. Suite à la découverte des vecteurs AAV-PHP.B et AAV-PHP.eB, des études ont montré que l'efficacité d'expression du transgène dans le SNC était différente selon le fond génétique des souris étudiées (Hordeaux et al., 2018; Challis et al., 2019; Matsuzaki et al., 2019). Ainsi, plusieurs études ont identifié la glycoprotéine LY6A, présente à la surface des cellules endothéliales, comme le récepteur nécessaire à l'entrée des vecteurs AAV-PHP.B et AAV-PHP.eB (Batista et al., 2019; Hordeaux et al., 2019; Huang et al., 2019). Cette protéine est exprimée par seulement la moitié des souches de souris utilisées en laboratoire dont les souris C57BL/6 sur lesquelles ont été développés ces deux vecteurs viraux (Mathiesen et al., 2020). De plus, il n'existe pas d'homologue de la protéine LY6A chez les primates. Cela explique la transduction limitée de ces vecteurs viraux dans le SNC chez ces animaux et suggère qu'il n'est donc pas possible de les utiliser en clinique (Hordeaux et al., 2018; Matsuzaki et al., 2018).

Grâce à l'ingénierie de la capsid, des vecteurs viraux permettant de transduire le SNC après une injection intraveineuse sans perturber l'homéostasie de la BHE ont donc été développés. Les vecteurs AAV-PHP.B et AAV-PHP.eB sont des outils intéressants pour des applications pré-cliniques dans le but d'apporter des preuves de concept de l'efficacité d'une thérapie génique. Pour l'instant, les stratégies d'évolution dirigée n'ont pas encore permis d'identifier de vecteurs viraux capables de transduire le SNC avec la même efficacité que les vecteurs AAV-PHP.B et AAV-PHP.eB et dont l'utilisation serait possible en clinique. Ainsi, il est nécessaire de trouver d'autres moyens pour délivrer les vecteurs viraux dans le cerveau avec les outils disponibles actuellement.

### II.2.e. Les ultrasons focalisés: principe et applications

En pratique, les ultrasons sont des ondes qui une fois en contact avec le tissu vont alterner entre des phases de haute pression (compression) ou de basse pression (raréfaction). L'application d'ultrasons focalisés (USF) sur la boîte crânienne est une méthode utilisée pour sa capacité de lésion des tissus cérébraux depuis les années 1950 (Bakay et al., 1956). Cependant, c'est dans les années 1990 que les tirs ultrasonores ont été plus largement développés. L'application des USF a été mieux maîtrisée grâce au suivi en IRM puis rendu

non invasive par un dispositif expérimental ne nécessitant pas la trépanation du crâne comme c'était le cas auparavant (Hynynen et al., 1996, 1998). Cette méthode consiste à focaliser un faisceau d'ultrasons sur une zone précise de quelques millimètres afin de concentrer leur effet. Leurs paramètres d'applications déterminent le type d'utilisation. Ils sont délivrés en continu, à haute fréquence et haute intensité pour les procédures qui visent à induire une lésion par élévation de la température tissulaire (Elias et al., 2016). Lorsque l'objectif est de perméabiliser la BHE, les ultrasons sont pulsés et délivrés avec une fréquence et une amplitude faible. De plus l'application des ultrasons est réalisée en combinaison avec l'injection de microbulles dans la circulation sanguine (Huang et al., 2012). Ces paramètres induisent une augmentation des effets mécaniques sur le tissu tout en limitant l'élévation de la température (Ahmed et al., 2021).

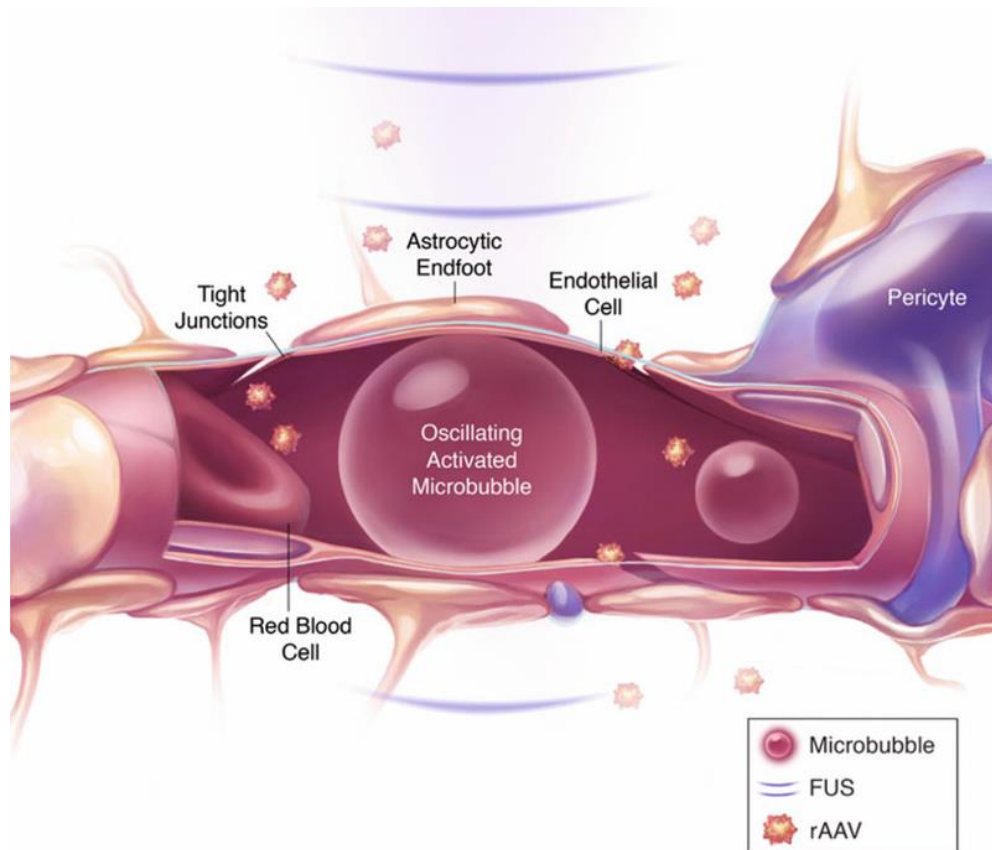
Lors des premières études pré-cliniques de perméabilisation de la BHE par les USF, ceux-ci étaient appliqués seuls, à une amplitude et une fréquence élevée mais nécessaire pour produire un effet significatif. Cela conduisait à des effets secondaires importants tels que des lésions tissulaires et des hémorragies, pouvant induire la mort des animaux (Vykhodtseva et al., 1995). Une perméabilisation plus contrôlée et n'induisant pas de dommages tissulaires a ensuite été obtenue grâce à la combinaison de l'application des USF avec l'injection intraveineuse de microbulles de quelques micromètres de diamètre (Hynynen et al., 2001). Ces sphères lipidiques ou protéiques contenant un gaz inerte, le plus souvent du perfluorocarbène, permettent de diminuer l'amplitude et la fréquence des USF, limitant ainsi l'augmentation de la température du crâne et des tissus (Timbie et al., 2015). Les microbulles sont injectées dans la circulation sanguine puis elles atteignent les vaisseaux sanguins situés sous le transducteur qui délivre les ultrasons. Les microbulles vont ainsi osciller sous l'effet de l'alternance des phénomènes de contraction et de raréfaction (**Figure 11**). La faible amplitude des ultrasons permet d'éviter la dégradation des bulles en les maintenant dans un état appelé cavitation stable. Les oscillations des bulles sont transmises aux cellules endothéliales environnantes provoquant un stress mécanique, des modifications du cytosquelette et des interactions intercellulaires. Ces phénomènes vont augmenter la perméabilité de la BHE par trois mécanismes. Le premier est la rupture transitoire des jonctions serrées, favorisant le transport paracellulaire. Une étude par microscopie électronique a montré que les protéines formant ces jonctions sont

dégradées sous l'effet des USF associés aux microbulles. La restauration de l'intégrité de la BHE a lieu en 1 à 2h après l'application des USF et aucun passage paracellulaire n'est détecté après 4h (Sheikov et al., 2008). Le deuxième mécanisme est l'augmentation de la transcytose. Il a été montré que ce processus contribue au moins pour moitié au transport de molécules à travers la BHE (Meijering et al., 2009). Une étude a ensuite montré que c'est l'augmentation de la quantité de cavéoline 1 suite à l'application des USF qui était à l'origine, au moins en partie, de l'augmentation du transport par transcytose (Deng et al., 2012). Enfin, une autre forme de transcytose appelée sonoporation a également été mise en évidence. Des pores et des fenestrations transitoires sont formés dans la membrane des cellules endothéliales facilitant le passage de la lumière des vaisseaux vers le tissu (Sheikov et al., 2004).

Les paramètres biophysiques d'USF permettant d'augmenter la perméabilité de la BHE sans induire de dommages tissulaires ont été établis, chez les rongeurs, les primates et l'homme (McDannold et al., 2012; Lipsman et al., 2018; Noroozian et al., 2019). Ils constituent donc un outil unique pour faire passer des agents thérapeutiques de la circulation sanguine vers le cerveau.

L'augmentation de perméabilité de la BHE par combinaison des USF et des microbulles pour faciliter le passage d'ADN dans le cerveau a déjà été réalisé dans plusieurs études. Le matériel génétique peut être délivré sous différentes formes : des plasmides conjugués avec les microbulles (Huang et al., 2012; Lin et al., 2015), de l'ADN encapsidé dans des nanoparticules recouvertes de polyéthylène glycol (Mead et al., 2016) ou dans des vecteurs viraux (Thévenot et al., 2012; Stavarache et al., 2019). L'ouverture de la BHE par les USF permet d'obtenir une transduction efficace du SNC chez la souris adulte avec des faibles doses de vecteur AAV9 (Noroozian et al., 2019). L'utilisation d'un promoteur ubiquitaire permet de transduire avec la même efficacité les neurones et les astrocytes (Thévenot et al., 2012). Le pourcentage de neurones transduit est par exemple estimé entre 50% et 74% selon les régions (Stavarache et al., 2019). En comparaison, l'étude de Foust et ses collaborateurs évaluait le pourcentage de transduction neuronal à 15% avec des doses de vecteur viraux 100 fois supérieures et une injection intraveineuse pendant la période néonatale (Foust et al., 2009). L'aspect focalisé des ultrasons est approprié pour

perméabiliser la BHE de manière ciblée dans le cas des pathologies qui affectent une région précise du cerveau.



**Figure 11: Mécanisme d'augmentation de la perméabilité de la BHE par l'application d'ultrasons focalisés combinée à l'injection de microbulles dans la circulation sanguine.**

*Après une injection intraveineuse, les microbulles se retrouvant dans le champ des ultrasons oscillent, provoquant un stress mécanique sur les cellules endothéliales des capillaires. Ce mécanisme augmente transitoirement et de façon réversible la perméabilité de la BHE, permettant le passage d'agent thérapeutique dans le cerveau (Noroozian et al., 2019).*

Dans le but de perméabiliser la BHE sur un volume plus grand, des études ont montré qu'il est possible d'effectuer plusieurs tirs ultrasonores (McDannold et al., 2012; Thévenot et al., 2012).

Le principal défi de la thérapie génique pour les pathologies affectant le SNC concerne l'acheminement du matériel génétique. Le développement de nouvelles capsides et la compréhension des mécanismes biologiques à l'origine de leur propriété sont des facteurs déterminant pour le développement de nouveaux vecteurs AAVs capables de traverser la BHE. Cependant, l'utilisation des vecteurs viraux développés ces dernières années est encore limitée à la démonstration de preuve de concept sur des modèles murins. Ainsi,

l'utilisation des USF pour perméabiliser transitoirement la BHE est une méthode efficace pour délivrer des vecteurs AAVs dans le SNC sans modifier leur capsid. La démonstration de l'efficacité thérapeutique et de la sécurité de cette approche pourrait permettre une transposition plus directe en clinique.

La recherche et l'optimisation des stratégies visant à contourner la BHE sont des étapes indispensables. Elles permettront d'apporter de nouvelles solutions thérapeutiques pour les pathologies génétiques affectant le SNC comme dans le cas des maladies mitochondriales.

### III. La mitochondrie et les maladies mitochondriales

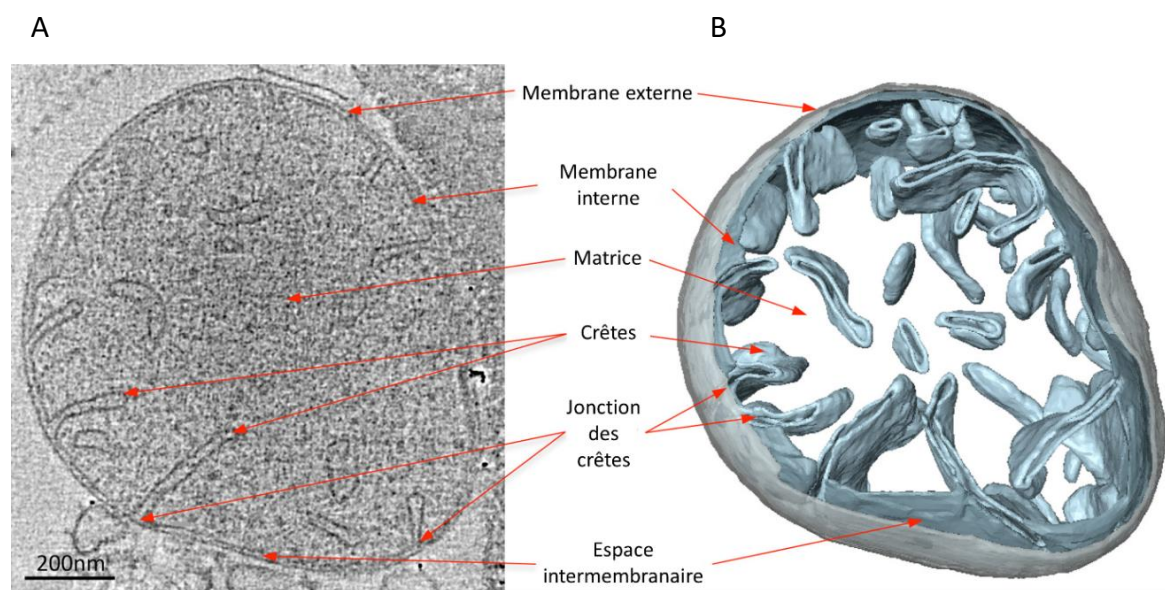
#### III.1. La biologie de la mitochondrie

##### III.1.a. L'origine et la structure des mitochondries

C'est en 1967 que le Dr L. Margulis, met en évidence des similitudes entre certains procaryotes et les mitochondries (Margulis, 1967). Selon sa théorie, basée sur des données biochimiques et cytologiques, une cellule procaryote (ou protomitochondrion) aurait été assimilée par une cellule procaryote de taille supérieure. L'augmentation de l'oxygène atmosphérique il y a environ 2 milliards d'années aurait obligé les cellules procaryotes anaérobies à intégrer dans leur cytoplasme les protomitochondrions aérobies afin de neutraliser l'oxygène. Le contexte précis et la nature de cette symbiose sont toujours débattus (Roger et al., 2017). L'endosymbiote a progressivement perdu son autonomie pour devenir un organite spécialisé dans la production d'ATP par respiration aérobie et a été impliqué dans plusieurs voies métaboliques. Cette transition a impliqué plusieurs changements au cours de l'évolution. Tout d'abord, un système d'import des protéines dans la mitochondrie a été mis en place. Deuxièmement, une grande partie de ces gènes ont été transférés vers le noyau de la cellule hôte. Ensuite, des voies biochimiques entre l'hôte et le symbiote ont été développées et un système de division de l'organite coordonné avec le cycle cellulaire de l'hôte a été mis en place. Enfin, la structure et l'enveloppe du symbiote ont été modifiés afin de développer des contacts

avec le système endomembranaire et le cytosquelette de la cellule hôte (Roger et al., 2017). Ces changements ont finalement conduit à l'émergence d'organismes eucaryotes dont 20% du cytoplasme est occupé par des mitochondries (Alberts et al., 2015).

Les mitochondries sont des organites intracellulaires d'environ 0,5 à 1 $\mu$ M de diamètre. Cette taille est suffisante pour être visualisée en microscopie optique ce qui a permis de les identifier au 19<sup>ème</sup> siècle. Il aura cependant fallu attendre la microscopie électronique pour les décrire avec plus de précision. Les mitochondries possèdent une membrane externe et une membrane interne. Ces deux membranes ont des fonctions et structures différentes (**Figure 12**). La membrane interne entoure la matrice mitochondriale, partie dans laquelle on trouve le génome et la majorité des protéines mitochondriales. La membrane interne forme des invaginations tubulaires dans de la matrice appelées crêtes mitochondriales. C'est sur ces crêtes que l'on trouve les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale.



**Figure 12 : Structure de la mitochondrie**

*A : Observation cryo-tomographique d'une mitochondrie isolée à partir de Saccharomyces cerevisiae. B : Morphologie de la mitochondrie reconstruite en 3D. La partie grise correspond à la membrane externe et la partie bleue à la membrane interne et ses replis qui forment les crêtes. (Adapté de Davis et al., 2014)*

La zone située entre la membrane interne et la membrane externe est l'espace intermembranaire. Il mesure 30 à 40 nm de largeur et apparaît plus clair en microscopie électronique car on y trouve peu de protéines. Enfin, la membrane externe sépare



l'espace intermembranaire du cytoplasme. Cette dernière est bien plus perméable que la membrane interne car elle possède un nombre important de porines. Cette classe de protéines membranaires crée des voies de passage à travers la membrane permettant l'échange d'ions et de molécules inférieures à 5kDa. L'espace intermembranaire a donc la même composition ionique que le cytoplasme et il n'y a pas de gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane externe (Alberts et al., 2015). La mitochondrie est capable d'interagir avec d'autres compartiments membranaires cellulaires comme le réticulum endoplasmique afin de faciliter l'échange lipidique, la signalisation calcique ou le contrôle de l'apoptose (Hayashi et al., 2009).

### III.1.b. La génétique mitochondriale

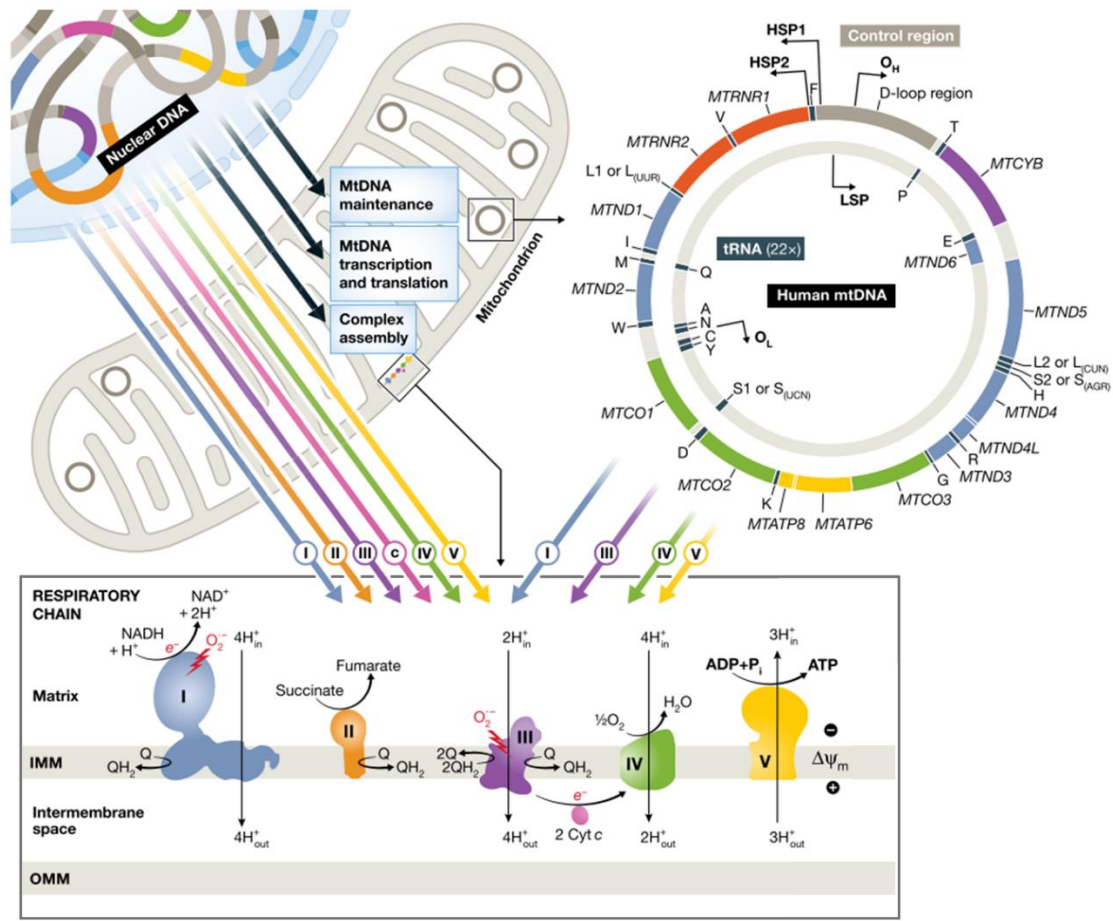
Les mitochondries possèdent un double contrôle génétique. Une partie des protéines sont encodées par des gènes présents sur l'ADN mitochondrial et l'autre partie par des gènes contenus dans l'ADN nucléaire.

L'ADN mitochondrial est transmis maternellement, sauf dans de très rares cas où la transmission peut être biparentale (Luo et al., 2018). C'est un ADN double brin, circulaire et composé chez l'humain de 16 569 paires de base. Un brin lourd et un brin léger sont différenciés par leur composition en base G et C. Le brin lourd (brin extérieur sur la **figure 13**) contient les gènes codant pour 2 ARNr, 14 ARNt et 12 protéines constituant des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. La chaîne légère contient les gènes de 8 ARNt et d'une protéine de la chaîne respiratoire (brin intérieur sur la **figure 13**). L'ADN mitochondrial est répliqué en continu par le complexe de la polymérase  $\gamma$  dont toutes les sous-unités sont codées par l'ADN nucléaire.

La transcription des 2 brins est indépendante. La partie non codante du génome mitochondrial contient une D-loop (*boucle de déplacement*) dans laquelle on trouve trois promoteurs. Deux promoteurs sont impliqués dans la transcription du brin lourd et le troisième permet celle du brin léger. Dans un premier temps, les facteurs de transcription se lient en amont du site d'initiation. Ensuite, ces facteurs recrutent l'ARN polymérase mitochondriale. Enfin, un facteur d'élongation rejoint le complexe pour améliorer l'efficacité de transcription. Sur le transcrit polycistronique, les ARNt bordent les ARNr et

presque tous ARNm codant pour les protéines. Ainsi, l'excision des ARNt par les RNases permet de libérer les ARNr et ARNm mitochondriaux (Barshad et al., 2018).

Pour la traduction des protéines mitochondriales, les acides aminés sont ajoutés aux ARNt correspondant par les aminoacyl-ARNt-synthétases, codées par l'ADN nucléaire. Les mitoribosomes sont constitués des ARNr mitochondriaux et de 80 protéines codées par l'ADN nucléaire.



**Figure 13 : Schéma de la mitochondrie, son double contrôle génétique et les complexes de la chaîne respiratoire.**

L'ADN mitochondrial est schématisé en haut à droite. Les protéines qui ne sont pas encodées par ce dernier sont synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans la matrice (flèches noires). Sur les crêtes, on trouve les complexes protéiques de la chaîne respiratoire (partie basse du schéma). Les flèches colorées représentent l'implication de chaque ADN dans la synthèse des protéines de la chaîne respiratoire (adapté de Chinnery et al., 2015).

La traduction est ensuite entièrement dépendante de facteurs codés par l'ADN nucléaire. A la fin de la traduction, des facteurs de terminaison possédant une activité d'hydrolyse libèrent le peptide synthétisé dans la matrice mitochondriale (D'Souza et al., 2018).

Une cellule diploïde humaine contient entre 1000 et 10 000 copies d'ADN mitochondrial, en fonction du type cellulaire et de l'environnement. L'exercice est par exemple un moyen d'augmenter ce nombre dans les cellules musculaires. (Stewart et al., 2020). Parmi ces copies, toutes ne présentent pas le même génome. Il existe donc un mélange d'ADN mitochondrial normal et muté au sein d'une même cellule créant une hétéroplasmie mitochondriale. Cette hétérogénéité varie d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe à un autre créant un deuxième niveau d'hétéroplasmie. Deux mécanismes sont à l'origine de l'hétéroplasmie. Des mutations transmises maternellement peuvent s'accumuler dans les cellules post-mitotiques ou être perdues dans les cellules prolifératives. D'autres mutations peuvent apparaître spontanément avec une fréquence d'apparition de 100 à 1000 fois supérieure à l'ADN nucléaire (Nissanka et al., 2020). Le niveau d'hétéroplasmie correspond au pourcentage d'ADN mitochondrial possédant une mutation spécifique par rapport à l'ADN mitochondrial total. Il existe un seuil au-delà duquel la mutation conduit à des défauts de fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Un phénotype pathologique est généralement observable pour un niveau d'hétéroplasmie entre 60 et 90 %, dépendamment de la mutation, du gène concerné et du type cellulaire ou tissulaire (Nissanka et al., 2020). L'hétéroplasmie est un phénomène dynamique tout au long de la vie qui varie en fonction des mécanismes de réplication, réparation ou dégradation du génome des mitochondries (van den Aemeele et al., 2020).

Pour les protéines mitochondriales encodées par l'ADN nucléaire, plus de 1100 gènes sont impliqués (Calvo et al., 2016). Parmi ces protéines, environ 150 sont directement impliquées dans le processus de phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP. Les autres sont nécessaires à l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire, à la maintenance et l'expression de l'ADN mitochondrial et à la dynamique mitochondriale (**figure 13**) (Craven et al., 2017). Les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme à proximité des mitochondries dans lesquelles elles sont ensuite importées. Les séquences d'adressage des protéines sont reconnues par les translocases de la famille TOMM (pour « translocase of outer mitochondrial membrane ») situées sur la membrane externe. Les protéines sont ensuite triées en fonction du compartiment mitochondrial auquel elles sont adressées selon de leur signal d'import (Dudek et al., 2013).

### III.1.c. Les principales fonctions de la mitochondrie dans la cellule

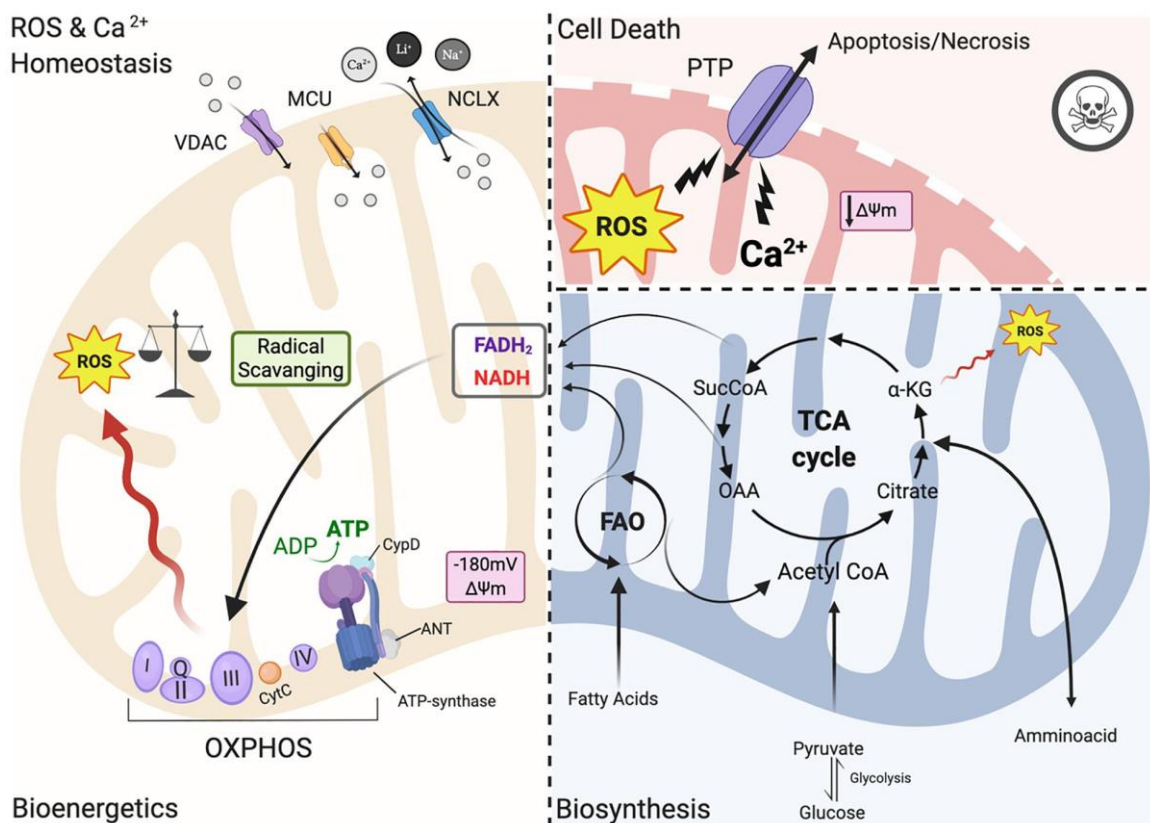
La mitochondrie est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que : la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative, la signalisation calcique, la mort cellulaire programmée et la régulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces fonctions sont résumées dans la **figure 14**

La synthèse d'ATP est la fonction majeure des mitochondries. Elle est réalisée grâce au processus de phosphorylation oxydative qui implique la chaîne respiratoire mitochondriale. Son fonctionnement dépend de la présence de coenzymes réduites, le NADH et le FADH<sub>2</sub> qui sont produits lors du cycle de Krebs. Cette voie métabolique également appelée cycle de l'acide citrique ou cycle tricarboxylique est présente chez toutes les cellules aérobies et a lieu dans la matrice mitochondriale (**figure 14**). Au total, un cycle produit trois molécules de NADH, une molécule de FADH<sub>2</sub> et une molécule de GTP qui peut transférer son phosphate à une molécule d'ADP afin de synthétiser une molécule d'ATP. (Mason et al., 2011).

L'étape suivante met en jeu la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette dernière est constituée de quatre complexes protéiques, deux transporteurs d'électrons et de l'ATP synthase, tous situés sur la membrane interne de la mitochondrie (**figure 13 et 14**).

Le complexe I ou NADH-Coenzyme Q oxydoréductase est composé de 45 sous unités, 7 sont codées par l'ADN mitochondrial et 38 par l'ADN nucléaire (Sharma et al., 2009). Ce complexe catalyse l'oxydation du NADH issu du cycle de Krebs en NAD<sup>+</sup>. Les électrons libérés lors de cette réaction sont ensuite transférés à l'ubiquinone. Cette réaction induit le pompage de 4 protons dans l'espace intermembranaire (Kampjut et al., 2020). Le complexe II ou succinate-CoenzymeQ réductase est composé de 4 sous unités encodées par l'ADN nucléaire. Dans les sous-unité catalytiques, le FADH<sub>2</sub> produit lors du cycle de Krebs est oxydé en FAD fournissant 2 électrons. Ces électrons sont ensuite transférés à l'ubiquinone (Rutter et al., 2010). L'ubiquinone ou CoenzymeQ (CoQ ou CoQ<sub>10</sub> pour la forme humaine) est situé au milieu de la bicouche lipidique de la membrane interne. Cette molécule transfère les électrons à partir du complexe I et II vers le complexe III (ou coenzymeQ-Cytochrome c réductase) (Alcázar-Fabra et al., 2016). Le complexe III (ou

coenzyme Q-cytochrome c réductase) est constitué de deux monomères identiques. Chaque monomère possède 11 sous unités dont 3 formant le centre catalytique (Fernández-Vizarra et al., 2015). L'ubiquinol, la forme réduite de l'ubiquinone provenant du complexe I et II libère ses électrons qui sont successivement transportés à travers les sites catalytiques puis transférés au cytochrome c. Ce mécanisme appelé le cycle Q permet le pompage de 4 protons dans l'espace intermembranaire (Sousa et al., 2018).



**Figure 14 : Synthèse des principales fonctions mitochondriales.**

Dans la partie basse à droite est schématisé le cycle de Krebs. En bas à gauche est illustrée la chaîne respiratoire mitochondriale, responsable de la production énergétique des cellules. En haut à gauche sont schématisés les principaux canaux responsables de la régulation calcique. En haut à droite sont résumés les processus de mort cellulaire et les acteurs de leur régulation. (Ramaccini et al., 2021).

Le cytochrome c est une petite molécule hydrophile d'environ 12kDa situé dans l'espace intermembranaire et reliée à la membrane interne par des interactions électrostatiques. La forme réduite du cytochrome c transporte les électrons un par un du complexe III au complexe IV (Zhao et al., 2019). Le complexe IV (ou cytochrome c oxydase) est la dernière

enzyme de la chaîne de transporteur d'électron. Parmi ses 14 sous unités, 3 sont encodées par l'ADN mitochondrial et forment le centre catalytique du complexe. Au total, 4 électrons doivent être transférés au centre catalytique pour réduire une molécule d'O<sub>2</sub> en deux molécules d'H<sub>2</sub>O. 8 protons sont éliminés de la matrice mitochondriale, 4 sont utilisés pour la réduction et 4 sont pompés dans l'espace intermembranaire (Sousa et al., 2018; Zhao et al., 2019).

Bien que longtemps débattu, l'organisation de ces complexes mitochondriaux sous forme de supercomplexes est maintenant largement acceptée (Milenkovic et al., 2017). La mise au point de l'électrophorèse en conditions natives (BN-PAGE) a permis de mettre en évidence des interactions entre les complexes I, II et IV, formant des respirasome (Schägger et al., 2000). Le complexe I est principalement retrouvé au sein des supercomplexes (95%) alors que les complexes III et IV existent sous des formes simples et superassemblées (54% pour le complexe III et 20% pour le IV) (Greggio et al., 2017). Les bénéfices apportés par cette organisation, en particulier sur la cinétique du transfert d'électrons entre les complexes sont cependant toujours débattus (Milenkovic et al., 2017).

La dernière étape de la phosphorylation oxydative met en jeu l'ATP synthase (ou F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase). Cette enzyme permet de phosphoryler l'ADP en ATP en utilisant l'énergie du gradient de protons formé de part et d'autre de la membrane interne par la chaîne respiratoire (**figure 13 et 14**). Cette enzyme possède 2 régions reliées centralement et latéralement. F<sub>1</sub>, situé dans la matrice mitochondriale, constitue le centre catalytique de l'enzyme et F<sub>o</sub> forme un canal dans la membrane interne. Le processus de phosphorylation de l'ATP débute par le transfert des protons à travers la région F<sub>o</sub>. Ce transport induit un changement de conformation de la région F<sub>1</sub> permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP. Chez les vertébrés, il a été établi que 2,7 protons sont nécessaires pour produire une molécule d'ATP (Baker et al., 2012).

Une autre fonction de la mitochondrie est la régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose (**figure 14**). Cette voie est activée par la protéine p53 suite à des dommages de l'ADN. L'expression des protéines "à BH3-seulement" est augmentée puis ces dernières inhibent les protéines antiapoptotiques et activent les protéines proapoptotiques. Ces interactions induisent une augmentation de la perméabilité mitochondriale et un

relargage cytoplasmique de cytochrome *c* et d'autres facteurs pro-apoptotiques. Le cytochrome *c* cytosolique induit la formation de l'apoptosome qui conduit à l'activation des caspases 9 puis 3/7. Les autres facteurs vont se lier à la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X afin de supprimer son effet inhibiteur ou être transférés vers le noyau pour induire une dégradation de l'ADN (Wang et al., 2009).

Une caractéristique physiologique des mitochondries est la présence d'un gradient électrochimique de part et d'autre de sa membrane interne. Ce gradient induit l'accumulation de calcium dans la mitochondrie à travers des canaux calciques spécialisés, les uniporteurs calciques mitochondriaux (Kirichok et al., 2004). Le calcium qui s'accumule dans la mitochondrie peut ensuite être éliminé via un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . L'accumulation de calcium dans la matrice mitochondriale régule le métabolisme en activant des enzymes du cycle de Krebs, augmentant ainsi la disponibilité de NADH et donc la production d'ATP. Cette capacité de régulation calcique joue aussi un rôle dans les mécanismes de mort cellulaire. En effet, la concentration en calcium régule la perméabilité membranaire permettant la sortie des activateurs des caspases dans le cytoplasme. Cependant, la perturbation trop importante du potentiel membranaire mitochondrial peut conduire à l'activation du processus de nécrose (**figure 14**) (Rizzuto et al., 2012).

La mitochondrie est également l'organe impliqué dans la production et l'élimination des ERO (**figure 14**). La formation des ERO a lieu au niveau la chaîne de transporteur d'électrons. Une partie des électrons circulant entre les complexes peut provoquer une réduction partielle de l' $\text{O}_2$  en ions superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ou une production de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Les ERO peuvent agir comme second messenger et participer à des fonctions physiologiques telles que la prolifération ou la survie cellulaire. Ils participent à la mise en place de la polarité neuronale et régulent l'organisation et la dynamique de leur cytosquelette en modulant la libération intracellulaire de calcium. Cependant, une quantité d'ERO trop importante est délétère pour la mitochondrie et pour la cellule. Ils induisent la peroxydation des lipides, provoquent des mutations de l'ADN, des dysfonctionnements mitochondriaux irréversibles conduisant à une synthèse d'ATP insuffisante et éventuellement la mort cellulaire (Zhao et al., 2019). Le cerveau est particulièrement vulnérable aux ERO pour quatre raisons. Sa demande en oxygène importante qui représente 20% de la demande totale. Les concentrations importantes en

métaux (fer et cuivre) qui sont impliqués dans la catalyse des ERO. Le taux élevé d'acides gras polyinsaturés dans les membranes des cellules qui servent de substrat pour la peroxydation des lipides et les niveaux relativement bas de défenses antioxydantes dans le cerveau. Pour diminuer le niveau d'ERO, la mitochondrie possède ses propres enzymes antioxydantes. L'enzyme SOD2 catalyse la dégradation de l' $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  moins réactif et en  $O_2$ . La catalase, la glutathion peroxydase (GPX) et la peroxyrédoxine réduisent ensuite l' $H_2O_2$  afin de prévenir la formation du radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$ . Enfin, le glutathion agit à la fois de manière non enzymatique en inactivant les espèces radicalaires  $O_2^{\bullet-}$  et  $OH^{\bullet}$  et en tant que donneur d'électrons dans la réduction de l' $H_2O_2$  par la GPX (Kim et al., 2015).

### III.1.d. La dynamique mitochondriale intra et intercellulaire

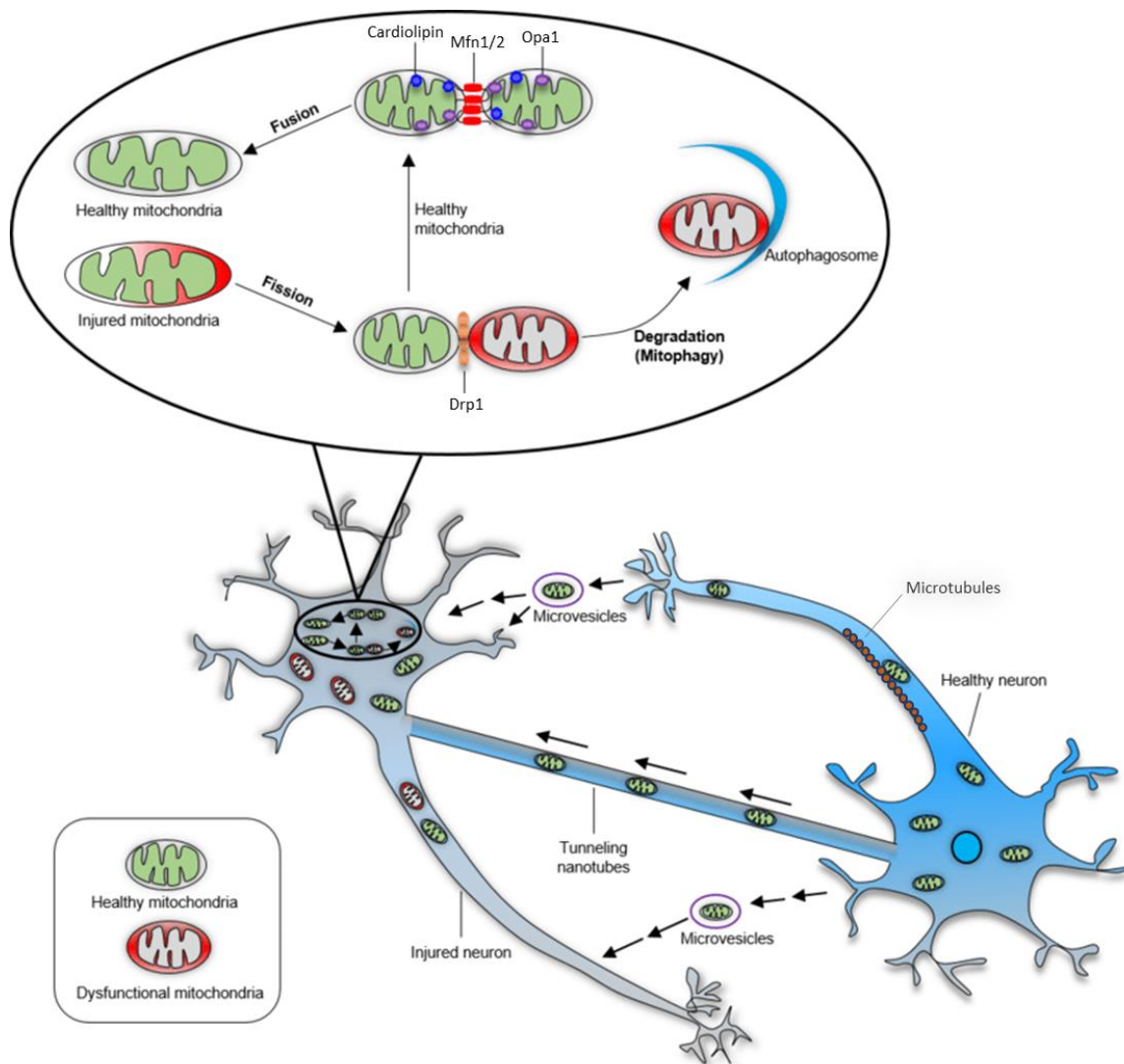
Les mitochondries sont des organites dynamiques. Ce paramètre peut être considéré selon trois aspects principaux. Les mitochondries se divisent ou fusionnent en permanence en fonction du métabolisme cellulaire. Elles sont capables de se déplacer à la fois dans et entre les cellules. Enfin, un mécanisme permet de réguler la dégradation des mitochondries : la mitophagie.

La fusion et la fission mettent en jeu des protéines GTPases de la famille des dynamines qui remodelent les deux membranes mitochondriales afin de séparer une mitochondrie en deux ou inversement. L'équilibre entre ces deux mécanismes permet de réguler la taille, le nombre et la structure des mitochondries. Ils permettent d'exercer un contrôle de la qualité des mitochondries et de réguler leurs fonctions (**figure 15**) (Tilokani et al., 2018).

Le processus de fusion entre deux mitochondries se déroule en deux étapes. La première étape est médiée par les protéines transmembranaires de la membrane externe Mfn1 et Mfn2 (mitofusine 1 et 2). Les 2 protéines se dimérisent, induisant un changement de leur conformation et provoquant un rapprochement puis une fusion des membranes externes. La deuxième étape est la fusion des membranes internes et requiert uniquement la protéine transmembranaire de l'atrophie optique 1 (OPA1) (Ge et al., 2020). La fusion joue un rôle clé dans la phosphorylation oxydative, en particulier dans certains types cellulaires comme les neurones. Il a par exemple été montré que l'inactivation du gène



codant pour la Mfn2 induit une réduction de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les cellules de Purkinje du cervelet (Chen et al., 2007). Un autre intérêt de la fusion mitochondriale est la compensation de l'hétéroplasmie. Une mitochondrie possédant une mutation délétère à son fonctionnement peut ainsi fusionner avec une mitochondrie possédant un ADN sauvage afin de diminuer le pourcentage d'ADN muté et rétablir sa fonction (Tilokani et al., 2018).



**Figure 15 : La dynamique des mitochondries**

Les mécanismes de dynamique mitochondriale intra et intercellulaire sont résumés sur ce schéma. La fusion, fission et la mitophagie (partie haute du schéma) agissent conjointement de façon à contrôler la qualité des mitochondries. Les mécanismes de transport intra ou intercellulaires sont représentés dans la partie basse du schéma (He et al., 2020).

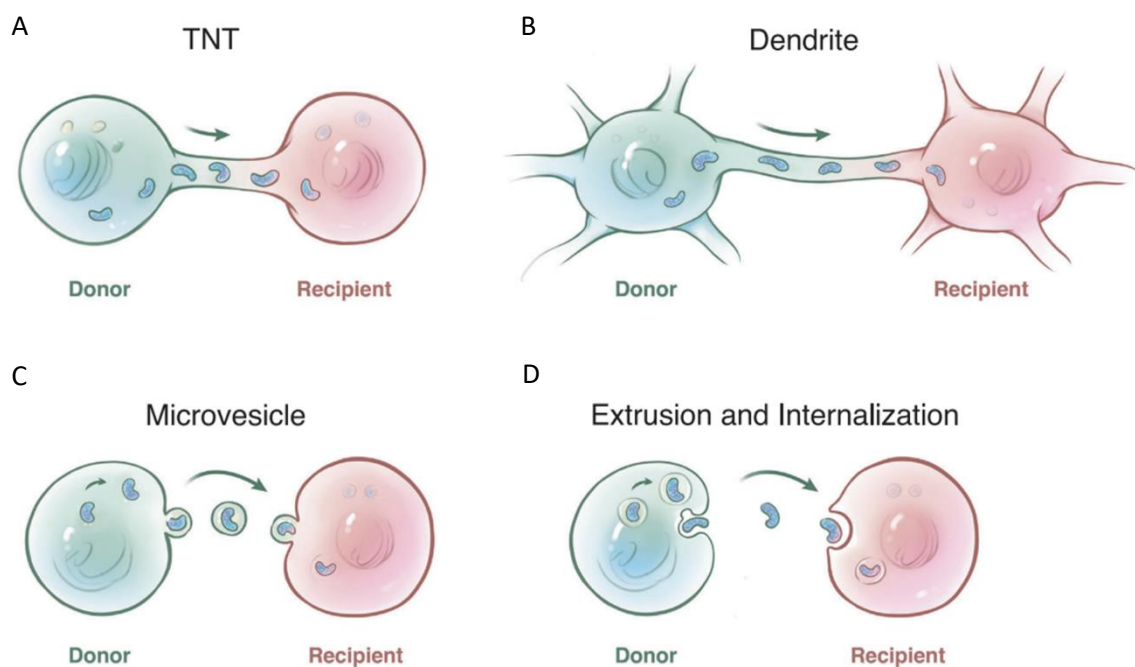
Le mécanisme de fission est initié par le recrutement du réticulum endoplasmique afin d'amorcer la constriction de la membrane externe. La protéine 1 liée à la dynamine (DRP1) est ensuite recrutée puis elle s'oligomérisse pour former un anneau autour du site de constriction. Enfin, un mécanisme dépendant de la GTP induit un changement de conformation des oligomères de Drp1 afin d'augmenter la constriction et de séparer les membranes (Tilokani et al., 2018). La fission permet de conserver un nombre équivalent de mitochondries dans les cellules mitotiques au cours de leur division (Taguchi et al., 2007). Pour les cellules post-mitotiques, la fission permet par exemple de modifier la localisation cellulaire des mitochondries dans les axones ou les dendrites des neurones. Dans les deux cas, la fission permet d'isoler les parties défectueuses de la mitochondrie qui peuvent ensuite être éliminées via la mitophagie (Seager et al., 2020) (**figure 15**). Des défauts de fission entraînent une altération de la morphologie et de la fonction des mitochondries notamment par une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire, une augmentation de la production d'ERO et une dégradation de l'ADN mitochondrial (Smirnova et al., 2001; Parone et al., 2008; Favaro et al., 2019).

Le deuxième aspect de la dynamique des mitochondries est le transport intracellulaire et intercellulaire. Ces deux mécanismes permettent d'adapter la localisation des mitochondries en fonction de la physiologie cellulaire.

Les mitochondries sont transportées dans la cellule grâce au réseau de microtubules (**figure 15**) par l'intermédiaire de protéines motrices : la kinésine-1 pour le transport antérograde et la dynamine pour le transport rétrograde (Schwarz, 2013). Dans le cas des neurones, le transport de mitochondries est indispensable pour fournir de l'énergie aux structures distales telles que les axones étant donné la faible capacité de diffusion de l'ATP (Seager et al., 2020). La présence des mitochondries à la synapse est indispensable pour l'exocytose et le recyclage des vésicules synaptiques, l'assemblage et le remodelage du cytosquelette d'actine ou l'homéostasie calcique (Sheng et al., 2012). La fonction associée au transport rétrograde est plus discutée. Une étude récente a cependant mis en évidence que son inhibition conduisait à une accumulation de mitochondries produisant plus d'ERO et moins d'ATP au niveau des terminaisons axonales (Mandal et al., 2020). Au total, il a été estimé qu'environ 15% des mitochondries se déplacent dans le sens rétrograde, 15% dans le sens antérograde et 70% sont stationnaires, ancrées aux microtubules par la

synthaphiline (Schwarz, 2013). Ces pourcentages sont régulés par l'activité synaptique. Lorsqu'elle augmente, le nombre de mitochondries dans la terminaison axonale augmente et inversement (Seager et al., 2020).

Le transfert intercellulaire des organites est un phénomène qui a été mis en évidence relativement récemment (Rustom et al., 2004). À l'origine, cette étude a montré que les endosomes pouvaient être échangés grâce aux « tunneling nanotubes » (TNT). Ces structures membranaires forment des ponts cytoplasmiques entre 2 cellules éloignées de plusieurs dizaines à centaines de microns (Vignais et al., 2017). Sur la base de cette découverte, plusieurs études ont par la suite mis en évidence le transfert intercellulaire de mitochondries *in vitro* puis *in vivo* via différents mécanismes (**figure 16**) (Spees et al., 2006; Hayakawa et al., 2016; Jackson et al., 2016).



**Figure 16 : Synthèse des différentes voies d'échange intercellulaire des mitochondries.**

Ce schéma regroupe les principaux mécanismes d'échange de mitochondries qui ont été décrits. Les mécanismes A et B font intervenir un contact direct entre le cytoplasme de deux cellules alors que les mécanismes C et D impliquent la sortie des mitochondries dans l'espace extracellulaire (Liu et al., 2021).

Le transfert de mitochondries par les TNT a été mis en évidence uniquement *in vitro*, entre des cellules identiques ou entre des cellules acceptrices et receveuses différentes comme entre des cellules souches mésenchymateuses et des cardiomyocytes (**figure 16A**) (Lou et

al., 2012; Pasquier et al., 2013; Zhang et al., 2016). Récemment, il a été montré que d'autres protrusions membranaires faisant communiquer le cytoplasme de deux cellules permettent d'échanger des mitochondries (**figure 16B**). C'est par exemple le cas pour les réseaux dendritiques formés entre les ostéocytes (Gao et al., 2019). Le transport par des vésicules extracellulaires est également un mécanisme permettant d'échanger des mitochondries. C'est le seul mécanisme qui a été démontré *in vivo* (**figure 16C**). Plusieurs études ont ainsi mis en évidence ce type de transfert entre des cellules souches mésenchymateuses et des cellules pulmonaires ou entre des neurones et des astrocytes (Islam et al., 2012; Hayakawa et al., 2016). Enfin, il a récemment été montré que des mitochondries fonctionnelles circulent librement dans la circulation sanguine. Ce mécanisme pourrait constituer un moyen d'échange de mitochondries entre des régions éloignées (**figure 16D**) (Al Amir Dache et al., 2020).

Le rôle physiologique de ce transfert n'a pas encore été identifié car la plupart des études le mettent en évidence en condition de stress (Liu et al., 2021 b). En condition d'ischémie cérébrale par exemple il a été démontré que les mitochondries défectueuses des neurones peuvent être transférées dans les astrocytes afin de les éliminer. En parallèle, les astrocytes fournissent des mitochondries fonctionnelles aux neurones (Hayakawa et al., 2016). Une autre étude a montré que les cellules ganglionnaires de la rétine sont également capables d'échanger leur mitochondries avec les astrocytes environnants afin de procéder à leur dégradation (Davis et al., 2014). Cet échange pourrait permettre aux cellules présentant des défauts de fonctionnement mitochondrial de recevoir des fragments de mitochondries contenant des protéines fonctionnelles ou de l'ADN mitochondrial en cas de mutation sur celui-ci (Tan et al., 2015; Murray et al., 2019).

Enfin, la mitophagie est le processus permettant de réguler le nombre de mitochondries et d'éviter l'accumulation de mitochondries anormales. L'élimination des mitochondries peut être aléatoire, lors du processus de macroautophagie, en particulier quand la cellule subit un stress nutritionnel. Cependant, lors de la mitophagie, la dégradation est sélective. Elle permet d'éliminer les mitochondries défectueuses, de maintenir un pool constant de mitochondries ou de s'adapter aux besoins métaboliques (Youle et al., 2011). La mitophagie est précédée par la fission mitochondriale. Les fragments générés présentant un potentiel membranaire et un niveau d'expression de protéine de fusion (OPA1)

diminué entrent ainsi en mitophagie (Twig et al., 2008). Le mécanisme le mieux décrit implique les protéines Pink1 et Parkin. La diminution du potentiel de membrane conduit à une diminution de l'import de la protéine Pink1 qui s'accumule donc dans la membrane externe. Pink1 recrute et active la protéine Parkin, une ubiquitine ligase qui va à son tour ubiquitinyler d'autres protéines de la membrane externe. Cela conduit à leur dégradation par le protéasome et à l'adressage des mitochondries à l'autophagosome. (Mishra et al., 2016). Le stress énergétique ou l'hypoxie ont également été décrits comme des conditions pouvant activer la mitophagie (Egan et al., 2011; Liu et al., 2012).

## III.2. Les maladies mitochondriales

### III.2.a. Epidémiologie et caractéristiques des maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales résultent de la mutation d'un gène nucléaire ou mitochondrial conduisant à un défaut du système de phosphorylation oxydative ou des fonctions mitochondriales associées. C'est en 1988 que les premières descriptions de patients présentant une mutation de l'ADN mitochondrial ont été faites (Holt et al., 1988; Wallace et al., 1988). En 1995, une mutation sur un gène nucléaire est également identifiée comme étant à l'origine d'un défaut de fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondrial (Bourgeron et al., 1995). Qualifiées pendant une dizaine d'années de maladies extrêmement rares, environ 300 pathologies associées à un dysfonctionnement mitochondrial sont aujourd'hui dénombrées. La prévalence d'une mutation mitochondriale ou nucléaire à l'origine d'une maladie mitochondriale est estimée à 1 sur 4300 ce qui les classe comme les plus importantes parmi les maladies héréditaires du métabolisme (Gorman et al., 2015; Stenton et al., 2020). Les mutations sont transmises de façon héréditaire selon tous les modes connus : autosomique récessif ou dominant, lié au chromosome X (récessif ou dominant) ou maternel.

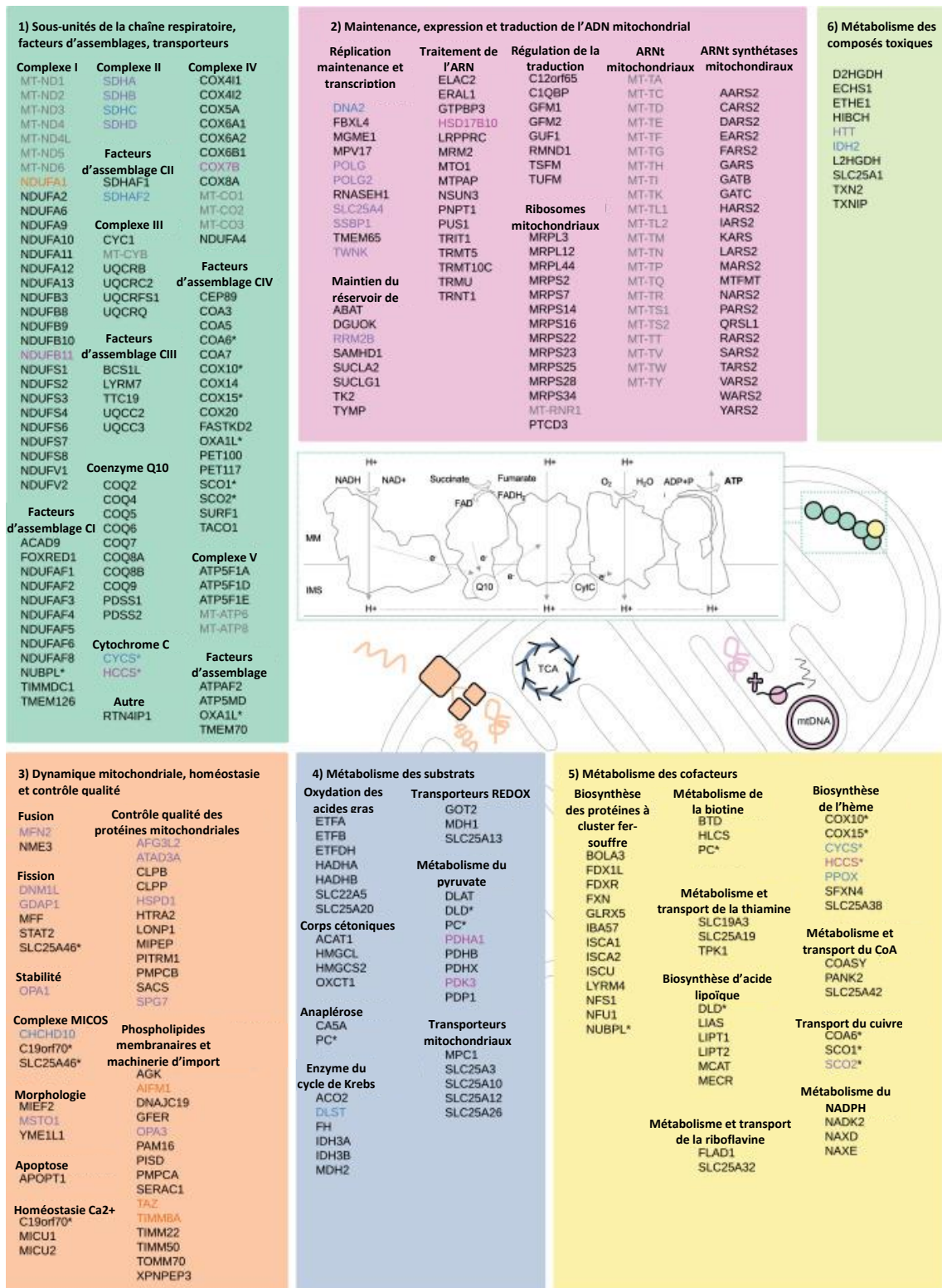
De par la diversité des mutations à l'origine des maladies mitochondriales, elles sont qualifiées de maladies très hétérogènes. Certaines affectent spécifiquement un organe mais la plupart sont des maladies multi-systémiques touchant principalement les organes avec des besoins énergétiques importants tels que le cerveau, le cœur et les muscles.

Cette hétérogénéité est également retrouvée au niveau de l'âge d'apparition de la maladie. Un début précoce, chez l'enfant, est souvent lié à une mutation de l'ADN nucléaire transmise de façon récessive. Cela conduit à des pathologies sévères et multi-systémiques avec une implication prépondérante du SNC. Les formes adultes quant à elles sont plus souvent le résultat d'une mutation de l'ADN mitochondrial. Elles impactent l'organisme de manière plus ciblée (Lightowlers et al., 2015). Cette distinction n'est cependant pas une règle stricte. Une mutation à l'origine d'une forme pédiatrique sévère peut dans certains cas se manifester plus tard. Une même mutation peut aussi conduire à un phénotype différent selon les patients (Miyae et al., 2019). Inversement, des manifestations cliniques similaires peuvent être le résultat d'une multitude de mutations différentes (Lake et al., 2016). Cette difficulté dans la corrélation entre le génotype et le phénotype complique le processus diagnostique et ralentit le développement de traitements efficaces (Alston et al., 2017).

### III.2.b. La diversité génétique des dysfonctions mitochondriales

L'apport des technologies de séquençage nouvelle génération tel que le séquençage complet de l'exome a permis d'identifier plus de 300 gènes dont une mutation est à l'origine de maladies mitochondriales (Theunissen et al., 2018; Wagner et al., 2019; Stenton et al., 2020). Ces gènes sont pour la grande majorité (89%) codés par l'ADN nucléaire. Les autres sont codés par l'ADN mitochondrial. La **figure 17** classe l'ensemble de ces gènes dans six catégories selon leur rôle fonctionnel dans la mitochondrie.

La majorité de ces gènes sont impliqués dans la structure et la fonction des cinq complexes de la chaîne respiratoire ou de leurs facteurs d'assemblages ainsi que des deux transporteurs d'électrons. Les défauts du complexe I sont les causes les plus fréquentes des maladies mitochondriales pédiatriques. Ils ont été identifiés dans environ 30% des cas parmi lesquels 75% sont le résultat d'une mutation d'un gène codé par l'ADN nucléaire (Alston et al., 2017).



Mode de transmission : Autosomique récessif, autosomique dominant, autosomique récessif et dominant, maternel, lié au X récessif, lié au X dominant

Figure 17 : Les gènes à l'origine des maladies mitochondriales.

Des mutations conduisant à une maladie mitochondriale ont été recensées pour l'ensemble de ces gènes. Ils sont impliqués dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale de manière directe ou indirecte. (Adapté de Stenton et al., 2020)

Les mutations des gènes impliqués dans les complexes II et III perturbent le fonctionnement de leurs sous unités catalytiques mais sont largement minoritaires (Fernández-Vizarrá et al., 2015; Fullerton et al., 2020). Les défauts du complexe IV sont principalement causés par des mutations de gènes nucléaires codant pour des protéines d'assemblage du complexe. Les principales mutations sont rencontrées sur le gène *SURF1* qui est essentiel à la formation d'intermédiaires d'assemblages du complexe (Abdulhag et al., 2015). Pour le complexe de l'ATP synthase, des mutations sur cinq gènes dont deux codés par l'ADN mitochondrial ont été identifiées et conduisent notamment à un défaut de synthèse d'ATP (Ganetzky et al., 2019). Enfin, pour les deux transporteurs d'électrons, l'ensemble des mutations sont nucléaires et affectent leur processus de biosynthèse.

La deuxième catégorie la plus représentée implique les gènes nécessaires à la maintenance, l'expression et la traduction de l'ADN mitochondrial. La plupart sont encodés par l'ADN nucléaire et participent à la régulation de la quantité de nucléotides, à la réplication et la réparation de l'ADN mitochondrial. Parmi ceux-ci, *POLG* (polymérase  $\gamma$ ) est le premier responsable de maladies mitochondriales causées par un gène nucléaire. Plus de 200 mutations sur ce gène ont été recensées. On retrouve également des mutations sur des gènes essentiels à la synthèse et la maturation des ARNm, ARNt et ARNr mitochondriaux (Frazier et al., 2019).

Les mutations des gènes qui entrent dans les catégories suivantes impactent d'autres fonctions cellulaires comme la dynamique et homéostasie mitochondriale, le métabolisme des substrats énergétiques, le métabolisme des cofacteurs et le métabolisme des composés toxiques. Parmi les gènes recensés dans la **figure 17** la famille de transporteurs mitochondriaux SLC25 est impliquée dans plusieurs de ces fonctions et les mutations sur les gènes codant pour ces protéines sont impliquées dans une vingtaine de maladies métaboliques (Palmieri et al., 2020).

### III.2.c. L'hétérogénéité clinique des maladies mitochondriales

Le nombre important de gènes impliqués dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire couplé à la grande diversité de mutations qui peuvent avoir lieu sur ces gènes conduit à

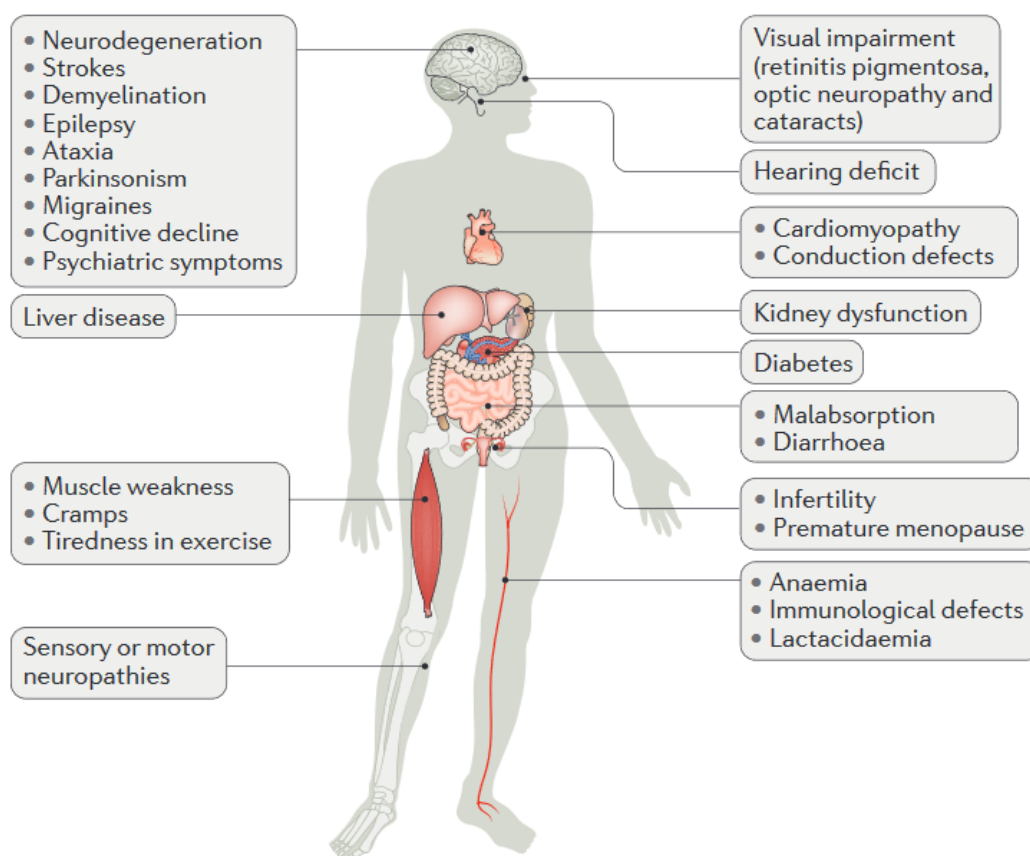


une présentation clinique des maladies mitochondriales très hétérogène. Cette hétérogénéité a lieu à plusieurs niveaux.

Tout d'abord, les maladies mitochondriales peuvent se manifester à n'importe quel âge. En France, une analyse d'une large cohorte regroupant 743 patients issus du réseau français des maladies mitochondriales et présentant des mutations pathologiques de l'ADN mitochondrial a été réalisée (Bannwarth et al., 2013). Dans 48% des cas, l'apparition des premiers symptômes avait lieu à moins d'un an et dans 25% des cas ils étaient présentés à l'âge adulte (supérieur à 16 ans). La distinction entre forme infantile et adulte n'est cependant pas toujours très claire. En effet, un phénotype classiquement observé chez l'enfant peut se manifester plus tard (Lightowlers et al., 2015). Une étude réalisée sur un groupe de 9 patients de plus de 69 ans a par exemple rapporté qu'ils souffraient d'une myopathie mitochondriale dont le phénotype est normalement rencontré chez des patients de moins de 30 ans (Johnston et al., 1995). Il est également difficile d'établir un lien entre le gène muté et l'âge d'apparition de la maladie. En fonction de la mutation retrouvée sur le gène POLG, l'âge d'apparition de la maladie peut par exemple varier entre 1 et 60 ans (Wong et al., 2008).

L'hétérogénéité des maladies mitochondriales est également retrouvée au niveau des organes et des tissus affectés (**Figure 18**). Pour certaines pathologies mitochondriales comme la neuropathie optique héréditaire de Leber, un seul organe est touché. Cette pathologie est caractérisée par une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine et conduit à une diminution bilatérale importante de la vision. Elle touche majoritairement les hommes et apparaît entre 20 et 30 ans (Schapira, 2006). Cependant, la majorité des maladies mitochondriales sont multi-systémiques avec une implication prépondérante du SNC et du système musculaire. On peut les séparer en deux groupes, les myopathies et les encéphalomyopathies. Parmi les myopathies les plus courantes, l'ophtalmoplégie externe progressive chronique est une pathologie caractérisée par une diminution de la mobilité oculaire conduisant à des déficits visuels (López-Gallardo et al., 2009). Les patients présentent également des désordres gastro-intestinaux et souffrent de migraine (Pfeffer et al., 2011). Le deuxième groupe de maladies mitochondriales multi-systémiques sont les encéphalomyopathies. Ces pathologies sont caractérisées par l'association de symptômes caractéristiques d'une encéphalopathie (retard mental,

ataxie, épilepsie, surdité, dystonie) et d'une myopathie. Des syndromes ont été définis afin de faciliter la classification de ces pathologies. Le syndrome de MELAS associe par exemple une myopathie (M), une encéphalopathie (E), une acidose lactique (LA) et des désordres neurologiques aigus ressemblant à des accidents ischémiques cérébraux ou «Stroke-like » (S). Selon l'évolution de la maladie, des symptômes tels que la surdité ou le diabète peuvent aussi se manifester plus tard (El-Hattab et al., 2015).



**Figure 18 : La diversité clinique des maladies mitochondriales.**

Cette figure regroupe l'ensemble des symptômes que peuvent présenter les patients atteints par une maladie mitochondriale. Ces pathologies peuvent toucher un ou une combinaison de plusieurs organes. De plus, des manifestations secondaires peuvent apparaître dans des organes qui ne présentent pas de lien fonctionnel avec le premier organe affecté (Suomalainen et al., 2018).

De nombreux patients n'entrent cependant pas complètement dans la définition d'un syndrome. Une étude sur une large cohorte de patients américains présentant tous la même mutation sur le gène *MT-TL1* a par exemple montré que 28% des cas présentaient un tableau clinique qui ne correspondait à aucun syndrome défini (Nesbitt et al., 2013).

La progression et la sévérité sont le troisième facteur hétérogène des maladies mitochondriales. Pour les maladies affectant un seul organe comme la neuropathie optique héréditaire de Leber, la progression suit une phase aiguë puis une phase chronique avec une dégénérescence progressive du nerf optique. La sévérité et l'éventuelle amélioration de la vision dépendent de la mutation (Man et al., 2002). Au contraire, la progression d'une maladie mitochondriale multi-systémique avec un début précoce est très rapide. Les encéphalomyopathies infantiles sont par exemple très souvent fatales durant les premières années de vie (Antonicka et al., 2003; Fassone et al., 2011; Spiegel et al., 2016). Pour les formes multi-systémiques débutant à l'adolescence ou à l'âge adulte, la vitesse de progression varie selon les organes affectés et la sévérité des symptômes. Le pronostic des patients atteints du syndrome MELAS est par exemple conditionné par la fréquence et l'intensité des épisodes de « Stroke-like » (El-Hattab et al., 2015).

Enfin, le niveau d'hétéroplasmie est le dernier facteur jouant un rôle dans l'hétérogénéité clinique des maladies mitochondriales. Une mutation de l'ADN mitochondrial peut induire ou non un phénotype pathologique selon sa fréquence parmi toutes les copies. Le seuil auquel la pathologie se manifeste est dépendant du gène et de la mutation. De plus, des pourcentages intermédiaires peuvent induire des formes spécifiques de la maladie. La mutation hétéroplasmique m.3243A>G, associée au syndrome MELAS conduit par exemple dans 10% des cas à une forme sévère et dans 10% des cas à une forme asymptomatique selon le pourcentage d'ADN muté. Entre ces deux extrêmes, des phénotypes divers impliquant un ou plusieurs organes sont retrouvés (El-Hattab et al., 2015).

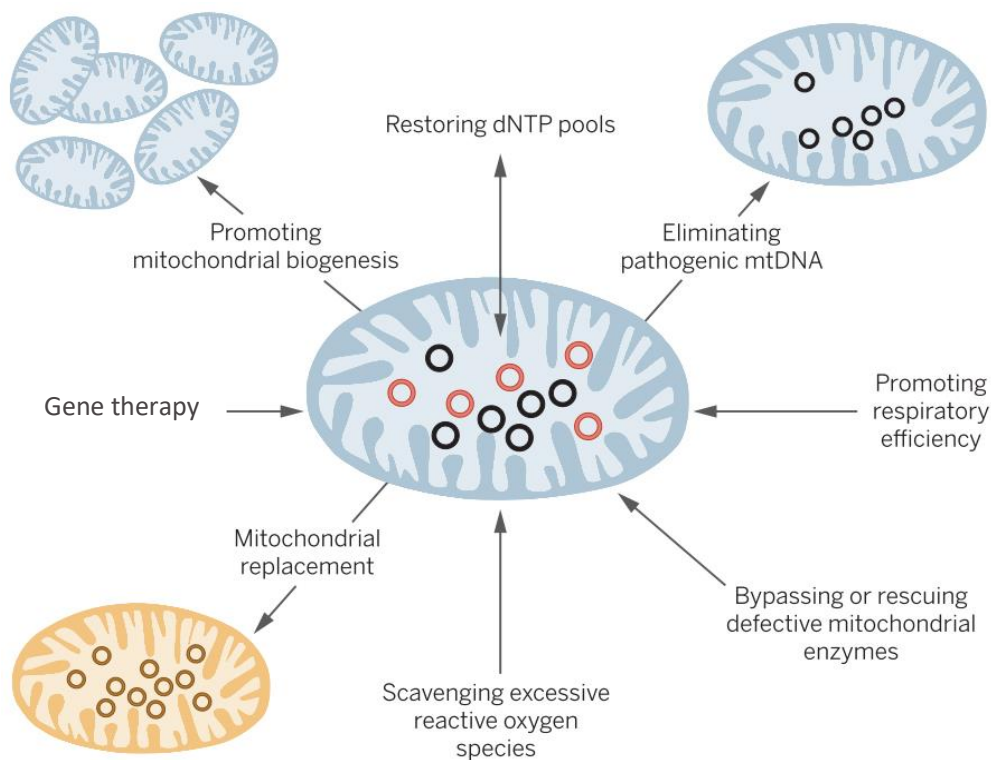
La diversité observée dans l'âge de présentation, le type d'organe affecté et la sévérité de la maladie constitue un challenge pour le diagnostic des patients. Cette diversité clinique complique l'identification des défauts génétiques à l'origine de la pathologie ce qui ralentit la prise en charge thérapeutique adaptée des patients.

### III.2.d. Les stratégies thérapeutiques pour les maladies mitochondriales

La diversité des maladies mitochondriales représente le principal défi dans leur prise en charge thérapeutique. Aujourd'hui, les traitements proposés sont largement symptomatiques et visent à améliorer la qualité de vie des patients. Plusieurs stratégies sont cependant étudiées et sont illustrées dans la **figure 19**. On peut les classer en 5 catégories principales. (1) Augmenter la biogénèse mitochondriale (2) cibler les conséquences d'un dysfonctionnement mitochondrial, en particulier le stress oxydant (3) améliorer ou contourner le système de phosphorylation oxydative (4) remplacer les mitochondries défectueuses et (5) corriger le défaut génétique (Russell et al., 2020).

Augmenter la quantité de mitochondries est une solution envisagée dans la mesure où plus de mitochondries, même partiellement fonctionnelles, pourraient suffire à restaurer une activité normale du système de phosphorylation oxydative. Une étude a par exemple montré que l'augmentation de l'expression de la protéine PGC1, régulant la prolifération mitochondriale, améliore l'activité du complexe IV du muscle squelettique chez des souris *Surf1* KO (Viscomi et al., 2011). Cependant, la complexité de régulation de cette voie de prolifération induit des résultats différents selon les molécules pharmacologiques utilisées (Fernandez-Marcos et al., 2011; Komen et al., 2014). Afin de pallier à cette limitation, l'exercice physique est un moyen sûr et efficace d'augmenter la production mitochondriale dans le muscle et dans le cerveau (Steiner et al., 2011; Granata et al., 2021). Les exercices aérobies sont notamment recommandés pour les patients atteints de myopathies mitochondriales (Bottani et al., 2020).

La principale conséquence d'un dysfonctionnement mitochondrial est l'élévation du taux d'ERO. De par leur mécanisme d'action non spécifique, des molécules antioxydantes sont utilisées dans plusieurs maladies mitochondriales afin de limiter l'effet toxique des ERO. Parmi ces molécules, des essais cliniques ont été menés avec KH176, un dérivé de la vitamine E ou MitoQ, un dérivé de l'ubiquinone. Ces études ont montré que ces traitements n'induisent pas d'effet secondaire mais aucun effet bénéfique significatif n'a été observé chez les patients atteints de maladies mitochondriales (Janssen et al., 2019; Bottani et al., 2020).



**Figure 19 : Synthèse des interventions thérapeutiques potentielles pour les patients atteints de maladies mitochondriales.**

Une mitochondrie dont la fonction est altérée est représentée en bleu. Elle peut contenir de l'ADN mitochondrial hétéroplasmique (ADN muté en noir et sauvage en rouge) ou présenter des défauts associés à des mutations sur l'ADN nucléaire. Les principales stratégies de prise en charge des maladies mitochondriales sont regroupées ici (Adapté de Lightowlers et al., 2015).

De nombreuses autres molécules ont été étudiées, seules ou combinées, pour leur effet de capture et d'élimination des EROs, l'ubiquinone, la vitamine C, l'acide lipoïque, le glutathion ou la cystéamine (El-Hattab et al., 2017). Bien que des résultats encourageants aient été obtenus lors d'études pré-cliniques, les essais cliniques réalisés avec ces molécules antioxydantes n'ont pas mis en évidence d'effet thérapeutique (Bottani et al., 2020).

D'autres traitements visent à augmenter l'activité de la chaîne de transport d'électrons. Pour cela, une stratégie consiste à augmenter la concentration des cofacteurs qui sont déficitaires dans certaines pathologies. Une étude a par exemple été réalisée chez des patients atteints d'encéphalomyopathie causée par un défaut de biosynthèse du CoQ<sub>10</sub>. La supplémentation orale avec cette coenzyme permet de restaurer l'activité de la chaîne respiratoire. Cette stratégie permet de corriger en partie les symptômes associés à la

pathologie (Rötig et al., 2000; Di Giovanni et al., 2001).

Pour augmenter l'activité de la chaîne respiratoire, une autre approche consiste à améliorer la disponibilité des substrats produits lors du cycle de Krebs (NADH et FADH<sub>2</sub>). Le dichloroacétate et la thiamine B sont deux molécules capables d'activer la pyruvate déshydrogénase. Cette enzyme induit une augmentation du catabolisme du pyruvate et par conséquent de la quantité de NADH et FADH<sub>2</sub>. Il a été montré que ces molécules pouvaient être efficaces dans le traitement de l'acidose lactique, fréquemment rencontrée chez les patients atteints de maladies mitochondriales (El-Hattab et al., 2017).

La thérapie par remplacement des mitochondries est décrite comme la stratégie la plus efficace pour la prévention de la transmission de maladies associées à des mutations de l'ADN mitochondrial (Slone et al., 2020). Le remplacement des mitochondries implique en général le transfert du matériel génétique nucléaire d'un ovocyte ou d'un zygote d'une mère identifiée comme « à risque », vers une cellule receveuse énucléée possédant des mitochondries saines. Malgré le potentiel préventif notable de cette stratégie, elle pose de nombreuses questions éthiques. L'application clinique d'une méthode où les conséquences à long terme ne sont pas connues est questionnable, en particulier à cause de l'incertitude sur le pourcentage d'ADN muté qui persiste après la naissance (Adashi et al., 2021).

Une stratégie émergente consiste à modifier le génome mitochondrial ou nucléaire afin de corriger directement le défaut ou de prévenir la transmission de la maladie. Selon la localisation de la mutation responsable de la maladie, les approches doivent être adaptées. Les mutations nucléaires (90% des cas) sont des cibles de choix pour les thérapies géniques par les vecteurs AAVs. De nombreuses études pré-cliniques mettent en avant le potentiel thérapeutique d'une telle approche dans des modèles murins de maladies mitochondriales comme le syndrome de Barth (Suzuki-Hatano et al., 2019), l'ataxie de Friedreich (Perdomini et al., 2014) ou l'encéphalopathie ethylmalonique (Di Meo et al., 2012).

Dans les cas où la mutation est présente sur l'ADN mitochondrial, le challenge est double : (1) la membrane interne limite l'accès à la mitochondriale et il faut donc trouver un moyen d'apporter le gène d'intérêt ou de corriger le défaut dans la matrice et (2) l'hétéroplasmie de l'ADN mitochondrial implique de trouver des stratégies pour cibler et dégrader

spécifiquement les molécules d'ADN possédant la mutation. Récemment, des vecteurs AAVs codants pour des nucléases conçues pour cliver l'ADN mitochondrial sur un site spécifique possédant une mutation ont été développés (ZFNs pour « *zinc-finger nucleases* » et mitoTALENs pour « *mitochondrially targeted transcription activator-like effector nucleases* ») (Bacman et al., 2018; Gammage et al., 2018). Les souris possédant une mutation hétéroplasmique sur le gène mitochondrial *mt-tRNA<sup>Ala</sup>* avec une fréquence de plus de 50% présentaient suite au traitement une inversion de l'hétéroplasmie au profit de molécules d'ADN sauvages. Cette stratégie est prometteuse et des études chez des modèles murins de maladies mitochondriales permettraient d'évaluer la pertinence thérapeutique de cette stratégie sur des phénotypes pathologiques plus complet. De tels systèmes peuvent également avoir un intérêt dans la prévention de la transmission des maladies mitochondriales. Il a en effet été montré que ces nucléases peuvent modifier le niveau d'hétéroplasmie dans des ovocytes de souris ou d'humains (Reddy et al., 2015). Le système DdCBEs (pour « *DddA-derived cytosine base editors* ») est également basé sur l'édition du génome mitochondrial. Ce système permet de corriger les mutations plutôt que de cliver les molécules d'ADN. Cette étude révèle des résultats prometteurs mais des recherches supplémentaires doivent être effectuées pour améliorer la précision de la correction et trouver des moyens d'acheminement *in vivo* ou *in vitro* de ce système (Mok et al., 2020). Si on ne prend pas en compte le niveau d'hétéroplasmie, une autre stratégie consiste à délivrer une copie sauvage de l'ADN par l'intermédiaire d'un vecteur viral, comme pour les thérapies géniques des mutations de gènes nucléaires. Cependant, cela nécessite l'introduction du vecteur viral dans la mitochondrie. Dans cette optique, un vecteur viral codant pour le gène *ND4* et dont la capsid a été modifiée avec une séquence d'adressage à la mitochondrie a été développé. Ce dernier a ensuite été injecté chez des patients atteints de neuropathie optique de Leber associée à une mutation du gène mitochondrial *MT-ND4* (Yu et al., 2012). Les résultats qui ont suivi ont montré une amélioration partielle de l'acuité visuelle chez certains patients mais une étude clinique récente n'est pas parvenue à atteindre les critères principaux d'évaluations (Guy et al., 2017; Russell et al., 2020).

## IV. Le syndrome de Leigh

### IV.1. L'épidémiologie et la génétique du syndrome de Leigh

Décrit pour la première fois en 1951 par le psychiatre anglais Denis Archibald Leigh, le SL ou encéphalomyélopathie nécrosante subaigüe est une maladie mitochondriale génétique dont la prévalence est aujourd'hui estimée à 1 naissance sur 40000 (Leigh, 1951; Chen et al., 2018). Dans certains cas, la prévalence peut être supérieure à cause de l'isolement d'une population et de l'augmentation de la consanguinité. Cela favorise l'échange de mutations d'un gène associé au SL. C'est par exemple le cas pour la forme franco-canadienne du syndrome de Leigh qui a été identifiée dans une population isolée de la région de Saguenay-Lac-Saint-Jean et pour laquelle la prévalence est estimée à 1/2000 naissance (Morin et al., 1993). Cette forme du SL est causée par une mutation du gène *LRPPRC*, codant pour une protéine impliqué dans la traduction de l'ARN mitochondrial (Sasarman et al., 2015).

Comme pour les autres maladies mitochondriales, le SL peut être provoqué par une mutation sur un gène nucléaire ou mitochondrial. Une mutation sur un gène nucléaire est retrouvée dans environ 75% des cas et peut être transmise par les deux parents selon un mode autosomique récessif ou liée au chromosome X. Pour le quart restant, c'est une mutation de l'ADN mitochondrial qui a été identifiée comme étant à l'origine du SL. Au total, des mutations sur plus de 75 gènes ont été identifiées chez les patients (Lake et al., 2016). La grande majorité de ces gènes sont impliqués dans la structure ou dans la fonction des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chang et al., 2020). Tous ces gènes sont regroupés dans le **tableau 1** et sont classés en fonction du déficit engendré par leur mutation. En ce qui concerne les gènes mitochondriaux, 10% des patients présentent une mutation sur *MT-ATP6* qui est indispensable à l'assemblage du complexe de l'ATP synthase (Ruhoy et al., 2014). Pour les gènes nucléaires, *SURF1* a été identifié comme le plus fréquemment mutés chez les patients atteints du SL. Il code pour une protéine nécessaire à l'assemblage du complexe IV (Chang et al., 2020). Parmi les mutations des gènes associés à un défaut du complexe I, celles du gène nucléaire *NDUFS4*



codant pour une sous-unité non enzymatique sont les plus fréquentes. Elles représentent 11% des cas et ont été recensées chez 22 patients issus de 18 familles différentes. De façon singulière, il a été montré que quasiment tous les patients présentant une mutation sur le gène *NDUFS4* présentaient les mêmes symptômes, contrairement aux mutations sur d'autres gènes nucléaires associés au complexe I (Lake et al., 2016; Ortigoza-Escobar et al., 2016).

C'est sur cette base que le modèle murin le plus pertinent a été développé.

Déficits	Gènes
Pyruvate déshydrogénase	<i>PDHA1</i> , <i>PDHB</i> , <i>PDHX</i> , <i>DLAT</i> , <i>DLD</i> , <i>LIPT1</i> , <i>LIAS</i> , <i>TPK1</i> , <i>SLC19A3</i> , <i>SLC25A19</i>
Complexe I	<i>MT-ND1</i> , <i>MT-ND2</i> , <i>MT-ND3</i> , <i>MT-ND4</i> , <i>MT-ND5</i> , <i>MT-ND6</i> , <i>NDUFV1</i> , <i>NDUFV2</i> , <i>NDUFS1</i> , <i>NDUFS2</i> , <i>NDUFS3</i> , <i>NDUFS4</i> , <i>NDUFS7</i> , <i>NDUFS8</i> , <i>NDUFA1</i> , <i>NDUFA2</i> , <i>NDUFA9</i> , <i>NDUFA10</i> , <i>NDUFA12</i> , <i>NDUFAF2</i> , <i>NDUFAF5</i> , <i>NDUFAF6</i> , <i>FOXRED1</i>
Complexe II	<i>SDHA</i> , <i>SDHAF1</i>
Coenzyme Q10	<i>PDSS2</i>
Complexe III	<i>UQCRCQ</i> , <i>BCS1L</i> , <i>TTC19</i>
Complexe IV	<i>MT-CO3</i> , <i>NDUFA4</i> , <i>SURF1</i> , <i>COX10</i> , <i>COX15</i> , <i>SCO2</i> , <i>PET100</i> , <i>LRPPRC</i> , <i>TACO1</i> , <i>ETHE1</i>
Complexe V	<i>MT-ATP6</i>
Maintenance de l'ADN mitochondrial	<i>FBXL4</i> , <i>POLG</i> , <i>SUCLA2</i> , <i>SUCLG1</i>
Traduction de l'ADN mitochondrial	<i>MT-TI</i> , <i>MT-TK</i> , <i>MT-TL1</i> , <i>MT-TV</i> , <i>MT-TW</i> , <i>MT-FMT</i> , <i>GTPB3</i> , <i>TRMU</i> , <i>EARS2</i> , <i>FARS2</i> , <i>IARS2</i> , <i>NARS2</i> , <i>GFM1</i> , <i>GFM2</i> , <i>TSMF</i> , <i>C12orf65</i> , <i>PNPT1</i>
Homéostasie mitochondriale	<i>HIBCH</i> , <i>ECHS1</i> , <i>SERAC1</i> , <i>AIFM1</i>
Biotinidase	<i>BTD</i>

*Mode de transmission des gènes : autosomique récessif, lié au chromosome X, maternel*

**Tableau 1 : Gènes sur lesquels des mutations ont été recensées chez les patients atteints du Syndrome de Leigh.**

Les gènes sont associés au déficit qu'une mutation engendre. Le code couleur permet de mettre en évidence que la majorité des gènes sont transmis selon le mode autosomique récessif. (Adapté de Lake et al., 2016)

## IV.2. La physiopathologie et le diagnostic du syndrome de Leigh

Le SL est une pathologie définie selon trois critères : (1) une maladie neurodégénérative présentant des symptômes variables, (2) causée par des déficits mitochondriaux d'origine génétique et (3) caractérisée par des lésions bilatérales et symétriques dans des régions spécifiques du SNC (Finsterer, 2008; Bonfante et al., 2016). Dans certains cas, le terme de « Leigh-like syndrome » peut être employé lorsque le patient présente une partie seulement de ces critères ou que les symptômes rencontrés sont atypiques.

Les premières manifestations du SL apparaissent généralement entre 3 et 12 mois. Cet âge peut toutefois varier. Les formes les plus précoces sont prénatales et les plus tardives débutent à l'adolescence ou à l'âge adulte (Leshinsky-silver et al., 2010). Cependant, 83% des patients développent le SL avant l'âge de deux ans (Finsterer, 2008). La progression de la maladie est en général très rapide avec un décès par arrêt respiratoire dans environ 70% des cas (Finsterer, 2008). L'âge médian auquel les patients décèdent est estimé à 2,4 ans (Sofou et al., 2014).

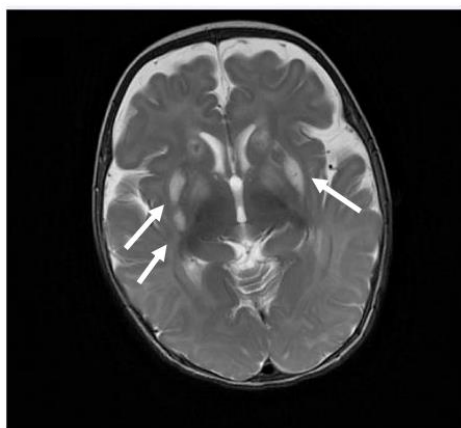
Les premiers symptômes présentés par les patients sont liés à l'aspect neurodégénératif de la pathologie. Dans les formes infantiles, les présentations cliniques suivantes sont généralement retrouvées : une hypotonie musculaire ou une dystonie, des crises d'épilepsie, une ataxie, des mouvements oculaires anormaux, une respiration irrégulière et un retard intellectuel (Baertling et al., 2014). La combinaison des symptômes et leur sévérité sont variables selon le gène muté (**Figure 20A**). Dans les formes plus tardives les symptômes sont plus discrets et atypiques avec par exemple des maux de tête, des problèmes d'équilibre, des vertiges, une surdité. Bien que l'atteinte du SNC soit prépondérante chez la plupart des patients, le SL est une pathologie multi-systémique. Les organes périphériques les plus fréquemment touchés sont le cœur qui présente une hypertrophie (environ 20% des cas) et le foie affecté par une stéatose ou une fibrose (environ 12% des cas) (Sofou et al., 2014). Dans certains cas, on observe également des désordres du système endocrinien, gastro-intestinal, pulmonaire ou rénal (Ruhoy et al., 2014). L'étude des manifestations cliniques est souvent la première étape du diagnostic d'un patient atteint du SL. Cependant, plusieurs méthodes de validation sont ensuite

envisagées afin de confirmer ce diagnostic. Après l'apparition des symptômes, une des premières étapes consiste à étudier les antécédents familiaux à la recherche de consanguinité ou de pathologies similaires. Ensuite, l'utilisation de techniques d'imageries permet de confirmer que les symptômes observés sont liés à des atteintes neurologiques spécifiques. En effet, l'IRM (imagerie par résonance magnétique) de pondération T2 permet de mettre en évidence des zones hyperintenses, de façon bilatérale et symétrique. Ces images sont caractéristiques de lésions cérébrales, principalement retrouvées au niveau des ganglions de la base (**Figure 20B**). D'autres régions comme le thalamus, le tronc cérébral et le cervelet peuvent également être touchées selon les patients. Ces lésions sont associées à une démyélinisation, une prolifération vasculaire et une réaction gliale.

A

Dystonia Spasticity Sensorinal hearing loss Epilepsy Liver dysfunction	Dyskinesia Ophtalmoplegia Ataxia	Ophtalmoplegia Spasticity Heart disease	Dystonia Spasticity Epilepsy Heart disease Renal dysfunction	Failure to thrive Ataxia Epilepsy	Dystonia Spasticity Epilepsy Central hypoventilation	Dystonia Sensorineural hearing loss Hyperhidrosis	Clinical
Basal ganglia Cerebellum	Basal ganglia Cerebellum Brainstem	Basal ganglia Thalamus Brainstem	Basal ganglia Thalamus Brainstem Cerebral cortex	Basal ganglia Brainstem	Basal ganglia Thalamus Brainstem Cerebellum	Basal ganglia	Neuroimaging
Variable complex deficiencies High 3-methylglutaconic acid in urine	CV deficiency	CI deficiency	CI deficiency	CIV deficiency COX deficiency on muscle histochemistry	Respiratory chain activity usually normal	Variable complex deficiencies High methylmalonic acid in urine	Laboratory
SERAC1	MT-ATP6	MT-ND	NDUF	SURF1	SLC19A3	SUCLA2	

B



**Figure 20 : Physiopathologie du syndrome de Leigh.**

A : Tableau résumant les symptômes, les atteintes neurologiques visibles en IRM et les marqueurs biochimiques associés au 7 principaux groupes de gènes mutés chez les patients atteints du syndrome de Leigh (adapté de Sofou et al., 2018). B : La présence de lésions au niveau des ganglions de la base est révélée par des signaux hyperintense en IRM T2 (flèches blanches) et est une caractéristique commune des patients atteint du syndrome de Leigh (Schubert Baldo et al., 2020).

L'IRM couplé à la spectrométrie par résonance magnétique permet de mettre en évidence une augmentation de la concentration en lactate (Saneto et al., 2008). En plus de l'imagerie, des analyses biochimiques de liquides biologiques peuvent être effectuées pour valider le diagnostic. Une acidose lactique ou une augmentation du ratio lactate/pyruvate dans le sang, l'urine ou le LCR, associés à une augmentation de la glycolyse, sont des marqueurs typiques des désordres de la chaîne respiratoire. On retrouve aussi communément une augmentation des concentrations en intermédiaires réactionnels du cycle de Krebs (Baertling et al., 2014). Si le phénotype clinique et biochimique n'est pas suffisamment révélateur, il est possible d'effectuer une biopsie musculaire afin de mesurer l'activité de la chaîne de phosphorylation oxydative, la consommation d'oxygène ou la production d'ATP dans le tissu (**Figure 20A**). La dernière étape consiste à identifier le défaut génétique du patient. Si le tableau clinique est caractéristique d'une mutation déjà identifiée, un séquençage direct du gène candidat est effectuée. Cependant, l'hétérogénéité des symptômes étant trop importante dans la grande majorité des cas, d'autres stratégies sont envisagées. Un séquençage complet de l'ADN mitochondrial est souvent réalisé en premier. Cela permet d'étudier plusieurs gènes candidats en une seule fois. Si aucune mutation n'est identifiée, un séquençage de gènes nucléaires fréquemment mutés est effectué. L'amélioration de l'accessibilité des techniques de séquençage nouvelle génération permet d'identifier plus rapidement et plus précisément les mutations. Ces méthodes permettent de séquencer plusieurs gènes en parallèle voire même tout l'exome (Baertling et al., 2014; Wagner et al., 2019).

L'établissement d'un diagnostic précis peut parfois prendre du temps car cela nécessite plusieurs étapes de validation jusqu'à l'identification de la mutation. Le diagnostic est cependant indispensable pour les patients et leur famille car il permet de mettre un nom sur la maladie, mais également d'adapter la prise en charge thérapeutique le plus tôt possible.

### IV.3. La prise en charge des patients atteints du syndrome de Leigh

Pour l'instant, il n'existe aucun traitement curatif pour les patients atteints du SL. Les stratégies thérapeutiques actuelles sont symptomatiques et visent à améliorer la qualité

de vie des patients.

Parmi les prises en charge actuelles, on distingue deux stratégies. La première est la médecine personnalisée. Elle est développée pour les patients présentant une mutation commune ou affectant la même protéine mitochondriale. Des agents pharmacologiques comme la thiamine et la biotine apportent par exemple des effets bénéfiques chez les patients présentant une mutation du gène *SLC19A3* (Haack et al., 2014; Ortigoza-Escobar et al., 2014). Une supplémentation en coenzyme Q10 permet une amélioration des déficits neurologiques chez les patients présentant un défaut associé à cette coenzyme (Van Maldergem et al., 2002).

La deuxième stratégie est communément appelée en anglais « one-size-fits-all ». Cette approche consiste à prendre en charge les patients de façon plus généralisée, indépendamment de leur défaut génétique. L'EPI-743, un analogue synthétique du coenzyme Q10 est un antioxydant qui a par exemple été administré à des patients atteints du SL et présentant des mutations différentes. Cette molécule améliore le tableau clinique et la qualité de vie des patients (Martinelli et al., 2012). D'autres agents antioxydants classiquement utilisés dans d'autres maladies mitochondriales comme l'idébénone sont maintenant envisagés pour le SL mais il n'existe pas de consensus sur le bénéfice apportés par ces traitements (Bakare et al., 2021). D'autres molécules peuvent être utilisées pour soulager des symptômes généralement retrouvés chez les patients atteints du SL. L'acidose et la dystonie peuvent par exemple être limités par certains agents pharmacologiques. Des médicaments antiépileptiques peuvent aussi être délivrés pour limiter les crises (Rahman et al., 2015).

Un autre aspect concerne la prise en charge psychologique des patients et de leur famille. La mise en place de soutien psychologique et le développement d'association de patients sont par exemple des éléments essentiels pour les malades et leur famille (Rahman et al., 2015).

De manière général, les options thérapeutiques sont largement limitées à l'amélioration de certains symptômes mais elles ne ralentissent pas la progression de la pathologie. La recherche de traitement efficace est notamment ralentie par la difficulté de mettre en place des essais cliniques dans le cas de pathologies génétiques rares et fatales comme le SL. En plus du faible nombre de patients présentant la maladie, la diversité des gènes et

des voies métaboliques impliquées complique la constitution de groupes expérimentaux homogènes. De plus, l'interprétation des résultats concernant les effets thérapeutiques doit être réalisée avec précaution car on observe des variations dans la présentation des symptômes au cours de l'évolution du SL (Gerards et al., 2015). Au vu de la sévérité de la pathologie et du ratio bénéfice risque évalué par les parents des patients, des essais cliniques de complaisance ont parfois lieu. Une étude montre par exemple que les symptômes neurologiques d'un enfant atteints du SL étaient améliorés après l'administration d'un analogue de la rapamycine (Sage-Schwaede et al., 2019). Les résultats de ce type d'étude doivent être confirmés lors d'essais cliniques plus large. Ainsi il est donc nécessaire de continuer d'effectuer des études pré-cliniques sur des modèles pertinents du SL afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## IV.4. Les modèles d'étude du syndrome de Leigh

### IV.4.a. Les modèles cellulaires et non murins du syndrome de Leigh

L'utilisation de modèles cellulaires permet d'évaluer directement la physiopathologie des patients atteints du SL. De plus, le fait que les cellules puissent être cultivées et manipulées en quantité importante permet de pratiquer des criblages d'agents pharmacologiques. Un modèle cellulaire classique consiste à utiliser des cellules directement issues de biopsie de patients. Des études biochimiques réalisées sur des cultures de fibroblastes ont par exemple montré que des mutations sur les gènes *ND6* ou *NDUFS4* conduisent à un défaut d'assemblage du complexe I (Ugalde et al., 2003; Leshinsky-Silver et al., 2009). Ces modèles cellulaires sont également pertinents pour développer des thérapies personnalisées. En effet, les cultures de fibroblastes conservent la mutation à l'origine du SL ce qui permet d'évaluer l'efficacité d'un traitement pour une mutation spécifique (Saada, 2011). Cependant, ce type cellulaire ne reflète pas nécessairement le phénotype pathologique observé dans d'autres tissus.

Pour pallier à cette limitation, des cellules souches pluripotentes reprogrammées à partir de fibroblastes de patients atteints du SL ont été développées (Galera et al., 2016; Grace et al., 2019). Ces modèles apportent la possibilité d'étudier les mécanismes moléculaires

de la pathologie sur une population cellulaire ou tissulaire spécifique. Des études ont par exemple récemment mis en évidence que ces cellules souches pluripotentes, dérivées de patients portant une mutation des gènes *MT-ATP6 SURF1* ou *NDUFS4*, peuvent être dérivées en cellules souches neurales tout en conservant la mutation pathologique et les défauts biochimiques liés à ces mutations (Lorenz et al., 2017; Inak et al., 2021).

D'autres modèles cellulaires moins spécifiques du SL permettent d'étudier de manière plus accessible les dysfonctionnements de la chaîne respiratoire. Parmi ces moyens, des inhibiteurs des différents complexes sont utilisés pour étudier des mécanismes moléculaires ou pour pratiquer des criblages d'agents thérapeutiques. La roténone, un inhibiteur du complexe I a par exemple été utilisé pour mimer les défauts génétiques associés à ce complexe sur des co-cultures de cellules neuronales et gliales (Liu et al., 2017 a). Cette stratégie permet d'étudier les mécanismes à l'origine de l'accumulation lipidique et d'évaluer l'effet d'un traitement antioxydant sur ce phénotype. Des inhibiteurs des complexes III et IV ont également été utilisés pour identifier des cibles génétiques médiant l'effet délétère du dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (Jain et al., 2016).

D'autres modèles basés sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et la drosophile sont également utilisés. La levure est principalement utilisée pour étudier les mutations sur les gènes codant les ARNt mitochondriaux de par leur homologie avec les formes humaines (Montanari et al., 2008). Cependant, ces levures ne possèdent pas de complexe I ce qui limite leur utilisation en tant que modèle de pathologie affectant celui-ci (Bakare et al., 2021). *Caenorhabditis elegans* est un organisme intéressant pour développer des modèles car son génome a été entièrement séquencé et il partage 83% d'homologie avec le génome humain. Ce nématode a par exemple été utilisé pour créer des modèles du SL en inactivant les homologues des gènes *Ndufs1*, *Ndufs2* et *NDUFS4* (Polyak et al., 2018; Maglioni et al., 2020). Son utilisation est cependant limitée à l'étude des mutations sur des gènes nucléaires car il a été montré que des mutations sur l'ADN mitochondrial de *Caenorhabditis elegans* n'induisent pas de phénotype pathologique (Tsang et al., 2003). Enfin, la drosophile est utilisée pour étudier les désordres cellulaires et moléculaires induits par des mutations de gènes associés au fonctionnement la chaîne respiratoire mitochondriale. Des modèles ont par exemple été générés en inactivant des homologues

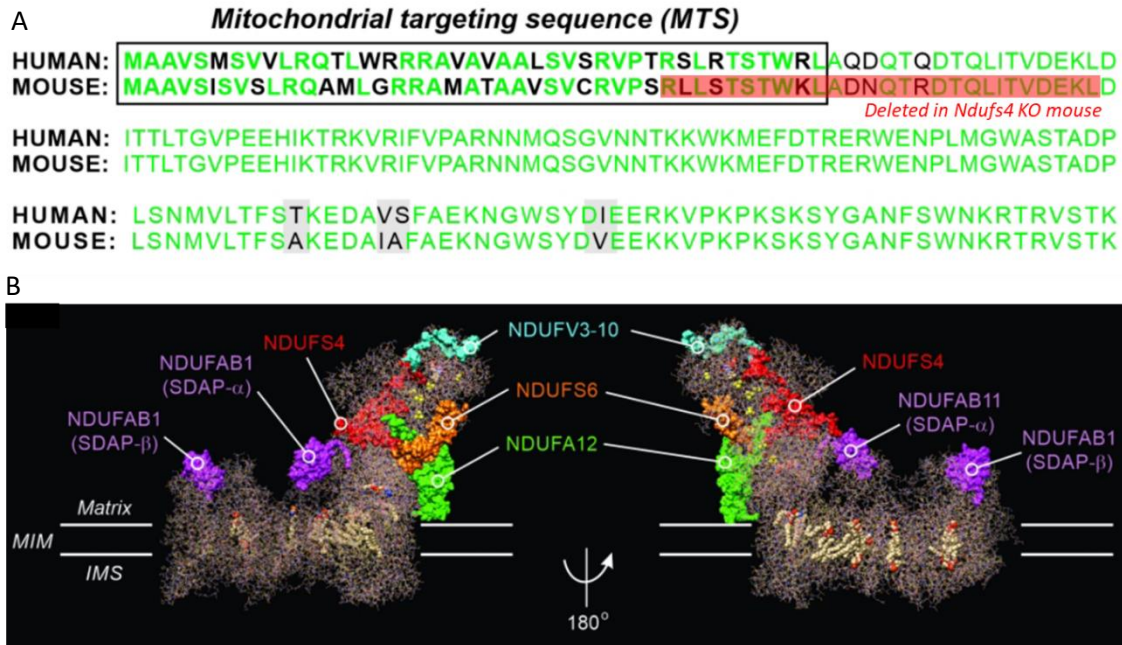
des gènes *SURF1* et *Ndufaf6* et *NDUFS4* associés au SL (Da-Rè et al., 2014; Liu et al., 2015; Foriel et al., 2018). Ils ont été utilisés pour étudier l'activité de la chaîne respiratoire, les mécanismes de neurodégénérescence et les déficits locomoteurs retrouvés chez les patients atteints du SL.

Ces modèles d'études permettent d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes pathologiques associés aux désordres mitochondriaux. Cependant, il est délicat de transposer directement ces conclusions à l'homme. Les études pré-cliniques réalisées sur ces modèles doivent donc être complétées et confirmées sur des modèles de mammifères.

#### IV.4.b. La délétion du gène *NDUFS4* chez la souris

C'est en 2008 que le modèle murin du SL reproduisant le plus fidèlement la pathologie humaine a été développé par l'équipe de Richard Palmiter (Kruse et al., 2008). Ce modèle est basé sur une délétion du gène *NDUFS4* dans tout l'organisme. Ce gène nucléaire est localisé sur le chromosome 5 chez l'humain et 13 chez la souris et code pour la protéine du même nom qui présente un haut degré d'homologie entre les 2 espèces (**figure 21A**). La séquence protéique contient 175 acides aminés dont 42 qui correspondent à la séquence d'adressage à la mitochondrie. Cette dernière est éliminée une fois la protéine importée générant ainsi une protéine de 133 acides aminés (van de Wal et al., 2021). Cette protéine de 18kDa est une des 45 sous unités du complexe I (**figure 21B**). Elle n'a pas de rôle enzymatique mais semble indispensable aux dernières étapes d'assemblage du complexe I (Kahlhöfer et al., 2021). Expérimentalement, le modèle murin est généré par délétion de l'exon 2 du gène *NDUFS4* qui code pour la fin de la séquence d'adressage mitochondriale et le début de la séquence codante protéique (**figure 21A**). Cette délétion induit un décalage du cadre de lecture empêchant la synthèse de la protéine *NDUFS4* mature. Les souris hétérozygotes sont indiscernables des souris sauvages mais leur croisement permet de générer des souris présentant une inactivation du gène sur les deux allèles (souris *NDUFS4* KO). Ces dernières développent alors une encéphalomyopathie fatale avec un phénotype pathologique similaire à celui observé chez les patients présentant des mutations du gène *NDUFS4* (**Figure 22A et F**) (Anderson et al., 2008; Leshinsky-Silver et al., 2009; Ortigoza-Escobar et al., 2016).





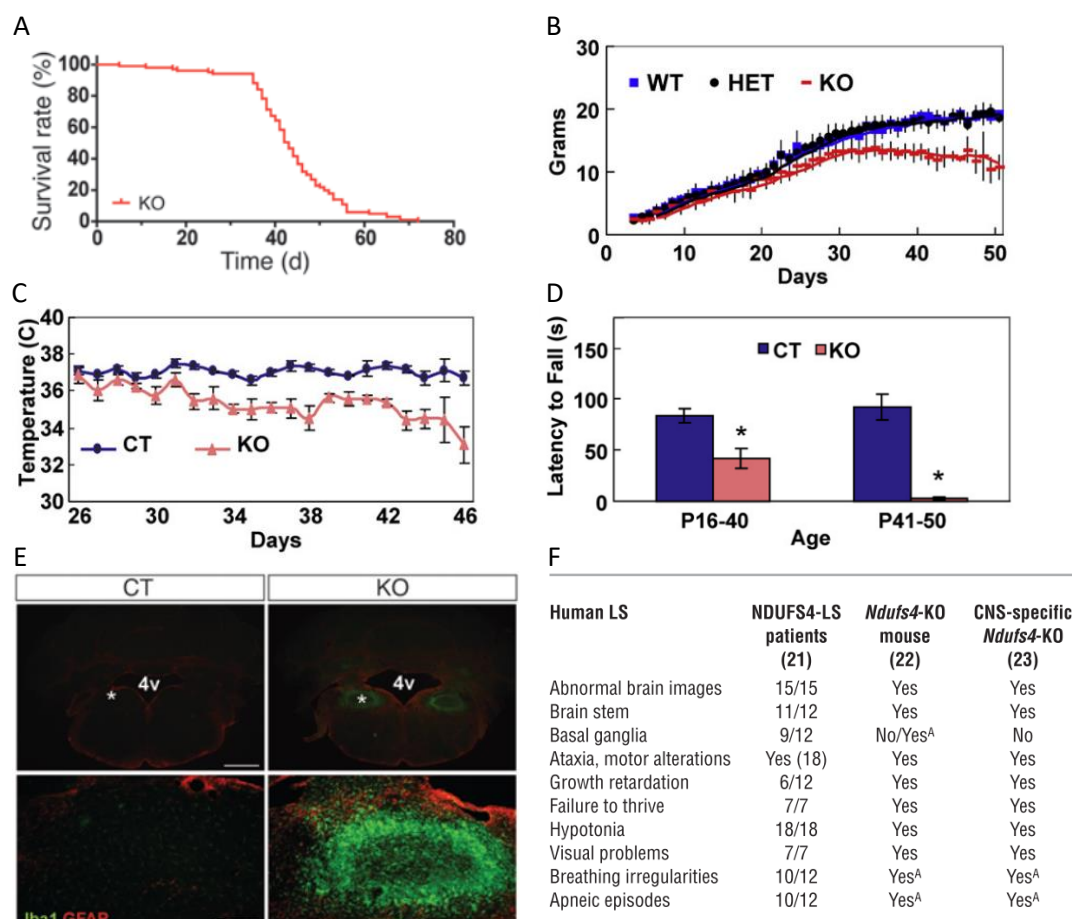
**Figure 21 : La séquence humaine et murine de la protéine NDUFS4 et sa localisation dans le complexe I.**

*A : Alignement des séquences protéiques humaines et murines de NDUFS4 ainsi que de son signal d'adressage mitochondrial. En rouge est surlignée la séquence qui est supprimée dans les souris NDUFS4 KO. Les acides aminés qui diffèrent entre les 2 séquences sont écrits en noir. B : Représentation de la structure du complexe I établie en cryo-microscopie électronique et mettant en avant la localisation de la protéine NDUFS4 (adapté de van de Wal et al., 2021).*

A partir de 20 jours, les souris NDUFS4 KO perdent leurs poils et sont plus petites que leurs congénères hétérozygotes et sauvages (**Figure 22B**). Autour de 30 jours, elles atteignent leur poids maximum d'environ 15g. Une hypothermie apparaît et leur activité locomotrice diminue progressivement (**Figure 22C et D**). A partir de 35 jours, les souris NDUFS4 KO perdent du poids et leur température corporelle continue de diminuer (**figure 22B et C**). Elles perdent progressivement la vue et développent une ataxie sévère. Elles meurent en moyenne à 50 jours en ayant perdu quasiment toute activité locomotrice (**Figure 22A et D**). Au niveau biochimique, l'activité du complexe I mitochondriale est variable selon les tissus. Elle n'est pas détectable dans le foie et le SNC et est réduite de moitié dans les muscles squelettiques. Cette diminution de l'activité est associée à une diminution de la quantité de complexe I dans sa forme intacte qui semble plus importante dans le foie et le SNC que dans le muscle (Kruse et al., 2008).

Afin d'étudier et de caractériser plus précisément le rôle du SNC dans le développement du phénotype pathologique, la même équipe a généré un modèle murin présentant une

délétion du gène *NDUFS4* dans le cerveau (Quintana et al., 2010). Ces souris présentent le même phénotype que les souris KO et meurent également à l'âge de 50 jours (**figure 22F**).



**Figure 22 : Présentation du phénotype pathologique des souris *NDUFS4* KO.**

A : Courbe de survie des souris *NDUFS4* KO. B : Courbe de poids des souris sauvages (WT), hétérozygotes (HET) et *NDUFS4* KO (KO) C : Courbe de température des souris sauvages (CT) et *NDUFS4* KO (KO) D : Comparaison du temps avant de tomber du rotarod entre les souris sauvages et les souris *NDUFS4* KO de 16 à 40 jours ou de 41 à 50 jours. E : Comparaison de la réaction gliale dans le noyau du vestibule des souris sauvages et *NDUFS4* KO par immunomarquage Iba1 (cellules microgliales) et GFAP (astrocytes). F : Tableau comparant les principaux phénotypes observés chez les patients atteints du syndrome de Leigh à cause d'une mutation sur le gène *NDUFS4* avec les modèles murins générés par inactivation constitutive ou spécifique au SNC du gène *NDUFS4*. (Kruse et al., 2008 et Quintana et al., 2012).

L'analyse histologique des tissus met en évidence une neurodégénérescence au niveau du tronc cérébral (noyau du vestibule, olive inférieure), du cervelet (noyau fastigial, vermis) et du bulbe olfactif. Ces régions présentent également une prolifération vasculaire et une

réaction gliale qui s'accroît au fur et à mesure de la progression de la maladie (**figure 22E**).

L'inactivation du gène *NDUFS4* dans des populations neuronales spécifiques a ensuite permis de mettre en évidence la contribution de chacune d'elles au phénotype létal des souris *NDUFS4* (Bolea et al., 2019).

L'inactivation spécifique du gène *NDUFS4* dans les neurones glutamatergiques ou GABAergiques induit un retard de croissance et la mort prématurée des souris alors que l'absence de *NDUFS4* dans les neurones cholinergiques conduit à un phénotype comparable aux souris contrôles. La délétion de ce gène dans les neurones glutamatergiques ou GABAergiques conduit à la mort des animaux à des âges similaires (70 jours en moyenne) mais les souris ne présentent pas le même tableau clinique. Dans le premier cas, la mortalité est associée à des déficits moteurs et une détresse respiratoire alors que dans le second c'est la répétition de crises d'épilepsie qui conduisait au décès. L'action concertée de ces populations neuronales conduit au phénotype pathologique observé chez les souris *NDUFS4* KO (Kruse et al., 2008; Quintana et al., 2010). La contribution des cellules gliales a également été évaluée. En réponse au stress oxydant provoqué par le dysfonctionnement des mitochondries neuronales, on trouve des gouttelettes lipidiques dans les astrocytes et les cellules microgliales du noyau du vestibule et du bulbe olfactif (Liu et al., 2015). Ces gouttelettes sont des bons marqueurs pathologiques car ils se forment à des stades précoces dans les régions qui seront plus tard touchées par la neurodégénérescence.

En plus des dommages prépondérants dans le cerveau, l'inactivation du gène *NDUFS4* conduit à un phénotype pathologique multi-systémique. Il a été montré que des souris avec une délétion du gène *NDUFS4* dans le cœur présentaient une hypertrophie ventriculaire (Chouchani et al., 2014). Malgré une diminution de 75% de l'activité du complexe I, cette délétion n'a pas d'impact sur la longévité des souris si elles ne sont soumises à aucun stress. Cependant, en cas de gestations répétées ou d'exercices physiques intensifs, ces souris présentent une augmentation des risques d'arrêt cardiaque (Karamanlidis et al., 2013). D'autres équipes ont montré que la délétion du gène *NDUFS4* conduit à la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine et la perte de la vision (Yu et al., 2015; Wang et al., 2020 a). Au niveau métabolique, la délétion du gène *NDUFS4*

induit une augmentation de la glycolyse au détriment de la  $\beta$ -oxydation provoquant l'accumulation sanguine d'acides gras et de lactate, des marqueurs pathologiques également retrouvés en clinique (Baertling et al., 2014; Jin et al., 2014).

Ce modèle d'étude récapitule donc en grande partie le tableau clinique présenté par les patients atteints du SL (**figure 22F**). De plus, il a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant du cerveau dans le développement d'une pathologie associée au dysfonctionnement du complexe I de la chaîne respiratoire. Pour ces raisons, les souris *NDUFS4 KO* ont largement été utilisées depuis, tant pour étudier les mécanismes à l'origine du développement de la maladie que pour étudier l'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques.

#### IV.4.c. Les autres modèles murins du syndrome de Leigh

D'autres modèles murins du SL ont également été développés afin d'étudier le phénotype engendré par d'autres mutations et de générer ainsi des modèles de plus en plus fidèles à la pathologie humaine.

Le premier a été développé en 1998 en inactivant constitutivement le gène *SOD2* codant pour la superoxyde dismutase mitochondriale, une enzyme qui catalyse la dégradation des ERO (Melov et al., 1998). Développé à l'origine comme un modèle de maladie neurodégénérative, il présentait des caractéristiques communes avec le SL, tant au niveau de la pathologie cérébrale (neurodégénérescence dans le tronc cérébral, réaction gliale) que celle des organes périphériques (hypertrophie cardiaque, accumulation de gouttelettes lipidiques dans le foie).

Afin d'avoir une meilleure similarité génétique, un modèle du SL a ensuite été développé par inactivation du gène nucléaire *SURF1*, les défauts du complexes IV étant largement associés à cette mutation chez les patients (Chang et al., 2020). Malgré un phénotype présentant une mortalité très précoce associée à un retard de croissance et une diminution des performances motrices, l'absence de pathologie cérébrale constitue une limite à son utilisation (Agostino et al., 2003).

Plus récemment, d'autres modèles murins du SL ont été développés. Tout d'abord par délétion totale du gène codant pour la protéine PARL (Presenilins-associated rhomboid-like protein), provoquant un défaut d'activité du complexe III et une neurodégénérescence sévère (Spinazzi et al., 2019). Ensuite, un autre modèle a été généré par délétion du gène *SDHC* codant pour une sous unité du complexe II de la chaîne respiratoire mais également indispensable au fonctionnement du cycle de Krebs. Cela conduisait à une létalité précoce et un phénotype de « Leigh-like syndrome » (Al Khazal et al., 2019). Enfin, la délétion du gène *NDUFS3* dans les neurones provoque un défaut d'activité du complexe I et une encéphalopathie fatale à cinq mois (Peralta et al., 2020).

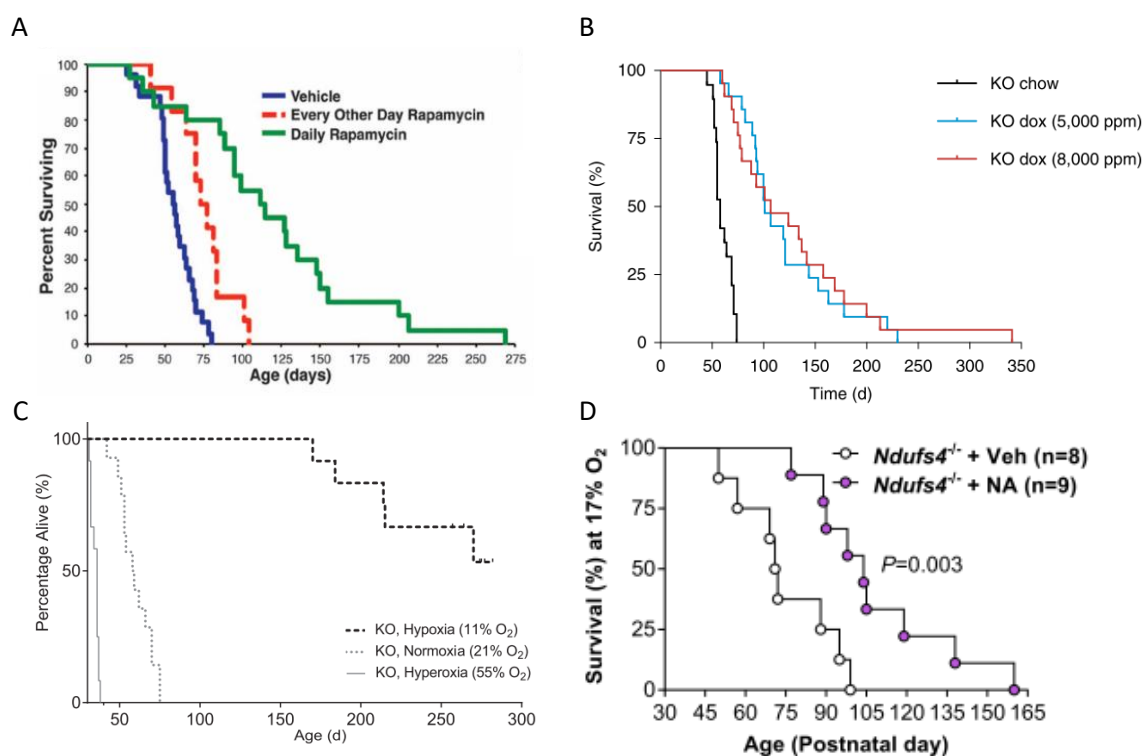
## IV.5. Les approches thérapeutiques pré-cliniques

### IV.5.a. Les approches thérapeutiques non génétiques

Les approches thérapeutiques non génétiques visent à développer de nouveaux agents thérapeutiques ou à évaluer la réponse à des molécules déjà utilisées dans d'autres applications. D'autres stratégies n'impliquent pas d'agents pharmacologiques et consistent à modifier l'environnement du sujet. L'effet thérapeutique apporté par ces approches n'est pas systématiquement médié par une amélioration des fonctions de la chaîne respiratoire.

L'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine est la première stratégie pré-clinique pharmacologique à avoir amélioré significativement le phénotype des souris *NDUFS4* KO (Johnson et al., 2013). Une injection intra-péritonéale quotidienne de rapamycine à partir de 20 jours double l'espérance de vie moyenne (**figure 23A**) et moins de 25% des animaux présentent des symptômes sévères avant leur mort. Ce traitement améliore significativement les performances motrices, prévient l'inflammation cérébrale et restaure des taux normaux de lactate, de pyruvate et d'intermédiaires de la glycolyse. Une délivrance par voie orale a ensuite été mise en place pour permettre un apport plus constant et linéariser la distribution de la rapamycine dans l'organisme. Un effet dose-réponse a été mis en évidence lors de cette étude (Johnson et al., 2015). Plusieurs mécanismes à l'origine des effets thérapeutiques ont été proposés et aucun n'implique une intervention directe sur la formation, la stabilité ou l'activité du complexe I. Ainsi, la

rapamycine permettrait d'activer la mitophagie, d'économiser l'ATP par inhibition de la synthèse protéique et de diminuer l'activité de la PKC afin de réduire l'inflammation (Zheng et al., 2016; Civileto et al., 2018; Martin-Perez et al., 2020). Malgré la démonstration du potentiel thérapeutique de la rapamycine, les doses nécessaires sont importantes et pourraient provoquer des effets secondaires graves et inévitables chez les jeunes enfants atteints du SL (Felici et al., 2017).



**Figure 23 : Synthèse des résultats de survie obtenus après mise en place de stratégies thérapeutiques non génétiques sur les souris NDUFS4 KO.**

A : Courbe de survie des souris NDUFS4 KO après injection de rapamycine tous les 2 jours (courbe rouge) ou tous les jours (courbe verte) (Johnson et al., 2013). B : Courbe de survie après supplémentation en doxycycline dans la nourriture des animaux NDUFS4 KO (dose basse en bleu et haute en rouge) (Perry et al., 2021). C : Courbe de survie des animaux NDUFS4 KO élevés en condition hypoxique, normoxique ou hyperoxique (Ferrari et al., 2017). D : Courbe de survie des animaux NDUFS4 KO élevés en hypoxie modérée et recevant ou non deux injections quotidiennes du précurseur du NAD<sup>+</sup> (Grange et al., 2021).

Une étude récente a mis en évidence un effet thérapeutique similaire suite au traitement des souris NDUFS4 KO avec la doxycycline (Perry et al., 2021) (**figure 23B**). Cette molécule, classiquement utilisée comme antibiotique, a été retenue après un criblage d'environ 5000 agents pharmacologiques car elle assurait la meilleure prolifération et survie d'un

modèle cellulaire de maladie mitochondriale. Ainsi, la doxycycline a été délivrée par voie orale à des animaux *NDUFS4* KO afin d'évaluer son potentiel thérapeutique sur un modèle murin du SL. Ce traitement prévient la mort neuronale et l'accumulation de protéines inflammatoires dans le cerveau des souris *NDUFS4* KO. Ces effets bénéfiques sont associés à une augmentation de la longévité des souris *NDUFS4* KO. Le mécanisme à l'origine de l'effet thérapeutique n'est pas clairement défini mais là encore il n'implique pas la restauration de l'activité du complexe I. L'hypothèse principale est que la diminution de l'activité de traduction mitochondriale par la doxycycline augmente la survie cellulaire et atténue les processus d'inflammation.

D'autres stratégies pharmacologiques agissant directement sur la chaîne respiratoire ou le cycle de Krebs ont été évaluées. Plusieurs études sur les souris *NDUFS4* KO ont par exemple mis en avant les effets bénéfiques sur la survie et le délai de progression de la maladie par augmentation de la biodisponibilité du NAD<sup>+</sup> (Felici et al., 2014; Lee et al., 2019; McElroy et al., 2020). Une autre approche expérimentée sur les souris *NDUFS4* KO consiste à limiter les conséquences d'un dysfonctionnement mitochondrial avec des molécules antioxydantes (Liu et al., 2015; De Haas et al., 2017). Ces traitements permettent d'améliorer les performances motrices mais ils ne préviennent pas les lésions cérébrales et n'augmentent pas la survie des animaux.

Une autre stratégie thérapeutique pré-clinique non génétique a été testée sur les souris *NDUFS4* KO. Elle n'implique pas l'utilisation de molécules pharmacologiques mais consiste à modifier l'environnement des animaux afin de les placer en condition hypoxique. A cause des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'apport d'O<sub>2</sub> est trop important par rapport à sa consommation. Celui-ci s'accumule et induit des effets toxiques par l'intermédiaire des ERO. L'objectif de cette stratégie est donc d'étudier si la diminution de la pression en O<sub>2</sub> induit un effet thérapeutique. Dans une première étude, les souris *NDUFS4* KO ont été exposées de manière chronique à un environnement hypoxique constitué de seulement 11% d'O<sub>2</sub> (équivalent à une altitude de 4500m). Les résultats révèlent que cette approche prévient le développement du phénotype pathologique (Jain et al., 2016). Les animaux *NDUFS4* KO présentent une croissance normale et des aptitudes locomotrices comparables à celles des souris contrôles. Leur survie moyenne est de 250 jours soit 5 fois plus que les souris *NDUFS4* KO élevées en

condition de normoxie (Ferrari et al., 2017) (**figure 23C**). Au niveau histologique et biochimique, les souris *NDUFS4* KO en hypoxie présentent peu voire pas de lésions ou d'inflammation cérébrale et des concentrations sanguines en lactate proches des souris contrôles (Jain et al., 2016; Ferrari et al., 2017). Le mécanisme à l'origine de l'effet thérapeutique n'implique aucune restauration de l'activité du complexe I. Une étude récente suggère que c'est la diminution de la pression en O<sub>2</sub> qui permet de restaurer le phénotype pathologique plutôt que l'activation de la voie de signalisation cellulaire de l'hypoxie (Jain et al., 2019 a). D'autres preuves de concept de l'efficacité de la diminution de l'apport en oxygène ont été apportées comme l'exposition chronique à des faibles doses de monoxyde de carbone ou la phlébotomie pour provoquer une anémie. (Jain et al., 2019)

Ces conditions expérimentales sont difficilement reproductibles en clinique. De plus, il a été montré que des protocoles plus facilement applicable comme l'exposition à des concentrations intermédiaires en O<sub>2</sub> (17%) ou une exposition intermittente à l'hypoxie n'était pas suffisant pour apporter un effet thérapeutique (Ferrari et al., 2017). Il a cependant été démontré que la combinaison de plusieurs approches pouvait pallier dans une certaine mesure à ce problème. L'exposition à une pression intermédiaire en O<sub>2</sub>, combinée à la supplémentation en NAD<sup>+</sup> permet une amélioration du phénotype pathologique des souris *NDUFS4* KO. Le bénéfice reste cependant moins important qu'en condition hypoxique avec une survie moyenne de 104 jours (Grange et al., 2021) (**figure 23D**).

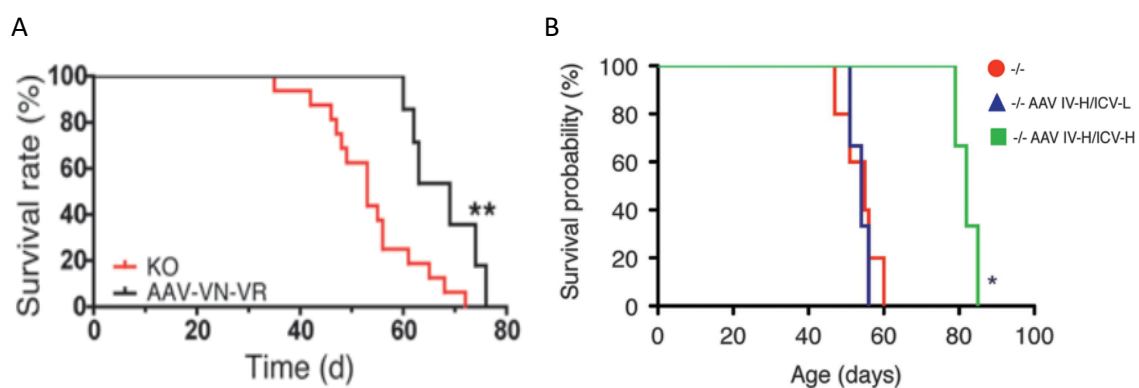
#### IV.5.b. Les approches thérapeutiques génétiques

Comme pour les autres maladies mitochondriales, la thérapie génique est une stratégie permettant de corriger de façon durable le défaut primaire à l'origine du SL. Deux approches ont été expérimentées sur les souris *NDUFS4* KO. Elles impliquent toutes les deux la restauration du gène *NDUFS4* par un vecteur AAV mais diffèrent par la méthode et l'âge d'injection.

La première stratégie a été de procéder à des injections stéréotaxiques dans le noyau du vestibule, une zone présentant des lésions importantes (Quintana et al., 2012). Un vecteur AAV1 codant l'ADNc *NDUFS4* de souris a ainsi été injecté bilatéralement chez des souris



*NDUFS4* KO âgées de 21 jours. Ce traitement permet de ralentir l'apparition du phénotype pathologique et induit une légère augmentation de la durée de vie moyenne des souris (53 jours pour les souris KO contre 69 pour les souris traitées) (**figure 24A**). L'analyse histologique des tissus met en évidence une réduction de la réaction microgliale et des lésions tissulaires dans la zone d'injection. Cependant, chez les souris les plus âgées, des lésions apparaissent dans le striatum et provoquent tout de même la mort des animaux. Ce résultat suggère que des lésions se développent plus lentement dans certaines parties et que la restauration de l'expression du gène dans une plus grande partie du cerveau est nécessaire pour augmenter la survie des animaux.



**Figure 24 : Synthèse des résultats de survie obtenus après mise en place de stratégies thérapeutiques génétiques sur les souris *NDUFS4* KO.**

*A* : Comparaison des courbes de survie des animaux *NDUFS4* KO (KO) et *NDUFS4* KO ayant reçus une injection bilatérale dans le noyau du vestibule, à 21 jours, d'un vecteur viral AAV1 codant l'ADNc *NDUFS4* (AAV-VN-VR) (Quintana et al., 2012). *B* : Comparaison des courbes de survie des souris *NDUFS4* KO non traitées et *NDUFS4* KO ayant reçues à leur naissance une injection d'un vecteur AAV9 codant l'ADNc *NDUFS4*, à la fois par voie intraveineuse et intracérébroventriculaire. La courbe bleue correspond à une dose haute en intraveineux et basse en intracérébroventriculaire et la courbe verte correspond à des doses hautes pour les deux modes d'injection (Di meo et al., 2017).

La deuxième stratégie consistait à injecter un vecteur AAV9 codant pour le gène *NDUFS4* humain chez des souris *NDUFS4* KO durant la période post-natale par différentes voies d'injection (Di Meo et al. 2017). La première voie étudiée a été la circulation sanguine. Contrairement aux études précédentes démontrant que cette approche permettait au vecteur AAV9 de transduire les cellules du SNC, aucune expression du transgène n'était ici retrouvée dans le cerveau. Des quantités importantes de protéine *NDUFS4* étaient cependant présentes dans les muscles squelettiques et le cœur. Cela permettait une

restauration de l'activité du complexe I dans ces organes, toutefois insuffisante pour prolonger la survie des animaux. Pour améliorer la transduction cérébrale, le vecteur viral a été injecté dans le LCR. Cette méthode permet une restauration de l'expression du gène *NDUFS4* dans le cerveau mais pas dans les autres organes. Cela permet de restaurer environ 60% de l'activité du complexe I dans le cerveau. Ce traitement améliore légèrement la coordination motrice mais n'a aucun effet sur la survie des animaux. Dans le but de restaurer l'expression du gène *NDUFS4* dans tout l'organisme, l'injection dans le LCR a donc été combinée avec une injection intraveineuse. La combinaison des deux modes d'injections est la seule stratégie permettant une amélioration de l'espérance de vie médiane des souris *NDUFS4* KO (53 jours pour les souris contrôles contre 86 jours pour les souris traitées) (**figure 24B**). La reexpression du gène *NDUFS4* dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques est associée à la restauration de l'activité du complexe I dans ces organes. Ce traitement corrige en partie le retard de croissance et améliore la coordination motrice des souris *NDUFS4* KO. L'analyse histologique des régions cérébrales transduites par le vecteur viral après une injection intracérébroventriculaire montre que le transgène est exprimé dans le bulbe olfactif et le cervelet mais pas dans le noyau du vestibule, ni dans le striatum et le thalamus, des régions critiques du SL. Cette étude suggère donc que pour améliorer la survie des animaux, la délivrance du transgène dans le SNC doit être encore plus large. De plus, le fait que seule la combinaison des deux modes d'injections permette d'augmenter la survie suggère que la restauration du gène dans les organes périphériques est un facteur impliqué dans l'effet thérapeutique.

Ces études mettent en évidence le potentiel thérapeutique d'une stratégie de thérapie génique. Néanmoins, les effets limités sur la survie des souris *NDUFS4* KO indiquent qu'il est nécessaire d'utiliser de nouveaux outils afin de restaurer l'expression du transgène dans une large partie du cerveau et dans les organes périphériques.

---

# Objectifs

---

Face à la nécessité de développer des traitements pour les maladies mitochondriales sévères telles que le SL, les études pré-cliniques permettent d'évaluer le potentiel thérapeutique de différentes approches. Ainsi, l'objectif de ma thèse a été de développer de nouvelles stratégies de thérapie génique sur un modèle murin du SL. Mon hypothèse est qu'une large restauration de l'expression du gène, en particulier dans le cerveau, permettra d'exercer un effet thérapeutique sur les souris *NDUFS4* KO. Un des challenges majeurs de la thérapie génique pour les pathologies impliquant le SNC est d'acheminer le transgène dans de larges régions du cerveau en tenant compte de l'imperméabilité de la BHE pour les vecteurs viraux. Ainsi, la première partie de mon travail consistera à évaluer la perméabilité de la BHE chez les souris *NDUFS4* KO dans le but d'adapter les stratégies de thérapie génique. La deuxième partie consistera à restaurer l'expression du gène *NDUFS4* le plus largement possible, en particulier dans le cerveau des souris *NDUFS4* KO. Pour cela, nous utiliserons deux approches, la première est d'apporter le transgène grâce au vecteur AAV-PHP.B. La deuxième approche est de permettre à un vecteur AAV9 de transduire le cerveau grâce à la perméabilisation transitoire et réversible de la BHE par les USF. Si des effets thérapeutiques sont observés, j'étudierai la capacité des mitochondries à être échangées entre les cellules, mécanisme qui pourrait participer aux éventuels bénéfices apportés par la thérapie génique.

## **Objectif 1 :**

Le premier objectif de ma thèse est d'évaluer la perméabilité de la BHE chez les souris *NDUFS4* KO. Ce paramètre n'a en effet jamais été étudié sur des modèles animaux de maladies mitochondriales sévères. Or, il a déjà été montré que des défauts de fonctionnement mitochondriaux, en particulier en condition de stress aiguë, peuvent conduire à une augmentation de perméabilité de la BHE. Ce phénotype doit être considéré à la fois d'un point de vue pathologique mais aussi thérapeutique. En effet une augmentation de la perméabilité de la BHE chez les souris *NDUFS4* KO conduirait à adapter les stratégies thérapeutiques pour acheminer le vecteur viral dans le cerveau. Nous

évaluerons donc la perméabilité de la BHE de ces souris de plusieurs manières. Tout d'abord nous étudierons la morphologie des vaisseaux sanguins constituant la BHE. Ensuite nous évaluerons la perméabilité de la BHE face à un vecteur AAV9 puis face à des molécules endogènes ou exogènes qui ne sont pas capables de traverser la BHE en condition physiologique.

### **Objectif 2 :**

Indépendamment des résultats obtenus lors de l'objectif 1, il est important d'évaluer le potentiel thérapeutique de nouvelles stratégies permettant d'améliorer la délivrance des vecteurs viraux dans le cerveau. Le deuxième objectif sera donc d'étudier si la restauration du gène défectueux à la fois dans les organes périphériques et dans le cerveau grâce au vecteur AAV-PHP.B permet d'exercer un effet thérapeutique sur les souris *NDUFS4* KO. Nous évaluerons l'effet de cette stratégie sur les phénotypes biochimiques, histologiques, comportementaux et sur la survie des animaux.

### **Objectif 3 :**

Si le deuxième objectif apporte une preuve de concept de l'efficacité de la restauration du transgène dans le cerveau des souris *NDUFS4* KO, le troisième objectif sera de mettre au point et d'étudier l'effet d'une stratégie qui pourrait être transposée en clinique. Pour cela nous combinerons l'utilisation d'un vecteur AAV9 avec l'application d'USF pour perméabiliser transitoirement la BHE. Afin de répondre à cet objectif nous aurons plusieurs étapes.

La première étape sera de déterminer la dose de vecteur viral à injecter. Le but est d'utiliser une dose permettant une expression du transgène suffisamment forte dans les organes périphériques en considérant qu'une partie sera redirigée vers le cerveau après application des USF. La deuxième étape sera de définir les paramètres d'USF permettant de perméabiliser la BHE sans causer de dommages. Ces paramètres seront déterminés sur des souris contrôles et éventuellement ajustés aux souris *NDUFS4* KO en fonction des résultats de l'objectif 1. La dernière étape sera d'étudier l'effet de la thérapie génique sur les souris *NDUFS4* KO en combinant l'injection du vecteur viral AAV9 codant pour le transgène thérapeutique à l'application des USF selon les paramètres déterminés.

**Objectif 4 :**

Si nous parvenons à mettre en évidence un effet thérapeutique, nous étudierons si le transfert intercellulaire de mitochondries participe à celui-ci. Il a déjà été démontré que les mitochondries pouvaient être échangées entre les cellules mais ce mécanisme n'a jamais été étudié dans un contexte de thérapie génique. Notre hypothèse est que ce transfert pourrait participer à l'effet thérapeutique en complément de celui apporté par le remplacement du gène. Afin de confirmer cette hypothèse, l'objectif sera de mettre en place un système fiable, reproductible et sain permettant d'étudier le transfert de mitochondries à la fois *in vitro* et *in vivo*.

---

# Résultats

---

## I. Etude de la perméabilité de la BHE chez les souris *NDUFS4*

### I.1. Contexte et résumé de l'étude

Le premier objectif était d'étudier la perméabilité de la BHE chez les souris *NDUFS4* KO. En effet, il a été montré qu'un stress mitochondrial pouvait être à l'origine d'une augmentation de la perméabilité de la BHE mais ce phénotype n'a jamais été étudié dans des modèles animaux de maladies mitochondriales sévères.

Nous avons choisi d'étudier ce phénotype chez les souris *NDUFS4* KO car c'est un modèle murin du syndrome de Leigh très bien caractérisé sur lequel a été testé de nombreuses stratégies thérapeutiques. D'un point de vue physiopathologique, l'impact du dysfonctionnement mitochondrial engendré par cette mutation sur la perméabilité de la BHE n'a cependant jamais été étudié. D'un point de vue thérapeutique, ce paramètre doit être considéré pour deux raisons. Tout d'abord, si des dysfonctionnements de la BHE existent, cela pourrait être considéré comme une cible thérapeutique. Ensuite, si la perméabilité de la BHE est augmentée, cela pourrait faciliter l'accès des traitements au cerveau.

Nous avons tout d'abord étudié la BHE des souris *NDUFS4* KO au niveau anatomique. Pour cela, nous avons utilisé des marqueurs membranaires des cellules endothéliales. Nous n'avons pas observé de différence morphologique des vaisseaux sanguins du cerveau entre les souris *NDUFS4* KO et les souris sauvages.

Pour étudier la perméabilité de la BHE au niveau fonctionnel, nous avons tout d'abord procédé à une injection intraveineuse de vecteur AAV9-CAG-GFP chez des souris *NDUFS4* KO et des souris WT. Deux semaines après l'injection du vecteur, les cerveaux et les foies ont été prélevés afin d'étudier la distribution du vecteur viral par immunomarquage et western blot de la GFP. Comme précédemment décrit, celle-ci était exprimée dans le foie

chez les deux génotypes de souris. Dans le cerveau la GFP n'était pas exprimée, ni chez les souris WT, ni chez les souris *NDUFS4* KO. Ce résultat indique qu'à cet âge, la BHE des souris *NDUFS4* KO est aussi imperméable que celle des souris WT aux vecteurs AAV9.

Afin d'évaluer la perméabilité de la BHE pour des molécules de taille inférieure, nous avons utilisé du bleu Evans. Ce colorant forme un complexe d'environ 3,5nm avec l'albumine qui ne passe pas la BHE en conditions physiologiques. Ce colorant a été injecté chez des souris WT et *NDUFS4* KO âgées d'un mois ainsi que chez des souris WT âgées de 14mois. Ces dernières ont été utilisées comme contrôle positif car il a été montré que le vieillissement induit une augmentation de la perméabilité de la BHE. 24h après l'injection, nous avons prélevé les cerveaux et les foies pour procéder à des mesures spectrophotométriques et des analyses microscopiques. Contrairement aux résultats obtenus chez les souris WT âgées de 14 mois, nous n'avons pas observé de pénétration du bleu Evans dans le cerveau des souris WT et *NDUFS4* KO âgée d'un mois.

Pour évaluer les défauts qui pourraient se manifester à plus long terme, nous avons donc examiné directement l'albumine endogène. La localisation de cette molécule a été évaluée par immunofluorescence et western blot sur les 3 groupes d'animaux. Ces analyses n'ont pas mis en évidence d'albumine dans les cerveaux des deux génotypes de souris âgées d'un mois. Ce résultat montre que la BHE des souris *NDUFS4* KO est imperméable à cette molécule.

En conclusion, ces résultats montrent que la perméabilité de la BHE ne semble pas augmentée chez ce modèle murin du SL. Cette étude suggère qu'une stratégie de thérapie génique par remplacement du gène dans tout l'organisme et en particulier dans le cerveau implique de trouver des moyens pour faire passer le vecteur viral à travers la BHE.

Dans cette étude, j'ai réalisé l'intégralité des expériences.

*N.B.* Cette partie a été rédigée et mise en page sous forme d'article qui sera soumis avant la soutenance de ma thèse.

I.2. Article 1: Blood brain barrier permeability is not affected in a mouse model of severe mitochondrial disease.



*Title:*

Blood brain barrier permeability is not affected in a mouse model of severe mitochondrial disease.

*Authors:*

Robin Reynaud Dulaurier <sup>1</sup>, Mathilde Faideau <sup>1</sup>, Michael Decressac <sup>1\*</sup>

*Affiliations:*

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut Neurosciences, 38000 Grenoble, France

\* Correspondence to: Michael Decressac; E-mail: [michael.decessac@inserm.fr](mailto:michael.decessac@inserm.fr)

*Keywords:* Blood-brain barrier, mitochondrial disease, Leigh syndrome, AAV vector

## **Abstract**

The blood brain barrier (BBB) plays an important physiological role in maintaining the central nervous system (CNS) homeostasis. It allows the selective permeability for nutrient and neurotransmitter while preventing the entry of neurotoxic agents. This protective function makes the BBB a major obstacle for gene therapy aimed at delivering a viral vector from the vascular milieu to the CNS. Impaired BBB permeability was observed in aging, age-related conditions and several inherited conditions and could be considered as a benefit in order to facilitate the delivery of therapeutic agents in the brain. In the context of mitochondrial diseases, integrity of the BBB has never been assessed in a mouse model. In this study, we examined the anatomical and functionality integrity of the BBB in the *NDUFS4* KO mouse model of Leigh syndrome, a severe mitochondrial condition. Our results indicated that BBB integrity was preserved and therefore was unlikely to contribute to the pathophysiology of Leigh syndrome. Moreover, this suggests that gene therapy strategies aimed at restoring gene expression in the CNS of *NDUFS4* KO mice, and possibly other models of mitochondrial dysfunction, require specific tools to bypass the BBB.

## Introduction

The blood brain barrier (BBB) is a semi permeable barrier created by endothelial cells of the brain vessels establishing an interface between vascular milieu and the central nervous system. Endothelial cells are supported by pericytes, both surrounded by a continuous, non-fenestrated basal lamina and astrocytic end-feet. Complex tight junctions between endothelial cells restrict the paracellular transport and force the molecules to take a transcellular route. Except small gaseous molecules or small lipophilic agents, the transcellular traffic requires the presence of specific transport systems, allowing the entry of nutrients, ions or neurotransmitters. Exchanges are highly regulated in order to maintain a brain microenvironment appropriate for a proper neuronal function. The BBB also acts as a protective barrier preventing the entry from blood-circulating neurotoxic and refluxing many of these agents via ABC energy-dependent efflux transporters (ATP-binding cassette transporters) (Abbott et al., 2006).

Disruption of the BBB usually results in a higher blood brain vessel permeability and consequently to an increased vulnerability of the brain parenchyma to toxic endogenous or exogenous molecules. BBB disruption has been reported in many conditions including physiological aging or aging-related diseases such as neurodegenerative diseases or diabetes (Bogush et al., 2017; Sweeney et al., 2018; Yang et al., 2020 a). Besides, recent studies focused on the BBB integrity in genetic disorders and found BBB breakdown for instance in Huntington's disease, X-linked adrenoleukodystrophy, cerebellar ataxia or genetic induced schizophrenia. (Di Pardo et al., 2017; Lee et al., 2018 a; Duarte Lobo et al., 2020; Crockett et al., 2021).

In the context of mitochondrial dysfunction, the integrity of the BBB remains elusive. Mitochondria are responsible for energy metabolism through oxidative phosphorylation involving the respiratory chain complexes. Several studies showed that pharmacological inhibition of complex I or III activity in endothelial cells was responsible for an increase in BBB permeability both *in vitro* and *in vivo* (Doll et al., 2015; Alelwani et al., 2020). In pathological conditions, it has been demonstrated that mitochondrial dysfunction in endothelial cells was, at least partly, responsible for BBB failure during ischemic stroke or septic encephalopathy (Doll et al., 2015; Haileselassie et al., 2020). Among the heterogeneous family of mitochondrial diseases, CoQ10 deficiency has been showed to be responsible for a severe BBB disruption in an *in vitro* model (Wainwright et al., 2020). The increased BBB permeability was associated with a disruption of the tight junction.

However, the BBB status has never been assessed in a mouse model of inherited mitochondrial disease.

Therefore, we choose to evaluate the integrity of the BBB in the most commonly studied Leigh syndrome mouse model, namely the *NDUFS4* knock out (KO) mouse (Kruse et al., 2008; van de Wal et al., 2021). This mouse model is of particular interest because the brain phenotype is severe and some pathological hallmark such as inflammation or lipid droplet accumulation could be associated with an increased BBB permeability (Quintana et al., 2010; Liu et al., 2015; Bolea et al., 2019; Farmer et al., 2020).

In contrast to its pathological consequence, disruption of the BBB can also be considered as a therapeutic opportunity. It has been estimated that more than 90% of small therapeutic molecule are not able to cross the BBB (S. Hersh et al., 2016). This include viral vectors used in gene replacement strategies for CNS disorders (Liu et al., 2021 a). Thus, an increased permeability of the BBB could be a benefit in order to facilitate the entry of therapeutic agents inside the brain. Several pre-clinical studies based on small molecule have been tested and showed remarkable therapeutic effect in *NDUFS4* KO mice (Johnson et al., 2013; Grange et al., 2021; Perry et al., 2021). However, conflicting results exists in the literature regarding the ability of theses compound to cross the BBB (Banerjee et al., 2011; Zhang et al., 2014). Thus, we wondered whether their therapeutic effects were facilitated by an increased in BBB permeability that allowed them to penetrate the brain. Other studies developed gene replacement strategy to reinstate *NDUFS4* gene expression in *NDUFS4* KO mice (Quintana et al., 2012; Di Meo et al., 2017; Reynaud-Dulaurier et al., 2020; Silva-Pinheiro et al., 2020). All of them used different method to bypass the BBB in order to restore gene expression in the brain. However, they did not check the BBB integrity. Depending on this phenotype, we could hypothesize that the therapeutic strategy could be adapted in *NDUFS4* KO mice and in other severe mitochondrial diseases.

In this study, we first assessed the morphology of the blood vessels that constitutes the BBB. Then, we evaluated the BBB permeability for molecules of different size. We first studied the BBB permeability for AAV vector. Then we performed an analysis of smaller exogenous and endogenous markers of BBB integrity. Our results showed that *NDUFS4* KO mice BBB was not impaired, suggesting that this phenotype do not to contribute to the pathophysiology of Leigh syndrome at the age of one month. This study also supports the relevance of strategies allowing therapeutic agents to cross the BBB.

## Material and methods

### *Animals*

*NDUFS4* heterozygous mice were obtained from the Jackson Laboratories (stock number 27058) and bred to produce *NDUFS4*-KO offsprings. Mice were genotyped at 2 weeks of age using the protocol from Jackson Laboratories and the following primers: wild-type forward: AGTCAGCAACATTTTGGCAGT, common: GAGCTTGCCTAGGAGGAGGT, mutant forward: AGGGGACTGGACTAACAGCA. In order to provide warmth and social interaction, *NDUFS4*-KO mice were housed with a minimum of one control littermate. Water bottles with long tip and food on the bottom of the cage were provided for each cage containing KO mice so that access to food and water was not a limiting factor for survival. Mice were observed every other day and euthanized if they showed a 20% loss in maximum body weight, lethargic behaviour, or were found prostrate or unconscious. All experimental procedures were reviewed and approved by the French ministry of higher education, research and innovation (APAFIS#32148-2021052010141059 v4) in accordance with the law on animal experimentation (article R.214-87 to R.214-126) and the ARRIVE guidelines.

### *Evans blue assay*

One-month-old *NDUFS4* KO mice, aged-matched littermates and 14-months old WT mice were anesthetized with isoflurane (3% for control mice and 0.5% for *NDUFS4*-KO mice due to their hypersensitivity (Quintana et al., 2012)). Evans blue was prepared as 4% solution in PBS and was injected as a single bolus dose of 2ml/kg via the retro-orbital sinus. After 24h hours, mice were deeply anesthetized by intra-peritoneal injection of pentobarbital (1 ml/kg) and transcardially perfused through the ascending aorta with PBS and tissues were processed for histological and biochemical analyses.

### *Histological analysis of Evans Blue distribution*

One brain hemisphere and one lobe of the liver were post-fixed in 4% paraformaldehyde (in PBS) during 5 days and cryoprotected overnight in 30% sucrose (in PBS). Then, they were embedded in OCT and cut on a cryostat (Thermo Fisher Scientific CryoStar NX50). Brains were cut as 35µm thick sections and collected in an antifreeze solution. Livers were cut as 12µm thick sections and directly mounted on Superfrost slides (Thermo Fisher Scientific). Nuclei were stained with DAPI (5 µg/mL in PBS) (Invitrogen) for 5 minutes

before being rinsed five times with PBS. Sections were coverslipped using the Dako fluorescent mounting medium (DAKO, Agilent).

#### *Analysis of Evans Blue content by spectroscopy*

The protocol was adapted from (Wang et al., 2014). One other brain hemisphere and one liver lobe were weighed and incubated in 50% trichloroacetic acid (at 1:4 weight-volume ratio) overnight under agitation to extract Evans Blue from tissues. The samples were centrifuged for 30 minutes at 10,000 rpm to pellet the tissue and supernatants were collected in separate tubes. Absorption of the supernatant was measured at a wavelength of 620 nm using a PHERAstar FS plate reader (BMG LABTECH).

#### *Adeno-associated viral vector production, titration and injection*

HEK293T cells grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin were triple transfected with pHHelper (#240071, Agilent Technologies), pAAV-CAG-GFP (a gift from Edward Boyden, catalog number 37825, Addgene, Watertown, MA, USA), and pAAV2/9n (a gift from James M. Wilson, catalog number 112865, Addgene, Watertown, MA, USA) plasmids using polyethylenimine (Polyscience Inc., #23966, pH=7.0). After 72h, media and cells were collected and processed separately. Cells were lysed in a hypotonic buffer and nuclei were pelleted by centrifugation. Nuclear pellet was lysed and genomic DNA was degraded through sonication followed by incubation with DNase (1UI/ $\mu$ L) and RNase (1mg/mL). Media was filter in a Stericup 0.22 $\mu$ m PES membrane and AAV particles were precipitated with polyethylene glycol 8000 and collected by centrifugation. AAV vector from media and cells were then purified using discontinuous iodixanol gradient ultracentrifugation. Viral particles were collected using a syringe attached to a 22G needle to pierce into the centrifugation tube between the 40% and 60% layers. The viral vector solution was then washed in PBS and concentrated using a Millipore Amicon Ultra filter unit (#UFC910008, 100kD).

For the titration, all extra-viral DNA was removed by digestion with DNase I (1unit/ $\mu$ L). Then, the viral DNA was released by lysis with 2M NaOH. RT-qPCR was performed using the SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) and primers against the ITRs (Forward: GACCTTTGGTCGCCCCGGCCT; Reverse: GAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC). The extracted viral DNA and a serial dilution of a viral plasmid containing ITRs as a standard were measured using the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System and the CFX Maestro Software (Bio-Rad, Hercules, CA). To

obtain the final concentration of the viral solution (expressed in vg (viral genome)/mL), the CT value of viral genome copies were calculated using the standard curve. The titer of the AAV9-CAG-GFP (AAV9-GFP) was  $6,11.10^{14}$  vg/mL.

#### *Adeno-associated viral vector injection*

At 4 weeks of age, *NDUFS4*-KO mice and control littermates were anesthetized with isoflurane as described above. Mice received an intravenous injection of the AAV9-GFP viral vector at a dose of  $5.10^{13}$  vg/kg (in PBS) through the retro-orbital sinus. Two weeks after this procedure, animals were sacrificed for histological and biochemical analyses.

#### *Tissue staining*

Mice were deeply anesthetized by intra-peritoneal injection of pentobarbital (1 ml/kg) and transcardially perfused through the ascending aorta with PBS and then with 4% paraformaldehyde diluted in PBS. Tissues were dissected and post-fixed during 24 hours at 4°C in 4% paraformaldehyde. Tissues were cryoprotected overnight in 30% sucrose (in PBS) before being embedded in OCT and cut on a cryostat (Thermo Fisher Scientific CryoStar NX50). Brains were cut as 35µm thick sections and collected in an antifreeze solution. Livers were cut as 12µm thick sections and directly mounted on Superfrost slides (Thermo Fisher Scientific).

Immunohistological staining was performed as previously described (Reynaud Dulaurier et al., 2020). Sections were rinsed in PBS before being incubated for 1 hour in PBS containing 10% normal goat serum and 0.25% Triton X-100. Tissues were then incubated overnight at room temperature in the same solution containing one of the following primary antibodies: anti-GFP (chicken, 1:2000, Abcam, #ab13970), anti-albumin (chicken, 1:1000, Abcam, #ab106582), anti-podocalyxin (goat, 1:1500, R&D Systems, AF1556) and anti-CD31 (goat, 1:500, R&D Systems, AF3628).

Sections were then washed three times in PBS and incubated in secondary antibodies coupled to Alexa 488 or Alexa 568 (1:300, Molecular Probes, Invitrogen) diluted in the blocking solution for 2 hours at room temperature. Sections were rinsed again and nuclei were stained with DAPI (5 µg/mL in PBS) (Invitrogen) for 5 minutes before being rinsed five times in PBS. Section were coverslipped using the Dako mounting medium (Agilent).

#### *Microscopy*

Images of the anatomical staining of the blood vessel were captured at 20-X objective magnification using the LSM 710 confocal microscope (Zeiss). All the other images were captured at 20X objective magnification using an AxioScan.Z1 slide scanner (Zeiss).

#### *Western blotting*

Tissues were homogenized in a lysis buffer (150mM NaCl, 25mM Tris-HCl (pH 7.4), 0,5%, Triton X-100, 0,5mM EDTA) and western blot analysis was performed as previously described (Reynaud Dulaurier *et al*, 2020). Protein concentration was measured using the Bio-Rad Dc protein assay. 10µg of protein were boiled at 95°C for 5 minutes in Laemmli buffer (Bio-Rad), separated on a SDS-PAGE gel and then electrotransferred (100V, 1 hour) on a PVDF membrane (pore size: 0,45µM) (Millipore). After blocking for 1 hour in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBS-T) and 5% non-fat dry milk, membranes were incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: GFP (chicken, 1:2000, Abcam, #ab290), calnexin (Rabbit, 1:5000, Enzo Life Science, ADI-SPA-860) or albumin (chicken, 1:1000, Abcam, #ab106582). After washing for 30 minutes in TBS-T, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with a HRP-conjugated secondary antibody (1:1000, Promega). Protein expression was revealed using the Clarity kit (Bio-Rad). Luminescence signal was detected using the ChemiDoc MP (Bio-Rad) and images were analysed with ImageJ software.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was conducted using the GraphPad Prism software (version 8). One-way ANOVA test with Tukey's multiple comparison test were performed to analyse the difference between experimental groups. The data were collected and processed in a blinded manner. No statistical methods were used to predetermine sample size, but our sample sizes are similar to those generally employed in the field. All values are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance was set at P<0.05.

#### *Data availability*

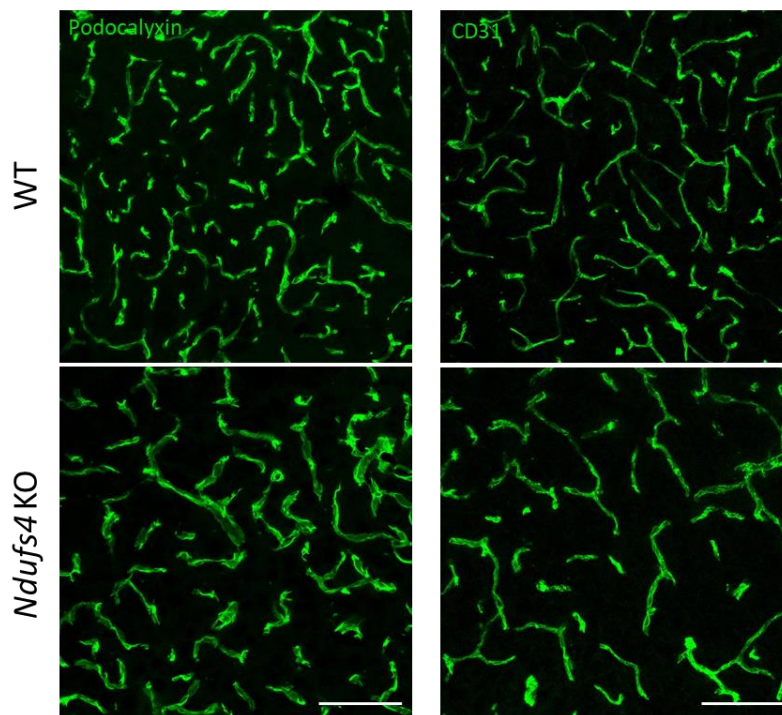
All the data and reagents (if not commercially available) that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.



## Results

### Anatomical analysis of the BBB in *NDUFS4* KO and WT mouse.

We first studied the morphology of the brain blood vessels of 1-month-old WT and *NDUFS4* KO mice. The study was performed with 1-month-old *NDUFS4* KO mice because preclinical gene therapy strategies were initiated at that age (Reynaud-Dulaurier et al., 2020; Silva-Pinheiro et al., 2020). Moreover, *NDUFS4* KO mice already developed an advanced pathology at 30 days (Kruse et al., 2008). We first performed immunostaining on sagittal brain slices of WT and *NDUFS4* KO mice. Brain slices were stained for podocalyxin and CD31, two membrane protein expressed by the endothelial cells and used in combination to study the brain vasculature (Kirst et al., 2020). Qualitative analysis of microscopic images showed no morphological difference between WT and *NDUFS4* KO mice either for podocalyxin or for CD31 (**figure 1**). This result showed that the BBB of adults *NDUFS4* KO mice was intact from a morphological point of view.



**Figure 1: Morphological comparison of the blood vessels in brain slices between WT and *NDUFS4* KO mice.**

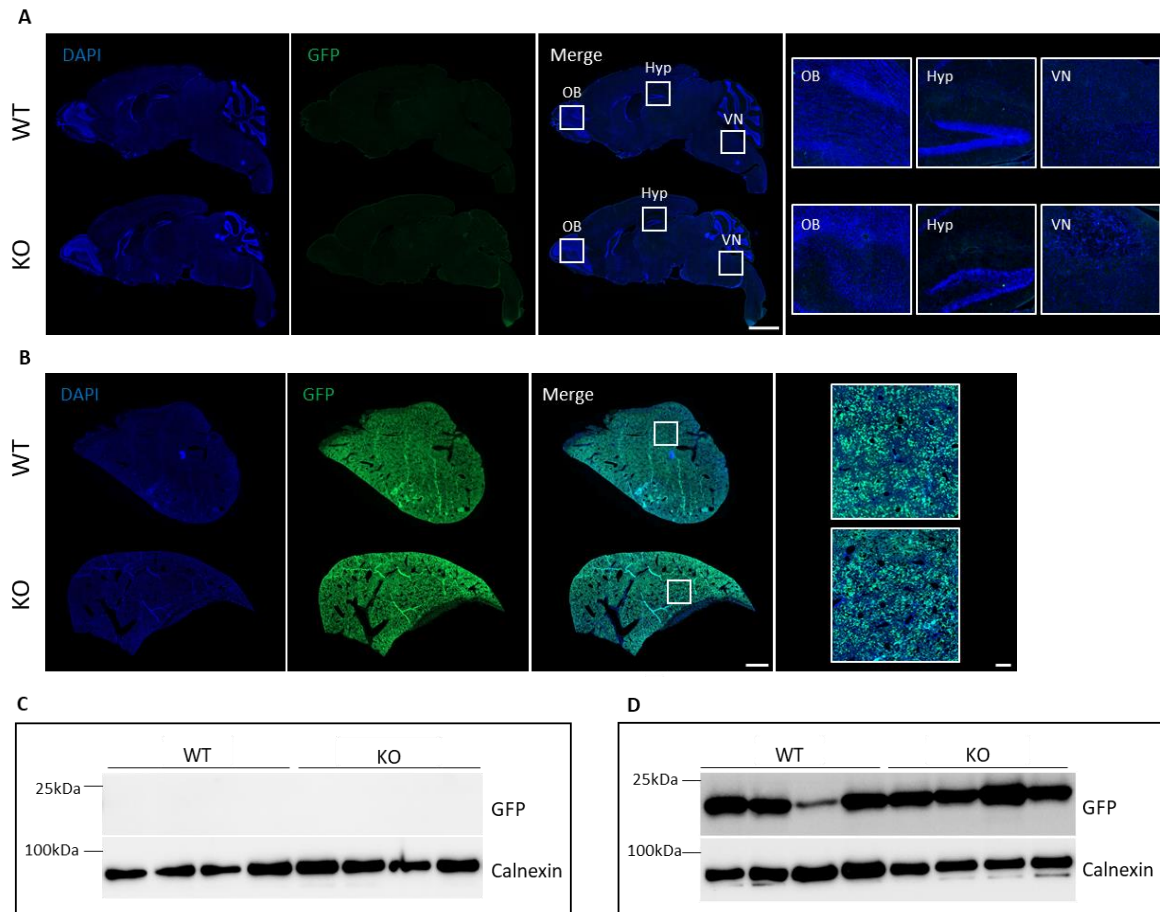
Representative microscopy images of WT or *NDUFS4* KO brain slices stained for podocalyxin or CD31. Scale bar: 100 $\mu$ M.

### **Analysis of BBB permeability for AAV9 vector in adults *NDUFS4* KO and WT mice.**

Then, we wanted to evaluate the permeability of the BBB in *NDUFS4* KO mice for molecules of different size. To study this phenotype, we first assessed the ability of an AAV vector to cross the BBB of adult *NDUFS4* KO mice. Previous study using neonate intravenous injection of AAV9 vector to reinstate *NDUFS4* expression showed that the transgene was not expressed in the brain (Di Meo et al., 2017). However, BBB permeability for AAV9 vector in adult *NDUFS4* KO mice has never been assessed. Thus, we performed an intravenous injection of AAV9-GFP vector in 1-month-old WT and *NDUFS4* KO mice. 2 weeks after the injection, mice were euthanized and brains and livers were collected. Histological and western blot analysis of the liver showed that GFP was widely expressed in this organ for both genotypes (**figure 2B and D**). This results confirm that the injections were performed correctly and that the viral vector is functional. Histological analysis of brain slices showed that GFP was not expressed in the brain of WT and *NDUFS4* KO mice (**figure 2A**). This result was confirmed by the western blot showing that GFP was not detected in both genotypes (**figure 2C**). Together, these results showed that AAV9 vector was not able to transduce the brain at this dose both in WT and in *NDUFS4* KO adult mice.

### **Evaluation of the BBB permeability of *NDUFS4* KO mice for small and endogenous molecules.**

Because of the large size of viral vectors (around 25 $\mu$ m), we could not conclude that the integrity of the BBB was fully maintained in *NDUFS4* KO mice. In order to assess the BBB permeability for smaller molecule, we first used Evans blue, a small dye with a strong affinity for albumin, a plasma protein of 66kDa, that do not cross the BBB in physiological condition and that is commonly used to assess vascular leakage in the brain (Wick et al., 2018). Evans blue has been injected intravenously in 1-month-old WT and *NDUFS4* KO mice and in 14-month-old WT mice. These latter mice were used as positive control for Evans blue extravasation in the brain because it has been shown that BBB permeability is increased in aged mice (Senatorov et al., 2019; Yang et al., 2020 a). To allow an uniform blood distribution of the Evans blue and to visualize vascular leakage, mice were euthanized 24h after the injection. Brains and livers were collected (**figure 3A**) to evaluate the Evans blue penetrance by spectrophotometry and microscopy. Quantitative analysis of the absorbance in brain samples showed no difference between *NDUFS4* KO mice and aged-matched littermates ( $0,049 \pm 0,002$  and  $0,053 \pm 0,003$  respectively) while the

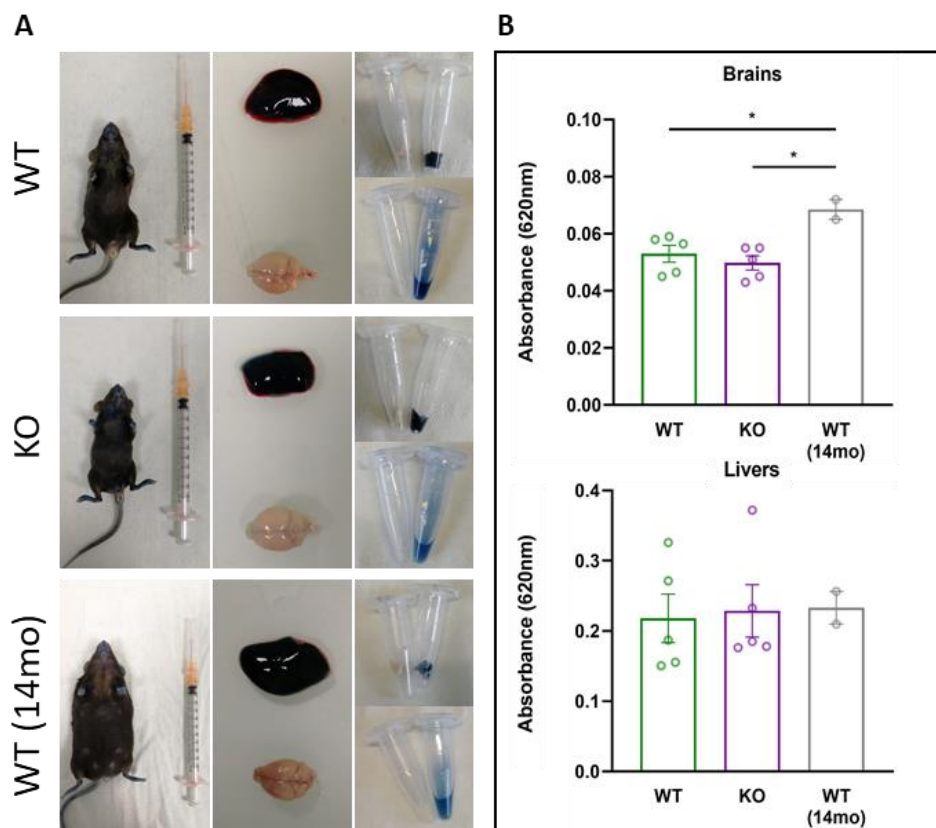


**Figure 2. GFP expression in the brain and liver two weeks after intravenous injection of an AAV9-GFP vector in 1-month-old WT or NDUFS4-KO mice.**

(A) Scanning microscope image of a representative sagittal section from WT and NDUFS4 KO mice brain showing the absence of GFP (green) expression and stained with DAPI (blue). Scale bar: 2mm. Right panel shows an enlargement of olfactory bulb (OB), hippocampus (Hyp) and vestibular nuclei (VN). Scale bar: 200 $\mu$ M. (B) Scanning microscope image of a representative liver section from WT and NDUFS4 KO mice showing the expression of GFP (green) and stained with DAPI (blue). Scale bar: 2mm. Right panel shows an enlargement of a representative area of the section. Scale bar: 200 $\mu$ M. (C) Western blots showing the expression level of GFP and calnexin in the brains of WT and NDUFS4 KO mice. (D) Western blots showing the expression level of GFP and calnexin in the liver of WT and NDUFS4 KO mice.

absorbance was significantly increased in 14-month-old WT mice ( $0,068 \pm 0,003$ , \* $P < 0,05$ ) (**figure 3B**). Measurement of the absorbance in the liver as a control of the injection showed that Evans blue levels were constant between the three groups (**figure 3B**). To assess Evans blue localization we performed a microscopy analysis. Evans blue fluorescence was detected in the liver for the three groups (**figure 4B**). In the brain, Evans blue was detected only in 14-month-old mice (**figure 4A**), especially in the olfactory bulb, the hippocampus and the brainstem. Together these results showed that after 24h, Evans

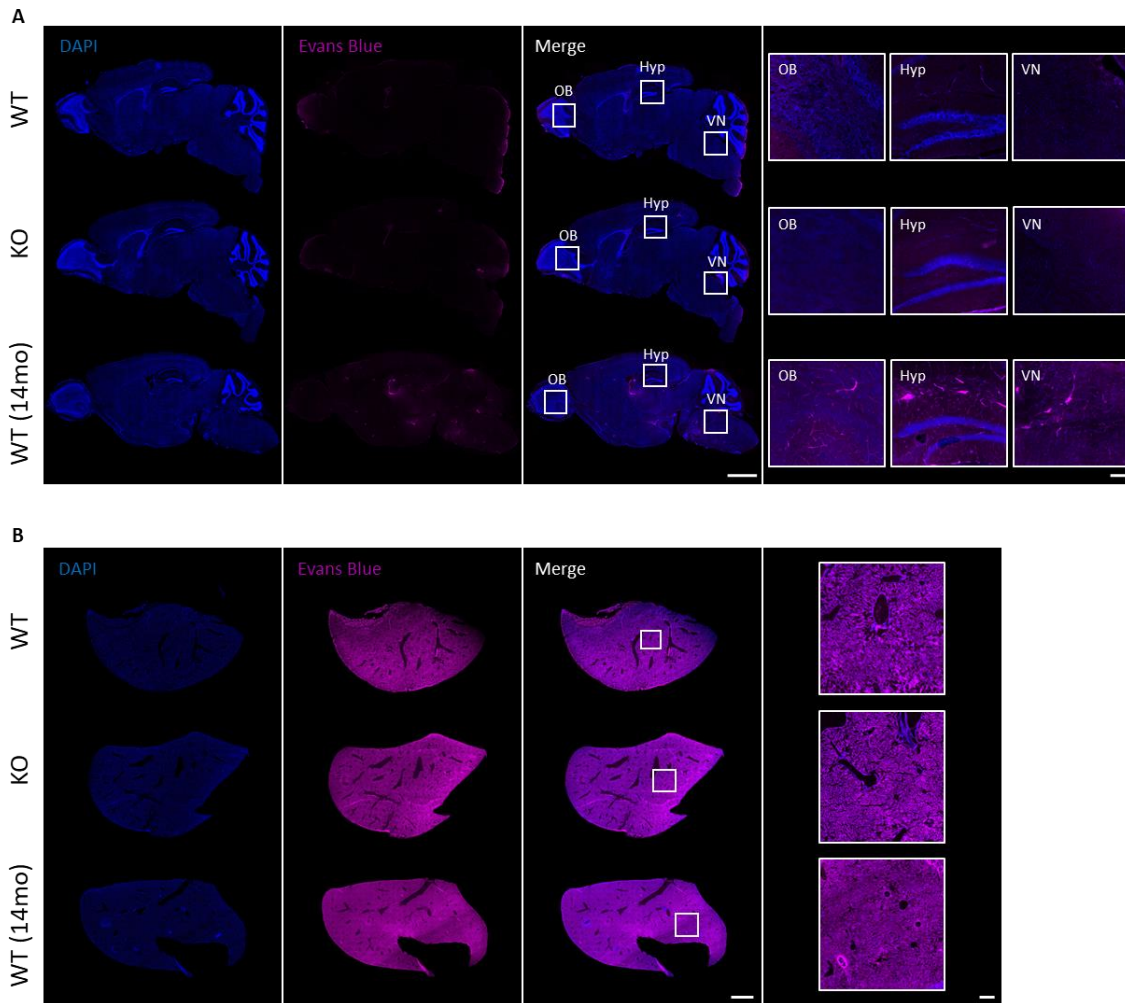
blue is not detected in the brain of *NDUFS4* KO mice. Considering the strong affinity of this dye for albumin, this suggests that the BBB impermeability for this blood protein is maintained, at least after 24h.



**Figure 3: Quantification of Evans Blue extravasation after intravenous injection.**

(A) Representative pictures of WT, *NDUFS4* KO and 14-month-old WT mice (left panel) and their organs of interest (middle panel) 24h after intravenous injection of Evans Blue. Representative pictures of the organs of interest (right panel), before (up) and 24h after incubation with trichloroacetic acid (below) for the extraction of Evans Blue from tissues. (B) Absorbance measurement at 620 nm of Evans Blue extracted from WT ( $n=5$ ), *NDUFS4* KO ( $n=5$ ) and 14-month-old WT ( $n=2$ ) brains and livers ( $*p<0,05$  One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test).

In order to evaluate the BBB leakage that may manifest over a longer timescale, we directly investigated the extravasation of endogenous albumin. This strategy makes it possible to assess the BBB permeability since the birth of *NDUFS4* KO mice. Immunostaining for albumin showed that this protein was not detected in the brain of 1-month WT and *NDUFS4* KO mice unlike what is observed in 14-month-old mice. In the brain of the latter, albumin was mainly located in the three regions in which Evans blue was also detected (**figure 4A and 5A**). Western blot analysis confirmed the absence of albumin in young adult mice brain

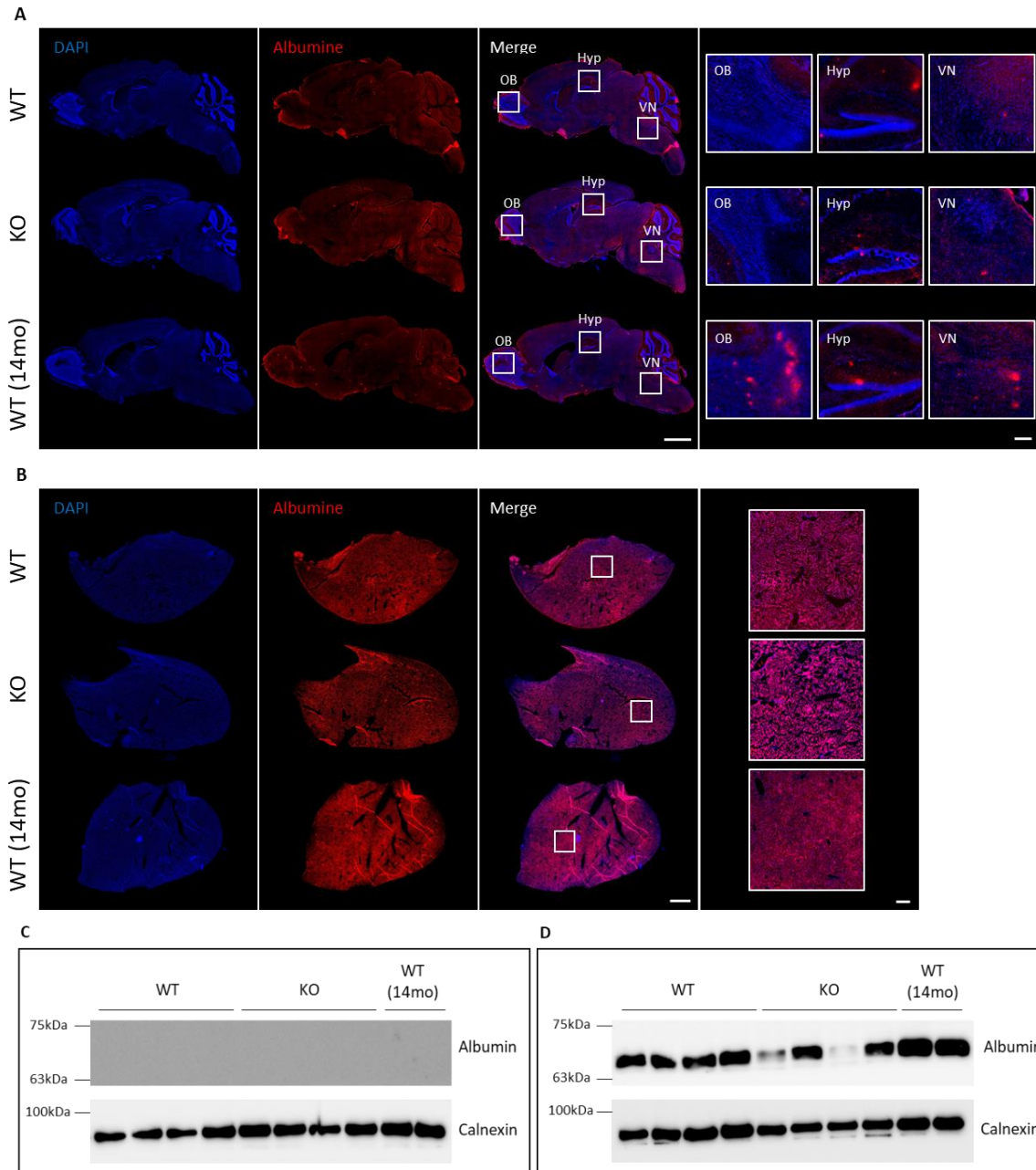


**Figure 4: Fluorescence visualization of Evans Blue extravasation.**

(A) Scanning microscope image of a representative sagittal section from WT, NDUF54 KO and 14-month-old WT mice brain stained with DAPI (blue) and imaged at 650nm excitation/670nm emission to detect Evans Blue fluorescence (pink) after intravenous injection of Evans Blue. Scale bar: 2 mm. Right panel shows an enlargement of olfactory bulb (OB), hippocampus (Hyp) and vestibular nuclei (VN). Scale bar: 200 $\mu$ M. (B) Scanning microscope image of a representative liver section from WT, NDUF54 KO and 14-month-old WT mice stained with DAPI (blue) and imaged at 650nm excitation/670nm emission to detect Evans Blue fluorescence (pink) after intravenous injection of Evans Blue. Scale bar: 2 mm. Right panel shows an enlargement of a representative area of the section. Scale bar: 200 $\mu$ M

for the two genotypes. However, the amount of albumin in 14-month old-mice brain was likely too low to be detected in western blot. We could also hypothesize that the experimental setup was not optimized for the detection of this protein (**figure 5C**). Analysis of albumin expression in the liver, the organ that synthesizes this protein, shows that it was widely expressed in the three groups (**figure 5B and D**). Thus, these results showed that BBB of NDUF54 KO mice at 1 month of age is impermeable to this endogenous molecule.





**Figure 4: Endogenous albumin quantification and localization.**

(A) Scanning microscope image of a representative sagittal section from WT, NDUF54 KO and 14-month-old WT mice brain showing the expression of albumin (red) and stained with DAPI (blue). Scale bar: 2mm. Right panel shows an enlargement of olfactory bulb (OB), hippocampus (Hyp) and vestibular nuclei (VN). Scale bar: 200 $\mu$ M. (B) Scanning microscope image of a representative liver section from WT, NDUF54 KO and 14-month-old WT mice showing the expression of albumin (red) and stained with DAPI (blue). Scale bar: 2mm. Right panel shows an enlargement of a representative area of the section. Scale bar: 200 $\mu$ M. (C) Western blots showing the expression level of albumin and calnexin in the brains of WT, NDUF54 KO and 14-month-old WT mice. (D) Western blots showing the expression level of albumin and calnexin in the liver of WT, NDUF54 KO and 14-month-old WT mice.

## Discussion

The increase in BBB permeability is a pathological phenotype found in many CNS-related conditions but it has never been assessed in the context of severe mitochondrial diseases (Sweeney et al., 2018). We found that the BBB of 1-month old *NDUFS4* KO mice was anatomically similar to that of WT littermate. We also showed that an intravenous delivery of an AAV9 vector was not able to transduce the brain parenchyma at this age. Finally, our results indicated that Evans blue and albumin, two markers of BBB integrity, were not able to cross the BBB of *NDUFS4* KO mice.

While many studies used Evans blue or other exogenous tracer to evaluate BBB integrity, we thought that it was important to check its permeability for endogenous plasma protein. Evans blue is useful to detect BBB disruption following acute injury but the detection of endogenous plasma proteins is better to assess abnormal passage over a longer period of time (Doll et al., 2015; Saunders et al., 2015; Yang et al., 2020 a). Our data showed that the impermeability of the BBB in *NDUFS4* KO mice is sufficient to prevent the entry of endogenous albumin. Consistent with previous report, we found clusters of albumin in the brain of healthy older mice (Senatorov et al., 2019; Yang et al., 2020 a). However, we were not able to detect albumin in the brain of these mice in our western blot experiment. The small amount of protein can explain this result and several technical options can be considered to ameliorate the detection. First, we could perform the experiment with samples isolated from brain regions where albumin is enriched such as the olfactory bulb or the hippocampus. Second, we could adapt the western blot protocol by increasing the amount of protein loaded, by changing the primary antibody or by improving the chemiluminescent detection or change for another way of visualization (*i.e.* by fluorescence).

We wanted to evaluate the BBB integrity of *NDUFS4* mice for two reasons. First of all, an extensive characterization of the pathological phenotype of *NDUFS4* KO mice have been made, especially in the brain, but the BBB state has never been assessed (Kruse et al., 2008; Quintana et al., 2010; Bolea et al., 2019; Johnson et al., 2020). The second reason that prompt us to assess the BBB integrity was therapeutic. It was important to evaluate this phenotype to potentially adapt future therapeutic interventions. In this study, we found that the mitochondrial dysfunction induced by *NDUFS4* deletion was not responsible for BBB disruption. Thus, brain inflammation and lactate accumulation that are pathological hallmarks of *NDUFS4* KO mice do not seem to be induced by an increased in BBB

permeability (Quintana et al., 2010; Johnson et al., 2020). Interestingly, these results are in contrast with previous studies showing that complex I inhibition with pharmacological compounds was responsible for BBB disruption (Doll et al., 2015; Alelwani et al., 2020). We hypothesize that the residual activity of complex I in *NDUFS4* KO mice is sufficient to maintain the BBB integrity (van de Wal et al., 2021). Contrary to other studies using *in vivo* model of stroke or sepsis, our data suggests that mitochondrial dysfunction caused by a genetic alteration responsible for a severe pathology is not responsible for BBB impairment (Doll et al., 2015; Haileselassie et al., 2020).

From a therapeutic view, our study showed that previous gene replacement studies that used strategies to overcome the limited capacity of AAV vectors to cross the BBB were coherent (Quintana et al., 2012; Di Meo et al., 2017; Reynaud-Dulaurier et al., 2020; Silva-Pinheiro et al., 2020). The maintenance of BBB integrity in *NDUFS4* KO mice must also be considered for the pharmacological strategies. Previous studies have shown therapeutic effect with compound that do not seem to cross efficiently the BBB such as rapamycin or tetracycline (Johnson et al., 2013; Zhang et al., 2014; Perry et al., 2021). Thus, we could wonder whether the benefits could be increased by facilitating the brain entry of these drugs.

It is important to point out that our study explored the integrity of the BBB in 1-month-old *NDUFS4* KO mice and we cannot exclude that BBB dysfunction could occur at latter stages of the disease. Interestingly, Evans blue and albumin were detected in 14 month-old mice in brain regions that are mainly affected by inflammation and neurodegeneration in *NDUFS4* KO mice (*i.e.* olfactory bulb and vestibular nucleus) (Quintana et al., 2012). Thus, we could hypothesize that *NDUFS4* KO mice would have later developed a BBB dysfunction in these regions, as accelerated aging process induced by mitochondrial dysfunction. For the therapeutic strategies, even if BBB permeability was impaired after this age, it seems too late to start a treatment given the advanced progression of the pathology and the short life expectancy of these mice.

To confirm that BBB permeability is not increased in mitochondrial diseases, it could be interesting to evaluate this phenotype in animal models presenting mutations in other gene involved in the respiratory chain. CoQ<sub>10</sub> deficient mice could be good candidates as it has been shown that BBB was disrupted in cultured brain endothelial cells treated with an inhibitor of CoQ<sub>10</sub> biosynthesis (Wainwright et al., 2020).



Overall, our study suggests that BBB permeability is not impaired in this mouse model of a severe mitochondrial disease. The generalization of this conclusion need confirmation in other Leigh syndrome mutations and models of mitochondrial diseases (Agostino et al., 2003; Al Khazal et al., 2019). This study also supports the necessity to find strategies allowing therapeutic agents to cross the BBB in order to treat the pathological phenotype in the brain.

## Acknowledgments

The authors want to thank Mrs Beatrice Blot for help with plasmids preparation. We also thank the Photonic Imaging Centre of Grenoble Institute Neurosciences (Univ. Grenoble Alpes – Inserm U1216) which is part of the ISdV core *facility and* certified by the *IBiSA* label. This work was supported by the Inserm and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-JCJC program, grant #ANR-17-CE37-0008-01. M.D is supported by an IDEX Chair of Excellence from the University of Grenoble-Alpes. M.D laboratory is member of the Grenoble centre of Excellence in Neurodegeneration.

## Authors contribution

R.R.D, and M.F performed the experiments; R.R.D and M.D prepared figures, designed experiments, analysed the results and wrote the manuscript.

All authors discussed the results and commented on the manuscript at all stages.

## Reference

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Agostino, A., Invernizzi, F., Tiveron, C., Fagiolari, G., Prella, A., Lamantea, E., Giavazzi, A., Battaglia, G., Tatangelo, L., Tiranti, V., & Zeviani, M. (2003). Constitutive knockout of Surf1 is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome c oxidase deficiency in mice. *Human Molecular Genetics*, 12(4), 399–413.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddg038>
- Al Khazal, F., Holte, M. N., Bolon, B., White, T. A., LeBrasseur, N., & Maher, L. J. (2019). A conditional mouse model of complex II deficiency manifesting as Leigh-like syndrome. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(12), 13189–13201. <https://doi.org/10.1096/fj.201802655RR>
- Alelwani, W., Elmorsy, E., Kattan, S. W., Babteen, N. A., Alnajeebi, A. M., Al-Ghafari, A., & Carter, W. G. (2020). Carbamazepine induces a bioenergetics disruption to microvascular endothelial cells from the blood-brain barrier. *Toxicology Letters*, 333(March), 184–191.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.08.006>
- Banerjee, S., Gianino, S. M., Gao, F., Christians, U., & Gutmann, D. H. (2011). Interpreting mammalian target of rapamycin and cell growth inhibition in a genetically engineered mouse model of Nf1-deficient astrocytes. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(2), 279–291.  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0654>
- Bogush, M., Heldt, N. A., & Persidsky, Y. (2017). Blood Brain Barrier Injury in Diabetes: Unrecognized Effects on Brain and Cognition. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 12(4), 593–601. <https://doi.org/10.1007/s11481-017-9752-7>
- Bolea, I., Gella, A., Sanz, E., Prada-Dacasa, P., Menardy, F., Bard, A. M., Machuca-Márquez, P.,

- Eraso-Pichot, A., Mòdol-Caballero, G., Navarro, X., Kalume, F., & Quintana, A. (2019). Defined neuronal populations drive fatal phenotype in a mouse model of Leigh syndrome. *ELife*, *8*, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.47163>
- Crockett, A. M., Ryan, S. K., Vásquez, A. H., Canning, C., Kanyuch, N., Kebir, H., Ceja, G., Gesualdi, J., Zackai, E., McDonald-McGinn, D., Viaene, A., Kapoor, R., Benallegue, N., Gur, R., Anderson, S. A., & Alvarez, J. I. (2021). Disruption of the blood-brain barrier in 22q11.2 deletion syndrome. *Brain*, *144*(5), 1351–1360. <https://doi.org/10.1093/brain/awab055>
- Di Meo, I., Marchet, S., Lamperti, C., Zeviani, M., & Viscomi, C. (2017). AAV9-based gene therapy partially ameliorates the clinical phenotype of a mouse model of Leigh syndrome. *Gene Therapy*, *24*(10), 661–667. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.53>
- Di Pardo, A., Amico, E., Scalabrì, F., Pepe, G., Castaldo, S., Elifani, F., Capocci, L., De Sanctis, C., Comerci, L., Pompeo, F., D'esposito, M., Filosa, S., Crispi, S., & Maglione, V. (2017). Impairment of blood-brain barrier is an early event in R6/2 mouse model of Huntington Disease. *Scientific Reports*, *7*(January), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep41316>
- Doll, D. N., Hu, H., Sun, J., Lewis, S. E., Simpkins, J. W., & Ren, X. (2015). Mitochondrial Crisis in Cerebrovascular Endothelial Cells Opens the Blood–Brain Barrier. *Stroke*, *46*(6), 1681–1689. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009099>
- Duarte Lobo, D., Nobre, R. J., Oliveira Miranda, C., Pereira, D., Castelhana, J., Sereno, J., Koeppen, A., Castelo-Branco, M., & Pereira De Almeida, L. (2020). The blood-brain barrier is disrupted in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: Evidence from transgenic mice and human post-mortem samples. *Acta Neuropathologica Communications*, *8*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00955-0>
- Farmer, B. C., Walsh, A. E., Kluemper, J. C., & Johnson, L. A. (2020). Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, *14*(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00742>
- Grange, R. M. H., Sharma, R., Shah, H., Reinstadler, B., Goldberger, O., Cooper, M. K., Nakagawa, A., Miyazaki, Y., Hindle, A. G., Batten, A. J., Wojtkiewicz, G. R., Schleifer, G., Bagchi, A., Marutani, E., Malhotra, R., Bloch, D. B., Ichinose, F., Mootha, V. K., & Zapol, W. M. (2021). Hypoxia ameliorates brain hyperoxia and NAD<sup>+</sup> deficiency in a murine model of Leigh syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*, *133*(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.03.005>
- Haileselassie, B., Joshi, A. U., Minhas, P. S., Mukherjee, R., Andreasson, K. I., & Mochly-Rosen, D. (2020). Mitochondrial dysfunction mediated through dynamin-related protein 1 (Drp1) propagates impairment in blood brain barrier in septic encephalopathy. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1689-8>
- Johnson, S. C., Kayser, E. B., Bornstein, R., Stokes, J., Bitto, A., Park, K. Y., Pan, A., Sun, G., Raftery, D., Kaeberlein, M., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2020). Regional metabolic signatures in the NDUFS4(KO) mouse brain implicate defective glutamate/ $\alpha$ -ketoglutarate metabolism in mitochondrial disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *130*(2), 118–132. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.03.007>
- Johnson, S. C., Yanos, M. E., Kayser, E. B., Quintana, A., Sangesland, M., Castanza, A., Uhde, L., Hui, J., Wall, V. Z., Gagnidze, A., Oh, K., Wasko, B. M., Ramos, F. J., Palmiter, R. D., Rabinovitch, P. S., Morgan, P. G., Sedensky, M. M., & Kaeberlein, M. (2013). MTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science*, *342*(6165), 1524–1528. <https://doi.org/10.1126/science.1244360>
- Kirst, C., Skriabine, S., Vieites-Prado, A., Topilko, T., Bertin, P., Gerschenfeld, G., Verny, F., Topilko, P., Michalski, N., Tessier-Lavigne, M., & Renier, N. (2020). Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature. *Cell*, *180*(4), 780–795.e25.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.028>

- Kruse, S. E., Watt, W. C., Marcinek, D. J., Kapur, R. P., Schenkman, K. A., & Palmiter, R. D. (2008). Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency Develop a Fatal Encephalomyopathy. *Cell Metabolism*, 7(4), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.02.004>
- Lee, C. A. A., Seo, H. S., Armién, A. G., Bates, F. S., Tolar, J., & Azarin, S. M. (2018). Modeling and rescue of defective blood-brain barrier function of induced brain microvascular endothelial cells from childhood cerebral adrenoleukodystrophy patients. *Fluids and Barriers of the CNS*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0094-5>
- Liu, D., Zhu, M., Zhang, Y., & Diao, Y. (2021). Crossing the blood-brain barrier with AAV vectors. *Metabolic Brain Disease*, 36(1), 45–52. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00630-2>
- Liu, L., Zhang, K., Sandoval, H., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Sanz, E., Li, Z., Hui, J., Graham, B. H., Quintana, A., & Bellen, H. J. (2015). Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell*, 160(1–2), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.019>
- Perry, E. A., Bennett, C. F., Luo, C., Balsa, E., Jedrychowski, M., Malley, K. E. O., Latorre-muro, P., Ladley, R. P., Reda, K., Wright, P. M., Gygi, S. P., Myers, A. G., & Puigserver, P. (2021). Tetracyclines promote survival and fitness in mitochondrial disease models. *Nature Metabolism*, 3(January). <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00334-y>
- Quintana, A., Kruse, S. E., Kapur, R. P., Sanz, E., & Palmiter, R. D. (2010). Complex I deficiency due to loss of NDUFS4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(24), 10996–11001. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006214107>
- Quintana, A., Zanella, S., Koch, H., Kruse, S. E., Lee, D., Ramirez, J. M., & Palmiter, R. D. (2012). Fatal breathing dysfunction in a mouse model of Leigh syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2359–2368. <https://doi.org/10.1172/JCI62923>
- Reynaud-Dulaurier, R., Benegiamo, G., Marrocco, E., Al-Tannir, R., Surace, E. M., Auwerx, J., & Decressac, M. (2020). Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome. *Brain*, 143(6), 1686–1696. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa105>
- S. Hersh, D., S. Wadajkar, A., B. Roberts, N., G. Perez, J., P. Connolly, N., Frenkel, V., A. Winkles, J., F. Woodworth, G., & J. Kim, A. (2016). Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 22(9), 1177–1193. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151221150733>
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Møllgård, K., & Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: How appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*, 9(OCT), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00385>
- Senatorov, V. V., Friedman, A. R., Milikovsky, D. Z., Ofer, J., Saar-Ashkenazy, R., Charbash, A., Jahan, N., Chin, G., Mihaly, E., Lin, J. M., Ramsay, H. J., Moghbel, A., Preininger, M. K., Eddings, C. R., Harrison, H. V., Patel, R., Shen, Y., Ghanim, H., Sheng, H., ... Kaufer, D. (2019). Blood-brain barrier dysfunction in aging induces hyperactivation of TGFβ signaling and chronic yet reversible neural dysfunction. *Science Translational Medicine*, 11(521), eaaw8283. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw8283>
- Silva-Pinheiro, P., Cerutti, R., Luna-Sanchez, M., Zeviani, M., & Viscomi, C. (2020). A Single Intravenous Injection of AAV-PHP.B-hNDUFS4 Ameliorates the Phenotype of NDUFS4<sup>-/-</sup> Mice. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 17(June), 1071–1078. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.04.026>
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in

- Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 14(3), 133–150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>
- van de Wal, M., Adjobo-Hermans, M., Keijer, J., Schirris, T., Homberg, J., Wieckowski, M. R., Grefte, S., van Schothorst, E. M., van Karnebeek, C., Quintana, A., & Koopman, W. J. H. (2021). NDUFS4 knockout mouse models of Leigh syndrome: pathophysiology and intervention. *Brain*, 2021, 1–51. <https://doi.org/10.1093/brain/awab426>
- Wainwright, L., Hargreaves, I. P., Georgian, A. R., Turner, C., Dalton, R. N., Abbott, N. J., Heales, S. J. R., & Preston, J. E. (2020). CoQ10 deficient endothelial cell culture model for the investigation of CoQ10 blood–brain barrier transport. *Journal of Clinical Medicine*, 9(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/jcm9103236>
- Wang, H. L., & Lai, T. W. (2014). Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Scientific Reports*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep06588>
- Wick, M. J., Harral, J. W., Loomis, Z. L., & Dempsey, E. C. (2018). An optimized evans blue protocol to assess vascular leak in the mouse. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(139), 1–9. <https://doi.org/10.3791/57037>
- Yang, A. C., Stevens, M. Y., Chen, M. B., Lee, D. P., Stähli, D., Gate, D., Contrepois, K., Chen, W., Iram, T., Zhang, L., Vest, R. T., Chaney, A., Lehallier, B., Olsson, N., du Bois, H., Hsieh, R., Cropper, H. C., Berdnik, D., Li, L., ... Wyss-Coray, T. (2020). Physiological blood–brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis. *Nature*, 583(7816), 425–430. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2453-z>
- Zhang, Y., Bokov, A., Gelfond, J., Soto, V., Ikeno, Y., Hubbard, G., Diaz, V., Sloane, L., Maslin, K., Treaster, S., Réndon, S., Van Remmen, H., Ward, W., Javors, M., Richardson, A., Austad, S. N., & Fischer, K. (2014). Rapamycin extends life and health in C57BL/6 mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 69 A(2), 119–130. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt056>

## II. Etude de l'effet d'une thérapie génique par remplacement du gène *NDUFS4* grâce au vecteur AAV-PHP.B dans un modèle murin du syndrome de Leigh

### II.1. Contexte et résumé de l'étude

Le second objectif de ma thèse était d'étudier l'effet d'une thérapie génique par remplacement du gène *NDUFS4* le plus largement possible chez les souris *NDUFS4* KO. La diffusion limitée des vecteurs viraux à travers la BHE et les résultats obtenus lors des précédentes études pré-cliniques de thérapies géniques sur ce modèle murin ont conduit à étudier l'effet de nouvelles stratégies permettant d'acheminer efficacement un transgène dans le cerveau. Pour cette étude, nous avons donc utilisé un vecteur AAV-PHP.B qui est capable de transduire le SNC après une injection intraveineuse afin de remplacer le gène *NDUFS4* chez des souris *NDUFS4* KO. Les résultats obtenus lors de cette étude ont été publiés dans la revue *Brain* en 2020. A la suite de ces travaux, un article d'opinion a été publié dans la revue *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Une copie de cet article est disponible en annexe à la page 195.

Lors de cette étude, nous avons tout d'abord vérifié que le vecteur AAV-PHP.B permettait une large restauration de l'expression du gène, en particulier dans le cerveau, chez les souris *NDUFS4* KO. Suite à cette validation, nous avons mis en place la stratégie de thérapie génique en injectant un vecteur AAV-PHP.B codant l'ADNc *NDUFS4* sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire CMV (cytomegalovirus)-CBA (chicken  $\beta$ -actin) chez des souris *NDUFS4* KO d'un mois. Nous avons ensuite évalué l'effet de ce traitement en suivant l'évolution de paramètres vitaux, comportementaux, histologiques et biochimiques et en les comparant avec des souris contrôles et des souris *NDUFS4* KO ayant reçues à l'âge d'un mois une injection d'un vecteur AAV-PHP.B codant pour la GFP sous le contrôle du même promoteur.

Nous avons montré que l'injection du vecteur AAV-PHP.B-*NDUFS4* permettait un remplacement du gène *NDUFS4* dans plusieurs organes dont le cerveau. Cela permettait la restauration du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et une

augmentation de son activité. La survie des souris *NDUFS4* KO traitées avec ce vecteur viral était augmentée et leur paramètres vitaux (poids/température) étaient comparables à ceux des contrôles. Au niveau comportemental, la restauration de l'expression du gène *NDUFS4* permettait une amélioration de tous les paramètres étudiés qui persistait au cours de la vie. Une analyse histologique des tissus a mis en évidence que ce traitement corrigeait la pathologie cérébrale. Dans l'œil, la restauration de l'expression du gène *NDUFS4* protégeait les cellules ganglionnaires de la rétine. L'hypertrophie cardiaque observée chez les souris *NDUFS4* KO était également corrigée après l'injection du vecteur AAV-PHP.B-*NDUFS4*.

Dans cette étude, j'ai pris en charge les analyses de certains tests comportementaux (redressement, activité), j'ai contribué aux coupes et immunomarquages des cerveaux et aux western blot sur ce tissu. J'ai participé aux coupes et marquages des coupes de cœurs ainsi qu'à l'analyse de l'aire des cardiomyocytes. Enfin j'ai pris en charge une partie des expériences demandées par les reviewers après la soumission de l'article dans le journal *Brain*. Ces travaux ont été initiés par le Dr Michaël Decressac au « Telethon Institut of Genetics and Medicine » à Naples en collaboration avec l'équipe du professeur Enrico Maria Surace située dans le même institut. Cette équipe a réalisé les enregistrements électrorétinographiques. Ces travaux ont également été réalisés en collaboration avec le Dr Giorgia Benegiamo de l'équipe du professeur Johan Auwerx qui dirige le « Laboratory for Integrative and Systems Physiology » à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. Cette équipe a réalisé les expériences d'évaluation de la quantité et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire ainsi que les mesures de la concentration en ATP et du stress oxydant.

II.2. Article 2: Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome.



**REPORT**

# Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome

Robin Reynaud-Dulaurier,<sup>1,\*</sup> Giorgia Benegiamo,<sup>2,\*</sup> Elena Marrocco,<sup>3</sup> Racha Al-Tannir,<sup>1</sup> Enrico Maria Surace,<sup>3,4</sup> Johan Auwerx<sup>2</sup> and Michael Decressac<sup>1,3</sup>

\*These authors contributed equally to this work.

Mutations in nuclear-encoded mitochondrial genes are responsible for a broad spectrum of disorders among which Leigh syndrome is the most common in infancy. No effective therapies are available for this severe disease mainly because of the limited capabilities of the standard adeno-associated viral (AAV) vectors to transduce both peripheral organs and the CNS when injected systemically in adults. Here, we used the brain-penetrating AAV-PHP.B vector to reinstate gene expression in the *Ndufs4* knockout mouse model of Leigh syndrome. Intravenous delivery of an AAV.PHP.B-*Ndufs4* vector in 1-month-old knockout mice restored mitochondrial complex I activity in several organs including the CNS. This gene replacement strategy extended lifespan, rescued metabolic parameters, provided behavioural improvement, and corrected the pathological phenotype in the brain, retina, and heart of *Ndufs4* knockout mice. These results provide a robust proof that gene therapy strategies targeting multiple organs can rescue fatal neurometabolic disorders with CNS involvement.

1 Université Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut des Neurosciences, 38000 Grenoble, France

2 Laboratory for Integrative and Systems Physiology, Institute of Bioengineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

3 Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), 80078 Pozzuoli, Italy

4 Medical Genetics, Department of Translational Medicine, Federico II University, 80131 Naples, Italy

Correspondence to: Michael Decressac

Université Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut des Neurosciences, 38000

Grenoble, France

E-mail: michael.decessac@univ-grenoble-alpes.fr

**Keywords:** gene therapy; neurometabolic disease; mitochondria; AAV vector

**Abbreviations:** AAV = adeno-associated viral; KO = knockout

## Introduction

Mitochondrial diseases are a heterogeneous group of genetic human disorders characterized by a primary defect in the mitochondrial oxidative phosphorylation system. About a third of these diseases results from a deficiency in complex I activity and represent a wide spectrum of clinical manifestations ranging from fatal neonatal diseases to adult-onset

neurodegenerative pathologies (Kirby *et al.*, 1999). Leigh syndrome, also known as subacute necrotizing encephalomyelopathy, is the most common infantile mitochondrial disease. This fatal paediatric condition is characterized by gliosis, demyelination and necrotic lesions in multiple brain areas including the brainstem and the basal ganglia that appear as hyperintense signals seen with MRI. Patients exhibit

Received October 30, 2019. Revised January 24, 2020. Accepted February 12, 2020. Advance access publication May 15, 2020

© The Author(s) (2020). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.

For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

a variety of symptoms such as psychomotor arrest or decline, ataxia, dystonia, lethargy, abnormal ocular movements and respiratory failure (Kirby *et al.*, 1999). To date, no therapeutic strategy alleviates the pathology and passing often occurs within the decade following diagnosis.

Several mutations have been associated with Leigh syndrome including some in the nuclear gene *Ndufs4* that encodes for a non-enzymatic 18 kDa subunit of complex I (Vinothkumar *et al.*, 2014). *Ndufs4* knockout (KO) mice closely replicate the pathological hallmarks observed in patients with Leigh syndrome. While *Ndufs4* heterozygous mice appear similar to wild-type animals, KO mice progressively develop encephalopathy leading to an early death around postnatal day (P)50 (Kruse *et al.*, 2008). Starting from P40, mice manifest Leigh syndrome-like symptoms including growth retardation, hypothermia, ataxia, lethargy and breathing irregularities (Kruse *et al.*, 2008). Recent studies also demonstrated the contribution of peripheral organ dysfunction in the phenotypic manifestation highlighting the need for a broad correction of the genetic defect (Quintana *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2014).

At the preclinical level, strategies based either on a pharmacological inhibition of mTOR or exposures to hypoxic conditions have provided remarkable therapeutic effects as well as important insights into the disease mechanism but their transposability in the clinic is limited (Johnson *et al.*, 2013, 2015; Jain *et al.*, 2016; Ferrari *et al.*, 2017). Gene replacement therapy using an adeno-associated viral vector (AAV9) has also been attempted in *Ndufs4* KO neonates but resulted in marginal benefits (Quintana *et al.*, 2012; Di Meo *et al.*, 2017).

In the present study we took advantage of the recent development of a novel AAV9 vector variant able to cross the blood–brain barrier also in adult mice (Deverman *et al.*, 2016). We therefore used the brain-penetrating AAV-PHP vector for a gene replacement strategy in *Ndufs4* KO mice and we showed that this approach afforded a long-term therapeutic effect by correcting Leigh syndrome-associated pathology in several organs and resulted in lifespan extension.

## Material and methods

### Animals

*Ndufs4* heterozygous mice were obtained from Jackson Laboratories (stock number 27058) and bred to produce *Ndufs4* KO offspring. Mice were genotyped at 2 weeks of age using the protocol from Jackson Laboratories and the following primers: wild-type forward: AGTCAGCAAC ATTTTGGCAGT, common: GAGCTTGCCTAGGAGGA GGT, mutant forward: AGGGGACTGGACTAACAGCA. To provide warmth and social interaction, KO mice were housed with a minimum of one control littermate. Water bottles had a long tip and food was provided on the bottom of each cage containing KO mice so that access to food and water was not a limiting factor for survival. Mice were

observed daily and euthanized if they showed a 20% loss in maximum body weight, lethargic behaviour, or were found prostrate or unconscious. Each animal's weight was recorded twice a week and body temperature was measured on the same day using a rectal thermometer (Microtherma2, Thermoworks). Measurements were done between 2 pm and 4 pm to minimize the effect of circadian variations on body temperature. All experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines of the European Directives (2010/63/EU) and the ARRIVE guidelines. They were reviewed and approved by the Italian Ministry of Health, Department of Public Health, Animal Health, Nutrition and Food Safety, in accordance with the law on animal experimentation (article7; D.L. 116/92; protocol number: 26/2014).

### Adeno-associated viral vector production and injection

The plasmid containing the *Ndufs4*-IRES-GFP cassette under the control of the CMV-chicken  $\beta$ -actin (CBA) promoter was provided by Prof. Palmiter (University of Washington School of Medicine) (Quintana *et al.*, 2012). The AAV-PHP.B plasmid was provided by Prof. Gradinaru (California Institute of Technology) (Deverman *et al.*, 2016). The AAV-PHP.B-*Ndufs4* and the control vector AAV-PHP.B-GFP vector were produced by the AAV Vector Core (Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), as previously described (Colella *et al.*, 2014).

At 4 weeks of age, KO mice and control littermates were randomly assigned to receive an intravenous injection of the *Ndufs4*-expressing or the GFP control AAV-PHP.B vector [ $1 \times 10^{12}$  genome copies, diluted in phosphate-buffered saline (PBS)] through the retro-orbital sinus.

### Paw clasp test, cylinder test, hanging test, and seizure frequency

To assess neurological decline, the paw clasp test was performed at 45 and 250 days of age. As previously described (Decressac *et al.*, 2010), mice were suspended by the tail and their clasp behaviour was examined for 30 s.

For the cylinder test, mice were placed in a 2 l glass cylinder, a video was recorded for 5 min and analysed using the EthoVision XT software (version 14.0). The number of rears (wall rears, seated rears or free rears) (Fig. 2C and Supplementary Videos 1–3) (Schweizer *et al.*, 2016) was scored and the time spent immobile was measured as an index of the locomotor activity.

The hanging test was performed at 45, 100 and 250 days. Mice were placed on the top of a standard wire cage lid. The lid was lightly shaken to cause the animals to grip the wires then turned upside down and suspended at a height of 40 cm over an open cage filled with bedding and excess nesting materials to prevent injury from falling. The latency for the mice to fall off the wire grid was measured and



average values were computed from two trials (15 min apart). Trials were stopped if the mouse remained on the lid after 3 min (Luk *et al.*, 2012).

The percentage of animals manifesting epileptic seizure (Supplementary Video 4) was estimated at 45, 100 and 250 days. Mice were monitored for the occurrence of epileptic episodes over 3 h. At the end of an epileptic event, the identity of the mouse was recorded and the animal returned to its home cage.

All testing and analysis were performed by an experimenter blind to the phenotype and treatment.

## Electroretinogram

The method used for electrophysiological recordings (ERGs) was described previously (Botta *et al.*, 2016). Briefly, mice were dark-adapted for 3 h. Following anaesthesia, mice were accommodated in a stereotaxic apparatus under dim red light, their pupils dilated with a drop of 1% tropicamide (Alcon Laboratories) and the body temperature maintained at 37.5°C. ERGs were evoked by flashes of different light intensities ranging from  $-4$  to  $+1.3$  log cd.s/m<sup>2</sup>, in scotopic condition, generated through a Ganzfeld stimulator (CSO). For each animal group, representative a-wave and b-wave tracks (evoked at  $+1.3$  cd.s/m<sup>2</sup> light stimulus) are shown.

## Blood collection and serum lactate analysis

Blood was collected from the retro-orbital plexus and serum was isolated by centrifugation. Lactate concentration was determined using a colorimetric assay following the manufacturer's instruction (Abcam, ab65331). Measures of absorbance were done on a PHERAstar FS plate reader (BMG Labtech) and collected with the MARS data analysis software version 3.20 R2 (BMG Labtech). Haematocrit was determined by measuring the space occupied by red blood cells after centrifugation of blood in heparinized capillaries (Brand Micro-hematocrit capillaries 749311) at 10 000 rpm for 5 min.

## BN-PAGE, total OxPhos immunostaining and complex I in-gel activity assay

The BN-PAGE (blue native polyacrylamide gel electrophoresis) and in-gel activity assay protocols were described in detail previously (Jha *et al.*, 2016). Briefly,  $\sim 30$  mg of frozen brain tissue was homogenized in ice-cold isolation buffer (0.2 M sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EGTA/Tris pH 7.4, pH adjusted to 7.4 with 1 M HEPES buffer, protease inhibitors). Following centrifugation, isolated mitochondria protein content was quantified using DC protein assay (Bio-Rad). For BN-PAGE immunoblotting and in-gel activity, 50  $\mu$ g mitochondria extract was solubilized using 5% digitonin. Electrophoresis of solubilized mitochondrial proteins was

performed using the NativePAGE™ system (Novex) using 3–12% gradient gels. For immunoblotting, samples were run at 150 V for 30 min and at 250 V for an additional 90 min. Proteins were transferred on a PVDF membrane using an iBlot Gel Transfer device (Invitrogen) and incubated with primary antibodies (Anti-OxPhos Complex Kit (Life Technologies, cat. no. 457999) and Anti-MTCO1 antibody (Abcam, ab14705) to detect total OxPhos (oxidative phosphorylation) proteins. Immunostaining of the membrane was performed using Western Breeze Chromogenic Immunodetection System (Invitrogen). For complex I in-gel activity assay, samples were run at 150 V for 30 min and at 250 V for an additional 150 min to obtain maximal separation of supercomplex bands. Gels were run at 4°C to preserve enzymatic activity. After electrophoresis, gels were incubated with complex I substrate solution (2 mM Tris-HCl, 0.1 mg/ml NADH, 2.5 mg/ml nitroterazolium blue chloride) at room temperature until the appearance of purple bands indicative of complex I activity (10–20 min).

## ATP measurement

For ATP measurement, 15–20 mg of frozen brain sample was homogenized in RIPA buffer with protease inhibitors. Homogenized samples were rotated for 20 min at 4°C and then spun down at 11 000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was used for protein quantification with DC protein assay (Bio-Rad). Protein samples were diluted to 1  $\mu$ g/ $\mu$ l with RIPA buffer. ATP concentration was measured using CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, G755A). Protein samples (20  $\mu$ l of 20  $\mu$ g) were assayed per well, the volume in each well was brought to 100  $\mu$ l with PBS and then mixed with 100  $\mu$ l CellTiter-Glo® reagent. After 10 min incubation at 21°C the luminescence signal was recorded.

## 4-HNE protein adducts measurement

For the measurement of HNE protein adducts the OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA Kit (Cell Biolabs, STA-838) was used following the manufacturer's instructions. Frozen brain sample (15–20 mg) was homogenized in RIPA buffer with protease inhibitors. Homogenized samples were rotated for 20 min at 4°C and then spun down at 11 000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was used for protein quantification with DC protein assay (Bio-Rad). Protein samples were diluted to 1  $\mu$ g/ $\mu$ l with RIPA buffer and 50  $\mu$ g of protein was used for the assay.

## Mitochondrial DNA abundance

Mitochondrial DNA abundance (mtDNA) was quantified as described (Quiros *et al.*, 2017), with some modifications. In short, DNA was extracted from  $\sim 15$  mg of frozen brain samples using the NucleoSpin™ Tissue kit (Macherey-Nagel, #740952) following manufacturer's instructions. The resulting genomic DNA (gDNA) was diluted to 10 ng/ $\mu$ l and



2 µl (20 ng) were used for qPCR on a Roche LightCycler® 480 using TB Green Premix Ex Taq (Takara, RR420W) mastermix. For mtDNA quantification, primers recognizing three different mitochondrial genes were used: 16S rRNA (forward: CCGCAAGGGAAAGATGAAAGAC, reverse: TCGTTTGGTTTCGGGGTTTC), ND1 (forward: CTA GCAGAAACAAACCGGGC, reverse: CCGGCTGCGTATT CTACGTT), dloop (forward: AATCTACCATCCTCCGTG AAACC, reverse: TCAGTTTAGCTACCCCAAGTTAA). For nuclear DNA quantification, primers against the *Hk2* gene were used (forward: GCCAGCCTCTCCTGATTTT AGTGT, reverse: GGGAACACAAAAGACCTCTTCTGG).

### Tissue staining and microscopy

Mice were deeply anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and were then perfused through the ascending aorta with PBS. Tissues were dissected and post-fixed for 24 h at 4°C in 4% paraformaldehyde. Tissues were cryoprotected overnight in 25% sucrose before being embedded in OCT and cut on a cryostat (Leica CM3050S or Thermo Fisher Scientific CryoStar NX50).

Immunohistological staining was performed as previously described (Decressac *et al.*, 2012). Sections were washed with PBS, incubated in 0.1 M PBS containing 10% normal goat serum, 0.25% Triton™ X-100 and the primary antibodies for 16–18 h at room temperature, shaking gently. The tissue sections were then washed three times in PBS and incubated with secondary antibodies coupled to Alexa 488 or Alexa 568 (1:300, Molecular Probes, Invitrogen) diluted in the blocking solution for 2 h at room temperature. Sections were rinsed again and coverslipped using the Vectashield HardSet mounting medium (Vector Laboratories) or the ProLong™ Gold Antifade medium (Molecular Probes).

Primary antibodies were used to detect GFAP (rabbit, 1:2000, Abcam, #ab7260), Iba1 (rabbit, 1:2000, Wako, #019-19751), GFP (chicken, 1:2000, Abcam, #ab13970), Calbindin (mouse, 1:1000, Millipore, #ab1778), NeuN (rabbit, 1:1000, Cell Signaling, #12943), and TH (mouse, 1:3000, Immunostar, #22941).

Staining of F-actin on liver samples was performed by incubating sections with Alexa Fluor® 594 Phalloidin (1:600; Molecular Probes, A12381) together with the secondary antibodies.

For the staining of lipid droplets in the olfactory bulb (Liu *et al.*, 2015), brain sections were rinsed in PBS and then incubated for 10 min in Nile red (2.5 µg/ml dissolved in 75% aqueous glycerol). Subsequently, sections were washed twice with PBS, mounted and coverslipped with ProLong™ Gold Antifade medium (Molecular Probes). Images were captured using the LSM 710 confocal microscope (Zeiss).

### Quantification of retinal ganglion cells and Purkinje cells

The number of retinal ganglion cells was determined by counting NeuN-positive cells in the retinal ganglion cell

layer. The number of Purkinje cells was determined by counting calbindin-positive cells in the cerebellum. Images were analysed using ImageJ v.2.0.0 software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Quantification was performed in 10 random fields of view per mouse and the average number of NeuN-positive or calbindin-positive cells per millimetre was calculated.

### Analysis of cardiac pathology

Analysis of cardiac pathology was first determined by calculating the heart weight (g)/body weight (g) ratio. In addition, we performed a morphometric analysis of the cardiac tissue. Heart sections (35-µm thick) were cut on a cryostat (Leica CM3050S or Cryostar NX50) followed by staining with wheat germ agglutinin (WGA) and DAPI. Free-floating sections were washed in Hank's balanced salt solution (HBSS) and stained with WGA-CF™640 (5 µg/ml, HBSS) (Biotium) for 4 h at 37°C to visualize cell membranes. Nuclei were stained with DAPI (5 µg/ml, PBS) (Invitrogen) for 5 min before being rinsed three times in PBS. Sections were mounted on glass slides and coverslipped with the ProLong Gold Antifade mounting medium (Molecular Probes). Images of entire sections were acquired using the Axio Scan.Z1 slide scanner (Zeiss) and images of the WGA staining were captured with an LSM 710 confocal microscope (Zeiss). For each animal, the cross-sectional area of cardiomyocytes was measured from 10 different pictures of WGA-stained sections. A minimum of 250 cells were analysed using ImageJ v.2.0.0 software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

### Western blotting

Tissues were harvested and homogenized in RIPA buffer (Sigma). Protein (20 to 30 µg) was boiled at 95°C for 5 min in Laemmli buffer (Bio-Rad), separated on an SDS-PAGE gel and then electrotransferred (100 V, 1 h) on a PVDF membrane (Millipore). After blocking for 1 h in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBS-T) and 3% non-fat dried milk, membranes were incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: GFP (chicken, 1:2000, Abcam, #ab290), GFAP (rabbit, 1:2000, Santa-Cruz, #sc-6170), Ndufs4 (mouse, 1:2000, Abcam, #ab87399), or Calnexin (Rabbit, 1:5000, Enzo Life Science, ADI-SPA-860). After washing for 30 min in TBST, membranes were incubated for 1 h at room temperature with an HRP-conjugated secondary antibody (1:1000, Promega). Protein expression was revealed using the Clarity kit (Bio-Rad). Luminescence signal was detected using the GE Amersham AI600 (GE Healthcare) or the ChemiDoc MP (Bio-Rad) and band intensities were quantified by densitometry using Fiji software v.2.0.0 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

For isolation of mitochondria, ~30 mg of frozen brain tissue was homogenized in ice-cold isolation buffer (0.2 M sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EGTA/Tris pH 7.4, pH adjusted to 7.4 with 1 M HEPES buffer, protease inhibitors).



Following centrifugation, isolated mitochondria protein content was quantified using DC protein assay (Bio-Rad).

For western blot, 5 µg of RIPA buffer-solubilized mitochondria were mixed to 4× Laemmli buffer and loaded on a NuPAGE 4–12% Bis-Tris Gel (Thermo Fisher, NP0336BOX). Gels were run at 200 V for 1 h in MOPS-SDS running buffer. Proteins were then transferred to PVDF membranes at 100 V for 2 h on ice. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS-T for 1 h at 21°C and were then incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: total OXPHOS rodent WB antibody cocktail (Abcam, #ab110413, 1:1000), or VDAC1 (#ab14734, 1:1000). After three washes with TBS-T, membranes were incubated with HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:2000). Images were quantified by densitometry using Fiji software and normalized to VDAC1 signal.

## Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using the GraphPad Prism software (version 7.0a). One-way ANOVAs with Tukey's multiple comparison tests were carried out to analyse the difference between experimental groups. Student's *t*-test was used to analyse the difference between two groups. The data were collected and processed in a randomized and blinded manner. No statistical methods were used to predetermine sample size, but our sample sizes are similar to those generally used in the field. All values are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Data availability

All the data and reagents (if not commercially available) that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Results

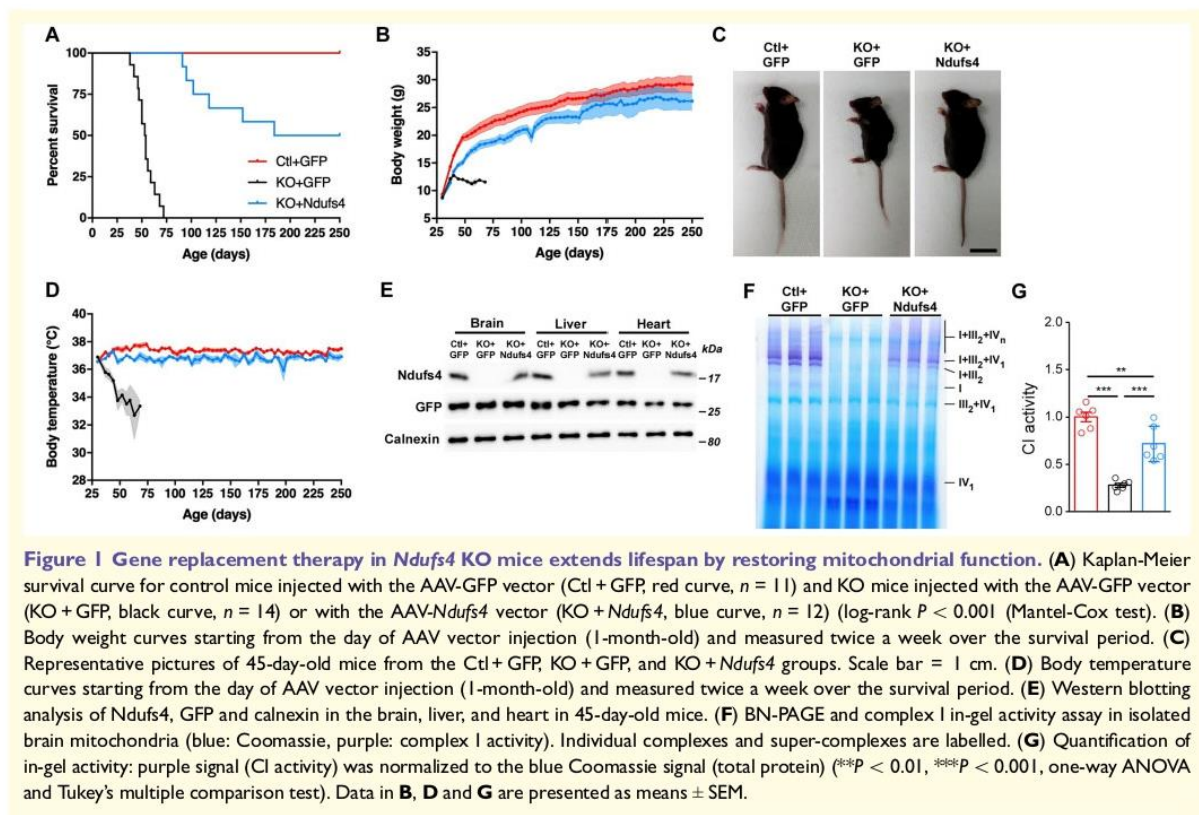
*Ndufs4* KO mice present with severe pathology in several organs including the brain, the retina, the liver and the heart (Kruse et al., 2008; Karamanlidis et al., 2013; Chouchani et al., 2014; Jin et al., 2014; Yu et al., 2015). We first verified that the AAV.PHP.B vector was efficient in transducing these tissues following intravenous injection in 1-month-old mice. Two weeks after AAV vector injection, transgene expression was detectable throughout the CNS (Supplementary Fig. 1A). GFP-positive cells were observed in the olfactory bulb, striatum, hippocampus, midbrain, cerebellum, spinal cord and vestibular nucleus and co-localized with ubiquitous or subtype-specific neuronal markers (Supplementary Fig. 1B and C). The AAV-PHP.B vector was also efficient in inducing transgene expression in other tissues including the liver, heart, muscle and retina (Supplementary Fig. 1C and D).

These results prompted us to examine the effect of systemic delivery of an AAV-PHP.B-*Ndufs4* vector (hereafter

referred as AAV-*Ndufs4* vector) in the *Ndufs4* KO mouse model of Leigh syndrome. One-month-old KO and control mice were randomly assigned to receive an intravenous injection of an AAV-*Ndufs4* or a GFP-expressing control vector ( $1 \times 10^{12}$  gc/mouse) and they were regularly monitored throughout their survival period. In line with previous reports, KO mice treated with the control GFP vector died at a median age of 54 days. In contrast, gene replacement therapy substantially increased the lifespan of mice with Leigh syndrome as 50% of the KO mice treated with the AAV-*Ndufs4* vector survived 250 days (log-rank  $P < 0.0001$ ;  $\chi^2 = 38.36$ ) (Fig. 1A). Bi-weekly monitoring of the body weight of the animals showed that delivery of the *Ndufs4* gene improved this parameter and promoted a continuous, yet slightly delayed, growth of KO mice (Fig. 1B and C). At 5–6 months of age, AAV-*Ndufs4*-treated KO mice were barely distinguishable from control animals ( $P = 0.23$  at 170 days) (Fig. 1B). Before dying, the body temperature of *Ndufs4* KO mice fell progressively below 34°C (Fig. 1D) (Jain et al., 2016). Gene replacement therapy rescued hypothermia as KO animals treated with the AAV-*Ndufs4* vector maintained a core body temperature similar to that of control mice (Fig. 1D) ( $P > 0.05$ ). We confirmed that these physiological improvements were associated with a restoration of *Ndufs4* expression in the brain, liver, heart and muscle (Fig. 1E). Complex I is essential for the assembly of mitochondrial super-complexes (Moreno-Lastres et al., 2012). Consistent with the recovery of *Ndufs4* expression, blue native in-gel activity assay and total OxPhos immunostaining demonstrated the physical restoration of complex I and super-complexes as well as an improvement of mitochondrial complex I activity (Fig. 1F, G and Supplementary Fig. 2A–C). In contrast, no differences in ATP content, oxidative stress or mitochondria content were observed between the experimental groups (Supplementary Fig. 2D–F) (Kruse et al., 2008).

As Leigh syndrome primarily affects the brain and causes severe neurological symptoms in patients, we first assessed the paw clasp phenotype in mice (Johnson et al., 2013). While 75% of AAV-GFP treated KO mice displayed clasp behaviour at 45 days of age, only 13% showed this phenotype in the AAV-*Ndufs4* treated group (Fig. 2A). Notably, none of the KO mice treated with the AAV-*Ndufs4* vector showed this phenotypic sign at 250 days of age (Fig. 2A). In addition, the cylinder test revealed a long-lasting improvement of locomotor activity in the AAV-*Ndufs4* treated group as seen by a reduction in the time spent inactive and a higher number of rears compared to KO mice treated with the control vector (Fig. 2B–D and Supplementary Videos 1–3). Likewise, long-term improvement in strength and resistance were observed in the hanging test (Fig. 2E). Brain pathology was also illustrated by the occurrence of epileptic seizures in about 23% of KO mice treated with the GFP-expressing viral vector (Fig. 2F and Supplementary Video 4) (Quintana et al., 2010). In contrast, only 5% of KO mice injected with the AAV-*Ndufs4* vector elicited epileptic episodes (Fig. 2F).



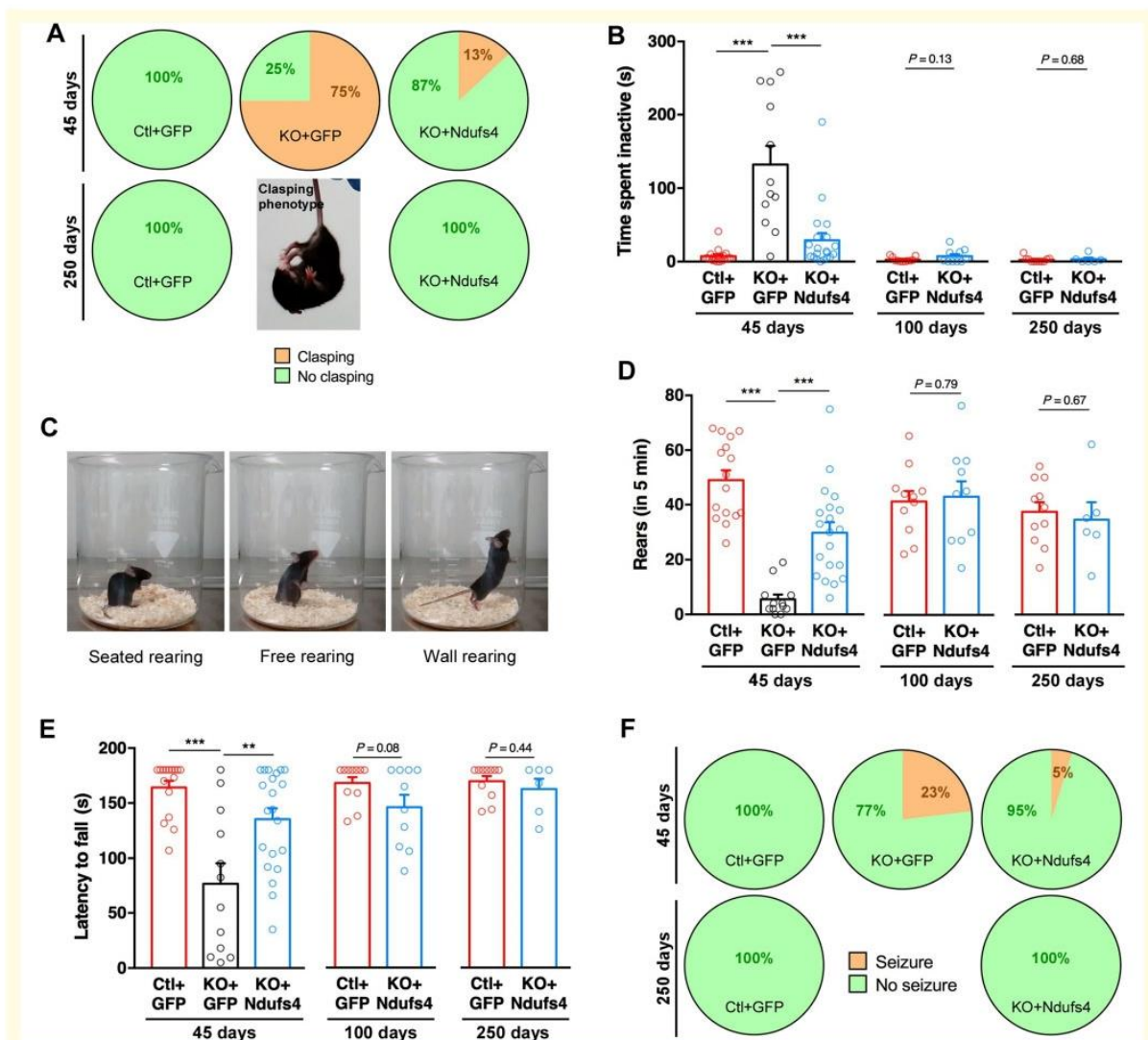


As seen in patients with Leigh syndrome, *Ndufs4* KO mice showed necrotic plaques and severe neuroinflammation in various brain regions including the cerebellum, the vestibular nucleus and the olfactory bulb (Kruse *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2013). In line with our observation that the AAV-PHP.B vector is efficient in infecting these brain areas and provides improvement in behavioural performances, western blot and histological analysis of the microglia (Iba1) and astrocyte (GFAP) markers confirmed the presence of severe gliosis in the brains of 45-day-old KO mice and revealed that AAV-mediated gene therapy prevented the development of this inflammatory reaction (Fig. 3A–D). In parallel, lipid accumulation in glial cells resulting from the neuronal metabolic distress was markedly reduced at 45 and 250 days of age in the olfactory bulb of mice treated with the AAV-*Ndufs4* vector (Fig. 3E) (Liu *et al.*, 2015, 2017). To assess the effect of gene replacement on neurodegeneration, we quantified the number of calbindin-positive Purkinje cells in the cerebellum and found that AAV-*Ndufs4* vector delivery rescued a large number of these neurons in KO mice at both 45 and 250 days (Fig. 3F and G) (Quintana *et al.*, 2010). These effects were associated with the restoration of NDUF54 expression in these subregions (Supplementary Fig. 3A and B).

In addition to the brain, the retina is severely affected in the Leigh syndrome mouse model (Yu *et al.*, 2015;

Song *et al.*, 2017). To test whether restoration of NDUF54 expression in the retina by gene delivery (Supplementary Fig. 3C and D) translated into improved retinal function, we performed ERG recordings and demonstrated that restoration of *Ndufs4* expression was associated with the maintenance of the B-wave response that was absent in KO mice (Fig. 4A and B). In line with these results and with our observation that peripheral delivery of the PHP-B vector efficiently transduced the inner retina including the ganglion cell layer and the inner nuclear layer (Supplementary Fig. 1D), we showed that the injection of the AAV-*Ndufs4* vector in *Ndufs4* KO mice protected NeuN-positive retinal ganglion cells as compared to the KO + GFP group ( $P < 0.001$ ) (Fig. 4C and D).

Besides the brain pathology, *Ndufs4* KO mice exhibit peripheral symptoms including metabolic perturbations (Johnson *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014; Jain *et al.*, 2016). We observed that gene replacement was effective in normalizing the polycythaemia (Supplementary Fig. 4A) and in lowering the level of blood lactate in *Ndufs4* KO mice (Supplementary Fig. 4B). In addition, it has been demonstrated that deletion of the *Ndufs4* gene drives hypertrophic cardiomyopathy (Karamanlidis *et al.*, 2013; Chouchani *et al.*, 2014). Consistent with our observation that systemic delivery of the AAV-PHP.B



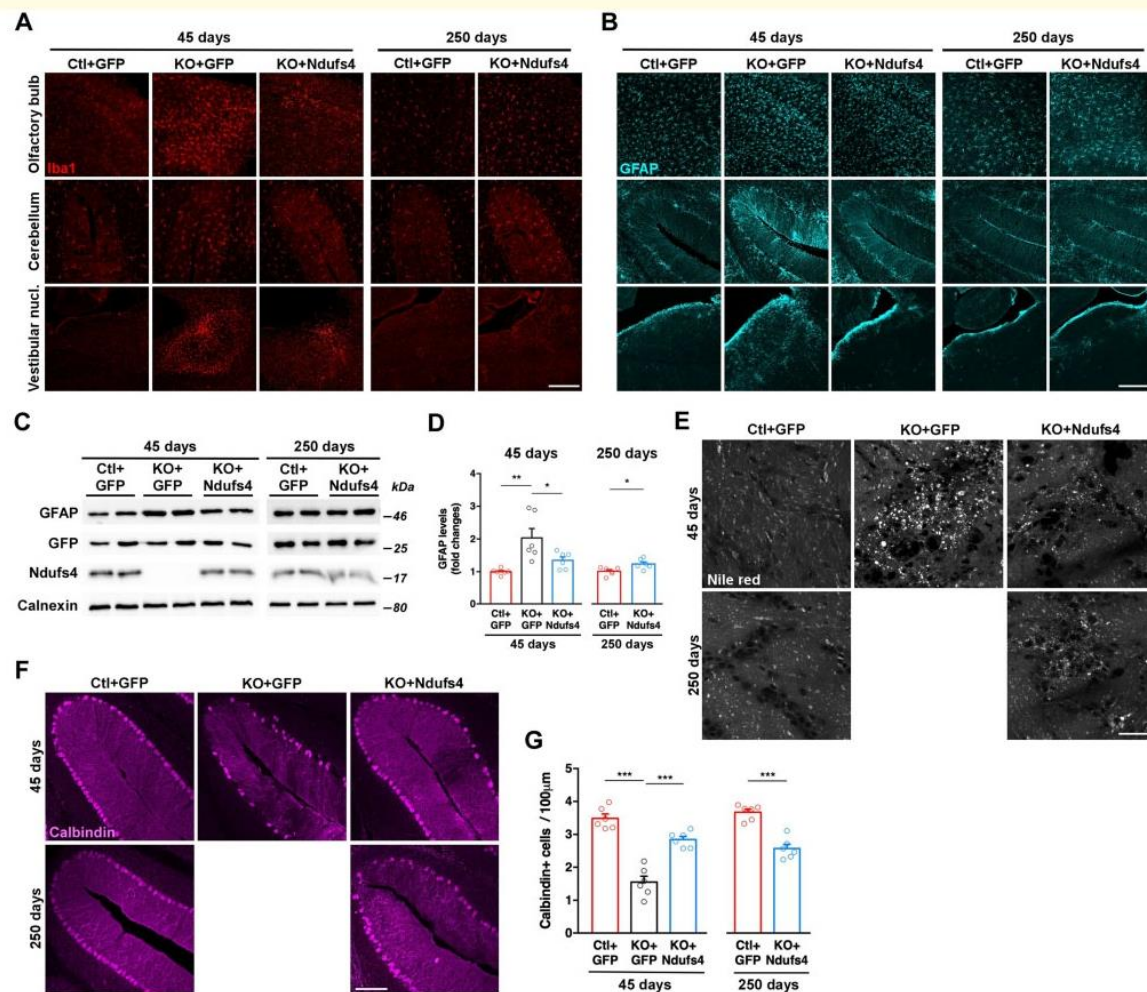
**Figure 2** *Ndufs4* gene therapy ameliorates behavioural performances. **(A)** Neurological defect was assessed by the paw claspings test. Pie charts represent the proportion of mice eliciting claspings behaviour at 45 and 250 days of age. *Insert* shows an example of claspings behaviour in a KO mouse treated with the AAV-GFP vector. **(B–D)** General locomotor activity was assessed using the cylinder test. The total time spent immobile **(B)** and the number of rears **(C and D)** were recorded over 5 min. Representative photographs illustrating the different types of rears that were quantified **(C)**. Data were collected at 45 days of age for all experimental groups ( $n = 12–20/\text{group}$ ) ( $^{***}P < 0.001$ , one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test) and at 100 and 250 days of age for AAV-GFP-treated control mice and AAV-*Ndufs4*-treated KO mice ( $n = 6–11/\text{group}$ ) (Student's *t*-test). **(E)** Strength and resistance were assessed using the hanging test. Data were collected at 45 days of age for all experimental groups ( $n = 12–20/\text{group}$ ) ( $^{***}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test) and at 100 and 250 days of age for AAV-GFP-treated control mice and AAV-*Ndufs4*-treated KO mice ( $n = 6–11/\text{group}$ ) (Student's *t*-test). **(F)** Pie charts representing the proportion of animals exhibiting epileptic seizures at 45 and 250 days of age. Data in **B**, **D**, and **E** are presented as means  $\pm$  SEM.

vector efficiently targeted the cardiac tissue (Supplementary Fig. 1C), we showed that treatment with the *Ndufs4*-expressing vector corrected this cardiac abnormality both at the anatomical and cellular level (Supplementary Fig. 4C–F).

## Discussion

Our study provides a proof-of-principle that gene replacement can exert a robust therapeutic effect in an adult mouse model of Leigh syndrome. These results have two important



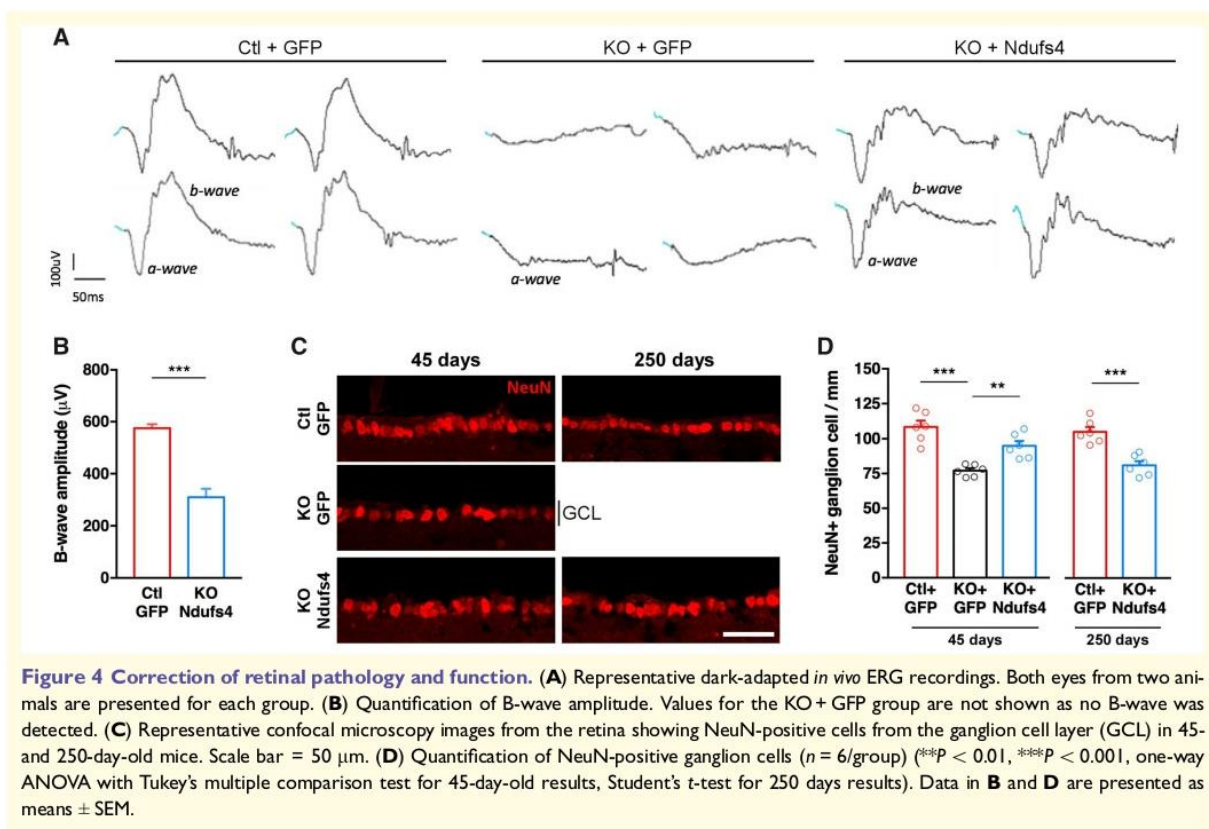


**Figure 3 Restoration of NDUFS4 expression in the brain prevented neuronal and glial pathology.** (A and B) Representative microscopy images of the olfactory bulb, cerebellum and vestibular nucleus stained for Iba1 (A) or GFAP (B) at 45 and 250 days. Scale bar = 200 µm for olfactory bulb and cerebellum, 400 µm for vestibular nucleus. (C) Western blots showing the expression level of GFAP, GFP, Ndufs4 and calnexin in the brains of 45-day and 250-day-old mice. (D) Quantification of immunoblots ( $n = 6$ /group) ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for 45 days results, Student's  $t$ -test for 250 days results). (E) Lipid accumulation in the olfactory bulb was detected using Nile red staining. Scale bar = 30 µm. (F) Representative microscopy images of calbindin-positive Purkinje cells in the cerebellum at 45 and 250 days old. Scale bar = 150 µm. (G) Quantification of calbindin-positive neurons in the cerebellum ( $n = 6$  per group) ( $**P < 0.001$ , one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for 45 days results, Student's  $t$ -test for 250 days results). Data in D and G are presented as means  $\pm$  SEM.

implications. We report the first-ever successful gene therapy with long-term benefits in this preclinical model of severe mitochondrial disease. This is an important step considering that previous attempts resulted in marginal extension of life-span. Indeed, targeted delivery of a *Ndufs4*-expressing AAV vector to the vestibular nuclei or combined systemic and intracerebroventricular injections of a similar viral vector in neonates slightly increased the median survival to 65 and 82 days, respectively (Quintana *et al.*, 2012; Di Meo *et al.*, 2017). In contrast, *Ndufs4* KO mice treated with rapamycin

or exposed to hypoxic conditions survived more than 100 days (Johnson *et al.*, 2013, 2015; Jain *et al.*, 2016; Ferrari *et al.*, 2017). Our results indicate that widespread gene replacement improves survival to a degree at least as good as the ones reported for these non-genetic strategies. Although we performed a single-dose study, one can anticipate that lower doses of AAV.PHP.B vector would afford milder therapeutic effects. This assumption is based on the results from both the AAV-based strategy and the non-genetic approaches, which showed that reduced dosage or





**Figure 4 Correction of retinal pathology and function.** (A) Representative dark-adapted *in vivo* ERG recordings. Both eyes from two animals are presented for each group. (B) Quantification of B-wave amplitude. Values for the KO + GFP group are not shown as no B-wave was detected. (C) Representative confocal microscopy images from the retina showing NeuN-positive cells from the ganglion cell layer (GCL) in 45- and 250-day-old mice. Scale bar = 50 µm. (D) Quantification of NeuN-positive ganglion cells ( $n = 6/\text{group}$ ) (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for 45-day-old results, Student's *t*-test for 250 days results). Data in B and D are presented as means  $\pm$  SEM.

intermittent treatment have reduced efficacy (Johnson *et al.*, 2013, 2015; Jain *et al.*, 2016; Di Meo *et al.*, 2017; Ferrari *et al.*, 2017). It is essential to emphasize that gene therapy should remain the ultimate goal for such a genetic condition as it is the only strategy that can permanently and efficiently fix the primary defect. Pharmacological or other non-genetic approaches could nevertheless serve as adjunctive treatments to alleviate residual defects.

Regardless of the clinical relevance of the strategy used, it is fundamental to first report that a fatal disease such as Leigh syndrome can be rescued. This goes along with the identification of the organs driving the main pathological manifestation. Despite the conditional ablation of *Ndufs4* in the brain clearly established that the CNS plays a critical role in Leigh syndrome pathology (Kruse *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2010), the demonstration that reinstating its expression is feasible and provides a therapeutic benefit had to be made. Similarly, reports have been important steps for other rare diseases with multi-organ deficiency such as lysosomal diseases or multiple system atrophy and have paved the road for future clinical development (Hua *et al.*, 2011; Spampinato *et al.*, 2011). The clinical transferability of the tools, methods and doses used to make this first demonstration are questions that need to be addressed in future experiments. For our study, the dose ( $1 \times 10^{12}$  gc) was selected

based on previous reports describing widespread and strong transgene expression in mice (Deverman *et al.*, 2016; Challis *et al.*, 2019). Studies have shown that the AAV.PHP.B vector produced a different and more restricted pattern of expression in non-human primates and was also less efficient in other mouse strains compared to mice on the C57BL/6 background (Hordeaux *et al.*, 2018; Challis *et al.*, 2019; Liguore *et al.*, 2019; Matsuzaki *et al.*, 2019). This background/species-dependent efficacy was recently associated with the expression of the receptor Ly6a (lymphocyte antigen 6 complex, locus A) (Batista *et al.*, 2019; Hordeaux *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2019). Nevertheless, this new AAV variant remains a powerful tool for the initial demonstration of therapeutic rescue in animals expressing good levels of this receptor, as reported here. It should be noted that the striking amelioration shown here is likely to be facilitated by the use of a KO model. Future studies are needed to examine the effect of this strategy in other transgenic mice and patient cells where the endogenous mutated protein may exert a dominant negative effect. Other properties of the AAV-PHP.B vector, such as its immunogenicity and toxicity, deserve to be explored more in-depth (Hordeaux *et al.*, 2018).

The second important finding provided by our work is that delayed intervention can still rescue the disease

phenotype, even if the therapeutic window to intervene is narrow, as is the case for paediatric conditions like Leigh syndrome. Despite the pathology already being prominent in 1-month-old *Ndufs4* KO mice, we decided to administer the AAV vector at a stage where most organs are almost fully mature, hence reducing the risk of a time-dependent decrease in transgene expression (Di Meo *et al.*, 2017). This timeline is also clinically relevant as children are diagnosed after the presentation of symptoms.

Beyond the findings reported here in a mouse model of Leigh syndrome, our study provides promising perspectives for other fatal conditions with CNS involvement as well as for less severe pathologies with later onset.

## Acknowledgements

We thank Edoardo Nusco, Mathilde Faideau, the TIGEM AAV Vector Core, and the TIGEM animal facility staff for excellent technical assistance. We thank the Photonic Imaging Center of Grenoble Institute Neurosciences (Univ. Grenoble Alpes – Inserm U1216) which is part of the ISdV core facility and certified by the IBiSA label. We are grateful to Pr. Richard D. Palmiter (University of Washington, Seattle) for providing the pAAV-CBA-*Ndufs4*-IRES-GFP plasmid and to Pr. Viviana Gradinaru for providing the PHP.B packaging plasmid.

## Funding

This work was supported by the Fondazione Telethon (grant #TMMDMTX16TT to M.D.), by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-JCJC program, grant #ANR-17-CE37-0008-01 to M.D.), by the grants from the Agence Nationale de la Recherche ANR-15-IDEX-02 NeuroCoG (to M.D.) in the framework of the “Investissement d’Avenir” program, by the European Research Council (ERC-AdG-787702 “UPRmt” to J.A., and ERC.311682 “AlleleChoker” to E.M.S.), by the Swiss National Science Foundation (SNSF 310030B-160318 to J.A.), by the Strategic Focal Area “Personalized Health and Related Technologies (PHRT)” of the ETH Domain (grant #2018-422 to G.B.), by a GRL grant of the National Research Foundation of Korea (NRF GRL 2017K1A1A2013124 to J.A.) and by the EPFL. M.D. is supported by an IDEX Chair of Excellence from the University of Grenoble-Alpes and by the Edmond J. Safra Foundation. M.D. laboratory is member of the Grenoble center of Excellence in Neurodegeneration. The authors also want to thank the Fondation Bettencourt Schueller and the Plan Cancer.

## Competing interests

The authors report no competing interests.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

## References

- Batista AR, King OD, Reardon CP, Davis C, Shankaracharya, Philip V, et al. Ly6a Differential Expression in Blood-Brain Barrier Is Responsible for Strain Specific Central Nervous System Transduction Profile of AAV-PHP.B. *Hum Gene Ther* 2019;
- Botta S, Marrocco E, de Prisco N, Curion F, Renda M, Sofia M, et al. Rhodopsin targeted transcriptional silencing by DNA-binding. *Elife* 2016; 5: e12242.
- Challis RC, Ravindra Kumar S, Chan KY, Challis C, Beadle K, Jang MJ, et al. Systemic AAV vectors for widespread and targeted gene delivery in rodents. *Nat Protoc* 2019; 14: 379–414.
- Chouchani ET, Methner C, Buonincontri G, Hu CH, Logan A, Sawicki SJ, et al. Complex I deficiency due to selective loss of *Ndufs4* in the mouse heart results in severe hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One* 2014; 9: e94157.
- Colella P, Trapani I, Cesi G, Sommella A, Manfredi A, Puppo A, et al. Efficient gene delivery to the cone-enriched pig retina by dual AAV vectors. *Gene Ther* 2014; 21: 450–6.
- Decressac M, Kadkhodaei B, Mattsson B, Laguna A, Perlmann T, Bjorklund A. alpha-Synuclein-induced down-regulation of *Nurr1* disrupts GDNF signaling in nigral dopamine neurons. *Sci Transl Med* 2012; 4: 163ra56.
- Decressac M, Wright B, Tyers P, Gaillard A, Barker RA. Neuropeptide Y modifies the disease course in the R6/2 transgenic model of Huntington’s disease. *Exp Neurol* 2010; 226: 24–32.
- Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, Kumar SR, Chan KY, Banerjee A, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol* 2016; 34: 204–9.
- Di Meo I, Marchet S, Lamperti C, Zeviani M, Viscomi C. AAV9-based gene therapy partially ameliorates the clinical phenotype of a mouse model of Leigh syndrome. *Gene Ther* 2017; 24: 661–7.
- Ferrari M, Jain IH, Goldberger O, Rezoagli E, Thoonen R, Cheng KH, et al. Hypoxia treatment reverses neurodegenerative disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Proc Natl Acad Sci Usa* 2017; 114: E4241–E50.
- Hordeaux J, Wang Q, Katz N, Buza EL, Bell P, Wilson JM. The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. *Mol Ther* 2018; 26: 664–8.
- Hordeaux J, Yuan Y, Clark PM, Wang Q, Martino RA, Sims JJ, et al. The GPI-Linked Protein LY6A Drives AAV-PHP.B Transport across the Blood-Brain Barrier. *Mol Ther* 2019; 27: 912–21.
- Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, et al. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 2011; 478: 123–6.
- Huang Q, Chan KY, Tobey IG, Chan YA, Poterba T, Boutros CL, et al. Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids. *PLoS One* 2019; 14: e0225206.
- Jain IH, Zazzeron L, Goli R, Alexa K, Schatzman-Bone S, Dhillon H, et al. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science* 2016; 352: 54–61.
- Jha P, Wang X, Auwerx J. Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes Using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE). *Curr Protoc Mouse Biol* 2016; 6: 1–14.
- Jin Z, Wei W, Yang M, Du Y, Wan Y. Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization. *Cell Metab* 2014; 20: 483–98.
- Johnson SC, Yanos ME, Bitto A, Castanza A, Gagnidze A, Gonzalez B, et al. Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. *Front Genet* 2015; 6: 247.



- Johnson SC, Yanos ME, Kayser EB, Quintana A, Sangesland M, Castanza A, et al. mTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science* 2013; 342: 1524–8.
- Karamanlidis G, Lee CF, Garcia-Menendez L, Kolwicz SC, Jr., Suthammarak W, Gong G, et al. Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. *Cell Metab* 2013; 18: 239–50.
- Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 1999; 52: 1255–64.
- Kruse SE, Watt WC, Marcinek DJ, Kapur RP, Schenkman KA, Palmiter RD. Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab* 2008; 7: 312–20.
- Liguore WA, Domire JS, Button D, Wang Y, Dufour BD, Srinivasan S, et al. AAV-PHP.B Administration Results in a Differential Pattern of CNS Biodistribution in Non-human Primates Compared with Mice. *Mol Ther* 2019;
- Liu L, MacKenzie KR, Putluri N, Maletic-Savatic M, Bellen HJ. The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D. *Cell Metab* 2017; 26: 719–37 e6.
- Liu L, Zhang K, Sandoval H, Yamamoto S, Jaiswal M, Sanz E, et al. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell* 2015; 160: 177–90.
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 2012; 338: 949–53.
- Matsuzaki Y, Tanaka M, Hakoda S, Masuda T, Miyata R, Konno A, et al. Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Shared among Diverse Inbred Strains of Mice. *Mol Ther* 2019; 27: 700–4.
- Moreno-Lastres D, Fontanesi F, Garcia-Consuegra I, Martin MA, Arenas J, Barrientos A, et al. Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 2012; 15: 324–35.
- Quintana A, Kruse SE, Kapur RP, Sanz E, Palmiter RD. Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 10996–1001.
- Quintana A, Zanella S, Koch H, Kruse SE, Lee D, Ramirez JM, et al. Fatal breathing dysfunction in a mouse model of Leigh syndrome. *J Clin Invest* 2012; 122: 2359–68.
- Quiros PM, Goyal A, Jha P, Auwerx J. Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 2017; 7: 47–54.
- Schweizer N, Viereckel T, Smith-Anttila CJ, Nordenankar K, Arvidsson E, Mahmoudi S, et al. Reduced Vglut2/Slc17a6 Gene Expression Levels throughout the Mouse Subthalamic Nucleus Cause Cell Loss and Structural Disorganization Followed by Increased Motor Activity and Decreased Sugar Consumption. *eNeuro* 2016; 3:
- Song L, Yu A, Murray K, Cortopassi G. Bipolar cell reduction precedes retinal ganglion neuron loss in a complex 1 knockout mouse model. *Brain Res* 2017; 1657: 232–44.
- Spampanato C, De Leonibus E, Dama P, Gargiulo A, Fraldi A, Sorrentino NC, et al. Efficacy of a combined intracerebral and systemic gene delivery approach for the treatment of a severe lysosomal storage disorder. *Mol Ther* 2011; 19: 860–9.
- Vinothkumar KR, Zhu J, Hirst J. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 2014; 515: 80–4.
- Yu AK, Song L, Murray KD, van der List D, Sun C, Shen Y, et al. Mitochondrial complex I deficiency leads to inflammation and retinal ganglion cell death in the Ndufs4 mouse. *Hum Mol Genet* 2015; 24: 2848–60.

## Supplementary material

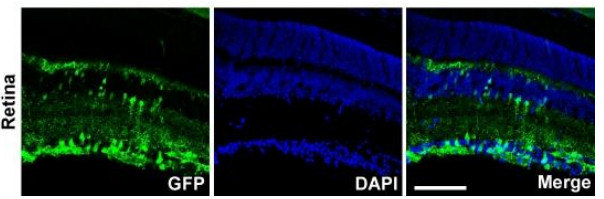
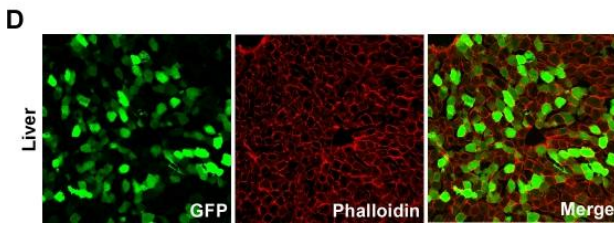
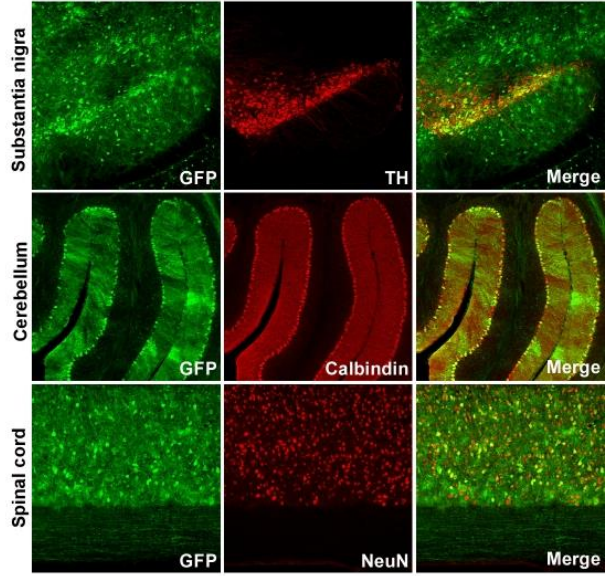
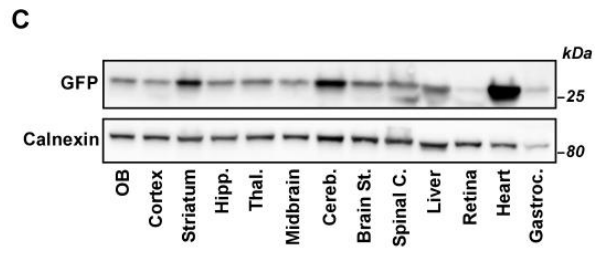
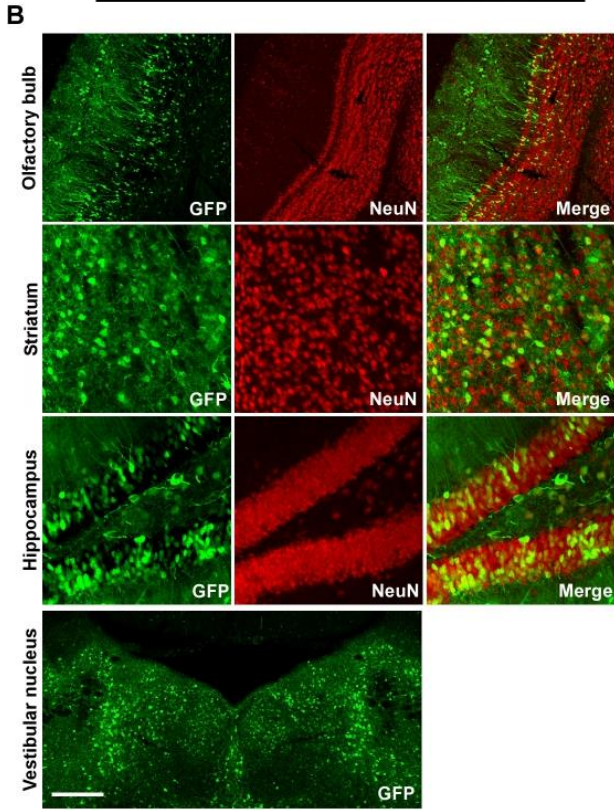
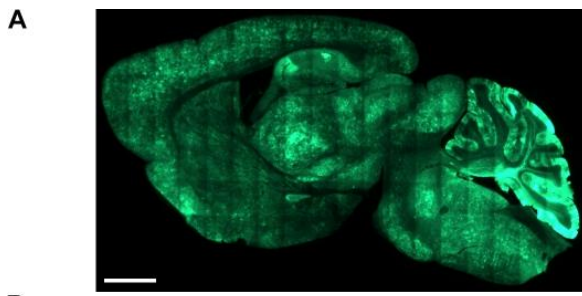
### **Supplementary Fig. 1: Systemic delivery of the AAV-PHP.B-Ndufs4 vector induces widespread expression of the transgene in the CNS and peripheral organs.**

(A) Scanning microscope image of a sagittal section from a mouse brain stained for GFP 2 weeks after systemic AAV-PHP.B vector administration. Scale bar: 1.5 mm

(B) Confocal microscopy images showing NeuN-positive neurons (in red) in the olfactory bulb, the striatum, the hippocampus, TH-positive (in red) nigral dopamine neurons, and calbindin-positive (in red) Purkinje cells in the cerebellum expressing the transgene (GFP in green) 2 weeks after systemic AAV vector injection. Scale bar: 250  $\mu\text{m}$  for the olfactory bulb, 100  $\mu\text{m}$  for the striatum and hippocampus, 350  $\mu\text{m}$  for the substantia nigra, 400  $\mu\text{m}$  for the cerebellum, 300  $\mu\text{m}$  for the spinal cord and the vestibular nucleus.

(C) Western blot analysis showing the expression of GFP in various brain regions, liver, retina, heart, and muscle (gastrocnemius) 2 weeks after AAV-PHP.B vector injection.

(D) Confocal images showing the expression of GFP (in green) in the liver (Phalloidin in red) and in the retina, including retinal ganglion cell layer and inner nuclear layer (DAPI in blue). Scale bar: 120  $\mu\text{m}$  for the liver and the retina.





**Supplementary Fig. 2: Restoration of mitochondrial complexes.**

(A) BN-PAGE immunoblot (total OxPhos cocktail) in isolated brain mitochondria. Individual complexes and supercomplexes are labeled.

(B) Total OxPhos western blot on isolated mitochondria from brains, individual complexes are labeled.

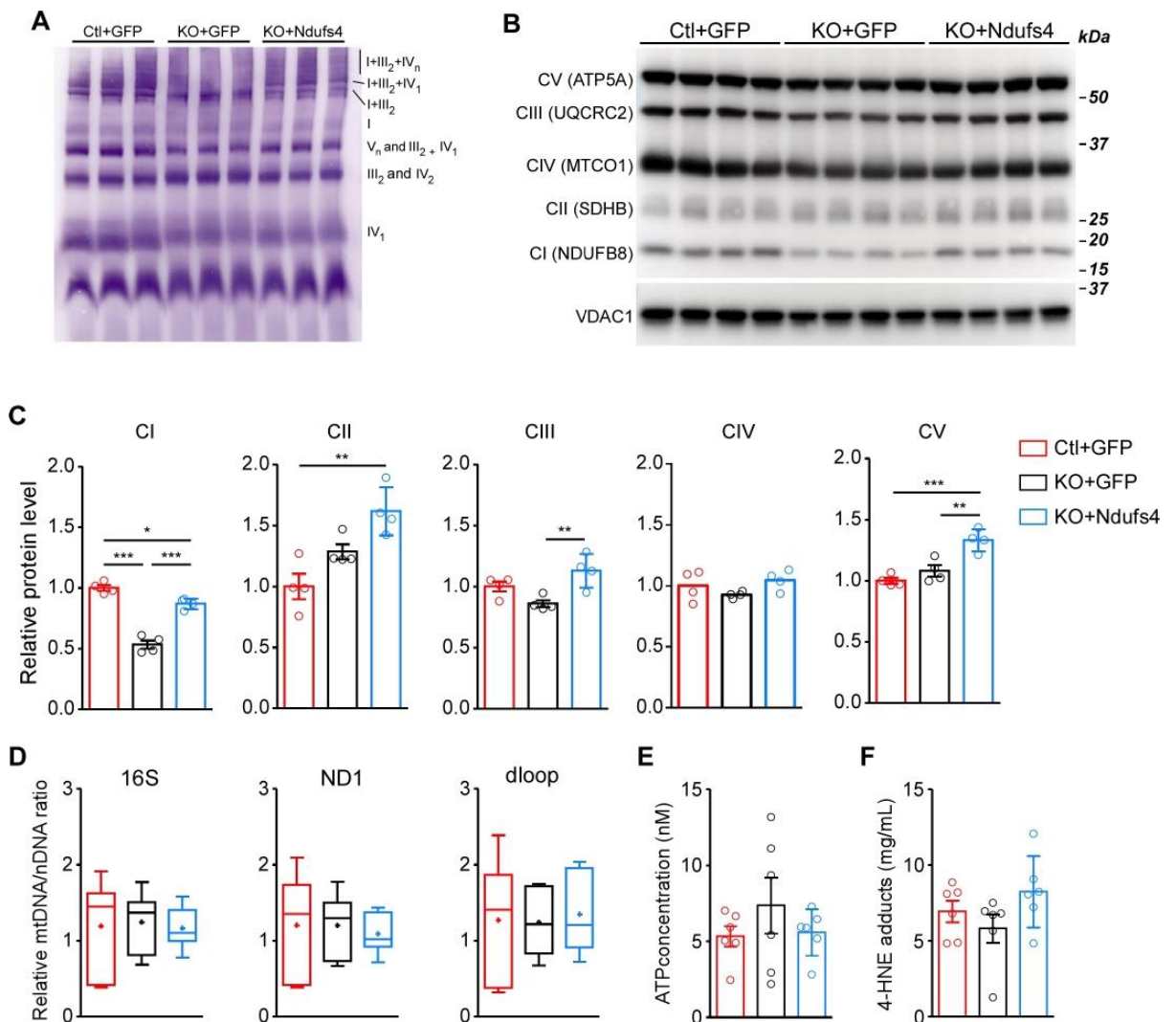
(C) Quantification of each electron transport chain complex (normalized to VDAC).

(D) Mitochondria content determined by quantification of the mtDNA/nucDNA ratio on genomic DNA from the brain, the nuclear *HK2* gene was used for normalization.

(E) ATP levels in protein extract of the brains.

(F) Oxidative stress (4-HNE adducts) quantification in the brain protein extracts.

Data in C, E and F are presented as means  $\pm$  SEM. Data in D are represented as box and whiskers, + sign indicates the mean. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test). Only significant differences are indicated.



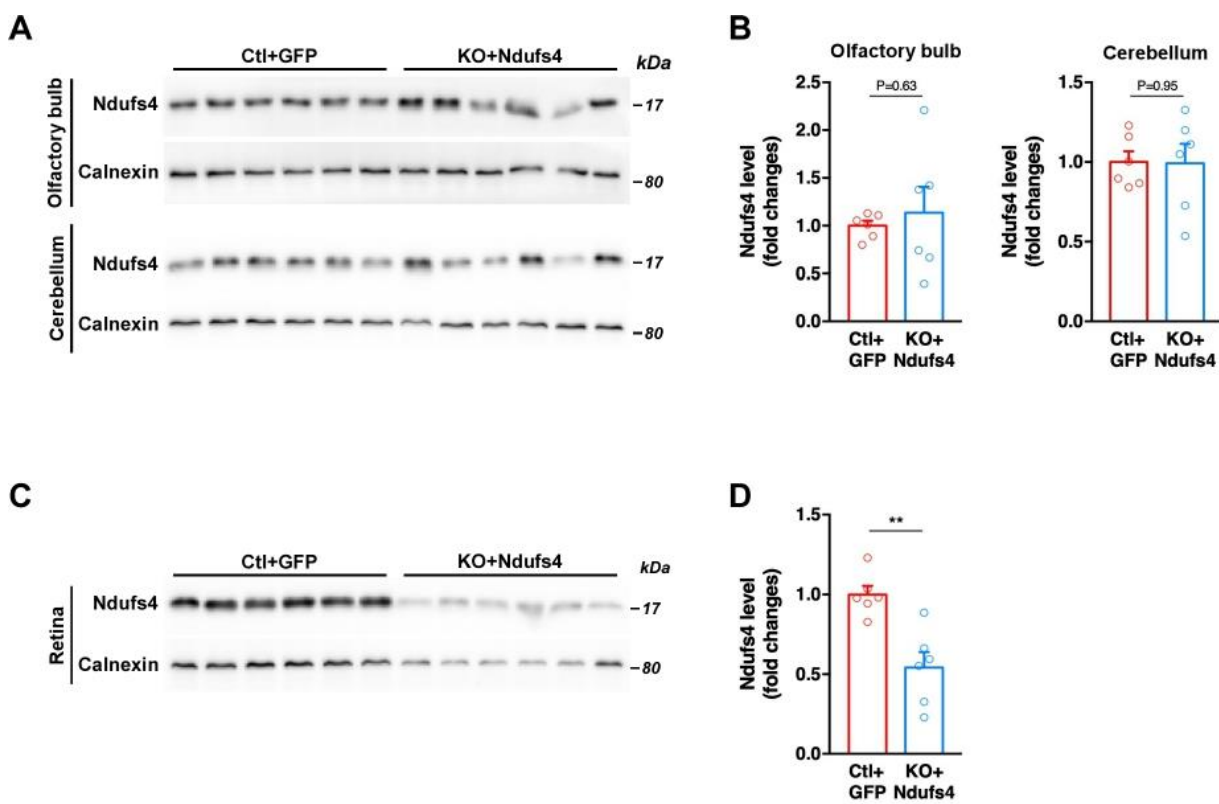
**Supplementary Fig. 3: Restoration of Ndufs4 expression in brain sub-regions and in the retina.**

(A) Western blot analysis showing the expression of Ndufs4 in the olfactory bulb and cerebellum from 45-days old Ctl+GFP and KO+Ndufs4 mice.

(B) Quantification of immunoblots (n=6/group) (student's *t*-test).

(C) Western blot analysis showing the expression of Ndufs4 in the retina from 45-days old Ctl+GFP and KO+Ndufs4 mice.

(D) Quantification of immunoblots (n=6/group) (\*\*P<0.01, student's *t*-test).



**Supplementary Fig. 4: Ndufs4 gene replacement rescued the cardiac pathology.**

(A) Hematocrit levels were measured at 45 and 250 days of age. (n=6-11/group) (\*P<0.05, \*\*\*P<0.001; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for 45 days results, student's *t*-test for 250 days results).

(B) Blood lactate levels at 45 and 250 days of age. (n=6/group) (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test for 45 days results, student's *t*-test for 250 days results).

(C) Representative pictures of horizontal heart sections stained with DAPI (blue). Scale bar: 1mm.

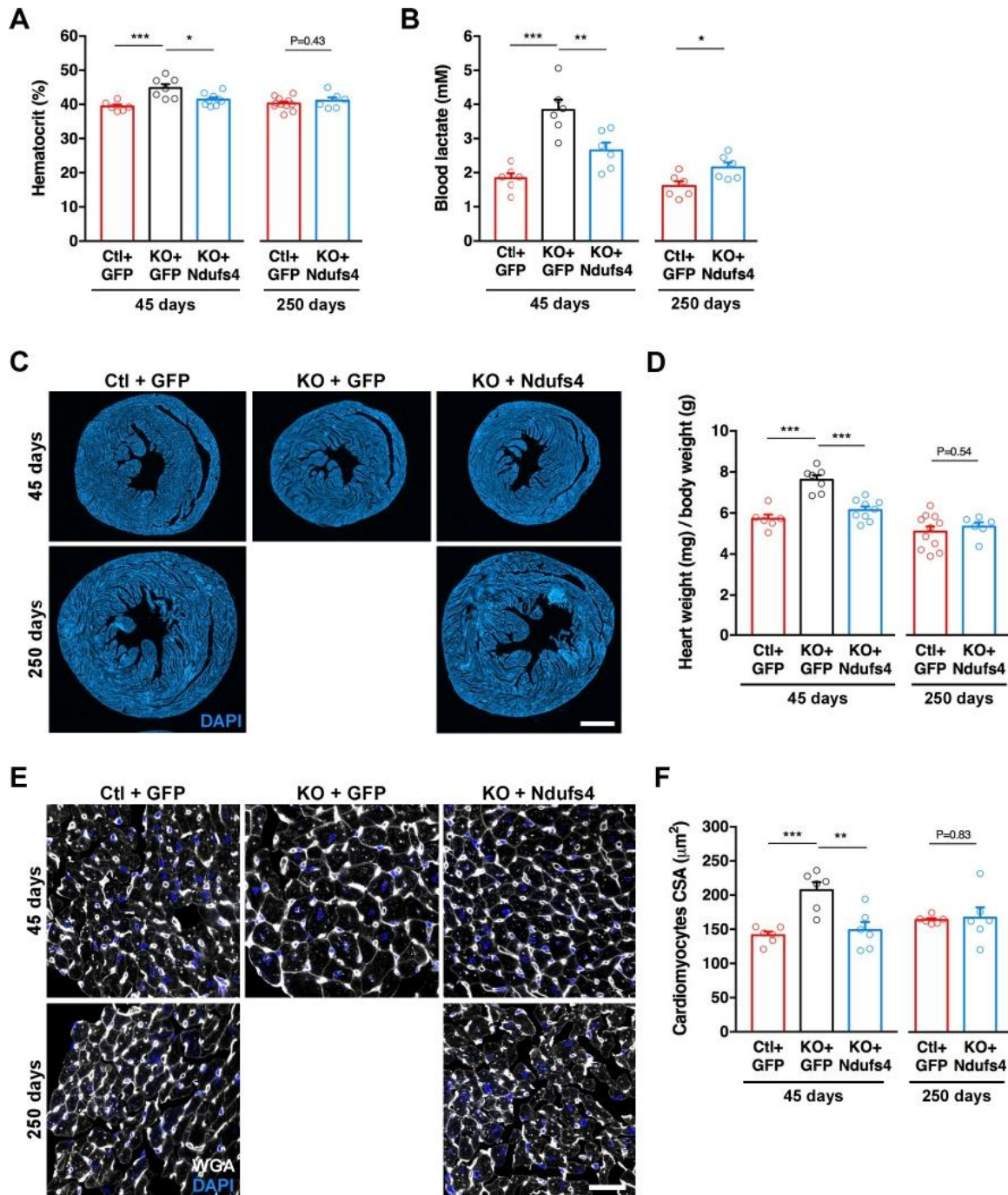
(D) Cardiac hypertrophy was assessed by calculating the heart weight / body weight ratio of 45-days old mice. (n=6-11/group). (\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001; one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test for 45 days results, student's *t*-test for 250 days results).

(E) Representative pictures of horizontal sections from cardiac tissues stained for wheat germ agglutinin (WGA, white) and DAPI (Blue). Scale Bar: 25µm.

(F) Measure of cross-sectional area from WGA-stained sections (CSA) (n=6/group) (\*P<0.05, \*\*P<0.01; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test for 45 days results, student's *t*-test for 250 days results).

Data in A, B, D, and F are presented as means ± SEM.





### III. Etude de l'effet d'une thérapie génique par combinaison d'un vecteur viral et d'USF dans un modèle murin du SL.

#### III.1. Contexte et résumé de l'étude

Les défauts héréditaires de la chaîne respiratoire mitochondriale peuvent conduire à des maladies neurodégénératives sévères chez les adultes et les enfants. Le syndrome de Leigh est la forme la plus commune de maladie mitochondriale pédiatrique. Les enfants atteints de ce syndrome développent des lésions cérébrales progressives en particulier dans le tronc cérébral, le cervelet et les ganglions de la base. Pour l'instant, aucun traitement n'a démontré d'effet significatif sur le ralentissement de la progression de la maladie et les patients décèdent durant les premières années de vie.

Le transfert de gène *in vivo* constitue une alternative aux approches pharmacologiques classiques car cette approche permet une correction du déficit de façon directe et durable. Les vecteurs viraux sont considérés comme les outils les plus efficaces pour délivrer de façon efficace et durable des gènes dans le SNC. Cependant un des principaux défis de la thérapie génique *in vivo* implique la BHE. Cette barrière naturelle bloque le passage des molécules de plus de 400 Da et empêche donc l'entrée d'agents thérapeutiques tels que les vecteurs viraux du système sanguin vers le cerveau.

Dans le cas des maladies mitochondriales sévères comme le syndrome de Leigh, différentes stratégies de thérapies géniques ont été évaluées dans des études pré-cliniques sur les souris *NDUFS4* KO. Les premières approches visaient à contourner la BHE en utilisant des voies d'injections intraparenchymale ou intracérébroventriculaire chez des souris nouveau-nées. Ces deux méthodes permettent une modeste augmentation de la durée de vie. Cependant la faible capacité de diffusion des vecteurs viraux dans le cerveau limite l'efficacité thérapeutique de ces approches (Quintana et al., 2012; Di Meo et al., 2017). Par la suite, des études ont utilisé le vecteur AAV-PHP.B, capable de transduire tout le cerveau après une injection intraveineuse chez des souris adultes. Cette approche a apporté une preuve de concept de l'efficacité thérapeutique d'une large restauration de l'expression du gène *NDUFS4* (Deverman et al., 2016; Reynaud-Dulaurier

et al., 2020; Silva-Pinheiro et al., 2020). Il a cependant été démontré par la suite que le passage du vecteur AAV-PHP.B à travers la BHE est limité à certaines souches de souris ce qui empêche leur utilisation en clinique (Hordeaux et al., 2018; Batista et al., 2019).

Ainsi, la perméabilisation de la BHE par les USF combinés aux microbulles constitue une alternative intéressante pour permettre aux vecteurs viraux de transduire efficacement le cerveau. A ce jour, les études se sont concentrées sur la délivrance d'un gène rapporteur afin de vérifier la faisabilité et la sûreté de cette approche. Cependant, aucune étude n'a été menée pour étudier son potentiel thérapeutique. De plus, dans le cas des pathologies affectant de larges régions du SNC, la BHE doit être perméabilisée sur une surface importante afin de délivrer le transgène le plus largement possible. Cela implique la mise au point d'un protocole permettant de balayer le faisceau ultrasonore sur une large surface du crâne de l'animal.

L'objectif de notre étude était d'étudier l'effet d'une thérapie génique en combinant l'injection d'un vecteur AAV avec l'application d'USF pour perméabiliser transitoirement la BHE dans un modèle murin du syndrome de Leigh.

Les résultats présentés dans cette partie correspondent à des résultats préliminaires permettant d'apporter des preuves de la faisabilité et du potentiel thérapeutique de notre approche. Ils sont découpés en plusieurs parties.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la dose de vecteur viral à injecter pour que le gène soit suffisamment exprimé dans les organes périphériques en considérant qu'une partie du vecteur viral est redirigé dans le cerveau après l'application des USF.

Ensuite, nous avons standardisé des paramètres d'USF permettant de perméabiliser la BHE de façon sûre chez des souris sauvages. Après avoir confirmé que ces paramètres permettaient à un vecteur AAV9 de transduire le cerveau, nous avons mis en place un protocole afin de balayer le faisceau d'USF sur une large surface du crâne.

Nous avons enfin mis en place la stratégie de thérapie génique sur les souris *NDUFS4* KO en combinant l'injection du vecteur viral AAV9-CMV-CBA-NDUFS4-IRES-GFP (par la suite, il sera simplifié AAV9-NDUFS4) à l'application des USF, balayés à la surface du crâne. Les résultats obtenus ici ont apporté une démonstration du potentiel thérapeutique de cette approche mais les paramètres d'USF doivent être améliorés, notamment pour augmenter

le volume de perméabilisation de la BHE.

Dans cette étude, j'ai participé à toutes les sessions d'USF en prenant en charge les procédures impliquant les animaux : préparation, injections, suivi tout au long de l'expérience. J'ai réalisé le suivi de la survie, du poids et de la température des animaux et j'ai réalisé et analysé les tests comportementaux. J'ai réalisé les coupes et marquages des cerveaux ainsi que les western blot. J'ai également produit et titré les vecteurs viraux. Enfin, j'ai participé à l'écriture du permis éthique permettant l'autorisation de l'expérimentation animale.

## III.2. Matériel et méthodes

**Les sections matériel et méthodes suivantes ont déjà été décrites. Je présenterai ici les changements par rapport aux précédentes.**

### *Animaux*

Les animaux utilisés sont issus de l'élevage de souris *NDUFS4*. Les souris ont été élevées et génotypées de la même façon que les deux études précédentes. Le permis éthique est le même que celui utilisé lors de l'étude sur la perméabilité de la BHE des souris *NDUFS4* KO.

### *Production et titration des vecteurs viraux*

Les titres des vecteurs viraux produits sont les suivants : pour les vecteurs AAV9-CAG-GFP (simplifié AAV9-GFP par la suite) :  $6,11 \cdot 10^{14}$  génomes viraux (gv)/mL et  $8,09 \cdot 10^{14}$  gv/mL. Pour les vecteurs AAV9-*NDUFS4* :  $4,59 \cdot 10^{14}$  gv/mL et  $4,70 \cdot 10^{14}$  gv/mL.

### *Injection intraveineuse des vecteurs viraux*

Pour l'étude de l'expression du transgène selon la dose de vecteur viral injectée, le vecteur AAV9-GFP a été injecté soit à la dose de  $1 \cdot 10^{13}$  gv/kg soit à la dose de  $5 \cdot 10^{13}$  gv/kg (dilué dans du PBS stérile) dans le sinus rétro-orbital de souris sauvages âgées d'un mois.

Pour l'étude impliquant le remplacement du gène *NDUFS4*, le vecteur AAV-*NDUFS4* a été injecté à une dose de  $5 \cdot 10^{13}$  gv/kg (dilué dans du PBS stérile) dans le sinus rétro-orbital de souris *NDUFS4* KO âgées d'un mois.

### *Western blot*

Les anticorps primaires utilisés pour réaliser les Western blot sont les suivants : anticorps anti-GFP (poulet, 1:2000, Abcam, #ab290) et anticorps anti-calnexin (lapin, 1:5000, Enzo Life Science, ADI-SPA-860)

Marquage Hématoxyline & éosine :

Les coupes de cerveaux de 14 $\mu$ M d'épaisseur ont été montées directement sur des lames Superfrost. Le marquage a été réalisé en suivant le protocole « *H&E Staining Method and Protocol – Harris* », disponible sur le site internet <http://www.ihcworld.com>

#### *Immunomarquage*

Les anticorps primaires utilisés pour réaliser les immunomarquages sont les suivants : anticorps anti-GFP (poulet, 1:2000, Abcam, #ab290), anticorps anti-NeuN (lapin 1:1000, Cell Signaling, #12943), anticorps anti-Iba1 (lapin, 1:2000, Wako, #019-19751), anticorps anti-GFAP (lapin, 1:2000, Abcam, #ab7260), anticorps anti-Olig2 (lapin, 1 :1000, Millipore, #AB9610).

#### *Microscopie*

Les coupes de cerveaux et de foies ont toutes été imagées à l'AxioScan.Z1 slide scanner (Zeiss) avec l'objectif 20X à l'exception des coupes de cerveaux utilisées pour la caractérisation des cellules transduites par le vecteur viral (figure 28). Ces dernières ont été imagées au microscope confocal LSM 710 (Zeiss) avec l'objectif 20X et 63X.

#### *Tests comportementaux*

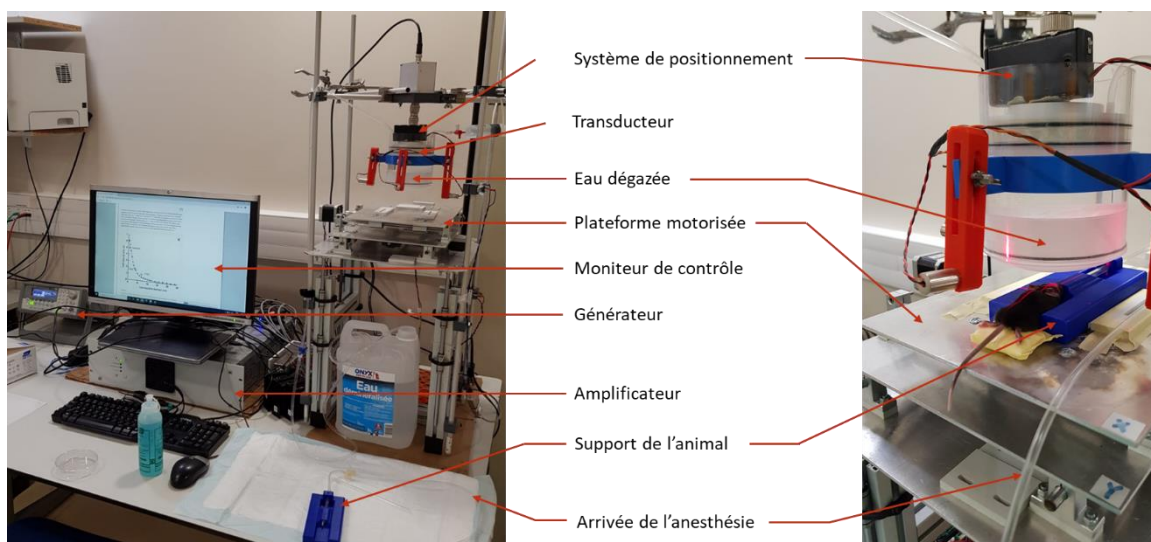
Le test de l'open field a été réalisé dans l'obscurité, dans une enceinte constituée de 4 zones cubiques de 50cm de côté et présentant des parois suffisamment hautes pour que les souris ne puissent pas sortir. Le test a duré 30min pour chaque souris et a été enregistré grâce à une caméra infrarouge. La distance parcourue est ensuite analysée avec le logiciel EthoVision XT (version 16.0).

**Dans cette section je décrirai en détail les méthodes utilisées pour appliquer les USF et effectuer les analyses en IRM.**

#### *Application des USF et acquisitions par IRM*

Afin de délivrer les USF, nous avons utilisé un équipement développé par Vasile Stupar, ingénieur de recherche dans l'équipe du Dr. Emmanuel Barbier « Neuroimagerie

fonctionnelle et perfusion cérébrale ». Cet équipement est constitué d'un générateur (33220A, Agilent, Palo Alto, CA, USA), d'un amplificateur, d'un transducteur (A392S, Panametrics, Waltham, MA, USA) placé dans un réservoir rempli d'eau dégazé et d'une plateforme motorisée, le tout contrôlé par un ordinateur (**figure 25**). L'animal est placé sur un support auquel est relié le dispositif d'anesthésie. Ce support est mobile ce qui permet de le placer dans une zone plus confortable au moment de l'injection retro-orbitale des microbulles, facilitant l'accès à l'œil de l'animal (**figure 25**). Un système de positionnement laser est situé au-dessus du transducteur. Contrairement à certains équipements utilisés dans d'autres études, le système de délivrance des USF n'est pas relié à une unité d'IRM (Huang et al., 2012; Thévenot et al., 2012). Les acquisitions IRM que nous avons réalisées ont donc été obtenues après la session d'application des USF, sur la plateforme IRMaGe avec un équipement BioSpec 47/40 Avance III (Bruker, Wissembourg, France) dont le champ magnétique est de 4,7 Teslas. Une antenne volumique de diamètre intérieur de 72mm a été utilisée pour l'émission et une antenne de surface optimisée pour les acquisitions sur le cerveau de souris a été utilisée pour la réception du signal.



**Figure 25 : Photographie du dispositif présent sur la plateforme IRMaGe permettant de délivrer les ultrasons focalisés.**

*Le générateur fournit le courant en continu qui est amplifié par l'amplificateur. Il est ensuite transmis au transducteur qui délivre les ultrasons selon les paramètres définis par l'ordinateur de contrôle. Le transducteur est placé dans un réservoir d'eau dégazé afin que les ultrasons ne se dissipent pas dans l'air. La plateforme mobile est contrôlée par l'ordinateur et peut se déplacer dans toutes les directions.*

Un protocole d'USF permettant de perméabiliser la BHE avait déjà été mis au point par Vasile Stupar. Il a cependant été développé chez le rat pour des tirs ultrasonores en un seul point. Avec son aide, nous l'avons donc adapté à la souris et nous avons mis au point un protocole pour balayer le faisceau d'USF.

Les souris sont tout d'abord anesthésiées avec 3% d'isoflurane (dans un mélange O<sub>2</sub> (0.8L/min) / air (1L/min) pour l'induction puis 1,5% (pour les souris sauvages) ou 0,5% (pour les souris *NDUFS4* KO) d'isoflurane en masque pour la maintenance. Leur crâne est rasé (crème dépilatoire) puis rapidement lavé à l'eau pour éviter l'irritation du crâne provoqué par la crème. L'animal est transféré sur le support (**figure 25**) où l'anesthésie est maintenue aux mêmes valeurs. Le support est placé sur la plateforme mobile et le centre du crâne est correctement ciblé grâce au laser de positionnement lorsque que les USF sont appliqués en un seul point. Pour le balayage, la zone ciblée correspond à l'endroit où vont démarrer les ultrasons (**figure 26**). Pour le premier animal, on effectue un balayage test, sans ultrasons, pour vérifier que la plateforme se déplace de manière à ce que le laser suive la trajectoire désirée sur le crâne de l'animal.

Les microbulles anioniques (fournies par Dr Anthony Delalande, CBM, Orléans) sont préalablement solubilisées dans 500µL d'HEPES (10mM, pH : 7,4) et cette solution est agitée pendant 45 secondes. La solution de microbulles est ensuite diluée puis injectée dans le sinus retro-orbital (0,5mL/kg de solution, diluée dans 90% d'HEPES (10mM, pH : 7,4) et 10% de sucrose pour que le volume final injecté soit de 100µL). Directement après l'injection des microbulles, du gel à échographie (ASEPT UNIGEL) est appliqué sur le crâne de l'animal pour assurer une bonne transmission des ultrasons. Puis, le support sur lequel se trouve l'animal est transféré sur la plateforme mobile et les USF sont appliqués immédiatement.

Les USF sont appliqués avec les paramètres suivants : fréquence du transducteur : 1,2Mhz, rapport cyclique : 5%, fréquence de répétition des pulsations : 1Hz, délai de pulsation : 50ms/sec. Afin de mettre au point le système, deux paramètres ont été ajustés au fil de l'étude : la tension délivrée (reliée à la pression par la formule suivante  $y = 0,0073x + 0,0122$  ou  $x$  est la valeur de la tension en mV et  $y$  la valeur de la pression en MPa) et la zone d'application des ultrasons (fixe ou balayage). La tension utilisée sera précisée à chaque fois dans les résultats. En ce qui concerne les USF, ils ont été délivrés soit sur une

seule zone pendant une minute, soit le faisceau a été balayé à une vitesse de 1mm par seconde pendant 180 secondes sur la surface du crâne en formant un rectangle de 8mm par 2mm (**figure 26**). Ce dernier paramètre a été légèrement modifié pour quelques animaux ce qui sera précisé dans la partie résultat le cas échéant.

Pour les procédures impliquant l'utilisation d'un vecteur viral, celui-ci est injecté sous PSM de type 2 directement après l'application des USF, dans le sinus retro-orbital n'ayant pas reçu l'injection de microbulles. Les souris sauvages ont reçu une injection d'un vecteur AAV9-GFP ( $5.10^{13}$  gv /kg dilué dans du PBS). Les souris *NDUFS4* KO ont reçu une injection d'un vecteur AAV9-NDUFS4 à la même concentration.

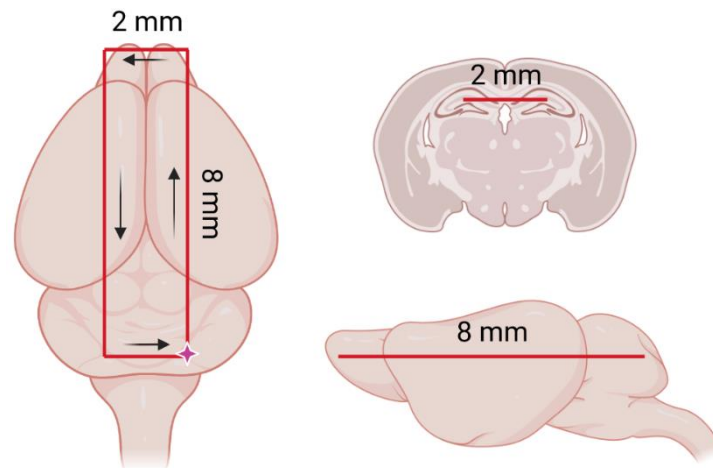
La fin de la procédure consiste à vérifier par IRM la sûreté et l'efficacité de la procédure de perméabilisation de la BHE par les USF. Pour cela un agent de contraste IRM contenant du gadolinium (Dotarem, Guerbet, France, 937Da, 1mL/kg) est injecté par voie intrapéritonéale. Après environ 5min, le temps que le produit soit passé dans toute la circulation sanguine, l'animal est transféré dans l'appareil IRM et maintenu sous anesthésie. Nous avons réalisé 2 types d'images :

- Pour visualiser les lésions nous avons utilisé une séquence d'imagerie anatomique d'écho de spin multi-coupe (TurboRARE) pondérée en T2 avec les paramètres suivants : 19 coupes axiales, épaisseur de coupe : 0,7mm, champ de vue : 20x20mm, résolution dans le plan : 78x78 $\mu$ m, TE (temps d'écho) / TR (temps de répétition) : 36/2200ms, nombre d'excitations : 3 pour un temps d'acquisition de 3min31sec. Dans le cas des souris *NDUFS4* KO, les images de pondération T2 n'ont pas été réalisées. En effet, leur forte sensibilité à conduit à limiter le temps sous anesthésie, d'autant plus que les paramètres de sûreté avaient déjà été validés sur des souris sauvages
- Pour vérifier la perméabilisation de la BHE nous avons réalisé deux acquisitions pondérées en T1 (RARE). Une en orientation axiale et la seconde en orientation coronale. Les paramètres pour l'acquisition axiales sont identiques à l'acquisition pondérée en T2 sauf : TE/TR= 7/800ms, nombre d'excitations : 2 pour un temps d'acquisition de 1min16sec. Pour l'acquisition en orientation coronale 11 coupes ont suffi pour couvrir l'ensemble du cerveau. Lors des procédures de mise au point sur les souris sauvages, une image pondérée en T1 était également réalisée avant



l'injection du produit de contraste afin d'avoir une image de référence.

A la fin de la procédure, les animaux ont été replacés dans leur cage sous la lampe chauffante et ils ont été surveillés jusqu'à leur réveil. Ils ont ensuite été replacés dans l'animalerie et leur état de santé a été contrôlé tous les jours pendant la semaine qui a suivi cette procédure.



**Figure 26 : Schéma de la zone de balayage du faisceau d'ultrasons sur le cerveau des souris.**

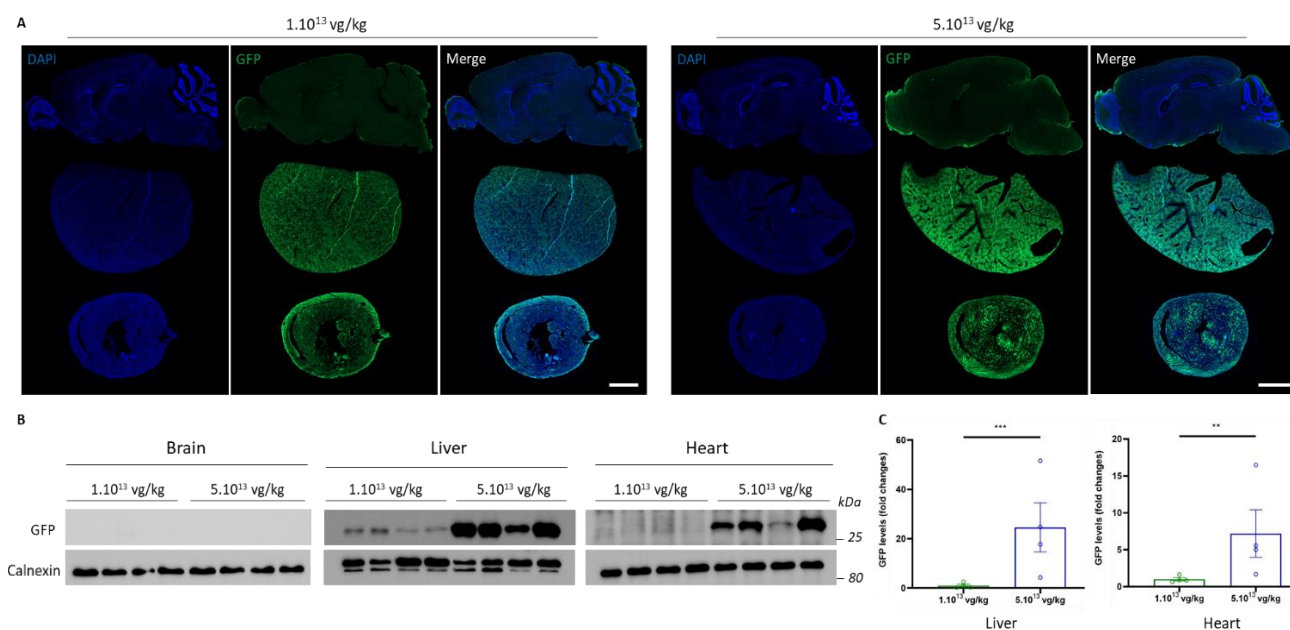
*Le balayage s'effectue sur un rectangle de 8 mm par 2 mm. Sur ce schéma sont représentés les coordonnées de balayage sur les 3 plans de coupe du cerveau : axial (à gauche), coronal (en haut à droite) et sagittal (en bas à droite). L'étoile désigne l'endroit où commence l'application des ultrasons puis le faisceau suit les flèches. (Généré avec Biorender).*

### III.3. Résultats

#### **Détermination de la dose de vecteur viral permettant une transduction efficace des organes périphériques chez des souris adultes.**

Nous avons tout d'abord évalué si l'expression du transgène était dépendante de la dose de vecteur viral injectée. Ainsi, le but était d'injecter une dose suffisamment basse pour améliorer la sûreté de la procédure tout en maintenant un niveau d'expression du transgène suffisant. Nous avons évalué le niveau d'expression de la GFP dans le cerveau, le foie et le cœur en considérant que l'application des USF dans les expériences suivantes redirigerait une partie du vecteur dans le cerveau. Pour cela, nous avons injecté un vecteur AAV9 codant pour la GFP sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire CAG dans le sinus retro-orbital chez des souris sauvages âgées de 30 jours. Les souris ont été

injectées avec 100µL de vecteur viral à une concentration de  $1.10^{13}$  gv/kg ou de  $5.10^{13}$  gv/kg. Deux semaines après l'injection, les souris ont été euthanasiées et les cerveaux, foies et cœurs ont été prélevés. Les immunomarquages des coupes de cerveau ainsi que le western blot sur ce tissu confirme que pour les deux doses, le transgène n'est pas exprimé dans le cerveau (**Figure 27A et B**). Pour le foie et le cœur, les résultats montrent que l'expression de la GFP est dépendante de la dose de vecteur viral injecté. Dans le foie, l'immunomarquage montre qu'à la dose de  $5.10^{13}$  gv/kg, la GFP est exprimée de façon homogène sur toute la surface des coupes de foie. L'analyse du western blot montre que cette dose permet une expression du transgène 25 fois supérieure ( $\pm 10$ ) à la dose de  $1.10^{13}$  gv/kg (**Figure 27B et C**). Dans le cœur, le niveau d'expression du transgène est également le plus important à la dose de  $5.10^{13}$  gv/kg. L'analyse du western blot montre que la GFP est exprimée 7 fois plus ( $\pm 3$ ) qu'à la dose de  $1.10^{13}$  gv/kg.



**Figure 27 : Comparaison de l'expression du transgène en fonction de la dose de vecteur AAV9-GFP injectée.**

**A :** Images représentatives acquises à l'Axioscan d'une coupe de cerveau (sagittale), de foie (transversale) et de cœur (transversale), montrant l'expression de la GFP (vert) et colorées au DAPI (bleu), 2 semaines après l'injection intraveineuse d'une faible dose (à gauche) ou d'une forte dose (à droite) d'un vecteur AAV9-GFP chez des souris sauvages de 30 jours. Barre échelle : 2mm. **B :** Western blot montrant l'expression de la GFP et de la calnexine dans le cerveau, le foie et le cœur de souris sauvages, 2 semaines après l'injection intraveineuse d'une faible dose ou d'une forte dose d'un vecteur AAV9- GFP. **(C)** Quantifications des western blot réalisés sur les foies et les cœurs (n = 4/groupe) (\* $P < 0.5$ , test de Wilcoxon-Mann-Whitney). Données présentées au format moyenne  $\pm$  SEM

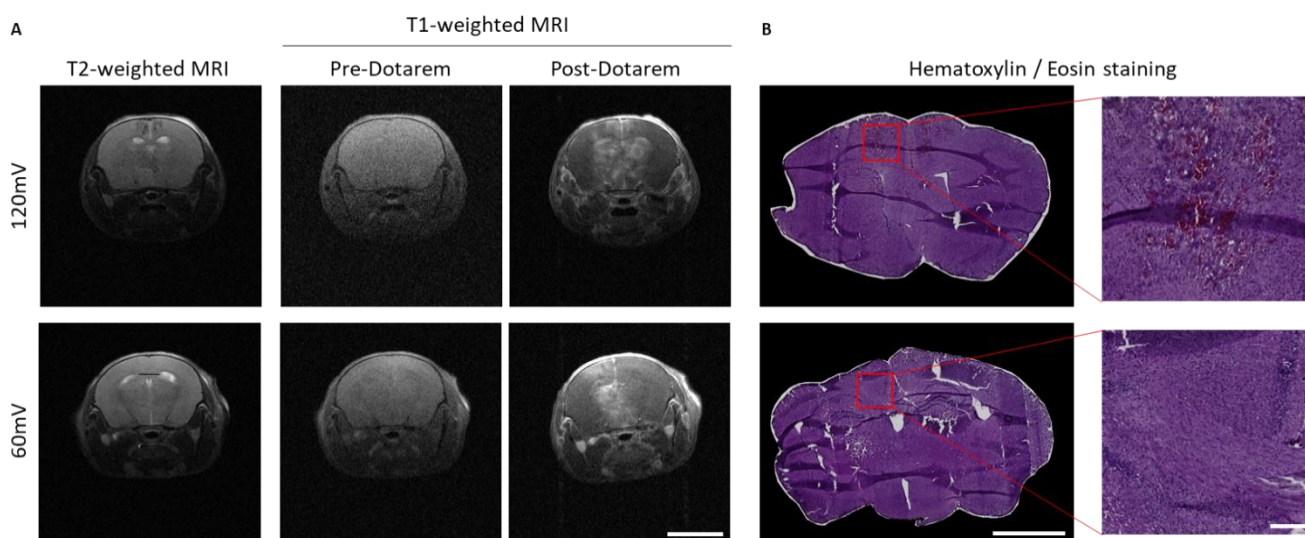
Le transgène est toutefois exprimé sur une surface moins importante que pour le foie (**Figure 27A**). Ces résultats montrent que l'expression du transgène est dépendante de la dose injectée. La dose de  $5.10^{13}$  gv/kg permettant la meilleure expression du transgène dans le foie et dans le cœur, c'est elle qui sera utilisée dans la suite de l'étude.

#### **Détermination de la tension permettant au USF de perméabiliser la BHE de manière non invasive.**

Afin de mettre au point la procédure d'USF, nous avons tout d'abord déterminé la tension à appliquer afin que les ultrasons induisent une perméabilisation de la BHE sans causer de lésion tissulaire. Pour cela, des USF ont été appliqués sur des souris sauvages âgées de 3 semaines afin que leur taille et leur poids soit comparable avec celui des souris *NDUFS4* KO d'un mois que nous utiliserons par la suite. Pour chaque animal, une image anatomique de pondération T2 a été réalisée pour mettre en évidence les éventuelles lésions cérébrales. Deux images de pondération T1, pré et post injection du produit de contraste permettent de mettre en évidence l'efficacité de l'ouverture de la BHE par les ultrasons. L'augmentation du contraste de l'image fait apparaître des zones hyperintenses correspondant à l'entrée du produit de contraste dans le cerveau. Nous avons commencé les tests avec une tension de 120mV. Cette première valeur a été estimée et adaptée au poids de la souris selon le protocole qui avait été établi chez le rat par l'équipe du Dr. Emmanuel Barbier. Cette tension permettait de perméabiliser efficacement la BHE dans la zone ciblée. Cependant, l'image de pondération T2 mettait en évidence des lésions tissulaire. Nous avons ainsi baissé progressivement la tension appliquée, jusqu'à déterminer qu'une tension de 60mV permettait d'ouvrir efficacement la BHE sans causer de dommages visibles par IRM (**figure 28A**).

Les animaux pour lesquels nous avons vu des lésions sur les images IRM ont été euthanasiés immédiatement et leur cerveau a été prélevé. Les autres ont été euthanasiés deux semaines après la procédure et leurs cerveaux ont également été prélevés pour vérifier l'absence de lésions tissulaires à plus long terme. Les résultats du marquage hématoxyline/éosine confirme la présence de lésions corticales pour une tension de 120mV. Pour une tension de 60mV, le marquage hématoxyline/éosine ne met pas en évidence de lésions hémorragiques (**figure 28B**). Pour ce dispositif, cette tension correspond à une pression acoustique délivrée par le transducteur de 0,45 MPa. Cette

tension permet de perméabiliser la BHE sans causer de dommages tissulaires et a donc été appliquée pour la suite de l'étude.



**Figure 28 : Evaluation de la tension à appliquer pour ouvrir la BHE efficacement et de manière non invasive.**

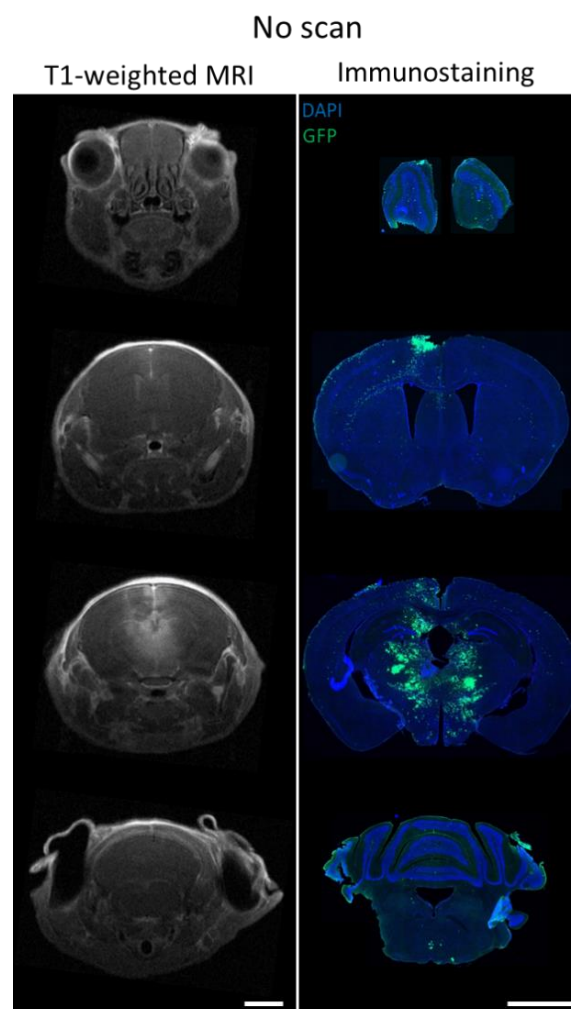
*A : Acquisitions coronales de pondération T2 et T1 (pré et post injection de produit de contraste) des cerveaux après application d'une tension de 120mV ou de 60mV. Barre d'échelle : 5mm. B : Images représentatives acquises à l'Axioscan d'une coupe coronale de cerveau marquée à l'hématoxyline/éosine pour l'identification des éventuelles lésions après application d'une tension de 120mV ou de 60mV. Barre d'échelle : 5mm. A droite, agrandissement d'une zone d'intérêt. Barre d'échelle : 200 $\mu$ M.*

### **Combinaison de l'injection d'un vecteur AAV9 avec l'application d'USF selon les paramètres déterminés**

Après avoir déterminé la tension permettant de perméabiliser la BHE de manière focalisée, l'objectif suivant est de vérifier que cela permet à un vecteur AAV9 de transduire cette région afin d'exprimer un transgène. Pour cela, nous avons appliqué le protocole d'USF au centre de la boîte crânienne chez des souris sauvages âgées de trois semaines. Chaque animal a ensuite immédiatement reçu une injection intraveineuse d'un vecteur AAV9- GFP ( $5.10^{13}$  gv/mL). L'image IRM après injection du produit de contraste met en évidence une augmentation de la perméabilité de la BHE localisée au niveau de la zone d'application des USF sur une largeur d'environ 2mm et sur une large partie de l'axe dorso-ventral du cerveau (**figure 29**).

Deux semaines après la procédure, les animaux ont été euthanasiés et les cerveaux et les foies ont été prélevés. Ce dernier constitue un tissu contrôle permettant de vérifier que

l'injection a été réalisée correctement et que la dose de vecteur viral injectée est suffisante pour permettre un bon niveau de transduction de cet organe malgré la redistribution d'une partie vers le cerveau. L'analyse qualitative des immunomarquages sur les coupes de foies révèle que le vecteur viral transduit toujours une large partie de cet organe (données non incluses ici). L'immunomarquage de la GFP sur les coupes de cerveaux confirme que le transgène est exprimé dans le cerveau, dans la zone où la BHE a été perméabilisée par les USF (**figure 29**). Ces résultats confirment que nos paramètres d'USF permettent au vecteur viral de transduire le cerveau dans la zone ciblée. La dose de vecteur viral injectée permet de conserver un bon niveau de transduction du foie lorsque les USF sont appliqués sur une seule zone.



**Figure 29 : Evaluation de la transduction d'un vecteur AAV9- GFP après application d'USF au centre de la boîte crânienne.**

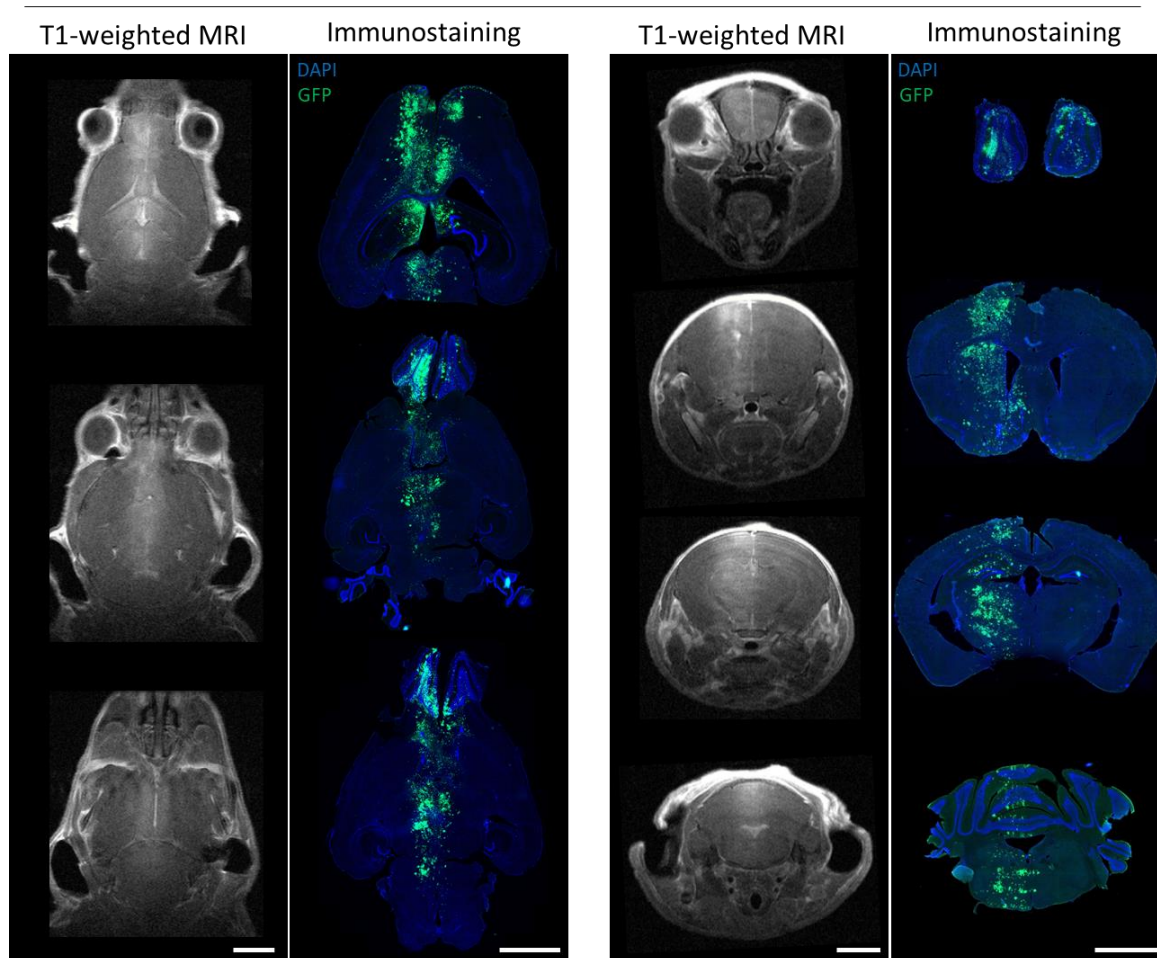
Correspondance entre l'image pondérée en T1 après injection du produit de contraste et l'expression de la GFP (vert) pour 4 coupes coronales représentatives de cerveau d'une souris ayant reçue les USF au centre de la boîte crânienne. Barres d'échelles = 2mm.

### **Evaluation de la transduction cérébrale d'un vecteur AAV9 après balayage du faisceau d'USF sur la surface du crâne des animaux.**

Afin de permettre au vecteur viral de transduire des régions plus larges du cerveau, nous avons appliqué un balayage du faisceau d'USF sur la surface du crâne de souris sauvages âgées de trois semaines. Après avoir vérifié en IRM que nos paramètres de balayage permettaient de perméabiliser la BHE sur une large surface, nous avons combiné l'application des USF en balayage avec l'injection intraveineuse d'un vecteur AAV9-GFP ( $5.10^{13}$  gv/mL). L'image IRM après injection du produit de contraste met en évidence une augmentation de la perméabilité de la BHE le long de l'axe antéro-postérieur, à partir du bulbe olfactif, jusqu'au mésencéphale (**figure 30**). Dans les zones où le faisceau d'USF n'a pas été balayé, en particulier dans les régions latérales et les régions les plus postérieures comme le tronc cérébral, l'absence de signal hyperintense indique que la BHE ne semble pas avoir été perméabilisée dans ces régions (**figure 30**). Quelques paramètres ont été adaptés entre les souris : nous avons testé d'effectuer un balayage avec un rectangle de 7mm par 3mm mais cela n'induisait pas de changement important des zones de perméabilisation de la BHE. Nous avons également essayé d'optimiser le placement des animaux sur le support pour deux raisons : (1) Lorsque la plateforme se déplace pour effectuer le balayage, le transducteur induit une pression sur le crâne de l'animal et peut faire glisser ce dernier de gauche à droite, d'où le décalage latéral de la zone ouverte sur le panel de droite de la **figure 30**. (2) La plateforme mobile doit être positionnée suffisamment haut afin d'assurer un bon contact entre la membrane du transducteur et le crâne de l'animal pour ne pas dissiper les ondes ultrasonores dans l'air. Cependant nous avons subi des pertes d'animaux à cause d'une pression trop importante sur le crâne de l'animal, conduisant à des arrêts respiratoires, en particulier à cause de la durée du balayage (180 secondes). Différentes hauteurs ont donc été testées afin de déterminer la plus adaptée.

Deux semaines après cette procédure, les animaux ont été euthanasiés et les cerveaux et les foies ont été prélevés. L'immunomarquage de la GFP réalisé sur les coupes de foies montre que le transgène est toujours largement exprimé dans cet organe (données non incluses ici). Ce résultat montre que les injections ont été réalisées correctement et que cette dose de vecteur viral permet un bon niveau de transduction du foie.





**Figure 30 : Evaluation de la transduction d'un vecteur AAV9-GFP après balayage du faisceau d'USF à la surface du crâne des animaux.**

Correspondance entre l'image pondérée en T1 après injection du produit de contraste et l'expression de la GFP (vert) pour 4 coupes axiales (panel de gauche) et 4 coupes coronales (panel de droite) de cerveaux de 2 souris ayant reçues les ultrasons en balayage. Barres d'échelles = 2mm.

L'immunomarquage de la GFP dans le cerveau confirme que le balayage du faisceau d'USF permet au vecteur viral de transduire de plus larges régions du cerveau. La comparaison entre les images de pondération T1 et les immunomarquages montre que la zone de perméabilisation de la BHE correspond à celle des régions cérébrales transduites par le vecteur viral (**figure 30**). Ces résultats confirment que nos paramètres de balayage permettent au vecteur viral de transduire préférentiellement les régions cérébrales médianes, le long d'un axe d'environ 2mm allant du bulbe olfactif jusqu'au mésencéphale. En dehors de ces régions, le niveau de transduction est faible et variable selon les animaux. Cette dose de vecteur viral permet de conserver un bon niveau de transduction

du foie même quand le faisceau d'USF est balayé et qu'une partie du vecteur viral est redirigé vers le cerveau.

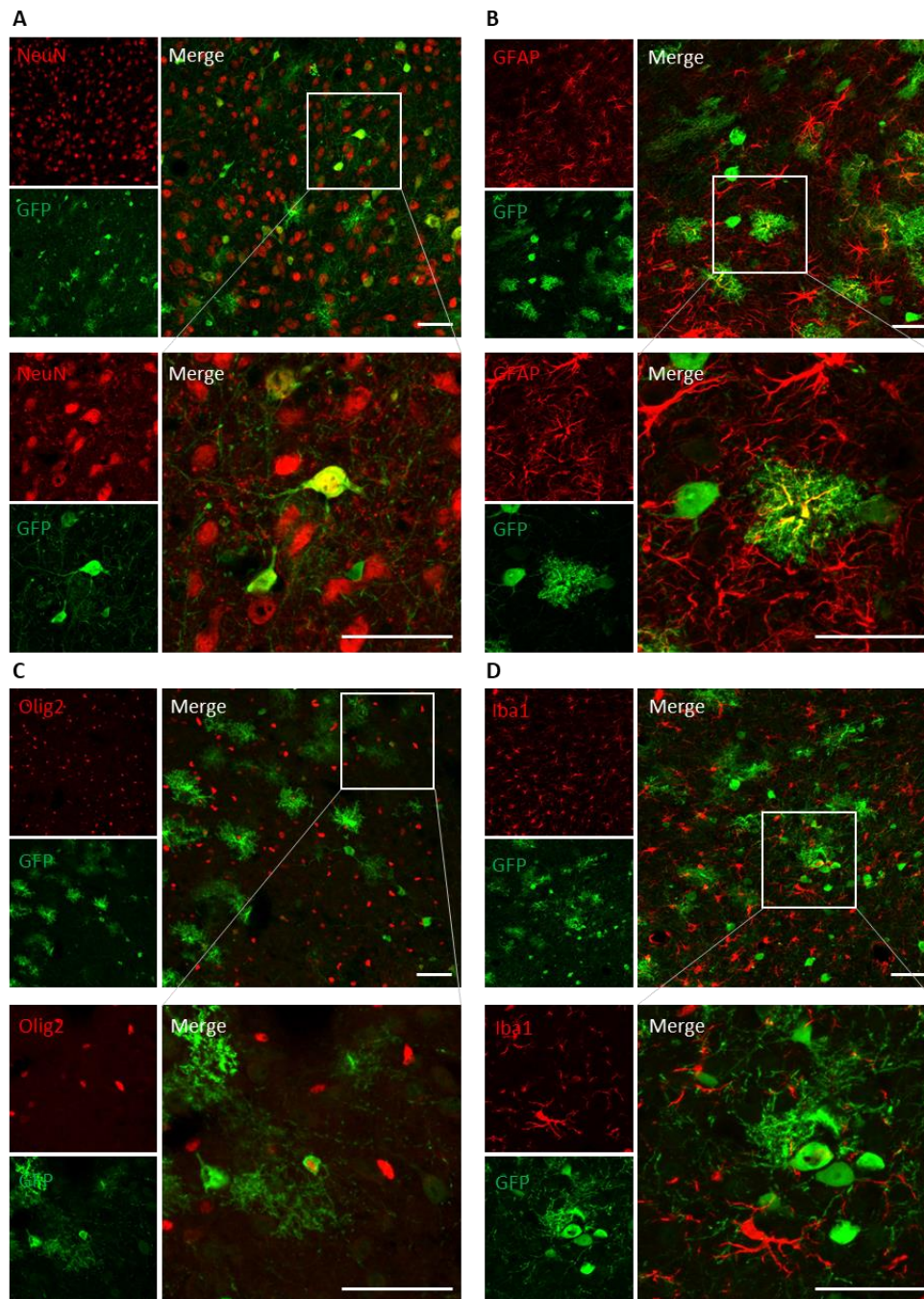
Afin de déterminer les types cellulaires transduits par le vecteur viral, nous avons réalisé une analyse phénotypique sur les coupes de cerveau. Les résultats montrent que le vecteur viral transduit des neurones (NeuN-positif/GFP-positif) et des astrocytes (GFAP-positif/GFP-positif) et dans une moindre mesure des oligodendrocytes (Olig2-positif/GFP-positif) mais nous n'avons pas détecté de cellules microgliales infectées (Iba1-positif/GFP-positif) (**figure 31**). Ces résultats montrent que cette stratégie pourrait donc être efficace pour remplacer l'expression du gène *NDUFS4* chez les souris *NDUFS4* KO car le vecteur viral transduit des neurones et des astrocytes, deux types cellulaires jouant un rôle prépondérant dans la pathologie (Bolea et al., 2019; Ramadasan-Nair et al., 2019; Liu et al., 2015).

#### **Evaluation de l'effet du remplacement du gène *NDUFS4* après augmentation de la perméabilité de la BHE par le balayage d'USF chez des souris *NDUFS4* KO.**

Après avoir déterminé des paramètres de balayage permettant de perméabiliser la BHE sur une large zone du cerveau, nous avons appliqué cette stratégie à des souris *NDUFS4* KO. Bien que les paramètres de balayage ne soient pas encore optimaux, l'objectif était de réaliser une étude pilote afin d'évaluer l'effet de cette approche. Nous n'avons pas testé à nouveau différentes intensités d'USF pour évaluer la sûreté de la procédure chez les souris *NDUFS4* KO. En effet, l'étude présentée dans la première partie des résultats de ma thèse a montré que la perméabilité de la BHE était similaire entre les souris *NDUFS4* KO et les souris sauvages, notamment vis-à-vis des vecteurs AAV9. En appliquant les mêmes paramètres d'USF que précédemment, on pouvait donc considérer que l'augmentation de la perméabilité de la BHE serait équivalente, sans induire de dommages tissulaires sur les souris *NDUFS4* KO. Pour cette étude pilote, nous avons donc constitué quatre groupes expérimentaux : des souris sauvages non traitées (Ctl), des souris *NDUFS4* KO non traités (KO), des souris *NDUFS4* KO traitées avec le vecteur AAV9-*NDUFS4* mais n'ayant pas reçu d'USF (KO+*NDUFS4*) et des souris *NDUFS4* KO traitées avec le vecteur AAV9-*NDUFS4* en combinaison de l'application des USF en balayage (KO+*NDUFS4*/USF).

Nous avons appliqué le même protocole de balayage sur des souris *NDUFS4* KO âgées d'un mois (n=3). Après l'application des USF, un vecteur AAV9-*NDUFS4* ( $5 \cdot 10^{13}$  gv/kg) a été

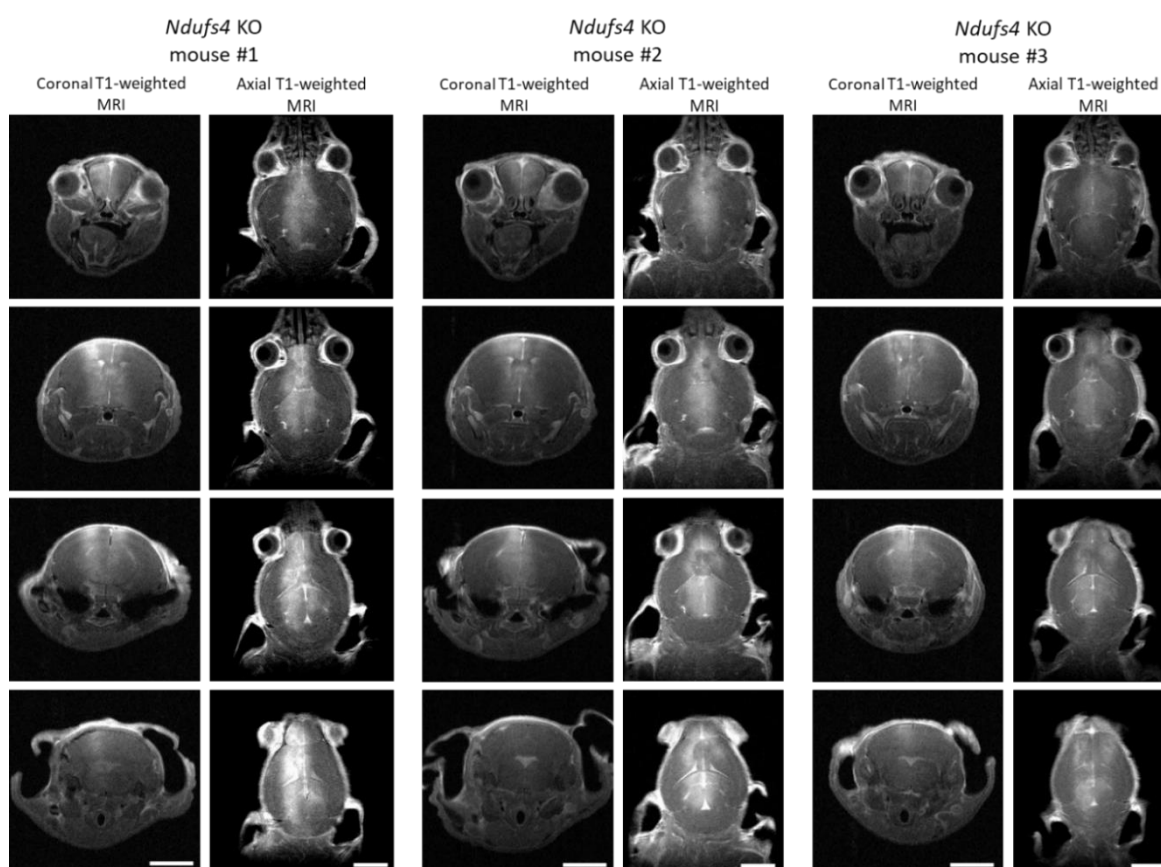




**Figure 31: Evaluation du phénotype des cellules transduites par le vecteur viral AAV9-GFP après l'application des ultrasons en balayage.**

Images représentatives acquises au microscope confocal de coupes de cerveaux marquées avec A : NeuN (rouge), marqueur des neurones et GFP (vert) neurones, B : GFAP (rouge), marqueur des astrocytes et GFP (vert), C : Olig2 (rouge), marqueur des oligodendrocytes et GFP (vert) et D : Iba1 (rouge), marqueur des cellules microgliales et GFP (vert). Pour chaque marqueur, une image a été acquise au grossissement 20X puis un zoom a été réalisé dans la zone encadrée en blanc afin d'acquérir une image au grossissement 63X. Barres d'échelles = 50µM.

injecté par voie intraveineuse. Les acquisitions pondérées en T1 et réalisées dans le plan coronal et axial mettent en évidence une augmentation de la perméabilité de la BHE dans les mêmes régions que ce qui avait été observé sur les souris sauvages (**figure 30 et 32**). La BHE est perméabilisée sur une grande partie de l'axe antéro-postérieur, en particulier dans les parties du cerveau les plus dorsales. Dans les régions plus ventrales, les parties postérieures comme le cervelet et le tronc cérébral ne semble pas avoir été ciblées par le faisceau d'USF (**figure 32**). Pour les mêmes raisons que chez les souris sauvages, des différences sont observées entre les animaux, certains présentent une perméabilisation asymétrique avec un hémisphère cérébral qui semble avoir été plus ciblé que l'autre. Ces résultats montrent que cette stratégie de balayage du faisceau d'USF permet de perméabiliser la BHE des souris *NDUFS4* KO dans des régions similaires à celles observées chez les souris sauvages.

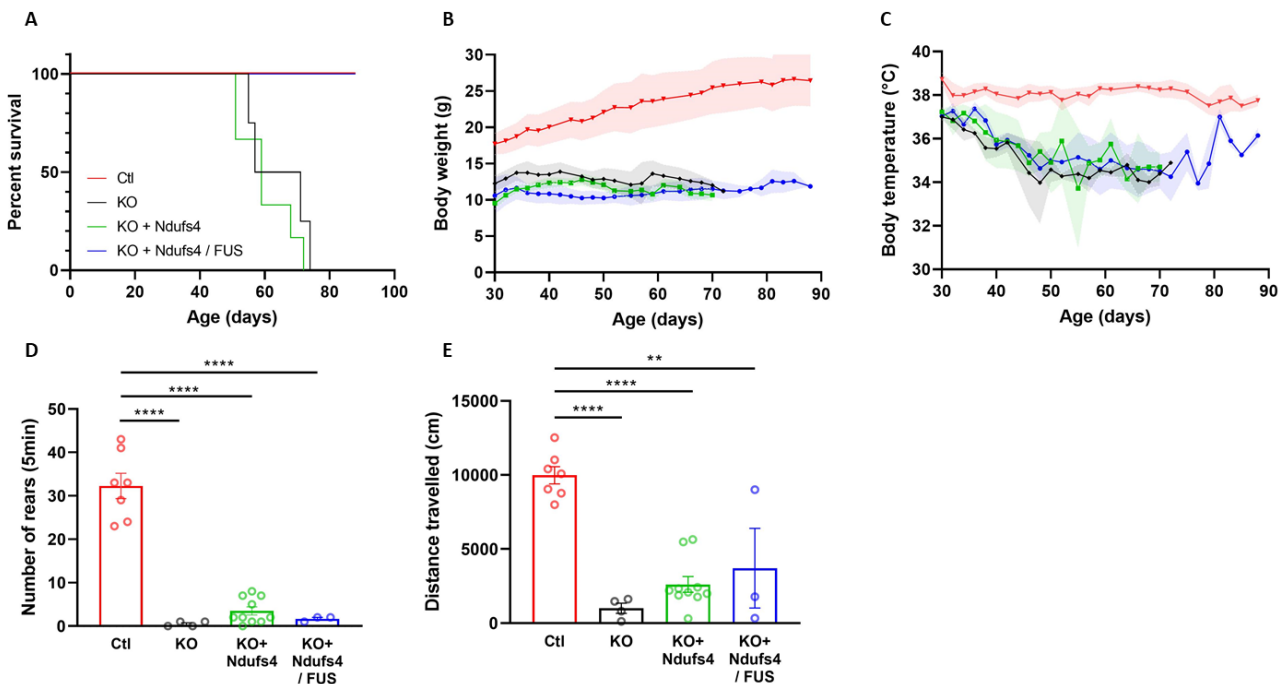


**Figure 32 : Evaluation de l'ouverture de la BHE en IRM sur les trois souris *NDUFS4* KO ayant reçu des ultrasons en balayage.**

Chaque panel présente 4 acquisitions pondérées en T1 post injection du produit de contraste couvrant les zones frontales à caudales (de haut en bas) dans le plan coronal (partie gauche de chaque panel) et 4 acquisitions couvrant les zones ventrales à dorsales (de haut en bas) dans le plan axial pour chaque animal. Barres d'échelles = 4mm.

A partir du jour de l'injection du vecteur viral, nous avons suivi le poids, la température corporelle et la survie de ces animaux traités ainsi que des trois autres groupes d'animaux afin d'évaluer l'effet de notre approche.

A 90 jours, les souris *NDUFS4* KO + *NDUFS4*/USF étaient toujours en vie alors que les dernières souris *NDUFS4* KO non traitées et *NDUFS4* KO + *NDUFS4* sans USF étaient mortes respectivement à 74 et 72 jours (**figure 33A**). Le retard de croissance n'était pas corrigé mais les souris traitées ayant reçues les USF ne perdaient pas de poids (**figure 33B**). Comme les deux autres groupes de souris *NDUFS4* KO, leur température corporelle avait baissé progressivement jusqu'à atteindre 34°C mais était remonté autour de 36°C les 10 derniers jours de suivi (**figure 33C**).

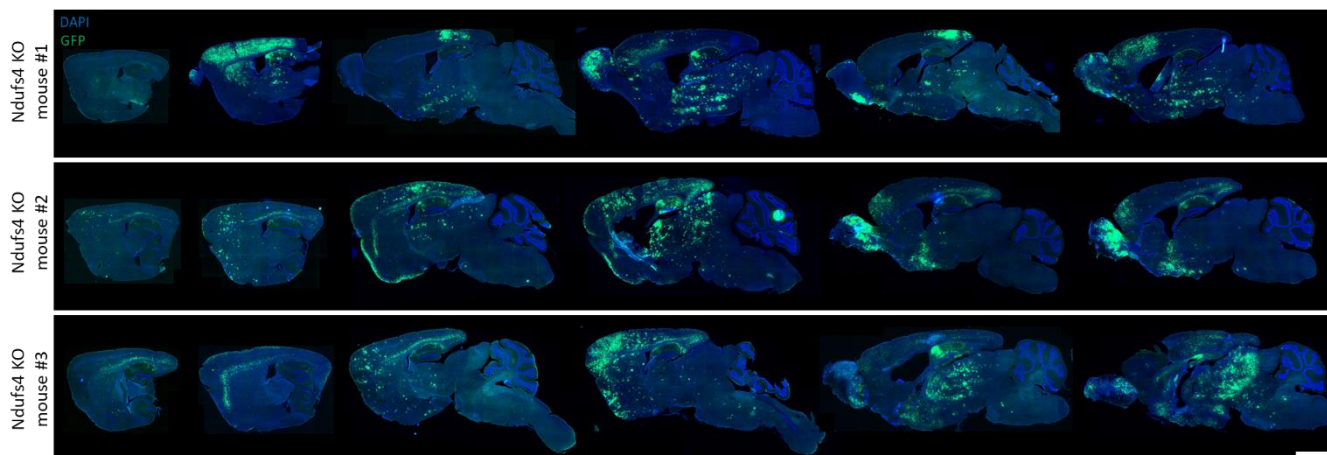


**Figure 33 : Evaluation de l'effet du remplacement du gène *NDUFS4* chez des souris *NDUFS4* KO en perméabilisant la BHE par un balayage d'USF.**

A : Courbes de survie des souris sauvages (courbe rouge,  $n=7$ ), des souris *NDUFS4* KO non traitées (courbe noire,  $n=4$ ), des souris *NDUFS4* KO traitées sans USF (courbe verte,  $n=10$ ) et des souris *NDUFS4* KO traitées avec USF (courbe bleue,  $n=3$ ) (log-rank  $P<0.0001$  (Mantel-Cox test)). B : Courbes de suivi du poids à partir du jour d'injection, mesuré 3 fois par semaines pendant la période de survie. C : Courbes de suivi de la température corporelle à partir du jour d'injection, mesuré 3 fois par semaines pendant la période de survie. D : Quantification du nombre de redressements dans un cylindre pendant 5min, test réalisé chez des souris de 45 jours. E : Activité locomotrice enregistrée pendant 30min dans un "open field", test réalisé chez des souris de 45 jours. (\*\* $P<0.01$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ , ANOVA univariée et test des étendues de Tukey). D et E : Données présentées sous le format moyenne  $\pm$  SEM

Comme nous l'avons fait dans l'étude précédente, nous avons réalisé des tests comportementaux chez les animaux âgés de 45 jours, soit 2 semaines après le traitement. Nous avons réalisé un test du cylindre et un test de l'open field afin d'évaluer les performances locomotrices des souris. Le traitement combiné au USF n'augmentait pas significativement le nombre de redressements dans le cylindre (KO : 0,5 redressement  $\pm$  0,29 ; KO + *NDUFS4*/USF : 1,6 redressements  $\pm$  0,33 (moyenne  $\pm$  SEM)) ni la distance parcourue dans l'open field par rapport aux souris *NDUFS4* KO non traitées (KO : 1064 cm  $\pm$  342 ; KO + *NDUFS4*/USF : 3705 cm  $\pm$  2685 (moyenne  $\pm$  SEM)) (**figure 33D et E**).

Les souris traitées avec le vecteur AAV9-*NDUFS4* et ayant reçu les USF ont été euthanasiées à 90 jours. Elles étaient toujours en vie et n'avaient pas atteint un point limite établi dans le permis éthique et nécessitant une mise à mort. Nous avons cependant choisi de les euthanasier à cette date car l'effet du traitement sur la survie était déjà supérieur aux effets thérapeutiques apportés par les autres études utilisant un vecteur AAV9 sur ce modèle murin. De plus, nous avons observé que la perméabilisation de la BHE n'était pas optimale et il semblait donc intéressant d'étudier les zones ayant été transduites par le vecteur viral. Ainsi, nous ne voulions pas prendre le risque de constater un animal mort un matin et donc de perdre les tissus. Les cerveaux ont été prélevés afin de déterminer les régions qui avaient été transduites par le vecteur viral. L'étude de l'effet du traitement sur le phénotype pathologique cérébral n'a pas encore été réalisée. D'autres tissus ont été prélevés afin d'évaluer la distribution du vecteur viral et l'effet du traitement sur d'autres phénotypes pathologiques (foies, yeux, cœurs) mais les analyses n'ont pas encore été réalisées. Le vecteur AAV9-*NDUFS4* exprimait la GFP en plus du transgène thérapeutique afin de pouvoir suivre les régions dans lesquelles l'expression du gène avait été restaurée. L'immunomarquage des coupes de cerveaux met en évidence l'expression dans la GFP dans de larges régions cérébrales (**figure 34**). Les zones les mieux transduites par le vecteur viral sont comparables à celles où la BHE a été perméabilisée (**figure 32 et 34**). Chez les trois animaux, les zones médianes situées à l'avant et sur les parties dorsales du cerveau sont les régions les plus transduites par le vecteur viral. Les niveaux d'expression de la GFP sont inférieurs dans les parties latérales et postérieures en particulier dans le cervelet et le tronc cérébral. Cependant, les niveaux d'expressions varient selon les animaux et l'hémisphère cérébral.



**Figure 34 : Evaluation de la distribution de la GFP dans le cerveau des 3 souris NDUFS4 KO traitées dont la BHE a été perméabilisée par un balayage des USF.**

*Images représentatives acquises à l'Axioscan de 6 coupes sagittales de cerveau montrant l'expression de la GFP (vert) et colorées au DAPI (bleu), 2 mois après perméabilisation de la BHE et injection intraveineuse d'un vecteur AAV9-CAG-NDUFS4-IRES-GFP chez des souris NDUFS4 KO de 30 jours. Barre d'échelle = 2mm.*

Ces résultats confirment que le balayage du faisceau d'USF permet au vecteur viral de transduire de larges régions du cerveau chez les souris *NDUFS4* KO, suffisantes pour prolonger la survie des animaux au moins jusqu'à 90 jours. Cependant, la distribution du transgène ne semble pas encore assez large pour améliorer la croissance, restaurer une température corporelle physiologique et corriger les désordres moteurs.

## IV. Etude du transfert intercellulaire de mitochondries dans le contexte de la thérapie génique

### IV.1. Contexte et résumé de l'étude

La découverte des nanotubes, des prolongements membranaires formant des ponts cytoplasmiques entre deux cellules, a permis de mettre en évidence que les organites intracellulaires pouvaient être échangés. La capacité des mitochondries à réaliser ce type de transfert, via les nanotubes ou par des échanges vésiculaires a par la suite été démontrée *in vitro* puis *in vivo*. Dans le SNC, le transfert intercellulaire de mitochondries a récemment été mis en évidence comme un phénomène biologique non négligeable et semble constituer un élément de réponse important aux dommages hémorragiques, aux lésions de la moelle épinière et à la neurodégénérescence.

Dans un contexte thérapeutique, l'effet du transfert de mitochondries sur des phénotypes pathologiques présents dans les maladies mitochondriales a déjà été étudié. Une étude a par exemple mis en évidence que des mitochondries peuvent être données par des cellules souches mésenchymateuses à des cellules présentant un déficit du complexe I lorsqu'elles sont co-cultivées. Cette approche permet de réduire le stress oxydatif dans les cellules présentant un déficit de complexe I mais l'activité du complexe n'est pas restaurée. Une autre étude a utilisé des cellules souches pluripotentes induites, dérivées de cellules mésenchymateuses, pour transférer des mitochondries aux cellules ganglionnaires de la rétine chez des souris *NDUFS4* KO. Cette approche permet d'améliorer la fonction rétinienne et de diminuer l'inflammation et la dégénérescence des cellules ganglionnaires. Cependant, des considérations éthiques et des challenges techniques doivent être résolus avant de pouvoir utiliser le transfert de mitochondries comme un traitement efficace et sûr chez l'homme. Le transfert de mitochondries peut également être considéré comme un élément renforçant l'effet d'une autre approche thérapeutique. Plusieurs études pré-cliniques ont utilisé des stratégies de thérapie génique afin de restaurer l'expression d'un gène défectueux dans des modèles murins de pathologies mitochondriales sévères. Cette approche permet de restaurer une partie de



la fonction respiratoire des mitochondries grâce à l'augmentation de l'activité des complexes défectueux. Cela apporte un effet thérapeutique important, en particulier grâce à la correction du phénotype pathologique dans le cerveau. Cependant, l'évaluation de la distribution du transgène dans l'organisme réalisée lors notre étude montre que le vecteur viral ne transduit pas la totalité des cellules. L'expression du transgène n'est donc pas restaurée dans toutes les cellules. Notre hypothèse est que les cellules ayant été transduites par le vecteur AAV.PHP.B pourraient servir de cellules donneuses et échanger ainsi leurs mitochondries saines aux cellules non transduites.

Dans cette étude, notre objectif est donc de déterminer si le transfert de mitochondries renforce l'effet thérapeutique observé lors de notre étude pré-clinique de thérapie génique sur le modèle murin du syndrome de Leigh.

Les résultats présentés dans cette partie correspondent à des résultats préliminaires dédiés principalement à la mise en place d'outils pour étudier ce mécanisme.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences afin de reproduire les conditions expérimentales permettant de mettre en évidence le transfert de mitochondries en culture cellulaire. Nous avons ensuite généré et caractérisé un nouvel outil permettant de mettre en évidence le transfert mitochondrial à la fois *in vitro* et *in vivo*. Il faut maintenant mettre en place des protocoles permettant d'identifier avec précision le transfert de mitochondries *in vivo* afin de pouvoir par la suite étudier ce phénomène en condition de thérapie génique sur les souris *NDUFS4* KO.

Dans cette étude, j'ai réalisé les procédures de validation du nouvel outil par western blot et immunomarquage. Les constructions plasmidiques ont été réalisées par Béatrice Blot, ingénieure au Grenoble Institut des Neurosciences. J'ai réalisé les expériences de co-culture à partir de l'infection des cellules jusqu'à l'analyse en microscopie ou en cytométrie. Les procédures de cytométrie impliquant le FACS ARIA ont été réalisées par Mylène Pezet, ingénieure à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences.

J'ai également produit et titré les vecteurs viraux (vecteurs lentiviraux et AAVs) et réalisé toutes les procédures *in vivo*.

## IV.2. Matériel et méthodes

**Les protocoles suivants ont déjà été détaillés dans d'autres parties et je préciserai donc seulement les modifications.**

### *Production et titration du vecteur AAV*

Les plasmides suivants ont été utilisés pour la transfection lors de la production du vecteur AAV-PHP.eB-CAG-mito-DsRed-T2A-H2B-GFP : pAAV-CAG-mito-DsRed-T2A-H2B-GFP (cloné par Béatrice Blot), pUCmini-iCAP-PHP.eB (fourni par Viviana Gradinaru, #103005, Addgene, Watertown, MA, USA) et pHelper (#240071, Agilent Technologies). La concentration du vecteur viral produit est de  $5.10^{14}$  gv/mL.

### *Injection du vecteur AAV*

Le vecteur AAV-PHP.eB-mito-DsRed-T2A-H2B-GFP a été injecté dans le sinus retro-orbital, chez des souris sauvages âgées d'un mois à la dose de  $1.10^{14}$  gv/kg

### *Immunohistochimie*

Les anticorps primaires utilisés pour réaliser les marquages des coupes de cerveau sont les suivants : anticorps anti-NeuN (lapin 1:1000, Cell Signaling, #12943), anticorps anti-Iba1 (lapin, 1:2000, Wako, #019-19751), anticorps anti-GFAP (lapin, 1:2000, Abcam, #ab7260), anticorps anti-Olig2 (lapin, 1 :1000, Millipore, #AB9610).

### *Western blot*

Les anticorps primaires utilisés pour réaliser les Western blot sont les suivants : anticorps anti-GFP (poulet, 1:2000, Abcam, #ab290), anticorps anti-RFP (lapin, 1 :2000 Abcam, #ab62341), anticorps anti-calnexine (lapin, 1:5000, Enzo Life Science, ADI-SPA-860).

**Dans la section suivante, je décrirai tous les protocoles qui n'ont été détaillés dans aucune section « matériel et méthodes » précédentes.**

### *Culture cellulaire*

Les lignées cellulaires utilisées dans cette étude sont des cellules SH-SY5Y (ATCC), dérivées de neuroblastomes humains. Cette lignée cellulaire a été choisie car c'est une lignée pour laquelle des échanges de mitochondries ont déjà été décrits. Les cellules SH-SY5Y ont été cultivées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> dans du DMEM (« *Dulbecco's Modified Eagle Medium* »)



complémenté avec 10% de FBS (« *Fœtal bovine serum* ») et 1% de pénicilline/streptomycine.

#### *Constructions plasmidiques utilisées*

Deux plasmides codant pour des protéines fluorescentes adressées à la mitochondrie ont été utilisés : mito-BFP (fourni par Gia Voeltz, #49151, Addgene, Watertown, MA, USA) et mito-DsRed (fourni par Michael Davidson, #55838, Addgene, Watertown, MA, USA). « mito » fait référence à la séquence d'adressage mitochondriale de la sous unité 4 ou 8 du cytochrome c oxydase (respectivement : COX4 et COX8). « BFP » et « DsRed » font référence à la couleur du fluorochrome, respectivement bleue et rouge. Ces deux constructions ont été utilisées dans les expériences de co-cultures afin de pouvoir suivre les mitochondries des cellules « donneuses ».

Un plasmide codant pour la protéine H2B, une histone fusionnée à la GFP (H2B-GFP, fourni par Geoff Wahl, #11680, Addgene, Watertown, MA, USA). Cette construction a été utilisée dans les procédures de co-culture afin d'identifier la population des cellules « receveuses ».

Nous avons ensuite conçu une nouvelle construction possédant les séquences mito-DsRed et H2B-GFP séparées par une séquence T2A (mito-Ds-Red-T2A-H2B-GFP). Ce plasmide a été construit par Béatrice Blot. Cette construction permet la transcription des deux séquences en une seule molécule d'ARN. Cette dernière sera ensuite traduite en 2 protéines distinctes en proportion similaires de part et d'autre de la séquence T2A. Cette construction permet d'exprimer les deux protéines dans la même cellule en réalisant une seule infection.

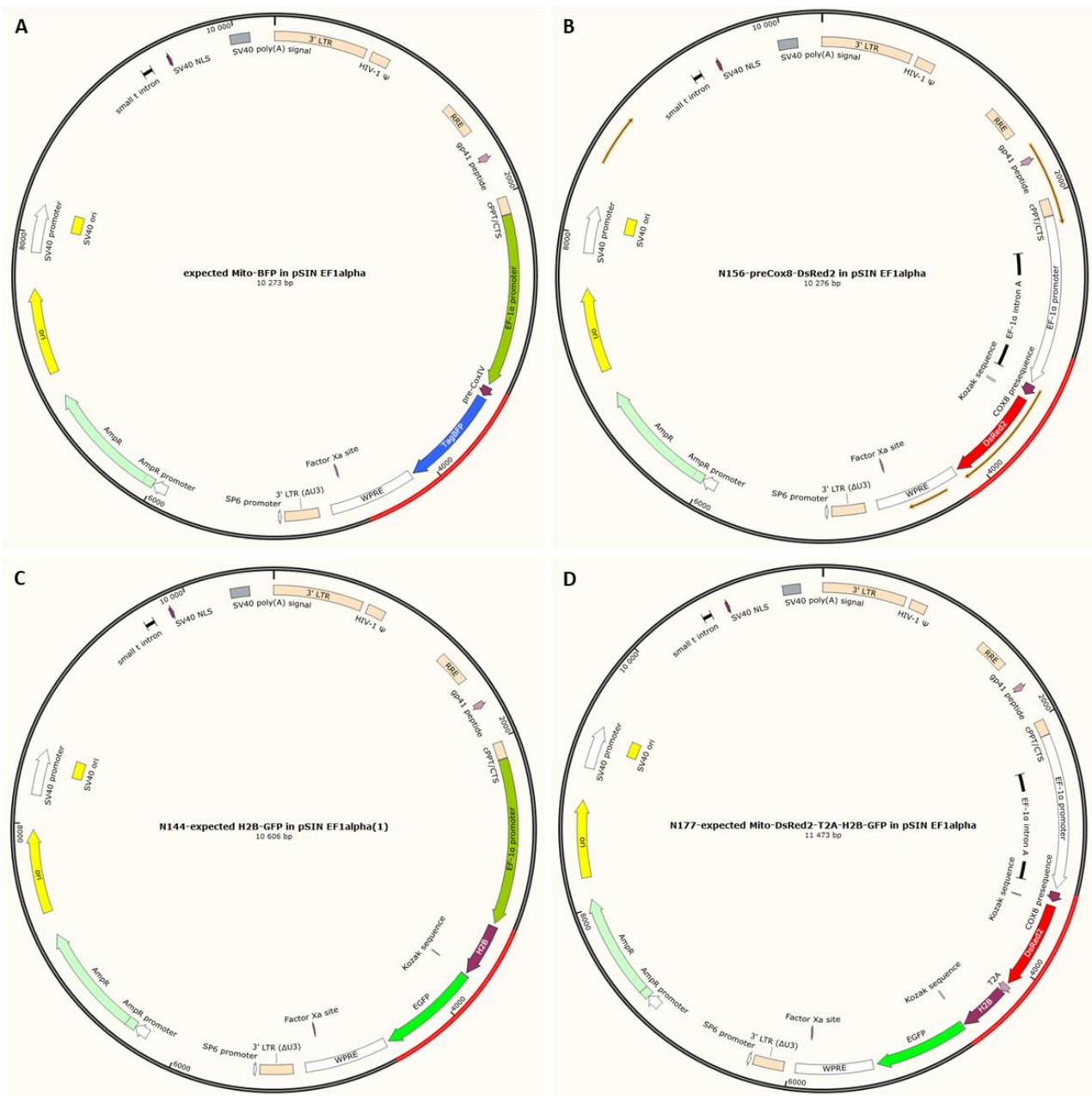
Toutes ces constructions ont ensuite été clonées dans un plasmide lentiviral sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire EF1- $\alpha$  (« *élongation factor 1* ») (**figure 35**). La construction mito-DsRed-T2A-H2B-GFP a également été cloné dans un plasmide viral adéno-associé sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire CAG pour les procédures *in vivo*.

#### *Production des vecteurs lentiviraux et titration fonctionnelle*

Les vecteurs lentiviraux ont été produit au sein du laboratoire selon un protocole décrit précédemment (Sébastien et al., 2020). Brièvement, des cellules HEK 293T ont été

transfectées avec 3 plasmides : psPAX2 (fourni par Didier Trono, #12260, Addgene, Watertown, MA, USA) contenant les gènes Gag et Pol, pCMV-VSV-G (fourni par Bob Weinberg, #8454, Addgene, Watertown, MA, USA) contenant les gènes de l'enveloppe et les plasmides d'intérêts. La transfection a été réalisée par la méthode du calcium phosphate en utilisant le kit « *CalPhos Mammalian Transfection Kit* » (Ozyme, #631312). 48 post transfection, le milieu contenant les particules virales était récupéré, centrifugé puis filtré (filtres de 0,45µM) pour éliminer les débris cellulaires. Les surnageants étaient transférés dans des tubes pour ultracentrifugeuse puis centrifugé pendant 2h à 20 000RPM, 4°C. Après l'ultracentrifugation, les particules virales culotées au fond du tube étaient resuspendus dans 100µL/tube de PBS. Après au moins 6h au frigo, le temps que les particules virales se réhydratent, les vecteurs étaient aliquotés puis immédiatement congelés dans l'azote liquide avant d'être stockés à long terme au congélateur à -80°C.

Pour la titration, des cellules SH-SY5Y étaientensemencées dans un plaque 24 puits (80 000 cellules par puits). Le lendemain, les cellules étaient infectées en utilisant des dilutions en cascade du vecteur viral. Après 6h, le milieu de culture était rafraîchi. 48h après l'infection, les cellules étaient rincées au PBS, décollées à la trypsine, centrifugées 3 min à 1000 rpm puis resuspendues dans 300µL de PBS. Le pourcentage de cellules infectées était ensuite évalué par cytométrie en flux. La concentration fonctionnelle en vecteur lentiviral pouvait être estimée par la formule :  $C = (P \times 80000) / (D \times 0,01)$  avec P le pourcentage de cellules infectées déterminé en cytométrie en flux, D le facteur de dilution et C la concentration en unité infectieuse par mL. La concentration devait être calculées en utilisant les valeurs des dilutions situées sur la partie linéaire de la courbe. Les concentrations en vecteur virale utilisées dans la suite des expériences étaient basées sur ces courbes de titration afin de maîtriser le taux d'infection des cellules.



**Figure 35: Carte des plasmides utilisés.**

A : Construction mito-BFP dans un plasmide lentiviral sous le contrôle d'un promoteur EF1- $\alpha$ . B : Construction DsRed-2-Mito-7 dans un plasmide lentiviral sous le contrôle d'un promoteur EF1- $\alpha$ . C : Construction H2B-GFP dans un plasmide lentiviral sous le contrôle d'un promoteur EF1- $\alpha$ . D : Construction DsRed-2-Mito-7-T2A-H2B-GFP dans un plasmide lentiviral sous le contrôle d'un promoteur EF1- $\alpha$ .

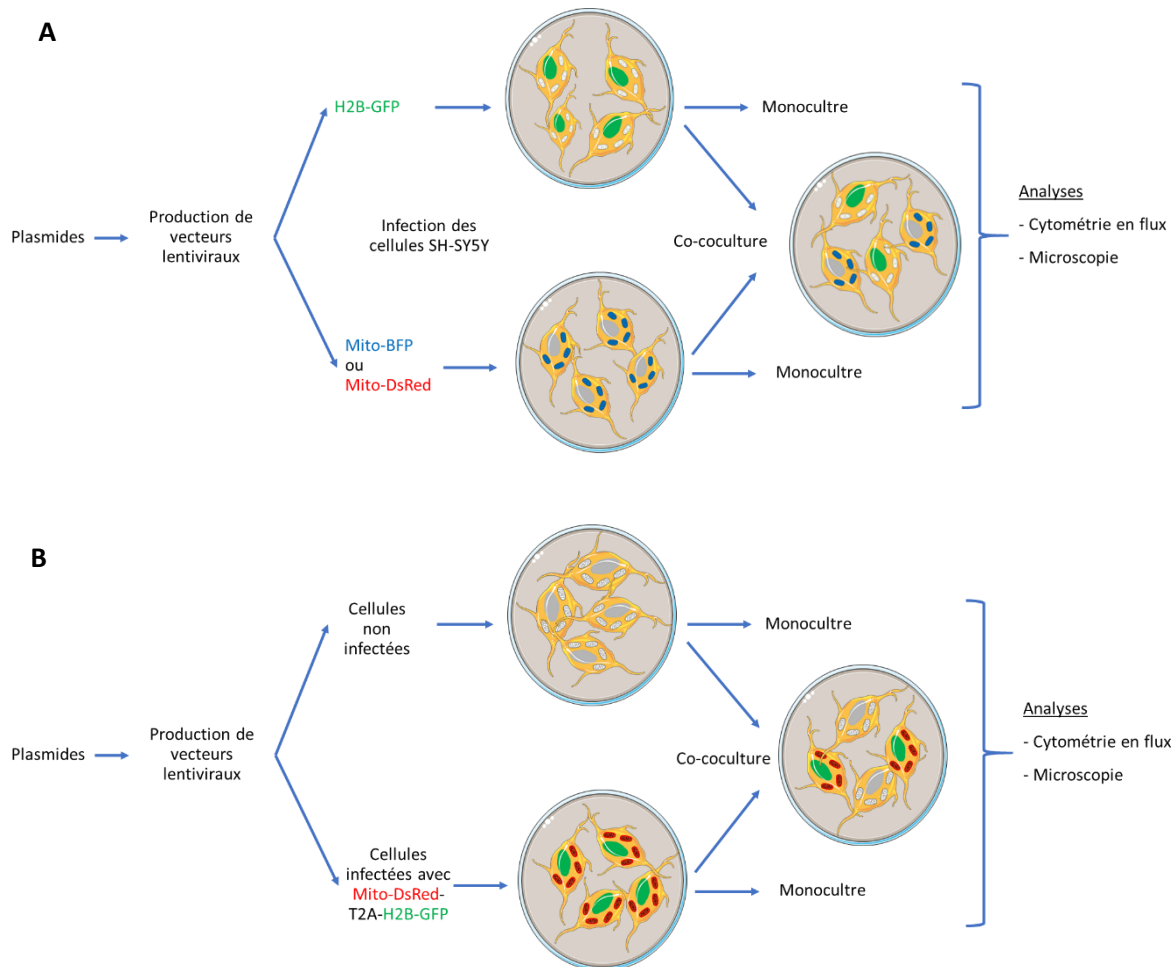
### *Établissement de la lignée cellulaire stable exprimant mito-DsRed et H2B-GFP.*

Pour établir cette lignée cellulaire, des cellules SH-SY5Y étaient ensemencées dans des boîtes de culture de 6cm de diamètre contenant 3mL de DMEM complété. Le lendemain, les cellules étaient infectées en ajoutant le vecteur lentiviral codant pour mito-DsRed-T2A-H2B-GFP à une dilution permettant une infection d'environ 50% des cellules, en utilisant les résultats de la titration fonctionnelle. Après 6h, les cellules étaient rincées et le milieu était rafraîchi. Pendant une semaine, le milieu était rafraîchi tous les deux jours. Cela permettait d'effectuer un premier tri des cellules en éliminant celles n'ayant pas survécus à l'infection. Après une semaine, les cellules étaient mises en suspension puis conservées sur glace jusqu'à la procédure de cytométrie. Les cellules ont été triées en utilisant le FACS Aria IIu (BD Biosciences) situé à l'Institut for Advanced Biosciences sur la plateforme de cytométrie en flux avec l'aide de Mylène Pezet. Pour le tri, des seuils ont tout d'abord été appliqués afin d'éliminer les débris cellulaires (valeurs FSC (« *forward scatter* ») et SSC (« *side scatter* » basses) et les doublets de cellules (ratio FSC-W/FSC-H constant). Les cellules doublement positives ont ensuite été collectées dans des puits de plaques 4 puits en séparant les cellules avec une intensité de fluorescence haute des cellules avec une intensité de fluorescence basse.

### *Infections des cellules SH-SY5Y et co-cultures*

Pour étudier le transfert de mitochondries, des cellules SH-SY5Y étaient ensemencées dans des boîtes de culture de 6cm. Le lendemain, les cellules étaient infectées en ajoutant le vecteur viral à une dilution permettant une infection d'environ 80%/90% des cellules, en utilisant les résultats de la titration fonctionnelle. Pour les expériences de co-culture basée sur l'utilisation de H2B-GFP et un des marqueurs mitochondriaux (mito-BFP ou mito-DsRed) une boîte de culture était infectée avec le vecteur lentiviral codant pour H2B-GFP et une boîte de culture avec le vecteur lentiviral codant pour le marqueur mitochondrial (**figure 36A**). Pour les expériences impliquant la construction mito-DsRed-T2A-H2B-GFP, une boîte de culture était infectée avec le vecteur lentiviral codant pour cette construction et une boîte de culture n'était pas infectée (**figure 34B**). Après 6h, les cellules étaient rincées et le milieu était rafraîchi. 48h post-infection, les cellules étaient rincées puis mises en suspension. Les 2 populations de cellules étaient ensuite ensemencées à un ratio 1:1 dans une boîte 6cm (pour la cytométrie en flux) ou dans des

puits de plaque 4 puits contenant des lamelles (pour la microscopie). Les cellules étaient ensuite co-cultivées pendant 40h. Des cellules non infectées ou simple infectées étaient également cultivées en parallèle pour être utilisées comme contrôles (**figure 36A et B**).



**Figure 36 : Schéma présentant la stratégie utilisée pour mettre en évidence le transfert de mitochondrie in-vitro.**

*A : Schéma présentant les conditions de co-culture lorsque nous avons utilisé 2 vecteurs lentiviraux, 1 pour marquer le noyau, 1 pour marquer les mitochondries. B : Schéma présentant les conditions de co-culture lorsque nous avons utilisé le vecteur lentiviral codant pour mito-DsRed-T2A-H2B-GFP. Une seule culture était infectée et les cellules étaient marquées à la fois dans le noyau et les mitochondries. La co-culture était donc réalisée avec des cellules non infectées.*

Lors de la procédure de mise en évidence du transfert de mitochondries en microscopie, les cellules ont été traitées à l'acide rétinolique (10 $\mu$ M) pendant la co-culture. Il a été montré que ce traitement permettait de différencier les cellules SH-SY5Y en cellules ayant des propriétés neuronales (Cheung et al., 2009). Ainsi, le but était d'augmenter le nombre

de prolongements membranaires afin d'accroître la probabilité de former des TNTs entre les cellules SH-SY5Y, un des moyens de transfert des mitochondries.

### *Cytométrie en flux*

Après 40h de co-culture, les cellules étaient rincées puis mise en suspension dans du PBS. Les cellules étaient conservées sur glace jusqu'à l'analyse en cytométrie en flux. Les cellules ont été analysées en utilisant l'Accuri c6 cell analyser et son logiciel associé (BD Accuri c6) ou le FACS Aria IIu (BD Biosciences), situés à l'Institut for Advanced Biosciences sur la plateforme de cytométrie en flux. Des échantillons simplement infectés étaient utilisés comme contrôle. L'échantillon correspondant aux cellules co-cultivées était ensuite analysé. Pour l'analyse post acquisition, des seuils ont été déterminés afin d'éliminer les débris cellulaires (valeurs FSC et SSC basses) et les doublets de cellules (ratio FSC-W/FSC-H constant). Une compensation a été appliquée pour éliminer la superposition des fluorescences. Un pourcentage du canal FL2, correspondant à la fluorescence induite par DsRed était soustraite au canal FL1, correspondant à la fluorescence induite par GFP. Ensuite, un quadrant était placé sur les échantillons contrôles, de sorte qu'il n'y ait aucun évènement dans le quadrant des cellules doubles positives. L'analyse de l'échantillon co-cultivé permettait ainsi de déterminer le pourcentage de cellules doublement positives.

### *Immunocytochimie*

Pour les immunomarquages des cultures cellulaires, ces dernières étaient fixées dans une solution de PFA 4% / sucrose 4% pendant 15min à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS, les cellules étaient perméabilisées avec une solution de 0,1% triton, 5% sérum de cheval dans du PBS pendant 5 min à température ambiante. Les lamelles étaient ensuite incubées avec une solution d'anticorps primaire anti Tom20 (lapin, 1:2000, Santa Cruz #sc-11415) ou anti-Tuj1 (souris, 1:1000, Covance #MMS-435P), sérum de cheval 5%, dans du PBS pendant 4h à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS, les lamelles étaient incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à l'Alexa 647 (1:400) pendant 1h30 à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS, une solution de DAPI (1/20000, Invitrogen) était ajoutée pendant 5min à température ambiante puis 5 rinçages étaient effectués. Les lamelles étaient ensuite montées sur des lames en utilisant un milieu de montage (Dako mounting medium, Agilent) avant d'être observées au microscope.

## *Microscopie et analyse des images*

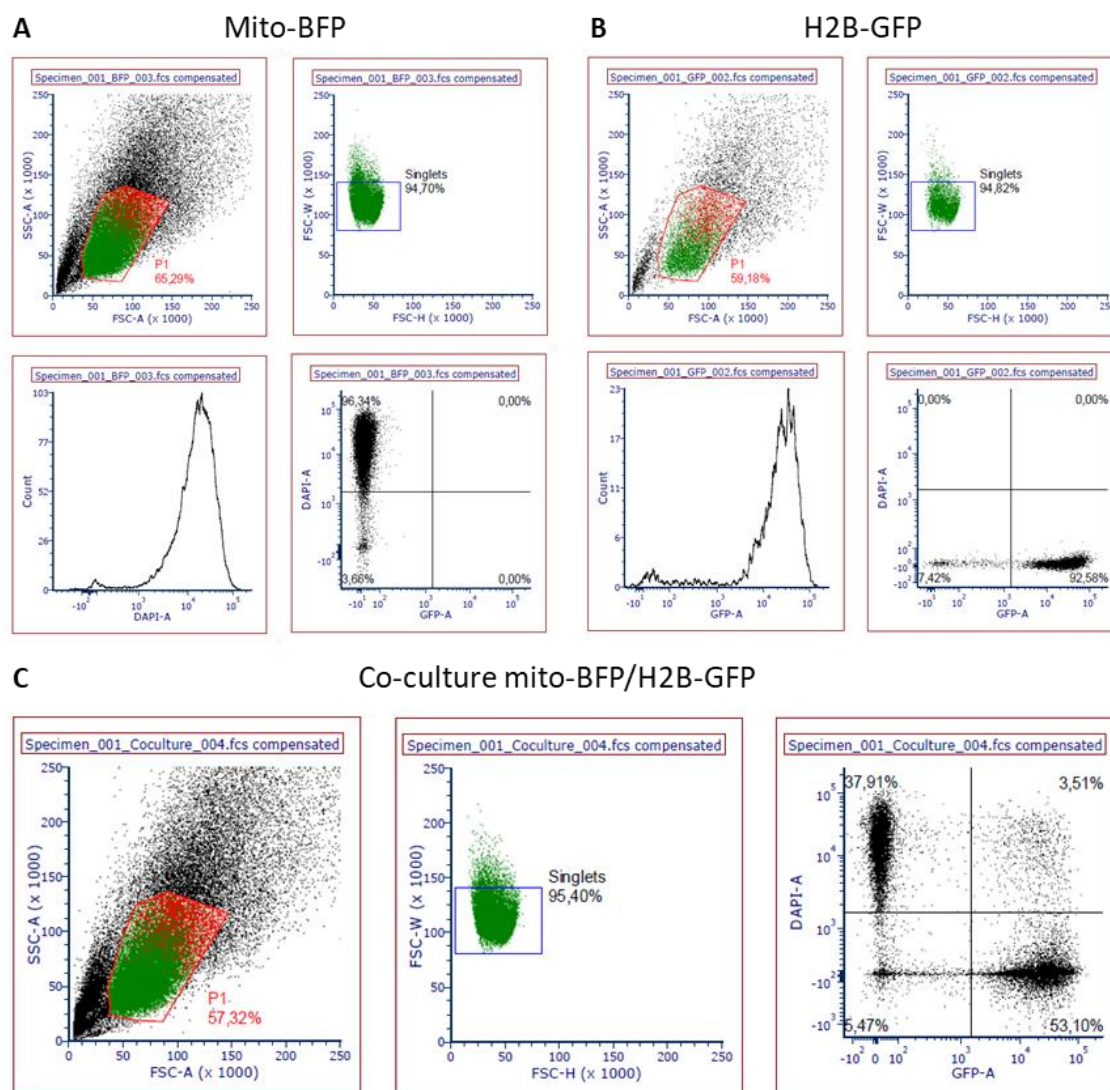
Les images ont été acquises au LSM 710 confocal microscope (Zeiss) puis l'analyse de la colocalisation des signaux de fluorescence a été réalisée grâce au logiciel ImageJ. Pour cela, une image de la projection maximale étaient obtenues par la fonction ZProjection. Ensuite le plugin EzColocalisation a été utilisé. Les régions d'intérêts (ROI) correspondant aux cellules unitaires étaient entourées manuellement puis les canaux de couleurs étaient séparés. Le coefficient de corrélation de Pearson (PCC) était calculé automatiquement par le plugin (corrélation de l'intensité pour chaque pixel entre deux canaux). Les nuages de point représentant l'intensité de chaque pixel en fonction du canal étaient générés automatiquement par le plugin.

## IV.3. Résultats

### **Etude du transfert de mitochondries *in vitro* par cytométrie en flux dans un système de co-culture.**

Le premier objectif était de mettre en évidence le transfert de mitochondries *in vitro* grâce à la cytométrie en flux après une co-culture entre des cellules « donneuses » de mitochondries et des cellules « receveuses », comme ce qui a déjà été réalisé dans d'autres études avec des outils différents (Pasquier et al., 2013; Liu et al., 2014; Jackson et al., 2016). Nous voulions ainsi déterminer si les moyens que nous avons à disposition étaient adaptés pour étudier ce phénomène. Pour cela, des cellules SH-SY5Y préalablement infectées avec un vecteur lentiviral codant pour mito-BFP (cellules « donneuses ») ont été co-cultivées avec des cellules préalablement infectées avec un vecteur lentiviral codant pour H2B-GFP (cellules « receveuses »). En parallèle, chaque population a également été cultivée séparément, en tant que contrôle. Après 40h les cellules ont été analysées en FACS afin de déterminer si des cellules doublement marquées étaient détectées dans la co-culture (**figure 37**). L'analyse en cytométrie des cellules co-cultivées montre que 3,5% des cellules sont doublement positive pour la GFP et la BFP (**figure 37C**). Ces cellules correspondent à des cellules infectées avec le vecteur lentiviral codant pour H2B-GFP et ayant reçues des mitochondries de cellules infectées avec le vecteur lentiviral codant pour mito-BFP. En parallèle, on peut noter que dans la

co-cultures, alors que le ratio de chaque population ensemencée était théoriquement de 1:1, seulement 38% des cellules étaient BFP positive (**figure 37C**).



**Figure 37 : Etude du transfert de mitochondries par cytométrie en flux.**

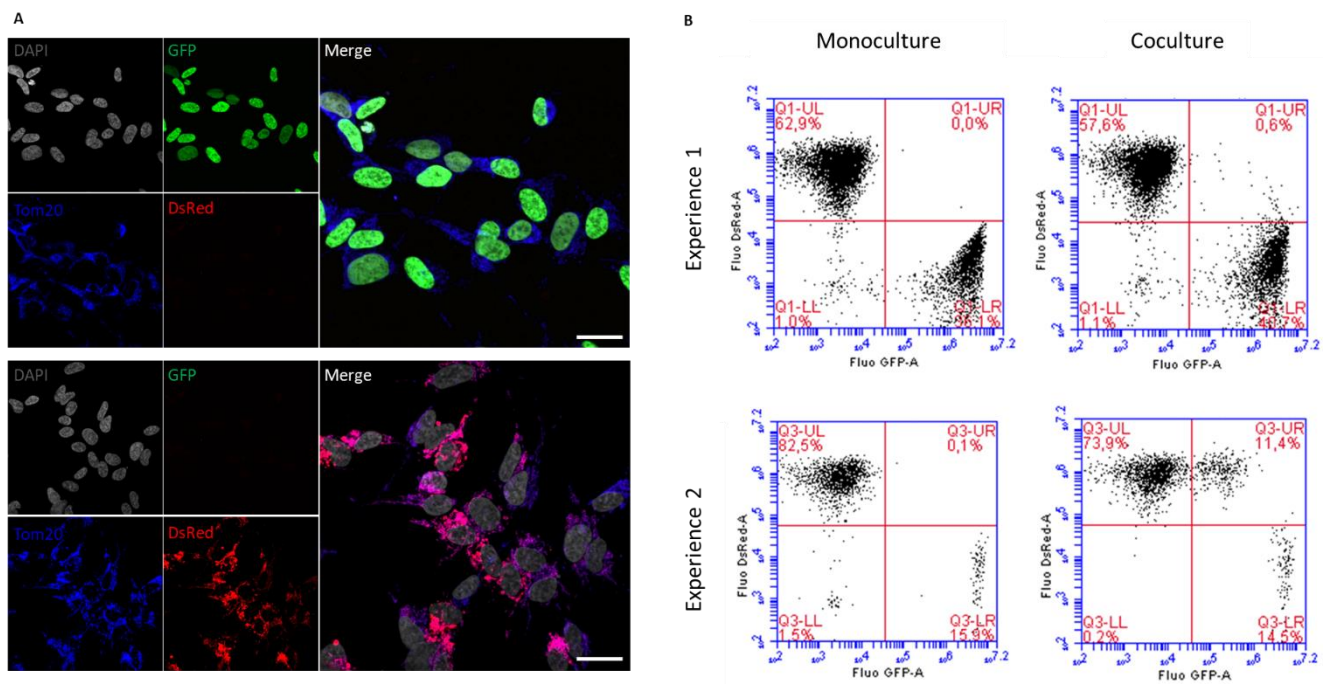
*A : Analyse de la fluorescence des cellules après infection avec le vecteur lentiviral codant pour mito-BFP. B : Analyse de la fluorescence des cellules après infection avec le vecteur lentiviral codant pour H2B-GFP. C : Analyse de la fluorescence des cellules après infection de 2 cultures, une avec mito-BFP, l'autre avec H2B-GFP puis co-culture des 2 populations.*

On peut ainsi suggérer que l'infection avec le vecteur lentiviral exprimant mito-BFP induit une mortalité cellulaire. Si cette mortalité est induite par un dysfonctionnement mitochondrial provoqué par l'infection, les conditions expérimentales ne sont pas optimales car le transfert n'est pas observé dans des conditions saines.



## **Etude du transfert de mitochondries in vitro en utilisant le marqueur mitochondrial mito-DsRed**

Bien qu'il n'ait jamais été décrit de toxicité liée au marqueur mito-BFP, l'utilisation de ce dernier dans d'autres expériences (transfection, production de vecteurs AAV) a confirmé qu'il induisait une augmentation de la mortalité cellulaire. Nous avons décidé de changer pour un marqueur mitochondrial plus largement utilisé dans la littérature, mito-DsRed. Nous avons tout d'abord vérifié la spécificité de localisation des marqueurs H2B-GFP et mito-DsRed. Pour cela des cultures de cellules SH-SY5Y ont été infectées avec le vecteur lentiviral codant pour H2B-GFP ou pour mitoDsRed. 48h post infection les cellules ont été fixées puis les mitochondries ont été marquées avec TOM20 et les noyaux ont été marqués au DAPI (**figure 38A**). Les images montrent que la GFP s'exprime spécifiquement dans le noyau et DsRed spécifiquement dans les mitochondries. Lorsque ces 2 populations de cellules sont co-cultivées et analysées en cytométrie, le pourcentage de cellules doubles positives varie de façon importante entre les expériences (0,6% de cellules GFP-positif/DsRed positives dans la première expérience et 11,4% dans la deuxième expérience) (**figure 38B**). Dans l'expérience numéro 2, le pourcentage de cellules GFP positive est relativement bas par rapport au cellules DsRed positive (seulement 15% de cellules GFP+) alors que dans la première expérience le ratio était autour de 1:1 comme attendu (**figure 38B**). Il semblerait que l'infection avec le vecteur lentiviral exprimant H2B-GFP provoque également de la mort cellulaire dans certains cas. De plus, l'immunomarquage des mitochondries montrent que ces dernières présentent une morphologie plutôt fragmentée qui suggère qu'elles sont soumises à un stress (**figure 38A**). La mortalité cellulaire excessive associée à une augmentation du stress mitochondrial conduit à l'obtention de résultats difficilement reproductibles et confirme que les conditions expérimentales ne sont donc toujours pas optimales.



**Figure 38 : Etude du transfert de mitochondries grâce au marqueur mito-DsRed.**

A : Images acquises aux microscope confocal de cellules SH-SY5Y infectées avec un vecteur lentiviral codant pour H2B-GFP (en haut) ou mito-DsRed (en bas), marquées avec TOM20 (en bleu) et colorées au DAPI (gris). Barre d'échelle : 20 $\mu$ M. B : Analyse de la fluorescence des cellules après infection de deux cultures, une avec mito-DsRed, l'autre avec H2B-GFP. A gauche, les 2 populations n'ont pas été co-cultivées, à droite elles l'ont été.

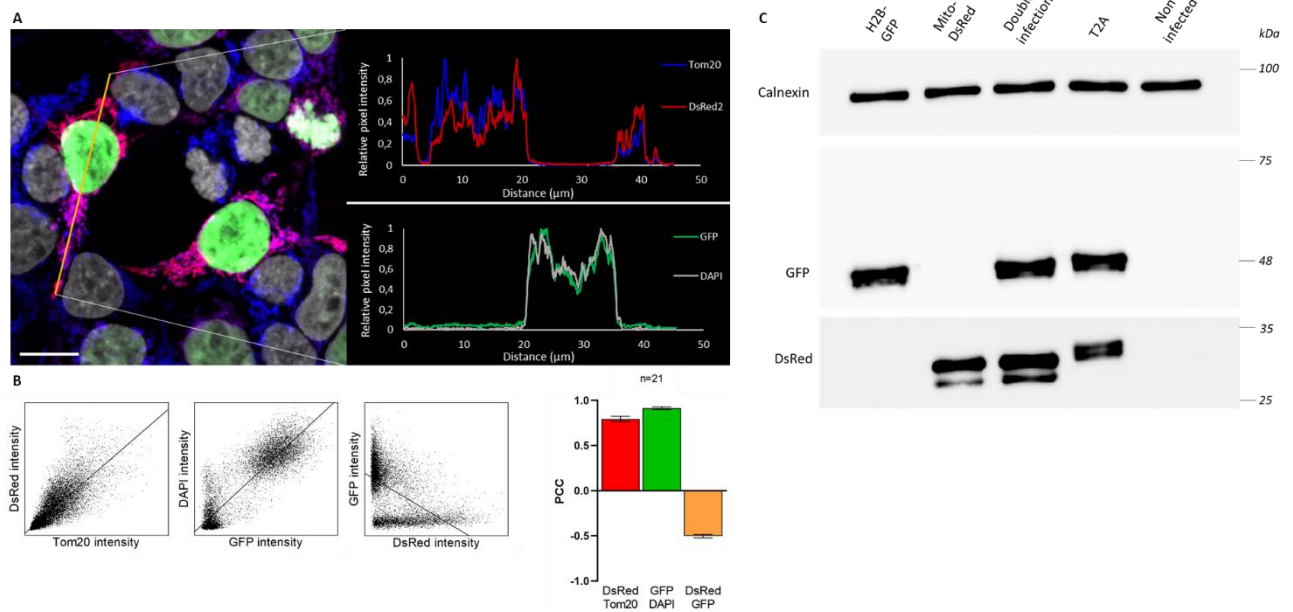
### Caractérisation d'un nouvel outil permettant l'expression des marqueurs mito-DsRed et H2B-GFP.

Pour améliorer notre approche expérimentale, il était nécessaire d'établir un système où les cultures cellulaires ne sont pas soumises à un stress trop important, provoqué par l'infection avec les vecteurs viraux. En effet, cela peut conduire à une perturbation de la physiologie mitochondriale et une augmentation de la mort cellulaire. De plus, le système de co-culture utilisé précédemment n'est pas adapté aux études *in vivo* car l'infection avec deux vecteurs viraux ne permet pas de distinguer les cellules ayant reçu des mitochondries des cellules ayant été doublement infectées. Ainsi, pour répondre à ces challenges, nous avons construit un plasmide codant à la fois pour le marqueur nucléaire (H2B-GFP) et pour le marqueur mitochondrial (DsRed), séparé par une séquence T2A. Cela permet de synthétiser deux protéines distinctes en proportion similaires de part et d'autre de la séquence T2A (Liu et al., 2017 b). Cette construction modifie notre approche expérimentale *in vitro*. Elle permet d'obtenir en une seule infection, une population

cellulaire qui exprime les deux marqueurs. Un tri cellulaire permet ensuite d'établir une lignée stable, possédant des mitochondries saines. Cette population peut être co-cultivée avec des cellules non infectées (receveuse) pour étudier le transfert de mitochondries. Sur cette même base, cette construction permet de répondre au challenge technique de l'étude du transfert *in vivo*. Seules les cellules ayant été transduites par le vecteur viral exprimeront les deux marqueurs. Ainsi, l'isolation de cellules présentant seulement des mitochondries marquées permettra de confirmer que ces dernières ont été transférées depuis une cellule infectée.

Pour les expériences *in vitro*, la séquence mito-DsRed-T2A-H2B-GFP a été clonée dans un plasmide lentiviral. Des vecteurs lentiviraux exprimant cette construction ont été produits puis testés en infectant des cellules SH-SY5Y afin de vérifier la spécificité d'expression. Les images obtenues en microscopie confocale montrent que H2B-GFP et mito-DsRed sont exprimés respectivement dans les noyaux et dans les mitochondries (**figure 39A**). Nous avons quantifié la colocalisation entre la GFP et le DAPI et entre le DsRed et TOM20 en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson (PCC). Ce paramètre peut être utilisé pour estimer la colocalisation de deux signaux (Dunn et al., 2011). Un PCC de 1 indique une corrélation linéaire parfaite entre deux signaux, un PCC de -1 indique une relation linéaire inverse parfaite et un PCC proche de 0 indique qu'il n'existe pas de relation entre les signaux. Les PCC entre les signaux DsRed/TOM20, GFP/DAPI et DsRed/GFP étaient respectivement :  $0,79 \pm 0,029$  ;  $0,91 \pm 0,015$  et  $-0,50 \pm 0,019$  (moyenne  $\pm$  SEM) (**figure 39B**). Ces résultats montrent un bon niveau de colocalisation entre les signaux DsRed et TOM20 et entre les signaux GFP et DAPI, alors que l'expression des marqueurs DsRed/GFP est distinctement séparée, conduisant à un PCC négatif. Cette construction permet donc l'expression des 2 protéines dans les compartiments cellulaires attendus.

Afin de vérifier que cette construction permet l'expression distincte des deux protéines de part et d'autre de la séquence T2A et qu'il ne reste pas de produit protéique non clivé, nous avons réalisé un western blot. Des cellules SH-SY5Y ont été infectées avec un vecteur lentiviral codant soit pour H2B-GFP, soit pour mito-DsRed, soit doublement infectées avec ces deux vecteurs, soit avec le vecteur lentiviral codant pour mito-DsRed-T2A-H2B-GFP.

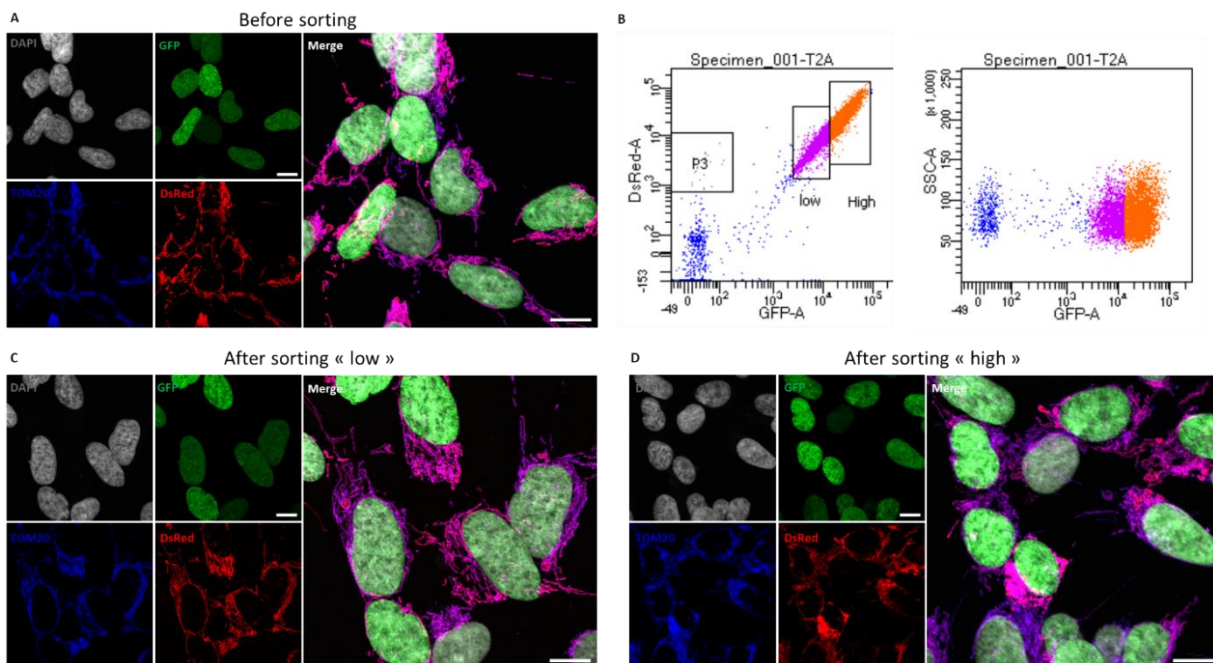


**Figure 39 : Caractérisation de la construction mito-DsRed-T2A-H2B-GFP.**

A : Image acquise au microscope confocal de cellules SH-SY5Y infectées avec un vecteur lentiviral exprimant mito-DsRed-T2A-H2B-GFP, marquées avec TOM20 (bleu) et colorées au DAPI (gris). A droite, le niveau d'intensité de fluorescence de chaque marqueur mesuré sur l'axe de la ligne orange. Barre d'échelle : 10µM B : Analyse de la colocalisation des différents marqueurs grâce au plugin EzColocalisation d'ImageJ. Le PCC est présenté sous la forme moyenne  $\pm$  SEM. C : western blot montrant l'expression de la calnexine, la GFP et le DsRed dans des cultures cellulaires infectées avec les vecteurs lentiviraux codant pour H2B-GFP, mito-DsRed, mito-DsRed-T2A-H2B-GFP (T2A), H2B-GFP + mito-DsRed (double infection) ou des cellules non infectées.

Les protéines GFP et DsRed étaient détectées aux poids moléculaires attendus dans les échantillons correspondant aux cultures infectées avec un seul vecteur viral ou à la culture co-infectée avec les deux vecteurs viraux (environ 45kDa pour H2B-GFP et 30kDa pour mito-DsRed). Pour la construction codant pour les 2 protéines, la GFP était détectée au poids moléculaire attendu. La bande correspondant à DsRed était retrouvée à un poids moléculaire légèrement plus élevé du fait de l'addition de 23 acides aminés correspondant au transcrit de la séquence T2A qui reste lié à la protéine présente en position N-terminal de cette séquence (Liu et al., 2017 b). Aucun élément non clivé n'était détecté à un poids moléculaire théorique de 75kDa dans l'échantillon correspondant aux cellules infectées avec la construction T2A (**figure 37C**). Ces résultats confirment que cette construction permet l'expression de deux protéines distincte et qu'aucun résidu non clivé n'est retrouvé.

Afin d'obtenir une population cellulaire homogène, présentant des mitochondries saines et dont l'expression du transgène est stable dans le temps, nous avons produit une lignée de cellules SH-SY5Y exprimant H2B-GFP et mito-DsRed. Pour cela, nous avons infecté des cellules avec le vecteur lentiviral codant pour la construction T2A. Les cellules ont été cultivées pendant une semaine afin d'effectuer un premier tri en éliminant les cellules mortes à cause de l'infection. Durant cette période une partie des cellules infectées a étéensemencée sur des lamelles afin de vérifier l'efficacité d'infection en microscopie (**figure 40A**). Les résultats montrent que la quasi-totalité des cellules a été infectée par le vecteur lentiviral. L'intensité des marquages varie d'une cellule à l'autre ce qui suggère que toutes les cellules ne présentent pas le même taux d'infection. Cela permet de distinguer deux populations, une qui présente des taux d'infections élevés et pour laquelle les mitochondries sont plus fragmentées et l'autre pour laquelle les taux d'infections sont plus bas ce qui réduit le stress mitochondrial.



**Figure 40 : Etablissement de la lignée cellulaire stable exprimant mito-DsRed-T2A-H2B-GFP.**

*A : Image acquise au microscope confocal de cellules SH-SY5Y infectées avec un vecteur lentiviral exprimant mito-DsRed-T2A-H2B-GFP, marquées avec TOM20 (bleu) et colorées au DAPI (gris) avant le tri cellulaire. B : Analyse de la culture cellulaire en cytométrie en flux. Les populations « low » (violet) et « high » (orange) ont été recueillies séparément. C : Image acquise au microscope confocal de cellules SH-SY5Y « low », marquées avec TOM20 (bleu) et colorées au DAPI (gris) après le tri cellulaire. D : Image acquise au microscope confocal de cellules SH-SY5Y « high », marquées avec TOM20 (bleu) et colorées au DAPI (gris) après le tri cellulaire. Barres d'échelles : 10μM.*

Sur cette base, les cellules ont été triées après analyse en cytométrie en flux (**figure 40B**). Les cellules présentant un haut niveau de fluorescence pour les deux marqueurs (« *high* ») et celles présentant un niveau de fluorescence bas (« *low* ») ont été recueillies séparément. Ces deux populations ont été observées en microscopie (**figure 40C et D**). Les résultats confirment ce qui a été observé avant le tri. La population de cellules « *low* » présente un réseau mitochondrial tubulaire et non fragmenté, caractéristique de mitochondries saines, contrairement à ce qui est observé dans la population « *high* ». Ces résultats montrent que la lignée de cellule SH-SY5Y « *low* » exprimant mito-DsRed et H2B-GFP permet d'étudier le transfert de mitochondries dans des conditions plus saines que les approches précédentes.

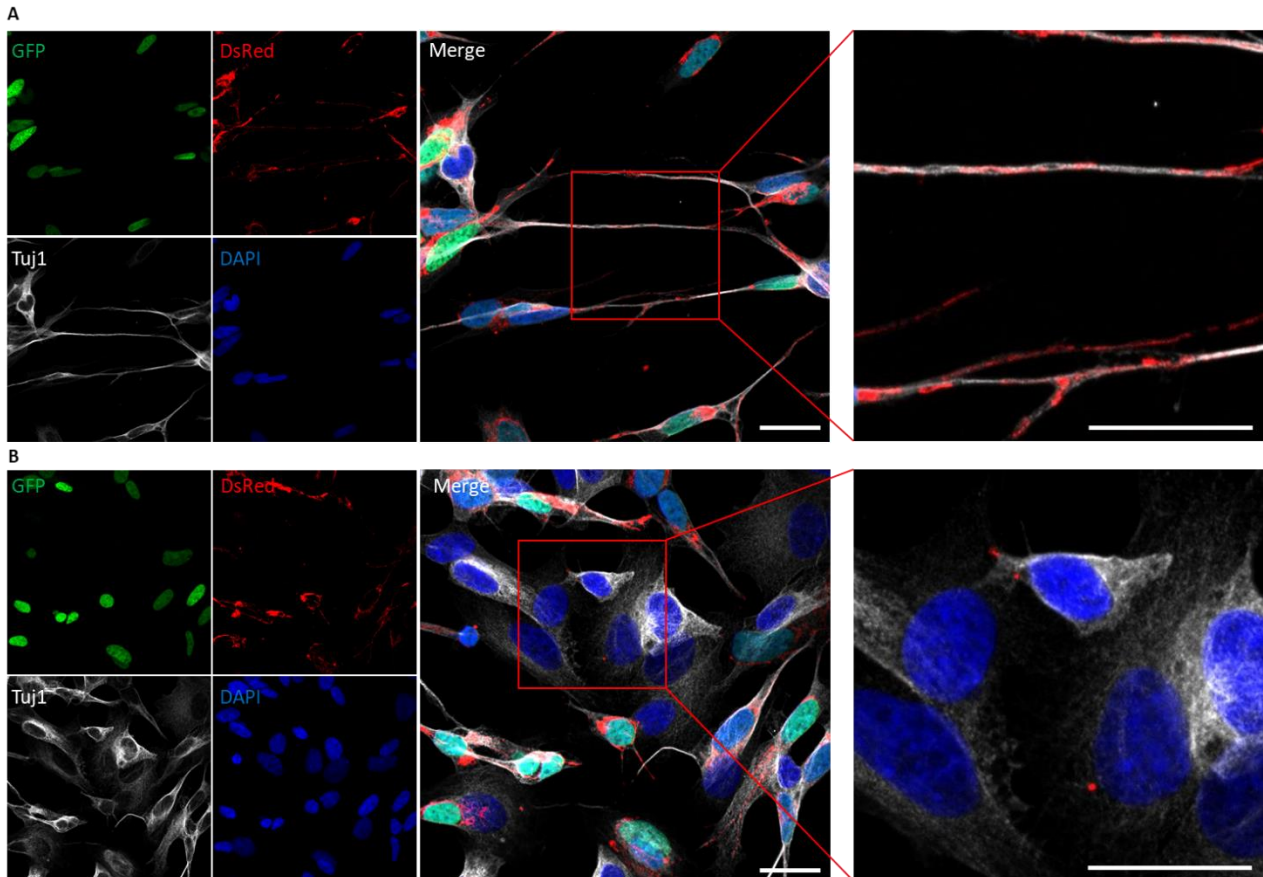
#### **Etude du transfert de mitochondries en microscopie en utilisant la lignée cellulaire SH-SY5Y exprimant mito-DsRed-T2A-H2B-GFP.**

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier en microscopie que cet outil permettait de mettre en évidence le transfert de mitochondries *in vitro*. Nous avons ainsi optimisé les conditions de culture pour que les cellules établissent plus de prolongements, augmentant ainsi la probabilité d'échanger des mitochondries par des structures ressemblant aux TNTs. Pour cela, il a été montré que le traitement des cellules SH-SY5Y à l'acide rétinoïque permet de les différencier en cellules ayant des propriétés neuronales parmi lesquelles le développement de longs prolongements membranaire (Cheung et al., 2009). Ainsi, pour valider ce protocole, des cellules SH-SY5Y « *low* » ont étéensemencées puis traitées pendant 3 jours à l'acide rétinoïque (10 $\mu$ M). Les images obtenues en microscopie confocale après marquage du réseau de microtubules (Tuj1) mettent en évidence la formation de longs prolongements contenant des mitochondries, entre les cellules (**figure 41A**).

Des cellules SH-SY5Y « *low* » ont donc été co-cultivées avec des cellules non infectées, en présence d'acide rétinoïque. Après 2 jours de co-culture, les cellules ont été fixées, le réseau de microtubules a été marqué avec un anticorps anti-TUJ1 afin de mettre en évidence les prolongements membranaires. Les noyaux ont été colorés au DAPI pour distinguer les cellules non infectées (*i.e.* DAPI-positives) des cellules infectées (*i.e.* GFP-positives et DAPI-positives). Les images obtenues en microscopie confocale mettent en évidence la présence de mitochondries DsRed positives à l'intérieur de cellules non



infectées (**figure 41B**). Ces résultats montrent que cette approche permet de mettre en évidence le transfert des mitochondries à partir des cellules de la lignée stable vers les cellules non infectées.



**Figure 41 : Etude du transfert du transfert mitochondrial en microscopie.**

A : Image acquise au microscope confocal de cellules SH-SY5Y « low », marquées avec Tuj1 (gris) et colorées au DAPI (bleu) après traitement à l'acide rétinoïque. B : Image acquise au microscope confocal de cellules SH-SY5Y « low » co-cultivées avec des cellules SH-SY5Y non infectées, marquées avec Tuj1 (gris) et colorées au DAPI (bleu) après traitement à l'acide rétinoïque. Barres d'échelles : 20µM.

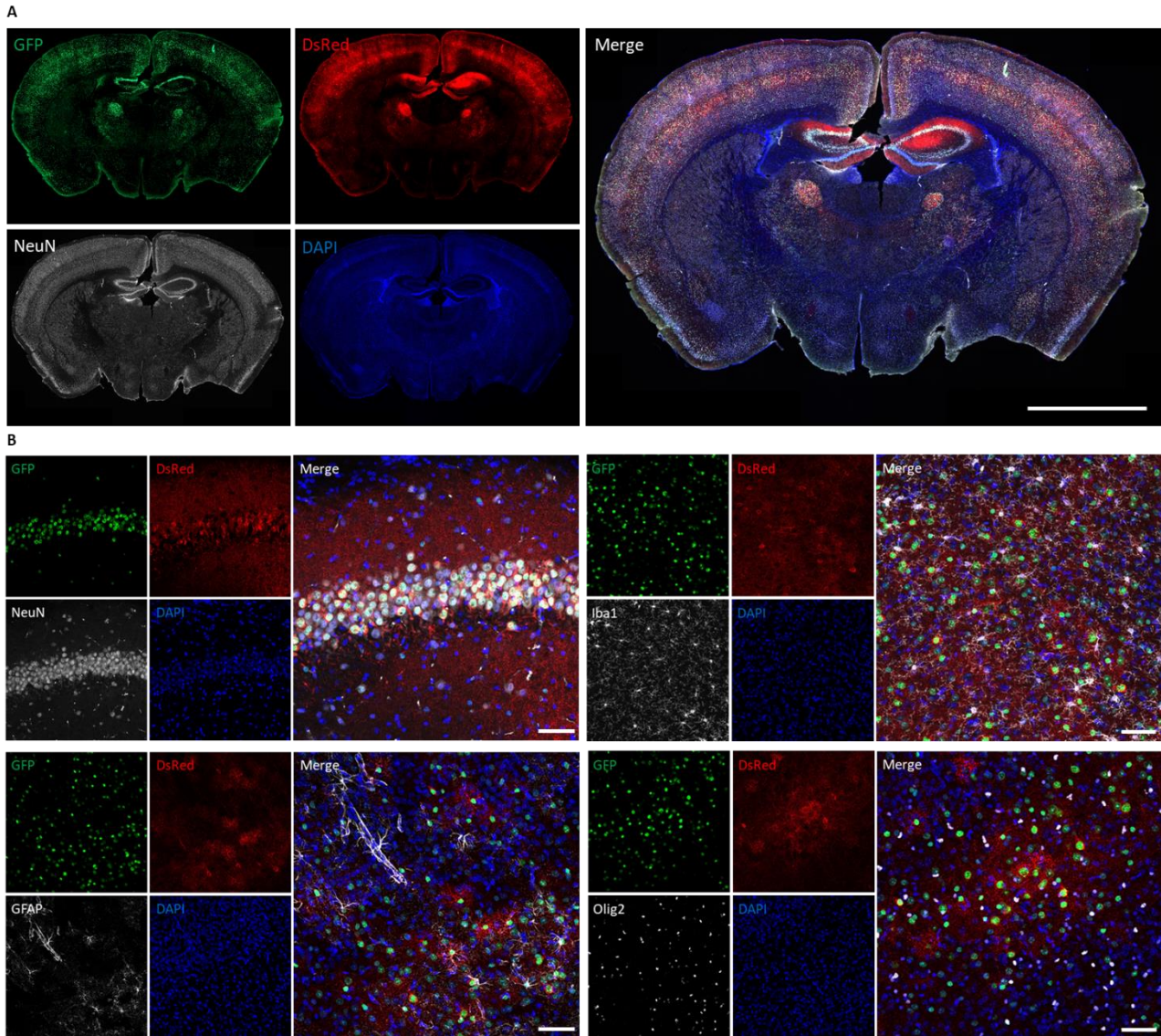
#### **Test de la construction T2A *in vivo*.**

La construction mito-DsRed-T2A-H2B-GFP permet de mettre en évidence le transfert de mitochondries *in vitro*. De plus, contrairement aux approches classiques qui se limitent à l'étude du transfert dans des systèmes de co-culture, cette construction permet d'étudier le transfert de mitochondrie *in vivo*. En effet, une transposition des procédures de co-culture consisterait à injecter 2 vecteurs viraux séparément (un codant pour H2B-GFP et l'autre pour mito-DsRed) mais cette méthode ne permettrait pas de distinguer les cellules

ayant reçu des mitochondries des cellules ayant été co-infectées par les deux vecteurs viraux. Ici, l'injection d'un seul vecteur viral exprimant mito-DsRed-T2A-H2B-GFP chez l'animal permet de différencier des populations donneuses exprimant les deux marqueurs des populations receveuses non infectées. Ainsi, des mitochondries DsRed positives dans une cellule GFP négative seront issues d'un transfert depuis une cellule infectée.

Comme les vecteurs lentiviraux ne peuvent pas traverser la BHE après une injection intraveineuse chez la souris, nous avons produit un vecteur AAV-PHP.eB codant pour mito-DsRed-T2A-H2B-GFP. Ce vecteur viral a été injecté par voie intraveineuse chez des souris sauvages âgées d'un mois ( $1.10^{14}$  gv/kg). 2 semaines après l'injection, les souris ont été euthanasiées et les cerveaux et les foies ont été prélevés pour analyser l'expression du vecteur viral. Les foies n'ont pas encore été analysés. Dans le cas des cerveaux, une analyse histologique du phénotype des cellules transduites montre que le vecteur viral cible principalement les neurones et les astrocytes (**figure 42B**). Ce résultat est intéressant car il a déjà été montré que le transfert de mitochondrie pouvait avoir lieu entre ces deux types cellulaires (Hayakawa et al., 2016). Bien qu'elle n'ait pas été quantifiée, la proportion de cellules infectée est intéressante. Elle permet un bon équilibre entre le nombre de cellules infectées potentiellement donneuses et non infectées potentiellement receveuses. Les résultats obtenus grâce à la microscopie permettent également d'établir une cartographie des régions dans lesquelles il serait intéressant d'étudier plus précisément le transfert de mitochondries. On pourrait en effet envisager d'étudier ce mécanisme dans les régions où les circuits neuronaux sont bien identifiés et présentent un bon taux d'infection comme dans le cortex ou l'hippocampe (**figure 42A**). Cependant, la microscopie ne permet pas d'isoler précisément les cellules ayant reçu des mitochondries à cause de la trop forte densité de cellules. D'autres méthodes plus adaptées à cet objectif telles que la cytométrie de flux doivent maintenant être étudiées.





**Figure 42 : Analyse du phénotype des cellules transduites par le vecteur AAV-PHP.eB-CAG-mito-DsRed-T2A-H2B-GFP.**

*A : Images représentatives acquises à l'Axioscan d'une coupe coronale de cerveau montrant l'expression de la GFP (vert) et du DsRed (rouge) 2 semaines après injection intraveineuse du vecteur viral chez des souris sauvages âgées d'un mois. Les noyaux des neurones ont été marqués avec NeuN (gris) et les coupes ont été colorées au DAPI (bleu). Barre d'échelle = 2mm. B : Images représentatives acquises au microscope confocal de coupes de cerveaux montrant l'expression de la GFP (vert) et du DsRed (rouge), marquées avec NeuN, GFAP, Iba1 ou Olig2 (gris) et colorées au DAPI (bleu) Barres d'échelles = 50µM.*

---

## Discussion

---

La thérapie génique constitue la meilleure approche pour le traitement des pathologies génétiques car elle permet une correction à long terme, en une seule intervention du défaut primaire à l'origine de la maladie. Dans le cadre de pathologies multi-systémiques avec une implication prépondérante du SNC, le principal défi concerne l'acheminement et l'efficacité d'expression du transgène dans le cerveau à cause de l'imperméabilité de la BHE aux vecteurs viraux. Mon travail de thèse a permis de montrer que des stratégies sont possibles pour contourner la BHE et induire un effet thérapeutique dans un modèle murin d'une maladie mitochondriale sévère. Ces résultats peuvent être utilisés pour développer d'autres applications et certains points techniques doivent encore être améliorés pour optimiser l'effet thérapeutique. Ces aspects seront donc discutés ici.

L'apport du transgène dans le cerveau est un facteur conditionnant l'effet thérapeutique d'une thérapie génique dans le cadre d'une pathologie impliquant majoritairement cet organe. Le syndrome de Leigh rentre dans cette catégorie de maladie étant donné les multiples lésions bilatérales retrouvées chez les patients au niveau des ganglions de la base, du thalamus, du tronc cérébral et du cervelet. Cliniquement, les symptômes manifestés sont largement associés à ces lésions avec un retard intellectuel, de l'épilepsie, une ataxie, et des problèmes de contrôle de la respiration très souvent fatals (Finsterer, 2008). Ces aspects sont renforcés par les études sur les souris *NDUFS4* KO, le modèle murin du syndrome de Leigh le mieux caractérisé. En effet, les souris présentant une délétion totale du gène *NDUFS4* ou celles présentant une délétion spécifique au cerveau présentent un phénotype similaire (Quintana et al., 2010; Bolea et al., 2019). Il semble donc essentiel que la mise en place d'une thérapie génique sur ce modèle implique la restauration de l'expression du gène *NDUFS4* dans la plus grande partie du cerveau possible. Contrairement aux études précédentes (Quintana et al., 2012; Di Meo et al., 2017), notre approche consistait à injecter le vecteur viral dans la circulation sanguine pour transduire tout le cerveau grâce à l'important réseau de capillaire distribué sur toute sa surface (Pardridge, 2005). La deuxième différence par rapport à l'étude de Di Meo et ses collaborateurs est que nous avons choisi de traiter les animaux à l'âge adulte. La

première raison est liée à la perte de l'expression de la protéine d'intérêt lorsque les organes ne sont pas suffisamment matures (Cunningham et al., 2009; Di Meo et al., 2017). La deuxième raison est la pertinence par rapport à une possible translation en clinique. En effet, les enfants atteints du syndrome de Leigh ne sont pas diagnostiqués à la naissance mais seulement quand les symptômes apparaissent (Baertling et al., 2014). Il paraît donc cohérent de débiter le traitement chez la souris en respectant ce critère.

### **La perméabilité de la BHE chez les souris *NDUFS4* KO.**

La première méthode que nous avons étudiée pour restaurer l'expression du transgène dans le cerveau est la capacité du vecteur viral à passer naturellement la BHE. Il a en effet été montré qu'un dysfonctionnement des mitochondries pouvait entraîner une augmentation de la perméabilité de la BHE ce qui pourrait être utilisé ici comme un avantage pour faciliter le passage des vecteurs viraux dans le cerveau (Doll et al., 2015; Song et al., 2020). Ce phénotype n'avait jamais été étudié sur des modèles murins de maladies mitochondriales sévères.

Lors de notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de différence de perméabilité de la BHE entre les souris *NDUFS4* KO et les souris sauvages. Les défauts liés à des problèmes mitochondriaux rencontrés dans les études précédentes étaient mis en évidence dans des modèles murins de troubles aigus comme des accidents cérébrovasculaires (AVC) ou dans des modèles de maladies neurodégénératives (Doll et al., 2015; Di Pardo et al., 2017; Sweeney et al., 2018). Dans tous les cas, l'augmentation de la perméabilité de la BHE semble associée à l'augmentation de la production d'ERO (Song et al., 2020). Or les études impliquant des souris *NDUFS4* KO ne mettent pas en évidence une augmentation de la quantité d'ERO ou de dommages associés par rapport aux souris sauvages (Kayser et al., 2016; Johnson et al., 2020; Reynaud-Dulaurier et al., 2020). On pourrait également suggérer que les défauts de perméabilité seraient susceptibles d'apparaître à des stades plus tardifs de la pathologie. En effet l'inflammation est un marqueur pathologique largement retrouvée dans le cerveau des souris *NDUFS4* KO et est connu comme étant à l'origine de perturbations de la BHE (Obermeier et al., 2013). On peut donc penser que le niveau d'inflammation cérébrale des animaux *NDUFS4* KO à 30 jours n'est pas suffisant pour induire une augmentation de la perméabilité de la BHE. Une évaluation de ce phénotype à un âge proche de la fin de vie des animaux pourrait mettre en évidence des

résultats différents de ceux obtenus ici. Cependant, si c'était le cas, il ne serait pas pertinent de reculer l'âge de traitement car le risque de mortalité à des stades avancés de la pathologie serait trop important.

Malgré l'absence de différence de perméabilité de la BHE, on pourrait questionner le fait que l'on ne détecte pas de GFP dans le cerveau des animaux *NDUFS4* KO, après une injection intraveineuse à 30 jours. Certaines études ont en effet montré que pour une dose similaire, ( $5 \cdot 10^{13}$  gc/kg) le vecteur AAV9 était capable de transduire des neurones et des astrocytes (Duque et al., 2009; Foust et al., 2009; Gray et al., 2011). Cependant, les pourcentages de transduction étaient relativement faibles et le type de cellules transduites était très variables en fonction de l'âge des animaux. L'étude de Foust et ses collaborateurs a montré qu'une injection intraveineuse chez des souris adultes induisait une transduction isolée de quelques neurones localisés seulement dans l'hippocampe et de patch astrocytaires dispersés dans le cerveau alors que qu'une injection en néonatale permettait une expression du transgène dans toutes les régions du cerveau (entre 10 et 50% des neurones étaient transduits selon les régions). L'étude de Duque et ses collaborateurs ne mettait pas en évidence de différence de niveau de transduction du cerveau entre une injection réalisée en néonatale ou chez les souris adultes. Le pourcentage de cellules transduites n'est cependant pas quantifié et l'analyse qualitative des images des coupes histologiques ne met pas en évidence un niveau de transduction très important. Cela pourrait être traduit par la mesure de l'activité biochimique du gène rapporteur (ratio de 20:1 entre l'activité mesurée dans le cœur et dans le cerveau). Une étude réalisée par la suite chez des primates non humain a montré que l'AAV9 pouvait transduire des cellules neuronales de jeunes primates non humains (3/4 ans) mais avec un pourcentage relativement faible et largement inférieur au niveau de transduction des organes périphériques (nombre de copie du transgène dans le cerveau mesuré par qPCR : moins de 0,05 contre 0,7 pour le foie) (Gray et al., 2011). Ces études montrent que bien qu'il soit décrit comme capable de traverser la BHE, le vecteur AAV9 permet essentiellement la transduction des cellules de la moelle épinière mais n'induit pas une large expression du transgène dans le cerveau. De plus, dans les conditions expérimentales permettant la plus forte expression du transgène selon Foust et ses collaborateurs (injection intraveineuse chez le nouveau-né), aucun effet thérapeutique

n'a été mis en évidence chez les souris *NDUFS4* KO (Di Meo et al., 2017). Cela confirme la nécessité d'utiliser des méthodes pour améliorer le passage des vecteurs dans le cerveau.

### **L'acheminement d'un transgène dans le cerveau par modification de la capsid des vecteurs AAV.**

Nos travaux ont apporté pour la première fois une preuve de concept que la thérapie génique pouvait apporter un bénéfice majeur dans un modèle murin d'une maladie mitochondriale sévère (Reynaud-Dulaurier et al., 2020).

Si on compare notre approche génétique aux stratégies non génétiques les plus efficaces, on observe que l'effet thérapeutique sur la survie est au minimum équivalent aux études utilisant la rapamycine, la doxycycline ou l'exposition à des conditions hypoxiques (Johnson et al., 2013; Ferrari et al., 2017; Perry et al., 2021). L'avantage de notre approche est que le traitement nécessite une seule injection pour corriger le phénotype de façon durable et sans provoquer d'effet secondaire. Au contraire, il a par exemple été montré que l'effet thérapeutique de la rapamycine passe par une injection quotidienne et des doses susceptibles de provoquer des effets secondaires graves voir fatal (Johnson et al., 2015; Felici et al., 2017). Les effets thérapeutiques obtenus avec la doxycycline sont prometteurs et plus facilement transposable en clinique étant donné la toxicité moindre de cette molécule, déjà utilisée en tant qu'antibiotique et la possibilité de la délivrer par voie orale. Néanmoins les résultats obtenus montrent que les performances locomotrices décroissent avec l'âge et que le retard de croissance n'est pas corrigé conduisant à une survie moyenne de 107 jours. Cette stratégie ne restaure pas le défaut génétique ce qui pourrait expliquer ces résultats. De plus, les concentrations de doxycycline mesurées dans le cerveau sont relativement faible par rapport à celle mesurées dans le foie (respectivement 2pmol/mg contre 30pmol/mg). Enfin pour l'exposition à des conditions hypoxiques, malgré l'effet important sur la survie (plus de 50% des animaux encore en vie à 280 jours) sans restaurer l'expression du gène *NDUFS4*, il est impossible de la transposer en clinique puisque la pression en oxygène nécessaire correspondrait à celle retrouvée à 4000m d'altitude. La thérapie génique représente donc à ce jour la stratégie qui regroupe le plus de critères thérapeutiques : efficacité, technique non-invasive et correction durable de la pathologie en une seule intervention. La transposabilité chez l'humain est

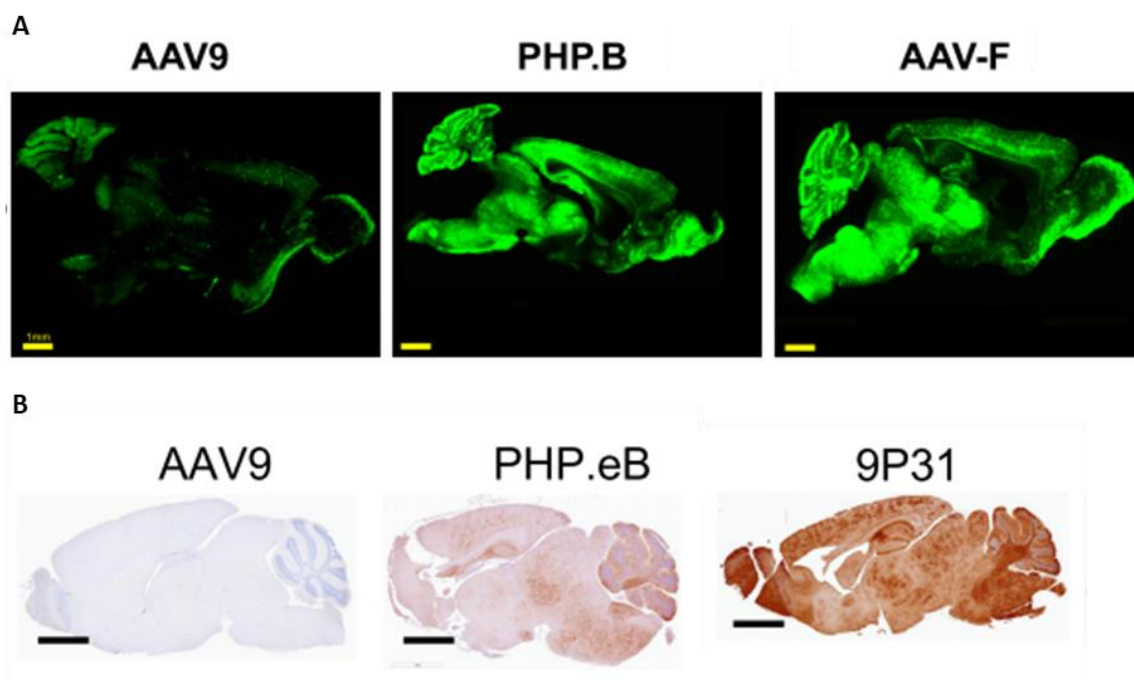
également un point clé qui doit être discuté pour passer d'une approche pré-clinique à clinique.

Ces dernières années, la mise au point de nouveaux vecteurs viraux (AAV.PHP.B, AAV.PHP.eB) a permis de contourner l'obstacle que représente la BHE dans le développement de la thérapie génique pour les pathologies impliquant le SNC. Ils ont été utilisés pour restaurer l'expression de gènes défectueux dans différents modèles de maladies mitochondriales et lysosomales, conduisant à chaque fois à des effets thérapeutiques jamais obtenus jusque-là (Lim et al., 2019; Lahey et al., 2020; Yang et al., 2020 b). Dans notre cas, l'effet thérapeutique observé et confirmé par la suite dans des travaux similaires met en avant l'efficacité de cette stratégie pour corriger de façon durable le phénotype pathologique des souris *NDUFS4* KO (Silva-Pinheiro et al., 2020). Il est néanmoins nécessaire de considérer que cette approche est limitée aux souris de fond génétique C57BL/6 sur lesquelles ont été développées et identifiées ces variants et à quelques souches de souris consanguines comme SJL/J et FVB/N (Deverman et al., 2016; Chan et al., 2017; Challis et al., 2019; Matsuzaki et al., 2019). Plusieurs études ont montré que le passage de ces vecteurs viraux à travers la BHE était conditionné par l'expression du récepteur LY6A à la surface des cellules endothéliales (Batista et al., 2019; Hordeaux et al., 2019; Huang et al., 2019). Cette limitation conduit à une diminution considérable de l'expression du transgène dans le cerveau chez d'autres souches de souris (quasiment aucune expression du transgène chez les souris BALB/c) et chez les primates non humain, avec un niveau de transduction du cerveau dix fois inférieur à celui observé chez les souris C57BL/6 après une injection intraveineuse (Liguore et al., 2019; Matsuzaki et al., 2019). Ce paramètre prévient donc la transposition directe de cette stratégie en clinique.

Pour pallier à ces limitations, de nouvelles plateformes de screening ont été développées sur la base d'une approche d'évolution dirigée : iTransduce et TRACER. Ces deux stratégies ont permis l'identification de plusieurs variants du vecteur AAV9 présentant un niveau d'expression du transgène dans le cerveau jusqu'à 120 fois (AAV-F) et 400 fois supérieure à l'AAV9 (9P31) pour les plus efficaces (**figure 43**) (Hanlon et al., 2019; Nonnenmacher et al., 2021). Dans les deux cas, l'efficacité de transduction du cerveau a été validée après injection intraveineuse chez les souris adultes C57BL/6 et BALB/c ce qui permet de conclure que le mécanisme de passage à travers la BHE est différent de celui des vecteurs



PHP. Ces variants doivent maintenant être testés sur des espèces plus grandes afin d'évaluer leur potentiel. Des résultats encore non publiés mais présentés par Mathieu Nonnenmacher lors du meeting annuel de la société américaine de thérapie génique et cellulaire montre que le variant 9P801, identifié grâce au système TRACER est capable d'induire une expression du transgène dans le cerveau des primates non humain jusqu'à 1000 fois supérieur au vecteur AAV9 (Nonnenmacher, 2021). Ce variant pourrait donc être un outil remarquablement efficace pour la thérapie génique de pathologie impliquant le SNC.



**Figure 43 : Variants de vecteur AAV9 capable de traverser la BHE récemment développés.**

*Coupes sagittales représentatives de souris C57BL/6 adultes injectées en intraveineuse avec un vecteur AAV9, un vecteur AAV-PHP ou A : le variant AAV-F, développé par Hanson et ses collaborateurs, le gène rapporteur (GFP) est exprimé dans tout le cerveau avec environ la même intensité et la même distribution que pour le vecteur AAV-PHP.B. B : Le variant AAV-9P31 développé par Nonnenmacher et ses collaborateurs, le gène rapporteur (GFP) est exprimé dans tout le cerveau avec une intensité plus forte que pour le vecteur AAV-PHP.eB.*

### **L'acheminement du transgène dans le cerveau par perméabilisation de la BHE grâce aux ultrasons focalisés.**

Pour permettre aux vecteurs viraux de traverser la BHE sans avoir à développer de nouvelles capsides, une autre approche peut être envisagée. En effet, il est possible d'agir directement sur la BHE afin d'augmenter sa perméabilité de façon transitoire et réversible

grâce aux USF (Timbie et al., 2015). Cette méthode, déjà utilisée chez l'homme pour d'autres applications (Abrahao et al., 2019; Mainprize et al., 2019; Meng et al., 2021) permet d'avoir recours aux vecteur AAV9 qui sont également utilisés dans le cadre d'essais cliniques (Mendell et al., 2017; Kuzmin et al., 2021).

Dans la plupart des études pré-clinique utilisant cette approche pour délivrer du matériel génétique dans le cerveau le transgène est exprimé uniquement dans la zone ciblée par les ultrasons (Thévenot et al., 2012; Hsu et al., 2013; Stavarache et al., 2019). Lors de notre étude, nous avons démontré qu'il était possible d'acheminer un transgène dans une large partie du cerveau grâce au balayage du faisceau d'ultrasons sur toute la surface du crâne de l'animal. Une étude publiée récemment par le laboratoire de Jean Christophe Roux et utilisant la même approche a également montré qu'il était possible de délivrer un vecteur AAV dans une grande partie du cerveau de façon efficace et sûr grâce aux USF (Felix et al., 2021). Il est donc intéressant de comparer notre étude avec cette dernière car c'est actuellement la seule à utiliser les ultrasons focalisés pour cette application.

Dans les deux études, l'utilisation des USF en balayage est efficace pour ouvrir la BHE puisque l'expression du transgène est retrouvée dans différentes régions du cerveau. Cependant, certains paramètres expérimentaux sont différents ce qui nous donne des éléments de comparaison et pourrait nous aider à optimiser nos paramètres afin que la BHE soit perméabilisée le plus largement possible et que le transgène soit délivré dans une grande partie du cerveau. De plus, il est important de déterminer des paramètres à la fois efficaces et sûrs.

Tout d'abord, la pression acoustique est un des principaux paramètres déterminant l'efficacité de perméabilisation de la BHE. Il a été montré que plus la pression est importante plus l'ouverture de la BHE est grande. Cependant elle doit être limitée car au-delà d'un certain seuil des dommages de types hémorragiques apparaissent (Shin et al., 2018). Dans l'étude de Felix et ses collaborateurs, la pression acoustique appliquée était de 0,65MPa contre 0,45MPa pour nous. Ces deux valeurs sont en dessous des seuils potentiellement susceptibles de provoquer des dommages tissulaires (0,82MPa). La pression appliquée dans notre étude est inférieure mais nos animaux sont plus petits (10g contre 15g en moyenne). Or, le crâne induit une diminution de la pression réellement appliquée à l'animal (pression in situ) par un facteur dépendant du poids. Bien que nous



n'ayons pas quantifié expérimentalement cette valeur, le calcul théorique grâce à l'équation donnée par Felix et ses collaborateurs montre une perte de 2% (contre 10% pour des animaux de 15g). Augmenter la pression acoustique ne semble donc pas nécessaire, au risque de provoquer des lésions potentiellement fatales, d'autant plus que dans les zones ayant été ciblées par le faisceau, le niveau d'expression du transgène est similaire avec celui obtenu avec le vecteur AAV-PHP.B. Le ratio bénéfice/risque d'une augmentation de la pression acoustique ne semble donc pas en faveur d'une modification de ce paramètre.

En ce qui concerne les paramètres de balayage, la vitesse de déplacement est 10 fois plus importante dans l'étude de Felix et ses collaborateurs et le faisceau est délivré en continu. Avec un faisceau ultrasonore d'1mm de diamètre, une vitesse de déplacement de 10mm/sec et 30 cycles de balayage, chaque zone d'1mm<sup>2</sup> reçoit en réalité 3 secondes d'ultrasons. Dans notre cas, les ultrasons sont délivrés pendant 50ms toutes les secondes à une vitesse de 1mm/sec. Avec un faisceau de diamètre de 2mm, chaque zone d'1mm<sup>2</sup> est soumise à 100ms d'ultrasons par tour. Comme nous avons effectué 9 tours, chaque zone reçoit en totalité 900ms d'ultrasons soit plus de 3 fois moins. Leur approche est intéressante car elle permet de délivrer les ultrasons de manière plus homogène sur toute la surface du crâne pour un temps d'intervention inférieur (30 tours de 5 secondes = 150 secondes contre 9 tours de 20 secondes pour nous soit 180 secondes). La diminution du temps d'intervention est un paramètre particulièrement avantageux dans notre cas étant donné la sensibilité importante des souris *NDUFS4* KO à l'anesthésie.

Un autre paramètre de balayage important est le chemin parcouru par le faisceau d'ultrasons. Dans notre cas, le schéma de balayage était limité par la programmation de la plateforme mobile qui n'autorisait pas une totale liberté de mouvement. Nous avons donc réalisé un rectangle centré sur le crâne de l'animal. Comme observé sur nos images IRM et microscopique, la BHE n'était donc pas perméabilisée dans les zones les plus latérales. De plus, les zones les plus postérieures n'étaient pas non plus systématiquement ciblées. Les premiers résultats thérapeutiques obtenus sur les souris *NDUFS4* KO montrent que ce niveau de transduction est donc suffisant pour restaurer l'expression du gène dans les régions assurant la survie des animaux, au moins jusqu'à 90 jours. Une étude impliquant un plus grand nombre d'animaux et permettant de réaliser une courbe de

survie plus longue déterminerait l'âge maximum que les souris *NDUFS4* KO traitées avec cette méthode peuvent atteindre avec ce niveau de transduction. Les analyses comportementales n'ont pas mis en évidence d'effet bénéfique majeur du traitement. Cela pourrait être expliqué par la transduction insuffisante des régions postérieures principalement touchées chez les souris *NDUFS4* KO comme le noyau du vestibule et le cervelet (Quintana et al., 2010). L'hypothermie n'est pas totalement corrigée par le traitement et cela pourrait être également lié à un défaut de restauration du gène dans les zones régulant la température corporelle comme l'hypothalamus, région située ventralement et pas systématiquement ciblée.

Une étude a montré que chez les souris *NDUFS4* KO, la fonction respiratoire mitochondriale restait stable dans les régions non synaptiques mais déclinait avec l'âge dans les terminaisons neuronales, en particulier dans les régions présentant des niveaux de neurodégénérescence important (bulbe olfactif, tronc cérébral et cervelet) (Kayser et al., 2016). On pourrait donc envisager de réaliser des tirs ultrasonores uniquement sur ces régions afin de pallier au problème de balayage. Cependant, les patients atteints du syndrome de Leigh présentent des lésions dans d'autres régions cérébrales (ganglions de la base, thalamus) ce qui pourrait donc limiter la pertinence de cette approche d'un point de vue clinique. La stratégie de balayage employée dans l'étude de Felix et ses collaborateurs consistant à effectuer une forme de « S » à la surface du crâne serait donc adaptée à notre problématique.

Un dernier point qui peut être discuté ici est le positionnement de l'animal. En effet, dans notre système nous avons parfois observé que la tête de la souris pouvait glisser de gauche à droite pendant le balayage à cause de la pression exercée par la membrane du transducteur. Cela peut expliquer l'asymétrie gauche/droite de perméabilisation de la BHE observée chez certaines souris. De plus, le glissement de la tête peut induire des défauts de contact entre la membrane du transducteur et le crâne de l'animal et donc une dispersion des ultrasons dans l'air. Pour améliorer ce paramètre, le moyen le plus efficace serait de modifier le support de l'animal en ajoutant des barres d'oreilles pour maintenir la tête pendant le déplacement.

Nos travaux ont permis de démontrer qu'il était possible d'ouvrir la BHE sur une large surface grâce aux USF afin de délivrer un vecteur viral dans le cerveau. La restauration de

l'expression du gène dans les zones ciblées permet la survie des animaux jusqu'à minimum 90 jours. Cette étude est la première à montrer que la délivrance d'un gène dans une large partie du cerveau grâce au balayage des ultrasons focalisés exerce un effet thérapeutique dans un modèle murin de maladie mitochondriale. L'optimisation des paramètres de balayage puis la confirmation des effets thérapeutiques sur des animaux dont une plus grande partie du cerveau a été transduite par le vecteur viral pourrait apporter de nouvelles perspectives pour la translation clinique de cette approche.

### **Mécanisme de renforcement de l'effet de la thérapie : le transfert de mitochondries.**

Afin de déterminer si le transfert de mitochondries peut renforcer l'effet thérapeutique apporté par la thérapie génique, il est important de mettre en place des outils adéquats. Après avoir utilisé les approches classiques pour étudier le transfert de mitochondries *in vitro*, nous avons construit et caractérisé un nouvel outil plus approprié pour la mise en évidence de ce mécanisme à la fois *in vitro* et *in vivo*.

Les stratégies actuelles utilisées pour étudier le transfert de mitochondries *in vitro* implique des expériences de co-culture (Babenko et al., 2015; Jiang et al., 2016; Chuang et al., 2017; Li et al., 2017). Des cellules donneuses sont identifiées par un marquage spécifique des mitochondries et sont co-cultivées avec des cellules receveuses, identifiées avec un autre marqueur (nucléaire ou cytoplasmique). Nous avons tout d'abord utilisé cette approche pour déterminer si nous parvenions à reproduire les résultats publiés dans la littérature dans des conditions non pathologique en utilisant : la lignée cellulaire SH-SY5Y et un marqueur mitochondrial fluorescent apporté par un vecteur lentiviral. Nous avons choisi les cellules SH-SY5Y car il a déjà été montré qu'elles étaient capables de former des TNTs, un des moyens de transfert des mitochondries (Smith et al., 2011; Dieriks et al., 2017). Pour les marqueurs permettant de différencier les cellules donneuses et receveuse, nous avons choisi d'utiliser des protéines fluorescentes apportées par un vecteur lentiviral. Cette méthode est une alternative moins toxique et plus spécifique que les colorants MitoTracker utilisés dans d'autres études. De plus, les colorants mitochondriaux limitent la fenêtre expérimentale durant laquelle on peut détecter le transfert (Berridge et al., 2018).

Lors des expériences de co-culture, nous avons détecté en cytométrie en flux un pourcentage de cellules positives pour le marqueur mitochondrial (mito-BFP ou mito-

DsRed) et pour le marqueur nucléaire (H2B-GFP). Ces cellules pourraient être des cellules infectées avec le vecteur lentiviral codant pour H2B-GFP ayant reçues des mitochondries d'une cellule donneuse. Le pourcentage de cellules doublement positives est cependant très variable d'un marqueur à l'autre (mito-BFP ou mito-DsRed) et d'une expérience à une autre. Malgré une attention particulière portée sur la reproductibilité des expériences, on ne peut pas exclure que certains paramètres aient pu varier, en particulier le stress provoqué par les infections par les vecteurs viraux. On a pu en effet observer que la mortalité cellulaire variait d'une expérience à une autre, que ce soit pour les cellules donneuses ou receveuses. Ainsi, lorsque l'ensemencement de la co-culture était théoriquement effectué à un ratio cellules donneuses / cellules receveuses de 1:1, l'analyse en cytométrie montrait que ce pourcentage était déséquilibré (dans un sens ou dans l'autre selon les expériences). Une perte de cellules donneuses peut donc conduire à une diminution du nombre de mitochondries potentiellement transférable. Inversement, une perte des cellules receveuses peut induire un défaut du nombre d'accepteurs des mitochondries potentiellement transmises par une cellule donneuse. De façon générale, la densité cellulaire globale au sein de la co-culture est un paramètre qui doit rester constant afin que le pourcentage de chance d'effectuer un échange avec une cellule environnante soit similaire d'une expérience à l'autre (Abounit et al., 2015).

De façon intéressante, le stress provoqué lors des infections par les vecteurs lentiviraux a pu être un élément favorisant le transfert de mitochondries. Il a par exemple été démontré que la production d'ERO lors d'un stress oxydant pouvait augmenter le nombre de mitochondries échangées (Park et al., 2021). Ici, le stress était un effet secondaire de l'infection par les vecteurs lentiviraux et n'était pas désiré ni contrôlé. Cependant l'application d'un stress avec des paramètres bien définis comme un ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou un stress nutritif (Wang et al., 2011) pourrait être un élément utilisé pour favoriser la mise en évidence du transfert.

Deux éléments nous ont donc par la suite poussé à développer un nouvel outil pour étudier le transfert de mitochondries. Le premier est lié aux aspects techniques développés ci-dessus. Afin de mieux contrôler les taux d'infection et la reproductibilité des résultats, il fallait (1) limiter les infections en combinant les marqueurs nucléaires et mitochondriaux dans la même construction et (2) créer une lignée cellulaire stable pour

les expériences *in vitro*. Le deuxième élément est la translation de cette approche *in vivo*. Nous ne pouvons pas étudier le transfert de mitochondries *in vivo* en utilisant cette approche car en réalisant 2 infections, nous aurions obtenu des cellules doublement infectées qui n'aurait pas été différenciables des cellules GFP-positives ayant reçues des mitochondries.

La création d'un nouvel outil permettant l'expression de mito-DsRed et H2B-GFP grâce à une seule infection par un vecteur lentiviral (*in vitro*) ou par un vecteur AAV-PHP.eB (*in vivo*) permettait donc de répondre à ces deux aspects. Pour créer cette construction, nous avons choisi de séparer les séquences mito-DsRed et H2B-GFP par une séquence T2A. L'ajout d'une séquence T2A est reconnu comme étant la stratégie la plus efficace pour co-exprimer plusieurs gènes (Szymczak et al., 2004; Liu et al., 2017 b). L'expression de la protéine située en deuxième position sur la construction (ici H2B-GFP) est supérieure par rapport aux constructions utilisant les séquences IRES. De plus, la petite taille de la séquence T2A est avantageuse lorsqu'on utilise des vecteurs viraux possédant une capacité d'emballage limité (Szymczak et al., 2004).

Etant donné la nouveauté de cette construction, il fallait s'assurer que les protéines étaient exprimées de façon efficace et spécifique. Il est nécessaire de vérifier que le peptide T2A résiduel attaché à l'extrémité C-terminal de la protéine exprimée en premier ne perturbe pas sa fonction. Lors d'une étude, il a en effet été rapporté que la protéine DsRed ne présentait pas de fluorescence en présence du peptide résiduel T2A malgré le fait qu'elle soit détectée en western blot (Hasegawa et al., 2007). Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de problème d'expression ou de localisation des protéines. L'analyse microscopique a montré que la GFP était spécifiquement exprimée dans le noyau et le DsRed dans les mitochondries. L'analyse en Western Blot et en cytométrie en flux lors de l'établissement de la lignée a montré que ces deux protéines étaient exprimées dans des proportions similaires, comme attendu avec une construction possédant une séquence T2A (Szymczak et al., 2004).

Pour les expériences *in vitro*, l'expérience de co-culture des cellules de la lignée exprimant mito-DsRed et H2B-GFP avec des cellules non infectées a permis de mettre en évidence des mitochondries qui ont été transférées d'une cellule infectée à une cellule non infectée. Ces événements étaient difficilement quantifiables sur l'ensemble de la co-

culture et il faudrait donc répéter l'expérience en procédant à une analyse en cytométrie en flux pour estimer le pourcentage de cellules ayant reçu des mitochondries.

Pour les expériences *in vivo*, nous avons montré que l'utilisation du vecteur AAV-PHP.eB permettait une expression efficace des deux marqueurs dans le cerveau, à la fois dans les neurones et dans les astrocytes. Le fait que ces deux types cellulaires soient les principaux transduits par le vecteur viral est intéressant car il a déjà été démontré que les astrocytes pouvaient échanger des mitochondries avec les neurones *in vivo* en condition d'ischémie cérébrale (Hayakawa et al., 2016). Il est compliqué de mettre en évidence un éventuel transfert de mitochondries en microscopie étant donné la très grosse densité cellulaire et l'incapacité à différencier une cellule donneuse et receveuse. Cependant, après homogénéisation et dissociation du tissu afin d'obtenir une suspension de cellules isolées, la cytométrie en flux serait une méthode efficace pour analyser le pourcentage de cellules DsRed positive correspondant aux cellules non infectées ayant reçues des mitochondries (Schwarz, 2015). Il est important de souligner ici que bien que le transfert de mitochondries ait déjà été mis en évidence *in vitro* et *in vivo*, ces découvertes sont particulièrement récentes (Liu et al., 2021 b). La mise en évidence de ce phénomène *in vivo* par une nouvelle approche viendrait donc apporter des preuves supplémentaires de ce mécanisme de communication intercellulaire.

Pour valider notre hypothèse initiale, un élément clef qui pourrait être déterminé grâce à l'outil que nous avons développé est la contribution du transfert mitochondriale dans l'effet thérapeutique de la thérapie génique.

*In vitro*, plusieurs pistes permettraient d'apporter des éléments de réponses. La première serait d'étudier l'effet du transfert de mitochondries dans une culture de fibroblastes de souris *NDUFS4* KO. Pour cela, la première étape que nous avons déjà réalisée est l'ajout du gène *NDUFS4* à la construction mito-DsRed-T2A-H2B-GFP, puis la production des vecteurs lentiviraux exprimant cette construction. Nous avons également déjà réalisé des cultures primaires de fibroblastes issues de souris *NDUFS4* KO. La création d'une lignée cellulaire stable de fibroblastes *NDUFS4* KO exprimant *NDUFS4*, mito-DsRed et H2B-GFP (cellules donneuses) puis la co-culture avec des fibroblastes *NDUFS4* KO non infectées (cellules receveuses) permettrait d'étudier le transfert de mitochondries entre ces deux populations. Pour évaluer le phénotype des cellules *NDUFS4* KO non infectées ayant reçu

des mitochondries, nous pourrions les trier et les récupérer grâce à la cytométrie en flux. Nous pourrions ainsi mesurer la respiration mitochondriale associée au complexe I ou la production d'ERO, deux marqueurs pathologiques des fibroblastes issus de souris *NDUFS4* KO (Valsecchi et al., 2012, 2013).

Le phénotype pathologique étant largement associé au type tissulaire observé dans le cas des maladies mitochondriales (Hu et al., 2019), un second moyen pour étudier ce mécanisme *in vitro* dans un modèle plus proche de la pathologie consisterait à différencier les fibroblastes en neurones. Pour cela, nous possédons un outil moléculaire développé par une équipe américaine et permettant d'induire la différenciation directe d'une culture primaire de fibroblaste en neurones fonctionnels par un système lentiviral inducible (Herdy et al., 2019). Nous pourrions donc appliquer la même stratégie qu'avec les cultures de fibroblastes ci-dessus mais induire leur différenciation neuronale lors de la co-culture.

*In vivo*, nous pourrions transposer la stratégie appliquée aux souris sauvages aux souris *NDUFS4* KO en ajoutant à la construction le gène *NDUFS4*. L'isolation et l'analyse des cellules ayant reçu des mitochondries mais pas le gène *NDUFS4* permettrait de déterminer si ces dernières présentent une amélioration du phénotype pathologique en particulier par la mesure de l'activité du complexe I. On notera que les expériences *in vivo* ne seraient pas conditionnées par la réalisation ou les résultats obtenus dans les expériences *in vitro*. En effet, la démonstration d'un effet bénéfique du transport de mitochondries semble à la fois techniquement plus abordable et scientifiquement encore plus convaincante dans un modèle murin du syndrome de Leigh bien caractérisé plutôt que dans un modèle cellulaire.

---

## Annexes

---

Article d'opinion : PHP.B/eB Vectors Bring New Successes to Gene Therapy for Brain Diseases.

*Publié dans le journal Frontiers in Bioengineering and Biotechnology dans la section Preclinical Cell and Gene Therapy le 15 octobre 2020.*





# PHP.B/eB Vectors Bring New Successes to Gene Therapy for Brain Diseases

Robin Reynaud-Dulaurier and Michael Decressac\*

Univ. Grenoble Alpes, Inserm, U1216, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France

**Keywords:** gene therapy (GT), rare disease (RD), viral vector, CNS—central nervous system, blood-brain barrier

Rare genetic diseases collectively affect around 300 million people worldwide and a staggering 74% of them are childhood-onset conditions with neurological manifestations (Lee et al., 2020). Correction or replacement of malfunctioning genes using viral vectors showed outstanding pre-clinical and clinical benefits for inherited pediatric diseases, in particular those for which non-cell autonomous mechanisms such as cross-correction is effective (i.e., X-linked adrenoleukodystrophy or Batten's disease) (Naldini, 2015; Aubourg, 2016).

However, this field still faces important challenges in particular for conditions caused by genes encoding for non-secreted proteins and whose dysfunction affect large regions of the brain that cannot be covered by intra-cerebral delivery. This includes a plethora of rare genetic conditions such as mitochondrial diseases, lysosomal storage diseases, polyglutamine diseases, and neuromuscular diseases.

Gene delivery to the brain via systemic injection can be successfully achieved during a short period of time after birth where the blood-brain barrier (BBB) remains permeable. This entails establishing a diagnosis within this privileged time-window. Unfortunately, despite being early-onset diseases, many pediatric conditions manifest the first clinical signs when the BBB is no longer penetrable by viral vectors. Because of the limitations of our current toolbox, alternative strategies had to be designed in order to allow transgene delivery to the central nervous system (CNS) when the BBB has acquired its selective permeability. Methods to engineer the viral capsid such as peptide insertion, chemical modifications, shuffled genome libraries, directed evolution, or rationally targeted mutagenesis led to the generation of tenth of artificial variants among which some have been designed with the purpose to cross more efficiently the BBB when delivered into the bloodstream (Castle et al., 2016).

By combining the insertion of randomized sequences in a lox sites-containing *cap* gene with multiple selection rounds in Cre transgenic mice, Deverman and colleagues created series of brain-penetrating adeno-associated viral (AAV) vector variants. One of these, namely the AAV-PHP.B vector, induced a transgene expression in the CNS at least 40-fold greater than the parental AAV9 capsid when injected intravenously, and it retained a cellular tropism for peripheral organs (Deverman et al., 2016). In a follow-up study, the same group further evolved the PHP.B variant for better neuronal transduction. By applying the same Cre recombinase-based AAV target evolution strategy to the PHP.B capsid, they isolated the AAV-PHP.eB variant that showed enhanced CNS infectivity, enabling the reduction of the viral load delivered intravenously (Chan et al., 2017).

The generation of these novel brain-penetrant viral vectors opened a unique opportunity to overcome the obstacle that represents the BBB in the development of gene therapy for conditions with CNS pathology. Recent reports show that this idea was indeed quickly picked up by several groups and applied to a wide range of genetic diseases. They confirmed that the engineered AAV-PHP.B and AAV-PHP.eB variants efficiently transduced the CNS following injection in the vascular milieu. These tools were then used to restore the expression of defectives genes in several mouse models of mitochondrial diseases (i.e., mitochondrial hyper-fusion, and Leigh syndrome),

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Georg A. Feichtinger,  
University of Leeds, United Kingdom

### Reviewed by:

Chengwen Li,  
University of North Carolina at Chapel  
Hill, United States

### \*Correspondence:

Michael Decressac  
michael.decssac@  
univ-grenoble-alpes.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Preclinical Cell and Gene Therapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Bioengineering and  
Biotechnology

**Received:** 13 July 2020

**Accepted:** 07 September 2020

**Published:** 15 October 2020

### Citation:

Reynaud-Dulaurier R and  
Decressac M (2020) PHP.B/eB  
Vectors Bring New Successes to  
Gene Therapy for Brain Diseases.  
Front. Bioeng. Biotechnol. 8:582979.  
doi: 10.3389/fbioe.2020.582979

cytoskeleton dysfunction (i.e., CDKL5 deficiency disorder), Rett syndrome and lysosomal disease (i.e., Pompe disease and Sandhoff disease). In all of these animal models, reinstatement of gene expression in the CNS and peripheral organs afforded robust therapeutic effects. The broad correction of pathological signs resulted in behavioral improvements and increased lifespan (Table 1). Notably, for some of these severe conditions, the use of these brain-penetrant AAV vectors provided the first demonstration that their respective pathological phenotypes can be rescued by gene therapy. This is for instance the case for the *Ndufs4*<sup>-/-</sup> mouse model of Leigh syndrome for which previous attempts of gene replacement therapy using an AAV9-Ndusf4 vector in neonates did not show significant effects (Di Meo et al., 2017). In addition, the *in vivo* studies listed in Table 1 have been performed in KO mice which is a paradigm that does not accurately mimic the genetic defects observed in patients. Mutations often result in the synthesis of a dysfunctional protein that can exert a dominant negative effect potentially hampering the therapeutic efficacy of the transgene. This question started to be addressed by Gao and colleagues who extended their findings in iPSC-derived neurons from a patient with CDKL5 disorder and confirmed the phenotypic improvement (Gao et al., 2020).

One can anticipate that this first set of pre-clinical studies will pave the way for similar strategies in other models of severe inherited conditions for which no curative options are currently available. In addition, the positive outcomes observed in these models of fatal neurological disorders make the PHP variants attractive tools for other brain conditions with late-onset. In this line, other groups have already extended the therapeutic repertoire of these new viral vectors by successfully tested them in models of Parkinson's and Alzheimer's disease (Morabito et al., 2017; Jin et al., 2020). Targeted delivery of AAV-PHP.B vectors also provided benefits in mouse models of deafness and retinitis pigmentosa (Giannelli et al., 2018; Gyorgy et al., 2019).

In parallel to these gene therapy studies, other research groups examined the versatility of the PHP variants. Since these artificial serotypes were isolated after several rounds of *in vivo* selection in C57BL6 mice, the brain-penetrant property of the AAV-PHP.B vector was tested in other genetic backgrounds. These experiments revealed that its ability to cross the BBB is strain-dependent and genetic approaches identified the lymphocyte antigen 6 complex locus A (Ly6a), a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein expressed by endothelial cells, as a key determinant for this differential efficacy

**TABLE 1** | Listing the preclinical studies of gene replacement therapies using the PHP.B or PHP.eB vectors in mouse models of rare genetic diseases with CNS pathology.

Disease (animal model)	Vector and strategy	Biological outcomes	References
Mitochondria hyper-fusion ( <i>Slc25a46</i> <sup>-/-</sup> mice)	AAV-PHP.B-Slc25a46 2 × 10 <sup>11</sup> gc/g, Temporal vein at P1-2	Restored gene expression Increased lifespan Rescued brain, eye, and peripheral nerve pathology	Yang et al., 2020
Cdk5 deficiency disorder ( <i>Cdk5</i> <sup>-/-</sup> mice)	AAV-PHP.B-Cdk5 10 <sup>12</sup> vg/mouse Intra-jugular at P28-30	Restored gene expression Improved behavioral phenotype Rescued brain pathology	Gao et al., 2020
Leigh syndrome ( <i>Ndufs4</i> <sup>-/-</sup> mice)	AAV-PHP.B-Ndusf4 10 <sup>12</sup> vg/mouse Retro-orbital sinus at P28	Restored gene expression Increased lifespan Improved behavioral phenotype Rescued brain, eye, and heart pathology	Reynaud-Dulaurier et al., 2020
Leigh syndrome ( <i>Ndufs4</i> <sup>-/-</sup> mice)	AAV-PHP.B-Ndusf4 1 × 10 <sup>12</sup> -2 × 10 <sup>12</sup> vg/mouse Tail vein at P26-28	Restored gene expression Increased lifespan Rescued brain pathology	Silva-Pinheiro et al., 2020
Rett syndrome ( <i>MeCP2</i> <sup>-/-</sup> mice)	AAV-PHP.eB-iMeCP2 1 × 10 <sup>9</sup> -1 × 10 <sup>12</sup> vg/mouse Tail vein at P28	Restored gene expression Increased lifespan Improved locomotor function Rescued brain pathology	Luoni et al., 2020
Pompe disease ( <i>Gaa</i> <sup>-/-</sup> mice)	AAV-PHP.B-GAA 5 × 10 <sup>12</sup> vg/kg Retro-orbital sinus at P14	Restored gene expression Rescued brain and muscle pathology	Lim et al., 2019
Sandhoff disease ( <i>Hexb</i> <sup>-/-</sup> mice)	AAV-PHP.B-HEXA/HEXB 3 × 10 <sup>11</sup> -1 × 10 <sup>12</sup> vg/mouse Tail vein at P28-42	Restored gene expression Increased lifespan Improved behavioral phenotype Rescued brain and liver pathology	Lahey et al., 2020



(Hordeaux et al., 2018, 2019; Challis et al., 2019; Huang et al., 2019; Matsuzaki et al., 2019; Batista et al., 2020). Moreover, when tested in non-human primates, the AAV-PHP.B vector showed lower transduction efficiency than that observed in mice, highlighting inter-species variability in the BBB penetrance of this novel AAV serotype (Matsuzaki et al., 2018; Liguore et al., 2019). These observations suggest that while being powerful tools to achieve genetic manipulations in the rodent brain (e.g. gene replacement, editing, optogenetics), the first generation of PHP variants are unlikely to be used in clinic. This being said, Kumar and colleagues performed a multiplexed screening including a selection step in various mouse strains and they isolated a new capsid (i.e., PHP.C2) that induced good brain transduction even in genetic backgrounds expressing low levels of Ly6a. Yet, this novel variant needs to be tested in other species as well as in disease models in order to determine its potential transferability to humans.

This strategy of capsid engineering does not offer infinite possibilities and because of the shortage in AAV capsids, alternative approaches must be developed in order to overcome the limitations of these novel vectors in particular regarding their use in clinic. Capsid engineering also goes along with changes in the selectivity of tissue infection and cellular tropism. While the PHP.B serotype retains a transduction of peripheral tissues similar to that of the AAV9 parental capsid, the improved brain penetrance of the PHP.eB vector is at the expense of peripheral organs (Chan et al., 2017). This makes the PHP.eB serotype an interesting tool for conditions with dominant CNS pathology but less attractive for multisystem diseases.

Also, despite PHP vectors showed great efficacy in preclinical disease models, they are unlikely to be a solution for all brain disorders. Their region-dependent infectivity as well as their heterogenous tropism for neural cells represents a limitation for some diseases where specific cell types are affected (Deverman et al., 2016; Chan et al., 2017; Challis et al., 2019). This is for instance the case for multiple system atrophy in which

alpha-synuclein-rich aggregates accumulate in oligodendrocytes, a cellular population that is poorly infected by these vectors in comparison to neurons and astrocytes (Deverman et al., 2016). Consequently, a “one-size-fits-all” strategy is unlikely to work and similar to the development of personalized medicine, some pathologies may require tailor-made vector constructs with features driven by the disease characteristics.

In summary, recent efforts in designing brain-penetrant AAV-capsids have made an important step forward by generating several tools. Their valuable features have already been challenged in animal models of severe diseases and they demonstrated remarkable therapeutic effects. Regardless of their applicability in a clinical setting, these emerging tools offer a unique opportunity to provide the proof-of-concept that many genetic pediatric diseases with CNS pathology could be rescued by gene delivery when suitable viral vectors will be available. This important piece of information brings new hope for patients affected by these conditions.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the preparation and writing of this paper and agreed on its final version.

## FUNDING

MD was supported by an IDEX Chair of Excellence from the University of Grenoble-Alpes, the Edmond J. Safra Foundation, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-JCJC program, grant #ANR-17-CE37-0008-01, and ANR-15-IDEX-02 NeuroCoG in the framework of the Investissement d’Avenir).

## ACKNOWLEDGMENTS

MD laboratory is member of the Grenoble center of Excellence in Neurodegeneration.

## REFERENCES

- Aubourg, P. (2016). Gene therapy for rare central nervous system diseases comes to age. *Endocr. Dev.* 30, 141–146. doi: 10.1159/000439339
- Batista, A. R., King, O. D., Reardon, C. P., Davis, C., Shankaracharya, P. V., Gray-Edwards, H., et al. (2020). Ly6a differential expression in blood-brain barrier is responsible for strain specific central nervous system transduction profile of AAV-PHP.B. *Hum. Gene Ther.* 31, 90–102. doi: 10.1089/hum.2019.186
- Castle, M. J., Turunen, H. T., Vandenbergh, L. H., and Wolfe, J. H. (2016). Controlling AAV tropism in the nervous system with natural and engineered capsids. *Methods Mol. Biol.* 1382, 133–149. doi: 10.1007/978-1-4939-3271-9\_10
- Challis, R. C., Ravindra Kumar, S., Chan, K. Y., Challis, C., Beadle, K., Jang, M. J., et al. (2019). Systemic AAV vectors for widespread and targeted gene delivery in rodents. *Nat. Protoc.* 14, 379–414. doi: 10.1038/s41596-018-0097-3
- Chan, K. Y., Jang, M. J., Yoo, B. B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W. L., et al. (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* 20, 1172–1179. doi: 10.1038/nn.4593
- Deverman, B. E., Pravdo, P. L., Simpson, B. P., Kumar, S. R., Chan, K. Y., Banerjee, A., et al. (2016). Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat. Biotechnol.* 34, 204–209. doi: 10.1038/nbt.3440
- Di Meo, I., Marchet, S., Lamperti, C., Zeviani, M., and Viscomi, C. (2017). AAV9-based gene therapy partially ameliorates the clinical phenotype of a mouse model of Leigh syndrome. *Gene Ther.* 24, 661–667. doi: 10.1038/gt.2017.53
- Gao, Y., Irvine, E. E., Eleftheriadou, I., Naranjo, C. J., Hearn-Yeates, F., Bosch, L., et al. (2020). Gene replacement ameliorates deficits in mouse and human models of cyclin-dependent kinase-like 5 disorder. *Brain* 143, 811–832. doi: 10.1093/brain/awaa028
- Giannelli, S. G., Luoni, M., Castoldi, V., Massimino, L., Cabassi, T., Angeloni, D., et al. (2018). Cas9/sgRNA selective targeting of the P23H Rhodopsin mutant allele for treating retinitis pigmentosa by intravitreal AAV9-PHP.B-based delivery. *Hum. Mol. Genet.* 27, 761–779. doi: 10.1093/hmg/ddx438
- Gyorgy, B., Meijer, E. J., Ivanchenko, M. V., Tenneson, K., Emond, F., Hanlon, K. S., et al. (2019). Gene transfer with AAV9-PHP.B rescues hearing in a mouse model of usher syndrome 3A and transduces hair cells in a non-human primate. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 13, 1–13. doi: 10.1016/j.omtm.2018.11.003
- Hordeaux, J., Wang, Q., Katz, N., Buza, E. L., Bell, P., and Wilson, J. M. (2018). The neurotropic properties of AAV-PHP.B are limited to C57BL/6J mice. *Mol. Ther.* 26, 664–668. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.01.018

- Hordeaux, J., Yuan, Y., Clark, P. M., Wang, Q., Martino, R. A., Sims, J. J., et al. (2019). The GPI-linked protein LY6A drives AAV-PHP.B transport across the blood-brain barrier. *Mol. Ther.* 27, 912–921. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.02.013
- Huang, Q., Chan, K. Y., Tobey, I. G., Chan, Y. A., Poterba, T., Boutros, C. L., et al. (2019). Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids. *PLoS ONE* 14:e0225206. doi: 10.1371/journal.pone.0225206
- Jin, J., Guo, J., Cai, H., Zhao, C., Wang, H., Liu, Z., et al. (2020). M2-like microglia polarization attenuates neuropathic pain associated with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 76:1255–1265. doi: 10.3233/JAD-200099
- Lahey, H. G., Webber, C. J., Golebiowski, D., Izzo, C. M., Horn, E., Taghian, T., et al. (2020). Pronounced therapeutic benefit of a single bidirectional AAV vector administered systemically in sandhoff mice. *Mol. Ther.* 28:1–11. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.06.021
- Lee, C. E., Singleton, K. S., Wallin, M., and Faundez, V. (2020). Rare genetic diseases: nature's experiments on human development. *iScience* 23:101123. doi: 10.1016/j.isci.2020.101123
- Liguore, W. A., Domire, J. S., Button, D., Wang, Y., Dufour, B. D., Srinivasan, S., et al. (2019). AAV-PHP.B administration results in a differential pattern of CNS biodistribution in non-human primates compared with mice. *Mol. Ther.* 27, 2018–2037. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.07.017
- Lim, J. A., Yi, H., Gao, F., Raben, N., Kishnani, P. S., and Sun, B. (2019). Intravenous injection of an AAV-PHP.B vector encoding human acid alpha-glucosidase rescues both muscle and CNS defects in murine pompe disease. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 12, 233–245. doi: 10.1016/j.omtm.2019.01.006
- Luoni, M., Giannelli, S., Indrigo, M. T., Niro, A., Massimino, L., Iannielli, A., et al. (2020). Whole brain delivery of an instability-prone Mecp2 transgene improves behavioral and molecular pathological defects in mouse models of Rett syndrome. *Elife* 9:1–30. doi: 10.7554/eLife.52629
- Matsuzaki, Y., Konno, A., Mochizuki, R., Shinohara, Y., Nitta, K., Okada, Y., et al. (2018). Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain. *Neurosci. Lett.* 665, 182–188. doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.049
- Matsuzaki, Y., Tanaka, M., Hakoda, S., Masuda, T., Miyata, R., Konno, A., et al. (2019). Neurotropic properties of AAV-PHP.B are shared among diverse inbred strains of mice. *Mol. Ther.* 27, 700–704. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.02.016
- Morabito, G., Giannelli, S. G., Ordazzo, G., Bido, S., Castoldi, V., Indrigo, M., et al. (2017). AAV-PHP.B-mediated global-scale expression in the mouse nervous system enables GBA1 gene therapy for wide protection from synucleinopathy. *Mol. Ther.* 25, 2727–2742. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.004
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351–360. doi: 10.1038/nature15818
- Reynaud-Dulaurier, R., Benegiamo, G., Marrocco, E., Al-Tannir, R., Surace, E. M., Auwerx, J., et al. (2020). Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome. *Brain* 143, 1686–1696. doi: 10.1093/brain/awaa105
- Silva-Pinheiro, P., Cerutti, R., Luna-Sanchez, M., Zeviani, M., and Viscomi, C. (2020). A single intravenous injection of AAV-PHP.B-hNDUFS4 ameliorates the phenotype of Ndufs4 (-/-) mice. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 17, 1071–1078. doi: 10.1016/j.omtm.2020.04.026
- Yang, L., Slone, J., Li, Z., Lou, X., Hu, Y. C., Queme, L. F., et al. (2020). Systemic administration of AAV-Slc25a46 mitigates mitochondrial neuropathy in Slc25a46(-/-) mice. *Hum. Mol. Genet.* 29, 649–661. doi: 10.1093/hmg/ddz277

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Reynaud-Dulaurier and Decressac. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



---

## Références

---

- Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E., 2006: Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience.*, **7**, 41–53.
- Abbott, N. J.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J., 2010: Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease.*, **37**, 13–25.
- Abdulhag, U. N.; Soiferman, D.; Schueler-Furman, O.; Miller, C.; Shaag, A.; Elpeleg, O.; Edvardson, S.; Saada, A., 2015: Mitochondrial complex IV deficiency, caused by mutated COX6B1, is associated with encephalomyopathy, hydrocephalus and cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics.*, **23**, 159–164.
- Abounit, S.; Delage, E.; Zurzolo, C., 2015: Identification and characterization of tunneling nanotubes for intercellular trafficking. *Current Protocols in Cell Biology.*, **2015**, 12.10.1-12.10.21.
- Abraham, A.; Meng, Y.; Llinas, M.; Huang, Y.; Hamani, C.; Mainprize, T.; Aubert, I.; Heyn, C.; Black, S. E.; Hynynen, K.; Lipsman, N.; Zinman, L., 2019: First-in-human trial of blood–brain barrier opening in amyotrophic lateral sclerosis using MR-guided focused ultrasound. *Nature Communications.*, **10**, 1–9.
- Acland, G. M.; Aguirre, G. D.; Bennett, J.; Aleman, T. S.; Cideciyan, A. V.; Bennicelli, J.; Dejneka, N. S.; Pearce-Kelling, S. E.; Maguire, A. M.; Palczewski, K.; Hauswirth, W. W.; Jacobson, S. G., 2005: Long-Term Restoration of Rod and Cone Vision by Single Dose rAAV-Mediated Gene Transfer to the Retina in a Canine Model of Childhood Blindness. *Molecular Therapy.*, **12**, 1072–1082.
- Adashi, E. Y.; Rubenstein, D. S.; Mossman, J. A.; Schon, E. A.; Cohen, I. G., 2021: Mitochondrial disease: Replace or edit? *Science.*, **373**, 1200–1201.
- Agbandje-McKenna, M.; Kleinschmidt, J., 2011: AAV capsid structure and cell interactions. *Methods in Molecular Biology.*
- Agostino, A.; Invernizzi, F.; Tiveron, C.; Fagiolari, G.; Prella, A.; Lamantea, E.; Giavazzi, A.; Battaglia, G.; Tatangelo, L.; Tiranti, V.; Zeviani, M., 2003: Constitutive knockout of Surf1 is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome c oxidase deficiency in mice. *Human Molecular Genetics.*, **12**, 399–413.
- Aguti, S.; Malerba, A.; Zhou, H., 2018: The progress of AAV-mediated gene therapy in neuromuscular disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy.*, **18**, 681–693.
- Ahmed, N.; Gandhi, D.; Melhem, E. R.; Frenkel, V., 2021: MRI Guided Focused Ultrasound-Mediated Delivery of Therapeutic Cells to the Brain: A Review of the State-of-the-Art Methodology and Future Applications. *Frontiers in Neurology.*, **12**, 1–16.
- Al-Dosari, M. S.; Gao, X., 2009: Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent Progress. *AAPS Journal.*, **11**, 671–681.
- Al Amir Dache, Z.; Otandault, A.; Tanos, R.; Pastor, B.; Meddeb, R.; Sanchez, C.; Arena, G.; Lasorsa, L.; Bennett, A.; Grange, T.; El Messaoudi, S.; Mazard, T.; Prevostel, C.; Thierry, A. R., 2020: Blood contains circulating cell-free respiratory competent mitochondria. *FASEB Journal.*, **34**, 3616–3630.
- Al Khazal, F.; Holte, M. N.; Bolon, B.; White, T. A.; LeBrasseur, N.; Maher, L. J., 2019: A conditional mouse model of complex II deficiency manifesting as Leigh-like syndrome. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.*, **33**, 13189–13201.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., 2015: *Molecular Biology of the Cell.*

*Molecular Biology of the Cell*. 6th Editio. New York: Garland Science.

Alcázar-Fabra, M.; Navas, P.; Brea-Calvo, G., 2016: Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics.*, **1857**, 1073–1078.

Alelwani, W.; Elmorsy, E.; Kattan, S. W.; Babteen, N. A.; Alnajeebi, A. M.; Al-Ghafari, A.; Carter, W. G., 2020: Carbamazepine induces a bioenergetics disruption to microvascular endothelial cells from the blood-brain barrier. *Toxicology Letters.*, **333**, 184–191.

Alexander, I. E.; Cunningham, S. C.; Logan, G. J.; Christodoulou, J., 2008: Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease. *Gene Therapy.*, **15**, 831–839.

Alston, C. L.; Rocha, M. C.; Lax, N. Z.; Turnbull, D. M.; Taylor, R. W., 2017: The genetics and pathology of mitochondrial disease. *Journal of Pathology.*, **241**, 236–250.

Anderson, S. L.; Chung, W. K.; Frezzo, J.; Papp, J. C.; Ekstein, J.; DiMauro, S.; Rubin, B. Y., 2008: A novel mutation in NDUFS4 causes Leigh syndrome in an Ashkenazi Jewish family. *Journal of Inherited Metabolic Disease.*, **31**, 461–467.

Antonicka, H.; Mattman, A.; Carlson, C. G.; Glerum, D. M.; Hoffbuhr, K. C.; Leary, S. C.; Kennaway, N. G.; Shoubridge, E. A., 2003: Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Human Genetics.*, **72**, 101–114.

Atchison, R. W.; Casto, B. C.; Hammon, W. M. D., 1965: Adenovirus-associated defective virus particles. *Science.*, **149**, 754–756.

Azzouz, M.; Martin-Rendon, E.; Barber, R. D.; Mitrophanous, K. A.; Carter, E. E.; Rohll, J. B.; Kingsman, S. M.; Kingsman, A. J.; Mazarakis, N. D., 2002: Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model. *Journal of Neuroscience.*, **22**, 10302–10312.

Babenko, V. A.; Silachev, D. N.; Zorova, L. D.; Pevzner, I. B.; Khutorenko, A. A.; Plotnikov, E. Y.; Sukhikh, G. T.; Zorov, D. B., 2015: Improving the Post-Stroke Therapeutic Potency of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells by Cocultivation With Cortical Neurons: The Role of Crosstalk Between Cells. *STEM CELLS Translational Medicine.*, **4**, 1011–1020.

Babenko, V. A.; Silachev, D. N.; Popkov, V. A.; Zorova, L. D.; Pevzner, I. B.; Plotnikov, E. Y.; Sukhikh, G. T.; Zorov, D. B., 2018: Miro1 enhances mitochondria transfer from multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) to neural cells and improves the efficacy of cell recovery. *Molecules.*, **23**, 1–14.

Bacman, S. R.; Kauppila, J. H. K.; Pereira, C. V.; Nissanka, N.; Miranda, M.; Pinto, M.; Williams, S. L.; Larsson, N. göran; Stewart, J. B.; Moraes, C. T., 2018: MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA<sup>Aala</sup> levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nature Medicine.*, **24**, 1696–1700.

Baertling, F.; Rodenburg, R. J.; Schaper, J.; Smeitink, J. A.; Koopman, W. J. H.; Mayatepek, E.; Morava, E.; Distelmaier, F., 2014: A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.*, **85**, 257–265.

Bainbridge, J. W. B.; Smith, A. J.; Barker, S. S.; Robbie, S.; Henderson, R.; Balaggan, K.; Viswanathan, A.; Holder, G. E.; Stockman, A.; Tyler, N.; Petersen-Jones, S.; Bhattacharya, S. S.; Thrasher, A. J.; Fitzke, F. W.; Carter, B. J.; Rubin, G. S.; Moore, A. T.; Ali, R. R., 2008: Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis. *New England Journal of Medicine.*, **358**, 2231–2239.

Bainbridge, J. W. B.; Mehat, M. S.; Sundaram, V.; Robbie, S. J.; Barker, S. E.; Ripamonti, C.; Georgiadis, A.; Mowat, F. M.; Beattie, S. G.; Gardner, P. J.; Feathers, K. L.; Luong, V. A.; Yzer, S.; Balaggan, K.; Viswanathan, A.; de Ravel, T. J. L.; Casteels, I.; Holder, G. E.; Tyler, N. et al., 2015: Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis. *New England Journal of Medicine.*, **372**, 1887–1897.

- Bakare, A. B.; Lesnefsky, E. J.; Iyer, S., 2021: Leigh Syndrome: A Tale of Two Genomes. *Frontiers in Physiology.*, **12**, 1–26.
- Bakay, L.; Hueter, T. F.; Ballantine, H. T.; Sosa, D., 1956: Ultrasonically Produced Changes in the Blood-Brain Barrier. *Archives of Neurology And Psychiatry.*, **76**, 457–467.
- Baker, L. A.; Watt, I. N.; Runswick, M. J.; Walker, J. E.; Rubinstein, J. L., 2012: Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **109**, 11675–11680.
- Banerjee, S.; Gianino, S. M.; Gao, F.; Christians, U.; Gutmann, D. H., 2011: Interpreting mammalian target of rapamycin and cell growth inhibition in a genetically engineered mouse model of Nf1-deficient astrocytes. *Molecular Cancer Therapeutics.*, **10**, 279–291.
- Bannwarth, S.; Procaccio, V.; Lebre, A. S.; Jarde, C.; Chaussonot, A.; Hoarau, C.; Maoulida, H.; Charrier, N.; Gai, X.; Xie, H. M.; Ferre, M.; Fragaki, K.; Hardy, G.; de Camaret, B. M.; Marlin, S.; Dhaenens, C. M.; Slama, A.; Rocher, C.; Bonnefont, J. P. et al., 2013: Prevalence of rare mitochondrial DNA mutations in mitochondrial disorders. *Journal of Medical Genetics.*, **50**, 704–714.
- Barshad, G.; Marom, S.; Cohen, T.; Mishmar, D., 2018: Mitochondrial DNA Transcription and Its Regulation : An Evolutionary Perspective. *Trends in Genetics.*, 1–11.
- Bartanusz, V.; Jezova, D.; Alajajian, B.; Digicaylioglu, M., 2011: The blood-spinal cord barrier: Morphology and clinical implications. *Annals of Neurology.*, **70**, 194–206.
- Barzel, A.; Paulk, N. K.; Shi, Y.; Huang, Y.; Chu, K.; Zhang, F.; Valdmanis, P. N.; Spector, L. P.; Porteus, M. H.; Gaensler, K. M.; Kay, M. A., 2015: Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice. *Nature.*, **517**, 360–364.
- Batista, A. R.; King, O. D.; Reardon, C. P.; Davis, C.; Shankaracharya, F.; Philip, V.; Gray-Edwards, H.; Aronin, N.; Lutz, C.; Landers, J.; Sena-Estevés, M., 2019: Ly6a differential expression in BBB is responsible for strain specific CNS transduction profile of AAV-PHP.B. *Human gene therapy.*, 1–33.
- Benkhelifa-Ziyyat, S.; Besse, A.; Roda, M.; Duque, S.; Astord, S.; Carcenac, R.; Marais, T.; Barkats, M., 2013: Intramuscular scAAV9-SMN injection mediates widespread gene delivery to the spinal cord and decreases disease severity in SMA mice. *Molecular Therapy.*, **21**, 282–290.
- Bernacki, J.; Dobrowolska, A.; Nierwińska, K.; Małeckci, A., 2008: Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacological reports : PR.*, **60**, 600–622.
- Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Rowe, M. R.; Schneider, R.; McConnell, M. J., 2018: Mitochondrial transfer between cells: Methodological constraints in cell culture and animal models. *Analytical Biochemistry.*, **552**, 75–80.
- Berry, G. E.; Asokan, A., 2016: Cellular transduction mechanisms of adeno-associated viral vectors. *Current Opinion in Virology.*, **21**, 54–60.
- Biffi, A.; Montini, E.; Lorioli, L.; Cesani, M.; Fumagalli, F.; Plati, T.; Baldoli, C.; Martino, S.; Calabria, A.; Canale, S.; Benedicenti, F.; Vallanti, G.; Biasco, L.; Leo, S.; Kabbara, N.; Zanetti, G.; Rizzo, W. B.; Mehta, N. A. L.; Cicalese, M. P. et al., 2013: Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science.*, **341**.
- Blacklow, N. R.; Hoggan, M. D.; Rowe, W. P., 1967: Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **58**, 1410–1415.
- Blacklow, N. R.; Hoggan, M. D.; Rowe, W. P., 1968: Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *Journal of the National Cancer Institute.*, **40**, 319–327.
- Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.;



- Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F., 1995: T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science.*, **270**, 475–480.
- Blankinship, M. J.; Gregorevic, P.; Allen, J. M.; Harper, S. Q.; Harper, H.; Halbert, C. L.; Miller, A. D.; Chamberlain, J. S., 2004: Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Molecular Therapy.*, **10**, 671–678.
- Blessing, D.; Vachey, G.; Pythoud, C.; Rey, M.; Padrun, V.; Wurm, F. M.; Schneider, B. L.; Déglon, N., 2019: Scalable Production of AAV Vectors in Orbitally Shaken HEK293 Cells. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **13**, 14–26.
- Bogush, M.; Heldt, N. A.; Persidsky, Y., 2017: Blood Brain Barrier Injury in Diabetes: Unrecognized Effects on Brain and Cognition. *Journal of Neuroimmune Pharmacology.*, **12**, 593–601.
- Bolea, I.; Gella, A.; Sanz, E.; Prada-Dacasa, P.; Menardy, F.; Bard, A. M.; Machuca-Márquez, P.; Eraso-Pichot, A.; Mòdol-Caballero, G.; Navarro, X.; Kalume, F.; Quintana, A., 2019: Defined neuronal populations drive fatal phenotype in a mouse model of Leigh syndrome. *eLife.*, **8**, 1–26.
- Bonfante, E.; Koenig, M. K.; Adejumo, R. B.; Perinjelil, V.; Riascos, R. F., 2016: The neuroimaging of Leigh syndrome: case series and review of the literature. *Pediatric Radiology.*, **46**, 443–451.
- Bottani, E.; Lamperti, C.; Prigione, A.; Tiranti, V.; Persico, N.; Brunetti, D., 2020: Therapeutic approaches to treat mitochondrial diseases: “One-size-fits-all” and “precision medicine” strategies. *Pharmaceutics.*, **12**, 1–63.
- Bouard, D.; Alazard-Dany, N.; Cosset, F. L., 2009: Viral vectors: From virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology.*, **157**, 153–165.
- Bourgeron, T.; Rustin, P.; Chretien, D.; Birch-Machin, M.; Bourgeois, M.; Viegas-Péquignot, E.; Munnich, A.; Rötig, A., 1995: Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genetics.*, **11**, 144–149.
- Bulcha, J. T.; Wang, Y.; Ma, H.; Tai, P. W. L.; Gao, G., 2021: Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy.*, **6**.
- Calvo, S. E.; Clauser, K. R.; Mootha, V. K., 2016: MitoCarta2.0: An updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research.*, **44**, D1251–D1257.
- Challis, R. C.; Ravindra Kumar, S.; Chan, K. Y.; Challis, C.; Beadle, K.; Jang, M. J.; Kim, H. M.; Rajendran, P. S.; Tompkins, J. D.; Shivkumar, K.; Deverman, B. E.; Gradinaru, V., 2019: Systemic AAV vectors for widespread and targeted gene delivery in rodents. *Nature Protocols.*, **14**, 379–414.
- 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.; Gradinaru, V., 2017: Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nature Neuroscience.*, **20**, 1172–1179.
- Chandler, R.; LaFave, M.; Varshney, G.; Trivedi, N.; Carrillo-Carrasco, N.; Senac, J.; Wu, W.; Hoffmann, V.; Elkahoun, A.; Burgess, S.; Venditti, C., 2015: Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *Journal of Clinical Investigation.*, **125**, 870–880.
- Chang, X.; Wu, Y.; Zhou, J.; Meng, H.; Zhang, W.; Guo, J., 2020: A meta-analysis and systematic review of Leigh syndrome: clinical manifestations, respiratory chain enzyme complex deficiency, and gene mutations. *Medicine.*, **99**, e18634.
- Chen, H.; McCaffery, J. M.; Chan, D. C., 2007: Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell.*, **130**, 548–562.
- Chen, L.; Cui, Y.; Jiang, D.; Ma, C. Y.; Tse, H. F.; Hwu, W. L.; Lian, Q., 2018: Management of Leigh

- syndrome: Current status and new insights. *Clinical Genetics.*, **93**, 1131–1140.
- Chen, Y. H.; Chang, M.; Davidson, B. L., 2009: Molecular signatures of disease brain endothelia provide new sites for CNS-directed enzyme therapy. *Nature Medicine.*, **15**, 1215–1218.
- Chen, Z.; Li, G., 2021: Immune response and blood–brain barrier dysfunction during viral neuroinvasion. *Innate Immunity.*, **27**, 109–117.
- Cheung, Y. T.; Lau, W. K. W.; Yu, M. S.; Lai, C. S. W.; Yeung, S. C.; So, K. F.; Chang, R. C. C., 2009: Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology.*, **30**, 127–135.
- Chiu, W.; Hsun, Y. H.; Chang, K. J.; Yarmishyn, A. A.; Hsiao, Y. J.; Chien, Y.; Chien, C. S.; Ma, C.; Yang, Y. P.; Tsai, P. H.; Chiou, S. H.; Lin, T. Y.; Cheng, H. M., 2020: Current genetic survey and potential gene-targeting therapeutics for neuromuscular diseases. *International Journal of Molecular Sciences.*, **21**, 1–27.
- Chou, S. H. Y.; Lan, J.; Esposito, E.; Ning, M.; Balaj, L.; Ji, X.; Lo, E. H.; Hayakawa, K., 2017: Extracellular Mitochondria in Cerebrospinal Fluid and Neurological Recovery After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke.*, **48**, 2231–2237.
- Chouchani, E. T.; Methner, C.; Buonincontri, G.; Hu, C. H.; Logan, A.; Sawiak, S. J.; Murphy, M. P.; Krieg, T., 2014: Complex I deficiency due to selective loss of NDUFS4 in the mouse heart results in severe hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS ONE.*, **9**.
- 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.; Stoica, L.; DiFiglia, M.; Aronin, N.; Martin, D. R.; Gao, G.; Sena-Esteves, M., 2016: Widespread central nervous system gene transfer and silencing after systemic delivery of novel AAV-AS vector. *Molecular Therapy.*, **24**, 726–735.
- Chtarto, A.; Bender, H. U.; Hanemann, C. O.; Kemp, T.; Lehtonen, E.; Levivier, M.; Brotchi, J.; Velu, T.; Tenenbaum, L., 2003: Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector. *Gene Therapy.*, **10**, 84–94.
- Chuang, Y. C.; Liou, C. W.; Chen, S. Der; Wang, P. W.; Chuang, J. H.; Tiao, M. M.; Hsu, T. Y.; Lin, H. Y.; Lin, T. K., 2017: Mitochondrial Transfer from Wharton’s Jelly Mesenchymal Stem Cell to MERRF Cybrid Reduces Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Bioenergetics. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, **2017**.
- Civiletto, G.; Dogan, S. A.; Cerutti, R.; Fagiolari, G.; Moggio, M.; Lamperti, C.; Benincá, C.; Viscomi, C.; Zeviani, M., 2018: Rapamycin rescues mitochondrial myopathy via coordinated activation of autophagy and lysosomal biogenesis. *EMBO Molecular Medicine.*, **10**, 1–15.
- Colella, P.; Ronzitti, G.; Mingozzi, F., 2018: Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **8**, 87–104.
- Craven, L.; Alston, C. L.; Taylor, R. W.; Turnbull, D. M., 2017: Recent Advances in Mitochondrial Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics.*, **18**, 257–275.
- Crockett, A. M.; Ryan, S. K.; Vásquez, A. H.; Canning, C.; Kanyuch, N.; Kebir, H.; Ceja, G.; Gesualdi, J.; Zackai, E.; McDonald-McGinn, D.; Viaene, A.; Kapoor, R.; Benallegue, N.; Gur, R.; Anderson, S. A.; Alvarez, J. I., 2021: Disruption of the blood-brain barrier in 22q11.2 deletion syndrome. *Brain.*, **144**, 1351–1360.
- Cunningham, S. C.; Spinoulas, A.; Carpenter, K. H.; Wilcken, B.; Kuchel, P. W.; Alexander, I. E., 2009: AAV2/8-mediated correction of OTC deficiency is robust in adult but not neonatal Spfash mice. *Molecular Therapy.*, **17**, 1340–1346.
- D’Souza, A. R.; Minczuk, M., 2018: Mitochondrial transcription and translation: overview. (Garone, C. & M. Minczuk, Eds.) *Essays in Biochemistry.*, **62**, 309–320.

Da-Rè, C.; Von Stockum, S.; Biscontin, A.; Millino, C.; Cisotto, P.; Zordan, M. A.; Zeviani, M.; Bernardi, P.; De Pittà, C.; Costa, R., 2014: Leigh Syndrome in *Drosophila melanogaster* morphological and biochemical characterization of Surf1 post-transcriptional silencing. *Journal of Biological Chemistry.*, **289**, 29235–29246.

Danthinne, X.; Imperiale, M. J., 2000: Production of first generation adenovirus vectors: A review. *Gene Therapy.*, **7**, 1707–1714.

Davidoff, A. M.; Ng, C. Y. C.; Sleep, S.; Gray, J.; Azam, S.; Zhao, Y.; McIntosh, J. H.; Karimipoor, M.; Nathwani, A. C., 2004: Purification of recombinant adeno-associated virus type 8 vectors by ion exchange chromatography generates clinical grade vector stock. *Journal of Virological Methods.*, **121**, 209–215.

Davis, C. H. O.; Kim, K. Y.; Bushong, E. A.; Mills, E. A.; Boassa, D.; Shih, T.; Kinebuchi, M.; Phan, S.; Zhou, Y.; Bihlmeyer, N. A.; Nguyen, J. V.; Jin, Y.; Ellisman, M. H.; Marsh-Armstrong, N., 2014: Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **111**, 9633–9638.

De Almeida, L. P.; Zala, D.; Aebischer, P.; Déglon, N., 2001: Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease.*, **8**, 433–446.

De Haas, R.; Das, D.; Garanto, A.; Renkema, H. G.; Greupink, R.; Van Den Broek, P.; Pertijs, J.; Collin, R. W. J.; Willems, P.; Beyrath, J.; Heerschap, A.; Russel, F. G.; Smeitink, J. A., 2017: Therapeutic effects of the mitochondrial ROS-redox modulator KH176 in a mammalian model of Leigh Disease. *Scientific Reports.*, **7**, 1–11.

Deng, J.; Huang, Q.; Wang, F.; Liu, Y.; Wang, Z.; Wang, Z.; Zhang, Q.; Lei, B.; Cheng, Y., 2012: The role of caveolin-1 in blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound combined with microbubbles. *Journal of Molecular Neuroscience.*, **46**, 677–687.

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.; Gradinaru, V., 2016: Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nature Biotechnology.*, **34**, 204–209.

Di Giovanni, S.; Mirabella, M.; Spinazzola, A.; Crociani, P.; Silvestri, G.; Broccolini, A.; Tonali, P.; Di Mauro, S.; Servidei, S., 2001: Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology.*, **57**, 515–518.

Di Meo, I.; Auricchio, A.; Lamperti, C.; Burlina, A.; Viscomi, C.; Zeviani, M., 2012: Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO Molecular Medicine.*, **4**, 1008–1014.

Di Meo, I.; Marchet, S.; Lamperti, C.; Zeviani, M.; Viscomi, C., 2017: AAV9-based gene therapy partially ameliorates the clinical phenotype of a mouse model of Leigh syndrome. *Gene Therapy.*, **24**, 661–667.

Di Pardo, A.; Amico, E.; Scalabrì, F.; Pepe, G.; Castaldo, S.; Elifani, F.; Capocci, L.; De Sanctis, C.; Comerci, L.; Pompeo, F.; D'esposito, M.; Filosa, S.; Crispi, S.; Maglione, V., 2017: Impairment of blood-brain barrier is an early event in R6/2 mouse model of Huntington Disease. *Scientific Reports.*, **7**, 1–8.

Dieriks, B. V.; Park, T. I. h; Fourie, C.; Faull, R. L. M.; Dragunow, M.; Curtis, M. A., 2017:  $\alpha$ -synuclein transfer through tunneling nanotubes occurs in SH-SY5Y cells and primary brain pericytes from Parkinson's disease patients. *Scientific Reports.*, **7**, 1–11.

Dodart, J. C.; Marr, R. A.; Koistinaho, M.; Gregersen, B. M.; Malkani, S.; Verma, I. M.; Paul, S. M., 2005: Gene delivery of human apolipoprotein E alters brain A $\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **102**, 1211–1216.

Doll, D. N.; Hu, H.; Sun, J.; Lewis, S. E.; Simpkins, J. W.; Ren, X., 2015: Mitochondrial Crisis in Cerebrovascular Endothelial Cells Opens the Blood–Brain Barrier. *Stroke.*, **46**, 1681–1689.

- Donsante, A.; Miller, D. G.; Li, Y.; Vogler, C.; Brunt, E. M.; Russell, D. W.; Sands, M. S., 2007: AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science.*, **317**, 477.
- Duan, D., 2018: Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy.*, **26**, 2337–2356.
- Duarte Lobo, D.; Nobre, R. J.; Oliveira Miranda, C.; Pereira, D.; Castelhana, J.; Sereno, J.; Koeppen, A.; Castelo-Branco, M.; Pereira De Almeida, L., 2020: The blood-brain barrier is disrupted in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: Evidence from transgenic mice and human post-mortem samples. *Acta Neuropathologica Communications.*, **8**, 1–19.
- Dudek, J.; Rehling, P.; van der Laan, M., 2013: Mitochondrial protein import: Common principles and physiological networks. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.*, **1833**, 274–285.
- Dunn, K. W.; Kamocka, M. M.; McDonald, J. H., 2011: A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.*, **300**, 723–742.
- Duque, S.; Joussemet, B.; Riviere, C.; Marais, T.; Dubreil, L.; Douar, A. M.; Fyfe, J.; Moullier, P.; Colle, M. A.; Barkats, M., 2009: Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons. *Molecular Therapy.*, **17**, 1187–1196.
- Duque, S. I.; Arnold, W. D.; Odermatt, P.; Li, X.; Porensky, P. N.; Schmelzer, L.; Meyer, K.; Kolb, S. J.; Schümperli, D.; Kaspar, B. K.; Burghes, A. H. M., 2015: A large animal model of spinal muscular atrophy and correction of phenotype. *Annals of Neurology.*, **77**, 399–414.
- Egan, D. F.; Shackelford, D. B.; Mihaylova, M. M.; Gelino, S.; Kohnz, R. A.; Mair, W.; Vasquez, D. S.; Joshi, A.; Gwinn, D. M.; Taylor, R.; Asara, J. M.; Fitzpatrick, J.; Dillin, A.; Viollet, B.; Kundu, M.; Hansen, M.; Shaw, R. J., 2011: Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.*, **331**, 456–461.
- El-Hattab, A. W.; Adesina, A. M.; Jones, J.; Scaglia, F., 2015: MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **116**, 4–12.
- El-Hattab, A. W.; Zarante, A. M.; Almannai, M.; Scaglia, F., 2017: Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **122**, 1–9.
- Elias, W. J.; Lipsman, N.; Ondo, W. G.; Ghanouni, P.; Kim, Y. G.; Lee, W.; Schwartz, M.; Hynynen, K.; Lozano, A. M.; Shah, B. B.; Huss, D.; Dallapiazza, R. F.; Gwinn, R.; Witt, J.; Ro, S.; Eisenberg, H. M.; Fishman, P. S.; Gandhi, D.; Halpern, C. H. et al., 2016: A Randomized Trial of Focused Ultrasound Thalamotomy for Essential Tremor. *New England Journal of Medicine.*, **375**, 730–739.
- Farmer, B. C.; Walsh, A. E.; Kluemper, J. C.; Johnson, L. A., 2020: Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Neuroscience.*, **14**, 1–13.
- Fassone, E.; Taanman, J. W.; Hargreaves, I. P.; Sebire, N. J.; Cleary, M. A.; Burch, M.; Rahman, S., 2011: Mutations in the mitochondrial complex I assembly factor NDUFAF1 cause fatal infantile hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Medical Genetics.*, **48**, 691–697.
- Favaro, G.; Romanello, V.; Varanita, T.; Andrea Desbats, M.; Morbidoni, V.; Tezze, C.; Albiero, M.; Canato, M.; Gherardi, G.; De Stefani, D.; Mammucari, C.; Blaauw, B.; Boncompagni, S.; Protasi, F.; Reggiani, C.; Scorrano, L.; Salviati, L.; Sandri, M., 2019: DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. *Nature Communications.*, **10**.
- Felici, R.; Cavone, L.; Lapucci, A.; Guasti, D.; Bani, D.; Chiarugi, A., 2014: PARP Inhibition Delays Progression of Mitochondrial Encephalopathy in Mice. *Neurotherapeutics.*, **11**, 651–664.
- Felici, R.; Buonvicino, D.; Muzzi, M.; Cavone, L.; Guasti, D.; Lapucci, A.; Pratesi, S.; De Cesaris, F.; Luceri, F.; Chiarugi, A., 2017: Post onset, oral rapamycin treatment delays development of mitochondrial encephalopathy only at supramaximal doses. *Neuropharmacology.*, **117**, 74–84.

- Felix, M. solenne; Borloz, E.; Metwally, K.; Dauba, A.; Larrat, B.; Matagne, V.; Ehinger, Y.; Villard, L.; Novell, A.; Mensah, S.; Roux, J. christophe, 2021: Ultrasound-Mediated Blood-Brain Barrier Opening Improves Whole Brain Gene Delivery in Mice. *Pharmaceutics.*, **13**, 1245.
- Fernandez-Marcos, P. J.; Auwerx, J., 2011: Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition.*, **93**, 884–890.
- Fernández-Vizarra, E.; Zeviani, M., 2015: Nuclear gene mutations as the cause of mitochondrial complex III deficiency. *Frontiers in Genetics.*, **6**, 1–11.
- Ferrari, F. K.; Samulski, T.; Shenk, T.; Samulski, R. J., 1996: Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of virology.*, **70**, 3227–3234.
- Ferrari, M.; Jain, I. H.; Goldberger, O.; Rezoagli, E.; Thoonen, R.; Chen, K. H.; Sosnovik, D. E.; Scherrer-Crosbie, M.; Mootha, V. K.; Zapol, W. M., 2017: Hypoxia treatment reverses neurodegenerative disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **114**, E4241–E4250.
- Filareto, A.; Parker, S.; Darabi, R.; Borges, L.; Iacovino, M.; Schaaf, T.; Mayerhofer, T.; Chamberlain, J. S.; Ervasti, J. M.; McIvor, R. S.; Kyba, M.; Perlingeiro, R. C. R., 2013: An ex vivo gene therapy approach to treat muscular dystrophy using inducible pluripotent stem cells. *Nature Communications.*, **4**, 1549.
- Finsterer, J., 2008: Leigh and Leigh-Like Syndrome in Children and Adults. *Pediatric Neurology.*, **39**, 223–235.
- Flotte, T.; Carter, B.; Conrad, C.; Guggino, W.; Reynolds, T.; Rosenstein, B.; Taylor, G.; Walden, S.; Wetzel, R., 1996: A Phase I Study of an Adeno-Associated Virus-CFTR Gene Vector in Adult CF Patients with Mild Lung Disease. Johns Hopkins Children’s Center, Baltimore, Maryland. *Human Gene Therapy.*, **7**, 1145–1159.
- Flotte, T. R.; Afione, S. A.; Conrad, C.; McGrath, S. A.; Solow, R.; Oka, H.; Zeitlin, P. L.; Guggino, W. B.; Carter, B. J., 1993: Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **90**, 10613–10617.
- Folegatti, P. M.; Ewer, K. J.; Aley, P. K.; Angus, B.; Becker, S.; Belij-Rammerstorfer, S.; Bellamy, D.; Bibi, S.; Bittaye, M.; Clutterbuck, E. A.; Dold, C.; Faust, S. N.; Finn, A.; Flaxman, A. L.; Hallis, B.; Heath, P.; Jenkin, D.; Lazarus, R.; Makinson, R. et al., 2020: Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet.*, **396**, 467–478.
- Foriel, S.; Beyrath, J.; Eidhof, I.; Rodenburg, R. J.; Schenck, A.; Smeitink, J. A. M., 2018: Feeding difficulties, a key feature of the Drosophila NDUFS4 mitochondrial disease model. *DMM Disease Models and Mechanisms.*, **11**.
- Forsayeth, J. R.; Bankiewicz, K. S., 2011: AAV9: Over the fence and into the woods.. *Molecular Therapy.*, **19**, 1006–1007.
- Foust, K. D.; Nurre, E.; Montgomery, C. L.; Hernandez, A.; Chan, C. M.; Kaspar, B. K., 2009: Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature Biotechnology.*, **27**, 59–65.
- Foust, K. D.; Wang, X.; McGovern, V. L.; Braun, L.; Bevan, A. K.; Haidet, A. M.; Le, T. T.; Morales, P. R.; Rich, M. M.; Burghes, A. H. M.; Kaspar, B. K., 2010: Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nature Biotechnology.*, **28**, 271–274.
- Frazier, A. E.; Thorburn, D. R.; Compton, A. G., 2019: Mitochondrial energy generation disorders: Genes, mechanisms, and clues to pathology. *Journal of Biological Chemistry.*, **294**, 5386–5395.

- Fu, H.; Muenzer, J.; Samulski, R. J.; Breese, G.; Sifford, J.; Zeng, X.; McCarty, D. M., 2003: Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: Global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Molecular Therapy*, **8**, 911–917.
- Fullerton, M.; McFarland, R.; Taylor, R. W.; Alston, C. L.; Highly, N. H. S.; Services, S.; Disorders, M.; Infirmary, R. V.; Hospitals, T.; Foundation, N. H. S.; Road, Q. V., 2020: The genetic basis of isolated mitochondrial complex II deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 1–13.
- Gabriel, N.; Hareendran, S.; Sen, D.; Gadkari, R. A.; Sudha, G.; Selot, R.; Hussain, M.; Dhaknamoorthy, R.; Samuel, R.; Srinivasan, N.; Srivastava, A.; Jayandharan, G. R., 2013: Bioengineering of AAV2 capsid at specific serine, threonine, or lysine residues improves its transduction efficiency in vitro and in vivo. *Human Gene Therapy Methods*, **24**, 80–93.
- Galera, T.; Zurita, F.; González-Páramos, C.; Moreno-Izquierdo, A.; Fraga, M. F.; Fernández, A. F.; Garesse, R.; Gallardo, M. E., 2016: Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome. *Stem Cell Research*, **16**, 63–66.
- Gammage, P. A.; Viscomi, C.; Simard, M. L.; Costa, A. S. H.; Gaude, E.; Powell, C. A.; Van Haute, L.; McCann, B. J.; Rebelo-Guimar, P.; Cerutti, R.; Zhang, L.; Rebar, E. J.; Zeviani, M.; Frezza, C.; Stewart, J. B.; Minczuk, M., 2018: Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nature Medicine*, **24**, 1691–1695.
- Ganetzky, R. D.; Stendel, C.; McCormick, E. M.; Zolkipli-Cunningham, Z.; Goldstein, A. C.; Klopstock, T.; Falk, M. J., 2019: MT-ATP6 mitochondrial disease variants: Phenotypic and biochemical features analysis in 218 published cases and cohort of 14 new cases. *Human Mutation*, **40**, 499–515.
- Gao, G.; Vandenberghe, L. H.; Alvira, M. R.; Lu, Y.; Calcedo, R.; Zhou, X.; Wilson, J. M., 2004: Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *Journal of Virology*, **78**, 6381–6388.
- Gao, G. P.; Alvira, M. R.; Wang, L.; Calcedo, R.; Johnston, J.; Wilson, J. M., 2002: Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 11854–11859.
- Gao, J.; Qin, A.; Liu, D.; Ruan, R.; Wang, Q.; Yuan, J.; Cheng, T. S.; Filipovska, A.; Papadimitriou, J. M.; Dai, K.; Jiang, Q.; Gao, X.; Feng, J. Q.; Takayanagi, H.; Zhang, C.; Zheng, M. H., 2019: Endoplasmic reticulum mediates mitochondrial transfer within the osteocyte dendritic network. *Science Advances*, **5**, 1–12.
- Gardlík, R.; Pálffy, R.; Hodosy, J.; Lukács, J.; Turňa, J.; Celec, P., 2005: Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical Science Monitor*, **11**, 110–121.
- Ge, Y.; Shi, X.; Boopathy, S.; McDonald, J.; Smith, A. W.; Chao, L. H., 2020: Two forms of opa1 cooperate to complete fusion of the mitochondrial inner-membrane. *eLife*, **9**, 1–22.
- Gerards, M.; Sallevelt, S. C. E. H.; Smeets, H. J. M., 2015: Leigh syndrome : Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Molecular Genetics and Metabolism*.
- Gil-Farina, I.; Fronza, R.; Kaepfel, C.; Lopez-Franco, E.; Ferreira, V.; D’Avola, D.; Benito, A.; Prieto, J.; Petry, H.; Gonzalez-Aseguinolaza, G.; Schmidt, M., 2016: Recombinant AAV Integration Is Not Associated with Hepatic Genotoxicity in Nonhuman Primates and Patients. *Molecular Therapy*, **24**, 1100–1105.
- Gorman, G. S.; Schaefer, A. M.; Ng, Y.; Gomez, N.; Blakely, E. L.; Alston, C. L.; Feeney, C.; Horvath, R.; Yu-Wai-Man, P.; Chinnery, P. F.; Taylor, R. W.; Turnbull, D. M.; McFarland, R., 2015: Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Annals of Neurology*, **77**, 753–759.
- Gorziglia, M. I.; Lapcevich, C.; Roy, S.; Kang, Q.; Kadan, M.; Wu, V.; Pechan, P.; Kaleko, M., 1999: Generation of an Adenovirus Vector Lacking E1, E2a, E3, and All of E4 except Open Reading Frame 3. *Journal of Virology*, **73**, 6048–6055.

- Gowing, G.; Svendsen, S.; Svendsen, C. N., 2017: *Ex vivo gene therapy for the treatment of neurological disorders. Progress in Brain Research*. 1st edn. Elsevier B.V., Vol. 230.
- Grace, H. E.; Galdun, P.; Lesnefsky, E. J.; West, F. D.; Iyer, S., 2019: MRNA Reprogramming of T8993G Leigh's Syndrome Fibroblast Cells to Create Induced Pluripotent Stem Cell Models for Mitochondrial Disorders. *Stem Cells and Development*., **28**, 846–859.
- Granata, C.; Caruana, N. J.; Botella, J.; Jamnick, N. A.; Huynh, K.; Kuang, J.; Janssen, H. A.; Reljic, B.; Mellett, N. A.; Laskowski, A.; Stait, T. L.; Frazier, A. E.; Coughlan, M. T.; Meikle, P. J.; Thorburn, D. R.; Stroud, D. A.; Bishop, D. J., 2021: High-intensity training induces non-stoichiometric changes in the mitochondrial proteome of human skeletal muscle without reorganisation of respiratory chain content. *Nature Communications*., **12**.
- Grange, R. M. H.; Sharma, R.; Shah, H.; Reinstadler, B.; Goldberger, O.; Cooper, M. K.; Nakagawa, A.; Miyazaki, Y.; Hindle, A. G.; Batten, A. J.; Wojtkiewicz, G. R.; Schleifer, G.; Bagchi, A.; Marutani, E.; Malhotra, R.; Bloch, D. B.; Ichinose, F.; Mootha, V. K.; Zapol, W. M., 2021: Hypoxia ameliorates brain hyperoxia and NAD<sup>+</sup> deficiency in a murine model of Leigh syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*., **133**, 83–93.
- Gray, S. J.; Matagne, V.; Bachaboina, L.; Yadav, S.; Ojeda, S. R.; Samulski, R. J., 2011: Preclinical differences of intravascular aav9 delivery to neurons and glia: A comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Molecular Therapy*., **19**, 1058–1069.
- Gray, S. J.; Nagabhushan Kalburgi, S.; McCown, T. J.; Jude Samulski, R., 2013: Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene Therapy*., **20**, 450–459.
- Greenberg, B.; Butler, J.; Felker, G. M.; Ponikowski, P.; Voors, A. A.; Desai, A. S.; Barnard, D.; Bouchard, A.; Jaski, B.; Lyon, A. R.; Pogoda, J. M.; Rudy, J. J.; Zsebo, K. M., 2016: Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet*., **387**, 1178–1186.
- Greggio, C.; Jha, P.; Kulkarni, S. S.; Lagarrigue, S.; Broskey, N. T.; Boutant, M.; Wang, X.; Conde Alonso, S.; Ofori, E.; Auwerx, J.; Cantó, C.; Amati, F., 2017: Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*., **25**, 301–311.
- Grieger, J. C.; Soltys, S. M.; Samulski, R. J., 2016: Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and FLT1 clinical vector. *Molecular Therapy*., **24**, 287–297.
- Grimm, D.; Pandey, K.; Nakai, H.; Storm, T. A.; Kay, M. A., 2006: Liver Transduction with Recombinant Adeno-Associated Virus Is Primarily Restricted by Capsid Serotype Not Vector Genotype. *Journal of Virology*., **80**, 426–439.
- Guy, J.; Feuer, W. J.; Davis, J. L.; Porciatti, V.; Gonzalez, P. J.; Koilkonda, R. D.; Yuan, H.; Hauswirth, W. W.; Lam, B. L., 2017: Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy: Low- and Medium-Dose Visual Results. *Ophthalmology*., **124**, 1621–1634.
- Haack, T. B.; Klee, D.; Strom, T. M.; Mayatepek, E.; Meitinger, T.; Prokisch, H.; Distelmaier, F., 2014: Infantile Leigh-like syndrome caused by SLC19A3 mutations is a treatable disease. *Brain*., **137**, e295–e295.
- Haileselassie, B.; Joshi, A. U.; Minhas, P. S.; Mukherjee, R.; Andreasson, K. I.; Mochly-Rosen, D., 2020: Mitochondrial dysfunction mediated through dynamin-related protein 1 (Drp1) propagates impairment in blood brain barrier in septic encephalopathy. *Journal of Neuroinflammation*., **17**, 1–11.
- Hanlon, K. S.; Meltzer, J. C.; Buzhdygan, T.; Cheng, M. J.; Sena-Esteves, M.; Bennett, R. E.; Sullivan, T. P.; Razmpour, R.; Gong, Y.; Ng, C.; Nammour, J.; Maiz, D.; Dujardin, S.; Ramirez, S. H.; Hudry, E.; Maguire, C. A., 2019: Selection of an Efficient AAV Vector for Robust CNS Transgene Expression. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*., **15**, 320–332.

- Hasegawa, K.; Cowan, A. B.; Nakatsuji, N.; Suemori, H., 2007: Efficient Multicistronic Expression of a Transgene in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.*, **25**, 1707–1712.
- Hayakawa, K.; Esposito, E.; Wang, X.; Terasaki, Y.; Liu, Y.; Xing, C.; Ji, X.; Lo, E. H., 2016: Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature.*, **535**, 551–555.
- Hayashi, T.; Rizzuto, R.; Hajnoczky, G.; Su, T. P., 2009: MAM: more than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology.*, **19**, 81–88.
- Herdy, J.; Schafer, S.; Kim, Y.; Ansari, Z.; Zangwill, D.; Ku, M.; Paquola, A.; Lee, H.; Mertens, J.; Gage, F. H., 2019: Chemical modulation of transcriptionally enriched signaling pathways to optimize the conversion of fibroblasts into neurons. *eLife.*, **8**, 1–21.
- Hermonat, P. L.; Muzyczka, N., 1984: Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **81**, 6466–6470.
- Hinderer, C.; Bell, P.; Vite, C. H.; Louboutin, J. P.; Grant, R.; Bote, E.; Yu, H.; Pukenas, B.; Hurst, R.; Wilson, J. M., 2014: Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **1**, 14051.
- Hinderer, C.; Katz, N.; Louboutin, J. P.; Bell, P.; Yu, H.; Nayal, M.; Kozarsky, K.; O'Brien, W. T.; Goode, T.; Wilson, J. M., 2016: Delivery of an Adeno-associated virus vector into cerebrospinal fluid attenuates central nervous system disease in mucopolysaccharidosis type II mice. *Human Gene Therapy.*, **27**, 906–915.
- Hinderer, C.; Katz, N.; Buza, E. L.; Dyer, C.; Goode, T.; Bell, P.; Richman, L. K.; Wilson, J. M., 2018: Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Human Gene Therapy.*, **29**, 285–298.
- Hladky, S. B.; Barrand, M. A., 2016: *Fluid and ion transfer across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers; a comparative account of mechanisms and roles. Fluids and Barriers of the CNS.* BioMed Central, Vol. 13.
- Holt, I. J.; Harding, A. E.; Morgan-Hughes, J. A., 1988: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.*, **331**, 717–719.
- Hordeaux, J.; Wang, Q.; Katz, N.; Buza, E. L.; Bell, P.; Wilson, J. M., 2018: The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. *Molecular Therapy.*, **26**, 664–668.
- Hordeaux, J.; Yuan, Y.; Clark, P. M.; Wang, Q.; Martino, R. A.; Sims, J. J.; Bell, P.; Raymond, A.; Stanford, W. L.; Wilson, J. M., 2019: The GPI-Linked Protein LY6A Drives AAV-PHP.B Transport across the Blood-Brain Barrier. *Molecular Therapy.*, **27**, 912–921.
- Hsu, P. H.; Wei, K. C.; Huang, C. Y.; Wen, C. J.; Yen, T. C.; Liu, C. L.; Lin, Y. T.; Chen, J. C.; Shen, C. R.; Liu, H. L., 2013: Noninvasive and Targeted Gene Delivery into the Brain Using Microbubble-Facilitated Focused Ultrasound. *PLoS ONE.*, **8**, 1–8.
- Hu, S. yi; Zhuang, Q. qian; Qiu, Y.; Zhu, X. fen; Yan, Q. feng, 2019: Cell models and drug discovery for mitochondrial diseases. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B.*, **20**, 449–456.
- Huang, Q.; Deng, J.; Wang, F.; Chen, S.; Liu, Y.; Wang, Z.; Wang, Z.; Cheng, Y., 2012: Targeted gene delivery to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption. *Experimental Neurology.*, **233**, 350–356.
- Huang, Q.; Chan, K. Y.; Tobey, I. G.; Chan, Y. A.; Poterba, T.; Boutros, C. L.; Balazs, A. B.; Daneman, R.; Bloom, J. M.; Seed, C.; Deverman, B. E., 2019: Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids. *PLoS ONE.*, **14**, 1–17.



Hudry, E.; Vandenberghe, L. H., 2019: Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. *Neuron.*, **101**, 839–862.

Hynynen, K.; Freund, W. R.; Cline, H. E.; Chung, A. H.; Watkins, R. D.; Vetro, J. P.; Jolesz, F. A., 1996: A Clinical, Noninvasive, MR Imaging-monitored Ultrasound Surgery Method. *Radiographics.*, **16**, 185–195.

Hynynen, K.; Jolesz, F. A., 1998: Demonstration of potential noninvasive ultrasound brain therapy through an intact skull. *Ultrasound in Medicine and Biology.*, **24**, 275–283.

Hynynen, K.; McDannold, N.; Vykhodtseva, N.; Jolesz, F. A., 2001: Noninvasive MR Imaging-guided Focal Opening of the Blood-Brain Barrier in Rabbits. *Radiology.*, **220**, 640–646.

Igarashi, T.; Miyake, K.; Asakawa, N.; Miyake, N.; Shimada, T.; Takahashi, H., 2013: Direct comparison of administration routes for aav8-mediated ocular gene therapy. *Current Eye Research.*, **38**, 569–577.

Inagaki, K.; Fuess, S.; Storm, T. A.; Gibson, G. A.; Mctiernan, C. F.; Kay, M. A.; Nakai, H., 2006: Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular Therapy.*, **14**, 45–53.

Inak, G.; Rybak-Wolf, A.; Lisowski, P.; Pentimalli, T. M.; Jüttner, R.; Glažar, P.; Uppal, K.; Bottani, E.; Brunetti, D.; Secker, C.; Zink, A.; Meierhofer, D.; Henke, M. T.; Dey, M.; Ciptasari, U.; Mlody, B.; Hahn, T.; Berruezo-Llacuna, M.; Karaiskos, N. et al., 2021: Defective metabolic programming impairs early neuronal morphogenesis in neural cultures and an organoid model of Leigh syndrome. *Nature Communications.*, **12**.

Islam, M. N.; Das, S. R.; Emin, M. T.; Wei, M.; Sun, L.; Westphalen, K.; Rowlands, D. J.; Quadri, S. K.; Bhattacharya, S.; Bhattacharya, J., 2012: Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature Medicine.*, **18**, 759–765.

Jackson, D. A.; Symons, R. H.; Berg, P., 1972: Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **69**, 2904–2909.

Jackson, M. V.; Morrison, T. J.; Doherty, D. F.; McAuley, D. F.; Matthay, M. A.; Kissenpfennig, A.; O’Kane, C. M.; Krasnodembskaya, A. D., 2016: Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells.*, **34**, 2210–2223.

Jacobson, S. G.; Cideciyan, A. V.; Roman, A. J.; Sumaroka, A.; Schwartz, S. B.; Heon, E.; Hauswirth, W. W., 2015: Improvement and Decline in Vision with Gene Therapy in Childhood Blindness. *New England Journal of Medicine.*, **372**, 1920–1926.

Jaffe, H. A.; Danel, C.; Longenecker, G.; Metzger, M.; Setoguchi, Y.; Rosenfeld, M. A.; Gant, T. W.; Thorgeirsson, S. S.; Stratford-Perricaudet, L. D.; Perricaudet, M.; Pavirani, A.; Lecocq, J. P.; Crystal, R. G., 1992: Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nature Genetics.*, **1**, 372–378.

Jain, I. H.; Zazzeron, L.; Goli, R.; Alexa, K.; Schatzman-Bone, S.; Dhillon, H.; Goldberger, O.; Peng, J.; Shalem, O.; Sanjana, N. E.; Zhang, F.; Goessling, W.; Zapol, W. M.; Mootha, V. K., 2016: Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science.*, **352**, 54–61.

Jain, I. H.; Zazzeron, L.; Goldberger, O.; Marutani, E.; Wojtkiewicz, G. R.; Ast, T.; Wang, H.; Schleifer, G.; Stepanova, A.; Brepoels, K.; Schoonjans, L.; Carmeliet, P.; Galkin, A.; Ichinose, F.; Zapol, W. M.; Mootha, V. K., 2019a: Leigh Syndrome Mouse Model Can Be Rescued by Interventions that Normalize Brain Hyperoxia, but Not HIF Activation. *Cell Metabolism.*, **30**, 824-832.e3.

Jain, I. H.; Zazzeron, L.; Goldberger, O.; Marutani, E.; Wojtkiewicz, G. R.; Ast, T.; Wang, H.; Schleifer, G.; Stepanova, A.; Brepoels, K.; Schoonjans, L.; Carmeliet, P.; Galkin, A.; Ichinose, F.; Zapol, W. M.; Mootha, V. K., 2019b: Leigh Syndrome Mouse Model Can Be Rescued by Interventions that Normalize

Brain Hyperoxia, but Not HIF Activation. *Cell Metabolism.*, **30**, 824–832.e3.

Janssen, M. C. H.; Koene, S.; de Laat, P.; Hemelaar, P.; Pickkers, P.; Spaans, E.; Beukema, R.; Beyrath, J.; Groothuis, J.; Verhaak, C.; Smeitink, J., 2019: The KHENERGY Study: Safety and Efficacy of KH176 in Mitochondrial m.3243A>G Spectrum Disorders. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.*, **105**, 101–111.

Jiang, D.; Gao, F.; Zhang, Y.; Wong, D. S. H.; Li, Q.; Tse, H. F.; Xu, G.; Yu, Z.; Lian, Q., 2016: Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage. *Cell Death and Disease.*, **7**, e2467-10.

Jiang, D.; Xiong, G.; Feng, H.; Zhang, Z.; Chen, P.; Yan, B.; Chen, L.; Gandhervin, K.; Ma, C.; Li, C.; Han, S.; Zhang, Y.; Liao, C.; Lee, T. L.; Tse, H. F.; Fu, Q. L.; Chiu, K.; Lian, Q., 2019: Donation of mitochondria by iPSC-derived mesenchymal stem cells protects retinal ganglion cells against mitochondrial complex I defect-induced degeneration. *Theranostics.*, **9**, 2395–2410.

Jiang, H.; Couto, L. B.; Patarroyo-White, S.; Liu, T.; Nagy, D.; Vargas, J. A.; Zhou, S.; Scallan, C. D.; Sommer, J.; Vijay, S.; Mingozzi, F.; High, K. A.; Pierce, G. F., 2006: Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood.*, **108**, 3321–3328.

Jin, Z.; Wei, W.; Yang, M.; Du, Y.; Wan, Y., 2014: Mitochondrial Complex I Activity Suppresses Inflammation and Enhances Bone Resorption by Shifting Macrophage-Osteoclast Polarization. *Cell Metabolism.*, **20**, 483–498.

Johnson, S. C.; Yanos, M. E.; Kayser, E. B.; Quintana, A.; Sangesland, M.; Castanza, A.; Uhde, L.; Hui, J.; Wall, V. Z.; Gagnidze, A.; Oh, K.; Wasko, B. M.; Ramos, F. J.; Palmiter, R. D.; Rabinovitch, P. S.; Morgan, P. G.; Sedensky, M. M.; Kaeberlein, M., 2013: MTOR inhibition alleviates mitochondrial disease in a mouse model of Leigh syndrome. *Science.*, **342**, 1524–1528.

Johnson, S. C.; Yanos, M. E.; Bitto, A.; Castanza, A.; Gagnidze, A.; Gonzalez, B.; Gupta, K.; Hui, J.; Jarvie, C.; Johnson, B. M.; Letexier, N.; McCanta, L.; Sangesland, M.; Tamis, O.; Uhde, L.; Den Ende, A. Van; Rabinovitch, P. S.; Suh, Y.; Kaeberlein, M., 2015: Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. *Frontiers in Genetics.*, **6**, 1–8.

Johnson, S. C.; Kayser, E. B.; Bornstein, R.; Stokes, J.; Bitto, A.; Park, K. Y.; Pan, A.; Sun, G.; Raftery, D.; Kaeberlein, M.; Sedensky, M. M.; Morgan, P. G., 2020: Regional metabolic signatures in the NDUFS4(KO) mouse brain implicate defective glutamate/ $\alpha$ -ketoglutarate metabolism in mitochondrial disease. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **130**, 118–132.

Johnston, W.; Karpati, G.; Carpenter, S.; Arnold, D.; Shoubridge, E. A., 1995: Late-onset mitochondrial myopathy. *Annals of Neurology.*, **37**, 16–23.

Kadry, H.; Noorani, B.; Cucullo, L., 2020: A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS.*, **17**, 1–24.

Kahlhöfer, F.; Gansen, M.; Zickermann, V., 2021: Accessory subunits of the matrix arm of mitochondrial complex i with a focus on subunit NDUFS4 and its role in complex i function and assembly. *Life.*, **11**.

Kampjut, D.; Sazanov, L. A., 2020: The coupling mechanism of mammalian respiratory complex I. *Science.*, **370**, eabc4209.

Kaplitt, M. G.; Leone, P.; Samulski, R. J.; Xiao, X.; Pfaff, D. W.; O'Malley, K. L.; During, M. J., 1994: Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genetics.*, **8**, 148–154.

Karamanlidis, G.; Lee, C. F.; Garcia-Menendez, L.; Kolwicz, S. C.; Suthammarak, W.; Gong, G.; Sedensky, M. M.; Morgan, P. G.; Wang, W.; Tian, R., 2013: Mitochondrial complex i deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. *Cell Metabolism.*, **18**, 239–250.

Kawase, Y.; Ly, H. Q.; Prunier, F.; Lebeche, D.; Shi, Y.; Jin, H.; Hadri, L.; Yoneyama, R.; Hoshino, K.;

- Takewa, Y.; Sakata, S.; Peluso, R.; Zsebo, K.; Gwathmey, J. K.; Tardif, J. C.; Tanguay, J. F.; Hajjar, R. J., 2008: Reversal of Cardiac Dysfunction After Long-Term Expression of SERCA2a by Gene Transfer in a Pre-Clinical Model of Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology.*, **51**, 1112–1119.
- Kay, M. A.; Glorioso, J. C.; Naldini, L., 2001: Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine.*, **7**, 33–40.
- Kayser, E. B.; Sedensky, M. M.; Morgan, P. G., 2016: Region-specific defects of respiratory capacities in the NDUFS4(KO) mouse brain. *PLoS ONE.*, **11**, 1–18.
- Kent, A.; Spink, J., 2017: Will rising prices and budget constraints prevent patients from accessing novel gene therapies? *Gene Therapy.*, **24**, 542–543.
- Kim, G. H.; Kim, J. E.; Rhie, S. J.; Yoon, S., 2015: The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology.*, **24**, 325–340.
- Kirichok, Y.; Krapivinsky, G.; Clapham, D. E., 2004: The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.*, **427**, 360–364.
- Kirst, C.; Skriabine, S.; Vieites-Prado, A.; Topilko, T.; Bertin, P.; Gerschenfeld, G.; Verny, F.; Topilko, P.; Michalski, N.; Tessier-Lavigne, M.; Renier, N., 2020: Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature. *Cell.*, **180**, 780-795.e25.
- Komen, J. C.; Thorburn, D. R., 2014: Turn up the power - Pharmacological activation of mitochondrial biogenesis in mouse models. *British Journal of Pharmacology.*, **171**, 1818–1836.
- Kondratov, O.; Marsic, D.; Crosson, S. M.; Mendez-Gomez, H. R.; Moskalenko, O.; Mietzsch, M.; Heilbronn, R.; Allison, J. R.; Green, K. B.; Agbandje-McKenna, M.; Zolotukhin, S., 2017: Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells. *Molecular Therapy.*, **25**, 2661–2675.
- Körbelin, J.; Dogbevia, G.; Michelfelder, S.; Ridder, D. A.; Hunger, A.; Wenzel, J.; Seismann, H.; Lampe, M.; Bannach, J.; Pasparakis, M.; Kleinschmidt, J. A.; Schwaninger, M.; Trepel, M., 2016: A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Molecular Medicine.*, **8**, 609–625.
- Kota, J.; Handy, C. R.; Haidet, A. M.; Montgomery, C. L.; Eagle, A.; Rodino-Klapac, L. R.; Tucker, D.; Shilling, C. J.; Therlfall, W. R.; Walker, C. M.; Weisbrode, S. E.; Janssen, P. M. L.; Clark, K. R.; Sahenk, Z.; Mendell, J. R.; Kaspar, B. K., 2009: Follistatin Gene Delivery Enhances Muscle Growth and Strength in Nonhuman Primates. *Science Translational Medicine.*, **1**, 1–17.
- Koyanagi, M.; Brandes, R. P.; Haendeler, J.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S., 2005: Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: A novel mechanism for cell fate changes? *Circulation Research.*, **96**, 1039–1041.
- Kruse, S. E.; Watt, W. C.; Marcinek, D. J.; Kapur, R. P.; Schenkman, K. A.; Palmiter, R. D., 2008: Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency Develop a Fatal Encephalomyopathy. *Cell Metabolism.*, **7**, 312–320.
- Kumar, M.; Keller, B.; Makalou, N.; Sutton, R. E., 2001: Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Human Gene Therapy.*, **12**, 1893–1905.
- Kuzmin, D. A.; Shutova, M. V.; Johnston, N. R.; Smith, O. P.; Fedorin, V. V.; Kukushkin, Y. S.; van der Loo, J. C. M.; Johnstone, E. C., 2021: The clinical landscape for AAV gene therapies. *Nature reviews. Drug discovery.*, **20**, 173–174.
- Lahey, H. G.; Webber, C. J.; Golebiowski, D.; Izzo, C. M.; Horn, E.; Taghian, T.; Rodriguez, P.; Batista, A. R.; Ellis, L. E.; Hwang, M.; Martin, D. R.; Gray-Edwards, H.; Sena-Esteves, M., 2020: Pronounced Therapeutic Benefit of a Single Bidirectional AAV Vector Administered Systemically in Sandhoff Mice. *Molecular Therapy.*, **28**, 1–11.

- Laitinen, M.; Hartikainen, J.; Hiltunen, M. O.; Eränen, J.; Kiviniemi, M.; Närvänen, O.; Mäkinen, K.; Manninen, H.; Syväne, M.; Martin, J. F.; Laakso, M.; Ylä-Herttuala, S., 2000: Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Human Gene Therapy.*, **11**, 263–270.
- Lake, N. J.; Compton, A. G.; Rahman, S.; Thorburn, D. R., 2016: Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of Neurology.*, **79**, 190–203.
- Le Guiner, C.; Servais, L.; Montus, M.; Larcher, T.; Fraysse, B.; Moullec, S.; Allais, M.; François, V.; Dutilleul, M.; Malerba, A.; Koo, T.; Thibaut, J. L.; Matot, B.; Devaux, M.; Le Duff, J.; Deschamps, J. Y.; Barthelemy, I.; Blot, S.; Testault, I. et al., 2017: Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications.*, **8**.
- Le Meur, G.; Stieger, K.; Smith, A. J.; Weber, M.; Deschamps, J. Y.; Nivard, D.; Mendes-Madeira, A.; Provost, N.; Péréon, Y.; Cherel, Y.; Ali, R. R.; Hamel, C.; Moullier, P.; Rolling, F., 2007: Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Therapy.*, **14**, 292–303.
- Lebherz, C.; Maguire, A.; Tang, W.; Bennett, J.; Wilson, J. M., 2008: Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *The Journal of Gene Medicine.*, **10**, 375–382.
- Leborgne, C.; Barbon, E.; Alexander, J. M.; Hanby, H.; Delignat, S.; Cohen, D. M.; Collaud, F.; Muraleetharan, S.; Lupo, D.; Silverberg, J.; Huang, K.; van Wittengerghe, L.; Marolleau, B.; Miranda, A.; Fabiano, A.; Davenport, V.; Beck, H.; Anguela, X. M.; Ronzitti, G. et al., 2020: IgG-cleaving endopeptidase enables in vivo gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies. *Nature Medicine.*, **26**, 1096–1101.
- Lee, C. A. A.; Seo, H. S.; Armien, A. G.; Bates, F. S.; Tolar, J.; Azarin, S. M., 2018a: Modeling and rescue of defective blood-brain barrier function of induced brain microvascular endothelial cells from childhood cerebral adrenoleukodystrophy patients. *Fluids and Barriers of the CNS.*, **15**, 1–15.
- Lee, C. F.; Caudal, A.; Abell, L.; Nagana Gowda, G. A.; Tian, R., 2019: Targeting NAD + Metabolism as Interventions for Mitochondrial Disease. *Scientific Reports.*, **9**, 1–10.
- Lee, E. J.; Guenther, C. M.; Suh, J., 2018b: Adeno-associated virus (AAV) vectors: Rational design strategies for capsid engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering.*, **7**, 58–63.
- Leigh, D., 1951: Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.*, **14**, 216–221.
- Leshinsky-silver, E.; Lev, D.; Malinger, G.; Shapira, D.; Cohen, S.; Lerman-sagie, T.; Saada, A., 2010: Leigh disease presenting in utero due to a novel missense mutation in the mitochondrial DNA – ND3. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **100**, 65–70.
- Leshinsky-Silver, E.; Lebre, A. S.; Minai, L.; Saada, A.; Steffann, J.; Cohen, S.; Rötig, A.; Munnich, A.; Lev, D.; Lerman-Sagie, T., 2009: NDUFS4 mutations cause Leigh syndrome with predominant brainstem involvement. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **97**, 185–189.
- Li, C.; Samulski, R. J., 2020: Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics.*, **21**, 255–272.
- Li, C. J.; Chen, P. K.; Sun, L. Y.; Pang, C. Y., 2017: Enhancement of Mitochondrial Transfer by Antioxidants in Human Mesenchymal Stem Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, **2017**.
- Li, H.; Wang, C.; He, T.; Zhao, T.; Chen, Y. ying; Shen, Y. liang; Zhang, X.; Wang, L. lin, 2019: Mitochondrial transfer from bone marrow mesenchymal stem cells to motor neurons in spinal cord injury rats via gap junction. *Theranostics.*, **9**, 2017–2035.
- Lightowlers, R. N.; Taylor, R. W.; Turnbull, D. M., 2015: Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science.*, **349**, 1494–1499.

- Liguore, W. A.; Domire, J. S.; Button, D.; Wang, Y.; Dufour, B. D.; Srinivasan, S.; McBride, J. L., 2019: AAV-PHP.B Administration Results in a Differential Pattern of CNS Biodistribution in Non-human Primates Compared with Mice. *Molecular Therapy.*, **27**, 1–20.
- Lim, J. A.; Yi, H.; Gao, F.; Raben, N.; Kishnani, P. S.; Sun, B., 2019: Intravenous Injection of an AAV-PHP.B Vector Encoding Human Acid  $\alpha$ -Glucosidase Rescues Both Muscle and CNS Defects in Murine Pompe Disease. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **12**, 233–245.
- Lin, C. Y.; Hsieh, H. Y.; Pitt, W. G.; Huang, C. Y.; Tseng, I. C.; Yeh, C. K.; Wei, K. C.; Liu, H. L., 2015: Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening for non-viral, non-invasive, and targeted gene delivery. *Journal of Controlled Release.*, **212**, 1–9.
- Lipsman, N.; Meng, Y.; Bethune, A. J.; Huang, Y.; Lam, B.; Masellis, M.; Herrmann, N.; Heyn, C.; Aubert, I.; Boutet, A.; Smith, G. S.; Hynynen, K.; Black, S. E., 2018: Blood–brain barrier opening in Alzheimer’s disease using MR-guided focused ultrasound. *Nature Communications.*, **9**, 1–8.
- Liu, D.; Zhu, M.; Zhang, Y.; Diao, Y., 2021a: Crossing the blood-brain barrier with AAV vectors. *Metabolic Brain Disease.*, **36**, 45–52.
- Liu, D.; Gao, Y.; Liu, J.; Huang, Y.; Yin, J.; Feng, Y.; Shi, L.; Meloni, B. P.; Zhang, C.; Zheng, M.; Gao, J., 2021b: Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. *Signal Transduction and Targeted Therapy.*, **6**.
- Liu, K.; Ji, K.; Guo, L.; Wu, W.; Lu, H.; Shan, P.; Yan, C., 2014: Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvascular Research.*, **92**, 10–18.
- Liu, L.; Feng, D.; Chen, G.; Chen, M.; Zheng, Q.; Song, P.; Ma, Q.; Zhu, C.; Wang, R.; Qi, W.; Huang, L.; Xue, P.; Li, B.; Wang, X.; Jin, H.; Wang, J.; Yang, F.; Liu, P.; Zhu, Y. et al., 2012: Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biology.*, **14**, 177–185.
- Liu, L.; Zhang, K.; Sandoval, H.; Yamamoto, S.; Jaiswal, M.; Sanz, E.; Li, Z.; Hui, J.; Graham, B. H.; Quintana, A.; Bellen, H. J., 2015: Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell.*, **160**, 177–190.
- Liu, L.; MacKenzie, K. R.; Putluri, N.; Maletić-Savatić, M.; Bellen, H. J., 2017a: The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D. *Cell Metabolism.*, **26**, 719-737.e6.
- Liu, Z.; Chen, O.; Wall, J. B. J.; Zheng, M.; Zhou, Y.; Wang, L.; Ruth Vaseghi, H.; Qian, L.; Liu, J., 2017b: Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Scientific Reports.*, **7**, 1–9.
- López-Gallardo, E.; López-Pérez, M. J.; Montoya, J.; Ruiz-Pesini, E., 2009: CPEO and KSS differ in the percentage and location of the mtDNA deletion. *Mitochondrion.*, **9**, 314–317.
- Lorenz, C.; Lesimple, P.; Bukowiecki, R.; Zink, A.; Inak, G.; Mlody, B.; Singh, M.; Semtner, M.; Mah, N.; Auré, K.; Leong, M.; Zabiegalov, O.; Lyras, E. M.; Pfiffer, V.; Fauler, B.; Eichhorst, J.; Wiesner, B.; Huebner, N.; Priller, J. et al., 2017: Human iPSC-Derived Neural Progenitors Are an Effective Drug Discovery Model for Neurological mtDNA Disorders. *Cell Stem Cell.*, **20**, 659-674.e9.
- Losordo, D. W.; Vale, P. R.; Hendel, R. C.; Milliken, C. E.; Fortuin, F. D.; Cummings, N.; Schatz, R. A.; Asahara, T.; Isner, J. M.; Kuntz, R. E., 2002: Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation.*, **105**, 2012–2018.
- Lou, E.; Fujisawa, S.; Morozov, A.; Barlas, A.; Romin, Y.; Dogan, Y.; Gholami, S.; Moreira, A. L.; Manova-Todorova, K.; Moore, M. A. S., 2012: Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS ONE.*, **7**, 1–11.

- Luo, S.; Valencia, C. A.; Zhang, J.; Lee, N. C.; Slone, J.; Gui, B.; Wang, X.; Li, Z.; Dell, S.; Brown, J.; Chen, S. M.; Chien, Y. H.; Hwu, W. L.; Fan, P. C.; Wong, L. J.; Atwal, P. S.; Huang, T., 2018: Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **115**, 13039–13044.
- Lwoff, A., 1957: The concept of virus. *Journal of general microbiology.*, **17**, 239–253.
- Mackett, M.; Smith, G. L.; Moss, B., 1982: Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **79**, 7415–7419.
- Maglioni, S.; Schiavi, A.; Melcher, M.; Brinkmann, V.; Luo, Z.; Laromaine, A.; Raimundo, N.; Meyer, J. N.; Distelmaier, F.; Ventura, N., 2020: Neuroigin-mediated neurodevelopmental defects are induced by mitochondrial dysfunction and prevented by lutein in *C. elegans*. *bioRxiv*.
- Maguire, A. M.; Simonelli, F.; Pierce, E. A.; Pugh, E. N.; Mingozzi, F.; Bennicelli, J.; Banfi, S.; Marshall, K. A.; Testa, F.; Surace, E. M.; Rossi, S.; Lyubarsky, A.; Arruda, V. R.; Konkle, B.; Stone, E.; Sun, J.; Jacobs, J.; Dell’Osso, L.; Hertle, R. et al., 2008: Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber’s Congenital Amaurosis. *New England Journal of Medicine.*, **358**, 2240–2248.
- Maguire, A. M.; High, K. A.; Auricchio, A.; Wright, J. F.; Pierce, E. A.; Testa, F.; Mingozzi, F.; Bennicelli, J. L.; Ying, G. shuang; Rossi, S.; Fulton, A.; Marshall, K. A.; Banfi, S.; Chung, D. C.; Morgan, J. I.; Hauck, B.; Zelenaiia, O.; Zhu, X.; Raffini, L. et al., 2009: Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber’s congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet.*, **374**, 1597–1605.
- Mainprize, T.; Lipsman, N.; Huang, Y.; Meng, Y.; Bethune, A.; Ironside, S.; Heyn, C.; Alkins, R.; Trudeau, M.; Sahgal, A.; Perry, J.; Hynynen, K., 2019: Blood-Brain Barrier Opening in Primary Brain Tumors with Non-invasive MR-Guided Focused Ultrasound: A Clinical Safety and Feasibility Study. *Scientific Reports.*, **9**, 1–7.
- Man, P. Y. W.; Turnbull, D. M.; Chinnery, P. F., 2002: Leber hereditary optic neuropathy. *Journal of Medical Genetics.*, **39**, 162–169.
- Mandal, A.; Wong, H. T. C.; Pinter, K.; Mosqueda, N.; Beirl, A.; Lomash, R. M.; Won, S.; Kindt, K. S.; Drerup, C. M., 2020: Retrograde mitochondrial transport is essential for organelle distribution and health in zebrafish neurons. *The Journal of Neuroscience.*, JN-RM-1316-20.
- Manno, C. S.; Arruda, V. R.; Pierce, G. F.; Glader, B.; Ragni, M.; Rasko, J.; Ozelo, M. C.; Hoots, K.; Blatt, P.; Konkle, B.; Dake, M.; Kaye, R.; Razavi, M.; Zajko, A.; Zehnder, J.; Nakai, H.; Chew, A.; Leonard, D.; Wright, J. F. et al., 2006: Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Medicine.*, **12**, 342–347.
- Margulis, L., 1967: On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology.*, **14**, 255–274.
- Martin-Perez, M.; Grillo, A. S.; Ito, T. K.; Valente, A. S.; Han, J.; Entwisle, S. W.; Huang, H. Z.; Kim, D.; Yajima, M.; Kaerberlein, M.; Villén, J., 2020: PKC downregulation upon rapamycin treatment attenuates mitochondrial disease. *Nature Metabolism.*, **2**, 1472–1481.
- Martinelli, D.; Catteruccia, M.; Piemonte, F.; Pastore, A.; Tozzi, G.; Dionisi-Vici, C.; Pontrelli, G.; Corsetti, T.; Livadiotti, S.; Kheifets, V.; Hinman, A.; Shrader, W. D.; Thoolen, M.; Klein, M. B.; Bertini, E.; Miller, G., 2012: EPI-743 reverses the progression of the pediatric mitochondrial disease-Genetically defined Leigh Syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **107**, 383–388.
- Mason, K. A.; Losos, J. B.; Singer, S. R.; Raven, P. H.; Johnson, G. B., 2011: *Biology* 9th Editio. McGraw-Hill.
- Mathiesen, S. N.; Lock, J. L.; Schoderboeck, L.; Abraham, W. C.; Hughes, S. M., 2020: CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **19**, 447–458.
- Matsushita, T.; Elliger, S.; Elliger, C.; Podsakoff, G.; Villarreal, L.; Kurtzman, G. J.; Iwaki, Y.; Colosi, P.,

- 1998: Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Therapy.*, **5**, 938–945.
- Matsuzaki, Y.; Konno, A.; Mochizuki, R.; Shinohara, Y.; Nitta, K.; Okada, Y.; Hirai, H., 2018: Intravenous administration of the adeno-associated virus-PHP.B capsid fails to upregulate transduction efficiency in the marmoset brain. *Neuroscience Letters.*, **665**, 182–188.
- Matsuzaki, Y.; Tanaka, M.; Hakoda, S.; Masuda, T.; Miyata, R.; Konno, A.; Hirai, H., 2019: Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Shared among Diverse Inbred Strains of Mice. *Molecular Therapy.*, **27**, 700–704.
- McCarty, D. M.; Fu, H.; Monahan, P. E.; Toulson, C. E.; Naik, P.; Samulski, R. J., 2003: Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Therapy.*, **10**, 2112–2118.
- McCarty, D. M.; Young, S. M.; Samulski, R. J., 2004: Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annual Review of Genetics.*, **38**, 819–845.
- McCarty, D. M.; DiRosario, J.; Gulaid, K.; Muenzer, J.; Fu, H., 2009: Mannitol-facilitated CNS entry of rAAV2 vector significantly delayed the neurological disease progression in MPS IIIB mice. *Gene Therapy.*, **16**, 1340–1352.
- McDannold, N.; Arvanitis, C. D.; Vykhodtseva, N.; Livingstone, M. S., 2012: Temporary Disruption of the Blood–Brain Barrier by Use of Ultrasound and Microbubbles: Safety and Efficacy Evaluation in Rhesus Macaques. *Cancer Research.*, **72**, 3652–3663.
- McElroy, G. S.; Reczek, C. R.; Reyfman, P. A.; Mithal, D. S.; Horbinski, C. M.; Chandel, N. S., 2020: NAD<sup>+</sup> Regeneration Rescues Lifespan, but Not Ataxia, in a Mouse Model of Brain Mitochondrial Complex I Dysfunction. *Cell Metabolism.*, **32**, 301–308.e6.
- Mead, B. P.; Mastorakos, P.; Suk, J. S.; Klivanov, A. L.; Hanes, J.; Price, R. J., 2016: Targeted gene transfer to the brain via the delivery of brain-penetrating DNA nanoparticles with focused ultrasound. *Journal of Controlled Release.*, **223**, 109–117.
- Meijering, B. D. M.; Juffermans, L. J. M.; Van Wamel, A.; Henning, R. H.; Zuhorn, I. S.; Emmer, M.; Versteilen, A. M. G.; Paulus, W. J.; Van Gilst, W. H.; Kooiman, K.; De Jong, N.; Musters, R. J. P.; Deelman, L. E.; Kamp, O., 2009: Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circulation Research.*, **104**, 679–687.
- Melcher, M.; Danhauser, K.; Seibt, A.; Degistirici, Ö.; Baertling, F.; Kondadi, A. K.; Reichert, A. S.; Koopman, W. J. H.; Willems, P. H. G. M.; Rodenburg, R. J.; Mayatepek, E.; Meisel, R.; Distelmaier, F., 2017: Modulation of oxidative phosphorylation and redox homeostasis in mitochondrial NDUF54 deficiency via mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy.*, **8**, 1–14.
- Meliani, A.; Boisgerault, F.; Hardet, R.; Marmier, S.; Collaud, F.; Ronzitti, G.; Leborgne, C.; Costa Verdera, H.; Simon Sola, M.; Charles, S.; Vignaud, A.; van Wittenberghe, L.; Manni, G.; Christophe, O.; Fallarino, F.; Roy, C.; Michaud, A.; Ilyinskii, P.; Kishimoto, T. K. et al., 2018: Antigen-selective modulation of AAV immunogenicity with tolerogenic rapamycin nanoparticles enables successful vector re-administration. *Nature Communications.*, **9**.
- Melov, S.; Schneider, J. A.; Day, B. J.; Hinerfeld, D.; Coskun, P.; Mirra, S. S.; Crapo, J. D.; Wallace, D. C., 1998: A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nature genetics.*, **18**, 159–163.
- 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.; Kissel, J. T.; Nagendran, S.; L'Italien, J.; Sproule, D. M.; Wells, C.; Cardenas, J. A.; Heitzer, M. D.; Kaspar, A.; Corcoran, S. et al., 2017: Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine.*, **377**, 1713–1722.
- Meng, Y.; Pople, C. B.; Suppiah, S.; Llinas, M.; Huang, Y.; Sahgal, A.; Perry, J.; Keith, J.; Davidson, B.;

- Hamani, C.; Amemiya, Y.; Seth, A.; Leong, H.; Heyn, C. C.; Aubert, I.; Hynynen, K.; Lipsman, N., 2021: MR-guided focused ultrasound liquid biopsy enriches circulating biomarkers in patients with brain tumors. *Neuro-Oncology.*, **23**, 1789–1797.
- Merkel, S. F.; Andrews, A. M.; Lutton, E. M.; Mu, D.; Hudry, E.; Hyman, B. T.; Maguire, C. A.; Ramirez, S. H., 2017: Trafficking of adeno-associated virus vectors across a model of the blood-brain barrier; a comparative study of transcytosis and transduction using primary human brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry.*, **140**, 216–230.
- Mietzsch, M.; Grasse, S.; Zurawski, C.; Weger, S.; Bennett, A.; Agbandje-Mckenna, M.; Muzyczka, N.; Zolotukhin, S.; Heilbronn, R., 2014: OneBac: Platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1-12 vectors for gene therapy. *Human Gene Therapy.*, **25**, 212–222.
- Mietzsch, M.; Hering, H.; Hammer, E. M.; Agbandje-Mckenna, M.; Zolotukhin, S.; Heilbronn, R., 2017: OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsulation of Foreign DNA. *Human Gene Therapy Methods.*, **28**, 15–22.
- Milenkovic, D.; Blaza, J. N.; Larsson, N. G.; Hirst, J., 2017: The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. *Cell Metabolism.*, **25**, 765–776.
- Mishra, P.; Chan, D. C., 2016: Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology.*, **212**, 379–387.
- Miyake, N.; Miyake, K.; Yamamoto, M.; Hirai, Y.; Shimada, T., 2011: Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. *Brain Research.*, **1389**, 19–26.
- Miyaue, N.; Yamanishi, Y.; Tada, S.; Ando, R.; Yabe, H., 2019: Repetitive brainstem lesions in mitochondrial DNA 11778G > A mutation of Leber hereditary optic neuropathy. *eNeurologicalSci.*, **14**, 74–76.
- Modlich, U.; Navarro, S.; Zychlinski, D.; Maetzig, T.; Knoess, S.; Brugman, M. H.; Schambach, A.; Charrier, S.; Galy, A.; Thrasher, A. J.; Bueren, J.; Baum, C., 2009: Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Molecular Therapy.*, **17**, 1919–1928.
- Moiani, A.; Paleari, Y.; Sartori, D.; Mezzadra, R.; Miccio, A.; Cattoglio, C.; Cocchiarella, F.; Lidonnici, M. R.; Ferrari, G.; Mavilio, F., 2012: Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. *Journal of Clinical Investigation.*, **122**, 1653–1666.
- Mok, B. Y.; de Moraes, M. H.; Zeng, J.; Bosch, D. E.; Kotrys, A. V.; Raguram, A.; Hsu, F.; Radey, M. C.; Peterson, S. B.; Mootha, V. K.; Mougous, J. D.; Liu, D. R., 2020: A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature.*, **583**, 631–637.
- Mokili, J. L.; Rohwer, F.; Dutilh, B. E., 2012: Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current Opinion in Virology.*, **2**, 63–77.
- Montanari, A.; Besagni, C.; De Luca, C.; Morea, V.; Oliva, R.; Tramontano, A.; Bolotin-Fukuhara, M.; Frontali, L.; Francisci, S., 2008: Yeast as a model of human mitochondrial tRNA base substitutions: Investigation of the molecular basis of respiratory defects. *Rna.*, **14**, 275–283.
- Monteilhet, V.; Veron, P.; Leborgne, C.; Benveniste, O., 2010: Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors and 9 in the Healthy Population : Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Human Gene Therapy.*, **712**, 704–712.
- Morin, C.; Mitchell, G.; Larochelle, J.; Lambert, M.; Ogier, H.; Robinson, B. H.; De Braekeleer, M., 1993: Clinical, metabolic, and genetic aspects of cytochrome C oxidase deficiency in Saguenay-Lac-Saint-Jean. *American journal of human genetics.*, **53**, 488–496.
- Müller, O. J.; Kaul, F.; Weitzman, M. D.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Kleinschmidt, J. A.; Trepel, M., 2003:



Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. *Nature Biotechnology.*, **21**, 1040–1046.

Murray, L. M. A.; Krasnodembskaya, A. D., 2019: Concise Review: Intercellular Communication Via Organelle Transfer in the Biology and Therapeutic Applications of Stem Cells. *Stem Cells.*

Muruve, D. A., 2004: The Innate Immune Response to Adenovirus Vectors. *Human Gene Therapy.*, **15**, 1157–1166.

Nakai, H.; Fuess, S.; Storm, T. A.; Muramatsu, S. ichi; Nara, Y.; Kay, M. A., 2005: Unrestricted Hepatocyte Transduction with Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vectors in Mice. *Journal of Virology.*, **79**, 214–224.

Naldini, L.; Blomer, U.; Gage, F. H.; Trono, D.; Verma, I. M., 1996a: Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **93**, 11382–11388.

Naldini, L.; Blömer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H.; Verma, I. M.; Trono, D., 1996b: In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.*, **272**, 263–267.

Naldini, L., 2011: Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nature Reviews Genetics.*, **12**, 301–315.

Nass, S. A.; Mattingly, M. A.; Woodcock, D. A.; Burnham, B. L.; Ardinger, J. A.; Osmond, S. E.; Frederick, A. M.; Scaria, A.; Cheng, S. H.; O’Riordan, C. R., 2018: Universal Method for the Purification of Recombinant AAV Vectors of Differing Serotypes. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **9**, 33–46.

Nathwani, A. C.; Gray, J. T.; Ng, C. Y. C.; Zhou, J.; Spence, Y.; Waddington, S. N.; Tuddenham, E. G. D.; Kembell-Cook, G.; McIntosh, J.; Boon-Spijker, M.; Mertens, K.; Davidoff, A. M., 2006: Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver. *Blood.*, **107**, 2653–2661.

Nathwani, A. C.; Tuddenham, E. G. D.; Rangarajan, S.; Rosales, C.; McIntosh, J.; Linch, D. C.; Chowdary, P.; Riddell, A.; Pie, A. J.; Harrington, C.; O’Beirne, J.; Smith, K.; Pasi, J.; Glader, B.; Rustagi, P.; Ng, C. Y. C.; Kay, M. A.; Zhou, J.; Spence, Y. et al., 2011: Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *New England Journal of Medicine.*, **365**, 2357–2365.

Nathwani, A. C.; Reiss, U. M.; Tuddenham, E. G. D.; Rosales, C.; Chowdary, P.; McIntosh, J.; Della Peruta, M.; Lheriteau, E.; Patel, N.; Raj, D.; Riddell, A.; Pie, J.; Rangarajan, S.; Bevan, D.; Recht, M.; Shen, Y. M.; Halka, K. G.; Basner-Tschakarjan, E.; Mingozzi, F. et al., 2014: Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *New England Journal of Medicine.*, **371**, 1994–2004.

Nayerossadat, N.; Ali, P.; Maedeh, T., 2012: Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research.*, **1**, 27.

Negrini, M.; Wang, G.; Heuer, A.; Björklund, T.; Davidsson, M., 2020: AAV Production Everywhere: A Simple, Fast, and Reliable Protocol for In-house AAV Vector Production Based on Chloroform Extraction. *Current Protocols in Neuroscience.*, **93**, 1–10.

Nesbitt, V.; Pitceathly, R. D. S.; Turnbull, D. M.; Taylor, R. W.; Sweeney, M. G.; Mudanohwo, E. E.; Rahman, S.; Hanna, M. G.; McFarland, R., 2013: The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: Clinical phenotypes associated with the m.3243A>G mutation - Implications for diagnosis and management. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry.*, **84**, 936–938.

Nicolson, S. C.; Samulski, R. J., 2014: Recombinant Adeno-Associated Virus Utilizes Host Cell Nuclear Import Machinery To Enter the Nucleus. *Journal of Virology.*, **88**, 4132–4144.

Niemeyer, G. P.; Herzog, R. W.; Mount, J.; Arruda, V. R.; Tillson, D. M.; Hathcock, J.; Van Ginkel, F. W.; High, K. A.; Lothrop, C. D., 2009: Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood.*, **113**, 797–806.

Nissanka, N.; Moraes, C. T., 2020: Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. *EMBO reports.*, **21**, 1–12.

Nitzan, K.; Benhamron, S.; Valitsky, M.; Kesner, E. E.; Lichtenstein, M.; Ben-Zvi, A.; Ella, E.; Segalstein, Y.; Saada, A.; Lorberboum-Galski, H.; Rosenmann, H., 2019: Mitochondrial Transfer Ameliorates Cognitive Deficits, Neuronal Loss, and Gliosis in Alzheimer's Disease Mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.*, **72**, 587–604.

Nonnenmacher, M.; Wang, W.; Child, M. A.; Ren, X. Q.; Huang, C.; Ren, A. Z.; Tocci, J.; Chen, Q.; Bittner, K.; Tyson, K.; Pande, N.; Chung, C. H. Y.; Paul, S. M.; Hou, J., 2021: Rapid evolution of blood-brain-barrier-penetrating AAV capsids by RNA-driven biopanning. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **20**, 366–378.

Nonnenmacher, M., 2021: RNA-driven Evolution of AAV Capsid Libraries Identifies Variants with High Transduction Efficiency in Non-Human Primate Central Nervous System.

Noroozian, Z.; Xhima, K.; Huang, Y.; Kaspar, B. K.; Kügler, S.; Hynynen, K.; Aubert, I., 2019: MRI-guided focused ultrasound for targeted delivery of rAAV to the brain. *Methods in Molecular Biology.*, Vol. 1950pp. 177–197.

Obermeier, B.; Daneman, R.; Ransohoff, R. M., 2013: Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine.*, **19**, 1584–1596.

Ortigoza-Escobar, J. D.; Serrano, M.; Molero, M.; Oyarzabal, A.; Rebollo, M.; Muchart, J.; Artuch, R.; Rodríguez-Pombo, P.; Pérez-Dueñas, B., 2014: Thiamine transporter-2 deficiency: Outcome and treatment monitoring. *Orphanet Journal of Rare Diseases.*, **9**, 1–10.

Ortigoza-Escobar, J. D.; Oyarzabal, A.; Montero, R.; Artuch, R.; Jou, C.; Jiménez, C.; Gort, L.; Briones, P.; Muchart, J.; López-Gallardo, E.; Emperador, S.; Pesini, E. R.; Montoya, J.; Pérez, B.; Rodríguez-Pombo, P.; Pérez-Dueñas, B., 2016: NDUFS4 related Leigh syndrome: A case report and review of the literature. *Mitochondrion.*, **28**, 73–78.

Palmieri, F.; Scarcia, P.; Monné, M., 2020: Diseases caused by mutations in mitochondrial carrier genes SLC25: A review. *Biomolecules.*, **10**, 1–32.

Panicali, D.; Paoletti, E., 1982: Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **79**, 4927–4931.

Pardridge, W. M., 2020: Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience.*, **11**, 1–27.

Park, J. H.; Hayakawa, K., 2021: Extracellular Mitochondria Signals in CNS Disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.*, **9**, 1–9.

Parks, R. J.; Chen, L.; Anton, M.; Sankar, U.; Rudnicki, M. A.; Graham, F. L., 1996: A helper-dependent adenovirus vector system: Removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **93**, 13565–13570.

Parone, P. A.; Da Druz, S.; Tondera, D.; Mattenberger, Y.; James, D. I.; Maechler, P.; Barja, F.; Martinou, J. C., 2008: Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS ONE.*, **3**, 1–9.

Pasquier, J.; Guerrouahen, B. S.; Al Thawadi, H.; Ghiabi, P.; Maleki, M.; Abu-Kaoud, N.; Jacob, A.; Mirshahi, M.; Galas, L.; Rafii, S.; Le Foll, F.; Rafii, A., 2013: Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *Journal of*

Passini, M. A.; Bu, J.; Richards, A. M.; Treleaven, C. M.; Sullivan, J. A.; O’Riordan, C. R.; Scaria, A.; Kells, A. P.; Samaranch, L.; San Sebastian, W.; Federici, T.; Fiandaca, M. S.; Boullis, N. M.; Bankiewicz, K. S.; Shihabuddin, L. S.; Cheng, S. H., 2014: Translational Fidelity of Intrathecal Delivery of Self-Complementary AAV9–Survival Motor Neuron 1 for Spinal Muscular Atrophy. *Human Gene Therapy.*, **25**, 619–630.

Peralta, S.; Pinto, M.; Arguello, T.; Garcia, S.; Diaz, F.; Moraes, C. T., 2020: Metformin delays neurological symptom onset in a mouse model of neuronal complex I deficiency. *JCI Insight.*, **5**.

Perdomini, M.; Belbellaa, B.; Monassier, L.; Reutenauer, L.; Messaddeq, N.; Cartier, N.; Crystal, R. G.; Aubourg, P.; Puccio, H., 2014: Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich’s ataxia. *Nature Medicine.*, **20**, 542–547.

Perry, E. A.; Bennett, C. F.; Luo, C.; Balsa, E.; Jedrychowski, M.; Malley, K. E. O.; Latorre-muro, P.; Ladley, R. P.; Reda, K.; Wright, P. M.; Gygi, S. P.; Myers, A. G.; Puigserver, P., 2021: Tetracyclines promote survival and fitness in mitochondrial disease models. *Nature Metabolism.*, **3**.

Pfeffer, G.; Sirrs, S.; Wad, N. K.; Mezei, M. M., 2011: Multisystem disorder in late-onset chronic progressive external ophthalmoplegia. *Canadian Journal of Neurological Sciences.*, **38**, 119–123.

Polyak, E.; Ostrovsky, J.; Peng, M.; Dingley, S. D.; Tsukikawa, M.; Kwon, Y. J.; McCormack, S. E.; Bennett, M.; Xiao, R.; Seiler, C.; Zhang, Z.; Falk, M. J., 2018: N-acetylcysteine and vitamin E rescue animal longevity and cellular oxidative stress in pre-clinical models of mitochondrial complex I disease. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **123**, 449–462.

Porteous, D. J.; Dorin, J. R.; McLachlan, G.; Davidson-Smith, H.; Davidson, H.; Stevenson, B. J.; Carothers, A. D.; Wallace, W. A. H.; Moralee, S.; Hoenes, C.; Kallmeyer, G.; Michaelis, U.; Naujoks, K.; Ho, L. P.; Samways, J. M.; Imrie, M.; Greening, A. P.; Innes, J. A., 1997: Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Therapy.*, **4**, 210–218.

Quintana, A.; Kruse, S. E.; Kapur, R. P.; Sanz, E.; Palmiter, R. D., 2010: Complex I deficiency due to loss of NDUFS4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **107**, 10996–11001.

Quintana, A.; Zanella, S.; Koch, H.; Kruse, S. E.; Lee, D.; Ramirez, J. M.; Palmiter, R. D., 2012: Fatal breathing dysfunction in a mouse model of Leigh syndrome. *Journal of Clinical Investigation.*, **122**, 2359–2368.

Rahman, S.; Thorburn, D., 2015: Nuclear Gene-Encoded Leigh Syndrome Spectrum Overview. *GeneReviews® [Internet].*, 1–27.

Raper, S. E.; Chirmule, N.; Lee, F. S.; Wivel, N. A.; Bagg, A.; Gao, G. P.; Wilson, J. M.; Batshaw, M. L., 2003: Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **80**, 148–158.

Rapoport, S. I.; Hori, M.; Klatzo, I., 1972: Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier. *The American journal of physiology.*, **223**, 323–331.

Rapoport, S. I., 2000: Osmotic opening of the blood-brain barrier: Principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Neurobiology.*, **20**, 217–230.

Rauschhuber, C.; Noske, N.; Ehrhardt, A., 2012: New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. *European Journal of Cell Biology.*, **91**, 2–9.

Reddy, P.; Ocampo, A.; Suzuki, K.; Luo, J.; Bacman, S. R.; Williams, S. L.; Sugawara, A.; Okamura, D.; Tsunekawa, Y.; Wu, J.; Lam, D.; Xiong, X.; Montserrat, N.; Esteban, C. R.; Liu, G. H.; Sancho-Martinez, I.; Manau, D.; Civico, S.; Cardellach, F. et al., 2015: Selective elimination of mitochondrial mutations in

the germline by genome editing. *Cell.*, **161**, 459–469.

Reynaud-Dulaurier, R.; Benegiamo, G.; Marrocco, E.; Al-Tannir, R.; Surace, E. M.; Auwerx, J.; Decressac, M., 2020: Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome. *Brain.*, **143**, 1686–1696.

Ricobaraza, A.; Gonzalez-Aparicio, M.; Mora-Jimenez, L.; Lumbreras, S.; Hernandez-Alcoceba, R., 2020: High-capacity adenoviral vectors: Expanding the scope of gene therapy. *International Journal of Molecular Sciences.*, **21**.

Rizzuto, R.; De Stefani, D.; Raffaello, A.; Mammucari, C., 2012: Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, **13**, 566–578.

Robert Cronin, Nicholas Dias, Yung Peng, R. K., 2017: In vivo tissue-topism of adeno-associated viral vectors. *Current Opinion in Virology.*, **176**, 139–148.

Roger, A. J.; Muñoz-Gómez, S. A.; Kamikawa, R., 2017: The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology.*, **27**, R1177–R1192.

Rosenberg, S. A.; Aebersold, P.; Cornetta, K.; Kasid, A.; Morgan, R. A.; Moen, R.; Karson, E. M.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Topalian, S. L.; Merino, M. J.; Culver, K.; Miller, A. D.; Blaese, R. M.; Anderson, W. F., 1990: Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *New England Journal of Medicine.*, **323**, 570–578.

Rosenfeld, M. A.; Siegfried, W.; Yoshimura, K.; Yoneyama, K.; Fukayama, M.; Stier, L. E.; Pääkkö, P. K.; Gilardi, P.; Stratford-Perricaudet, L. D.; Perricaudet, M.; Jallat, S.; Pavirani, A.; Lecocq, J. P.; Crystal, R. G., 1991: Adenovirus-mediated transfer of a recombinant  $\alpha$ 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science.*, **252**, 431–434.

Rostami, J.; Holmqvist, S.; Lindström, V.; Sigvardson, J.; Westermark, G. T.; Ingelsson, M.; Bergström, J.; Roybon, L.; Erlandsson, A., 2017: Human astrocytes transfer aggregated alpha-synuclein via tunneling nanotubes. *Journal of Neuroscience.*, **37**, 11835–11853.

Rötig, A.; Appelkvist, E. L.; Geromel, V.; Chretien, D.; Kadhom, N.; Edery, P.; Lebideau, M.; Dallner, G.; Munnich, A.; Ernster, L.; Rustin, P., 2000: Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet.*, **356**, 391–395.

Ruhoy, I. S.; Saneto, R. P., 2014: The genetics of leigh syndrome and its implications for clinical practice and risk management. *Application of Clinical Genetics.*, **7**, 221–234.

Russell, O. M.; Gorman, G. S.; Lightowlers, R. N.; Turnbull, D. M., 2020: Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell.*

Rustom, A.; Saffrich, R.; Markovic, I.; Walther, P.; Gerdes, H. H., 2004: Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science.*, **303**, 1007–1010.

Rutledge, E. A.; Halbert, C. L.; Russell, D. W., 1998: Infectious Clones and Vectors Derived from Adeno-Associated Virus (AAV) Serotypes Other Than AAV Type 2. *Journal of Virology.*, **72**, 309–319.

Rutter, J.; Winge, D. R.; Schiffman, J. D., 2010: Mitochondrion Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease. *Mitochondrion.*, **10**, 393–401.

S. Hersh, D.; S. Wadajkar, A.; B. Roberts, N.; G. Perez, J.; P. Connolly, N.; Frenkel, V.; A. Winkles, J.; F. Woodworth, G.; J. Kim, A., 2016: Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier. *Current Pharmaceutical Design.*, **22**, 1177–1193.

Saada, A., 2011: The use of individual patient's fibroblasts in the search for personalized treatment of nuclear encoded OXPHOS diseases. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **104**, 39–47.

- Sage-Schwaede, A.; Engelstad, K.; Salazar, R.; Curcio, A.; Khandji, A.; Garvin, J. H.; De Vivo, D. C., 2019: Exploring mTOR inhibition as treatment for mitochondrial disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology.*, **6**, 1877–1881.
- Samulski, R. J.; Chang, L. S.; Shenk, T., 1989: Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *Journal of Virology.*, **63**, 3822–3828.
- Saneto, R. P.; Friedman, S. D.; Shaw, D. W. W., 2008: Neuroimaging of mitochondrial disease. *Mitochondrion.*, **8**, 396–413.
- Saraiva, J.; Nobre, R. J.; Pereira de Almeida, L., 2016: Gene therapy for the CNS using delivery by AAV9AAVs: The impact of systemic. *Journal of Controlled Release.*, **241**, 94–109.
- Sasarman, F.; Nishimura, T.; Antonicka, H.; Weraarpachai, W.; Shoubbridge, E. A.; Allen, B.; Burelle, Y.; Charron, G.; Coderre, L.; DesRosiers, C.; Laprise, C.; Morin, C.; Rioux, J.; Shoubbridge, E. A., 2015: Tissue-specific responses to the LRPPRC founder mutation in French Canadian Leigh Syndrome. *Human Molecular Genetics.*, **24**, 480–491.
- Saunders, N. R.; Dziegielewska, K. M.; Møllgård, K.; Habgood, M. D., 2015: Markers for blood-brain barrier integrity: How appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience.*, **9**, 1–16.
- Saunders, N. R.; Dziegielewska, K. M.; Unsicker, K.; Ek, C. J., 2016: Delayed astrocytic contact with cerebral blood vessels in FGF-2 deficient mice does not compromise permeability properties at the developing blood-brain barrier. *Developmental Neurobiology.*, **76**, 1201–1212.
- Schägger, H.; Pfeiffer, K., 2000: Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO Journal.*, **19**, 1777–1783.
- Schapira, A. H., 2006: Mitochondrial disease. *The Lancet.*, **368**, 70–82.
- Schwarz, J. M., 2015: Using fluorescence activated cell sorting to examine cell-type-specific gene expression in rat brain tissue. *Journal of Visualized Experiments.*, **2015**, 1–12.
- Schwarz, T. L., 2013: Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.*, **3**, 1–15.
- Seager, R.; Lee, L.; Henley, J. M.; Wilkinson, K. A., 2020: Mechanisms and roles of mitochondrial localisation and dynamics in neuronal function. *Neuronal Signaling.*, **4**, 1–28.
- Sébastien, M.; Aubin, P.; Brocard, J.; Brocard, J.; Marty, I.; Fauré, J., 2020: Dynamics of triadin, a muscle-specific triad protein, within sarcoplasmic reticulum subdomains. *Molecular Biology of the Cell.*, **31**, 261–272.
- Senatorov, V. V.; Friedman, A. R.; Milikovsky, D. Z.; Ofer, J.; Saar-Ashkenazy, R.; Charbush, A.; Jahan, N.; Chin, G.; Mihaly, E.; Lin, J. M.; Ramsay, H. J.; Moghbel, A.; Preininger, M. K.; Eddings, C. R.; Harrison, H. V.; Patel, R.; Shen, Y.; Ghanim, H.; Sheng, H. et al., 2019: Blood-brain barrier dysfunction in aging induces hyperactivation of TGF $\beta$  signaling and chronic yet reversible neural dysfunction. *Science Translational Medicine.*, **11**, eaaw8283.
- Sharma, L.; Lu, J.; Bai, Y., 2009: Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases. *Current Medicinal Chemistry.*, **16**, 1266–1277.
- Sheikov, N.; McDannold, N.; Vykhodtseva, N.; Jolesz, F.; Hynynen, K., 2004: Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound in Medicine and Biology.*, **30**, 979–989.
- Sheikov, N.; McDannold, N.; Sharma, S.; Hynynen, K., 2008: Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium.

*Ultrasound in medicine & biology.*, **34**, 1093–1104.

Sheng, Z. H.; Cai, Q., 2012: Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience.*, **13**, 77–93.

Shimotohno, K.; Temin, H. M., 1981: Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell.*, **26**, 67–77.

Shin, J.; Kong, C.; Cho, J. S.; Lee, J.; Koh, C. S.; Yoon, M. S.; Na, Y. C.; Chang, W. S.; Chang, J. W., 2018: Focused ultrasound-mediated noninvasive blood-brain barrier modulation: Preclinical examination of efficacy and safety in various sonication parameters. *Neurosurgical Focus.*, **44**, 1–10.

Silva-Pinheiro, P.; Cerutti, R.; Luna-Sanchez, M.; Zeviani, M.; Viscomi, C., 2020: A Single Intravenous Injection of AAV-PHP.B-hNDUFS4 Ameliorates the Phenotype of NDUFS4<sup>-/-</sup> Mice. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **17**, 1071–1078.

Simonelli, F.; Maguire, A. M.; Testa, F.; Pierce, E. A.; Mingozzi, F.; Benniselli, J. L.; Rossi, S.; Marshall, K.; Banfi, S.; Surace, E. M.; Sun, J.; Redmond, T. M.; Zhu, X.; Shindler, K. S.; Ying, G. shuang; Ziviello, C.; Acerra, C.; Wright, J. F.; McDonnell, J. W. et al., 2009: Gene Therapy for Leber ' s Congenital Amaurosis is Safe and Effective Through 1 . 5 Years After Vector Administration. *Molecular Therapy.*, **18**, 643–650.

Slone, J.; Huang, T., 2020: The special considerations of gene therapy for mitochondrial diseases. *npj Genomic Medicine.*, **5**.

Smirnova, E.; Griparic, L.; Shurland, D. L.; Van Der Blik, A. M., 2001: Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell.*, **12**, 2245–2256.

Smith, I. F.; Shuai, J.; Parker, I., 2011: Active generation and propagation of Ca<sup>2+</sup> signals within tunneling membrane nanotubes. *Biophysical Journal.*, **100**, L37–L39.

Sofou, K.; De Coo, I. F. M.; Isohanni, P.; Ostergaard, E.; Naess, K.; De Meirleir, L.; Tzoulis, C.; Uusimaa, J.; De Angst, I. B.; Lönnqvist, T.; Pihko, H.; Mankinen, K.; Bindoff, L. A.; Tulinius, M.; Darin, N., 2014: A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet journal of rare diseases.*, **9**, 52.

Song, K.; Li, Y.; Zhang, H.; An, N.; Wei, Y.; Wang, L.; Tian, C.; Yuan, M.; Sun, Y.; Xing, Y.; Gao, Y.; Santibañez, J. F., 2020: Oxidative Stress-Mediated Blood-Brain Barrier (BBB) Disruption in Neurological Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, **2020**.

Sousa, J. S.; D'Imprima, E.; Vonck, J., 2018: *Mitochondrial respiratory chain complexes*. *Subcellular Biochemistry.*, Vol. 87.

Spees, J. L.; Olson, S. D.; Whitney, M. J.; Prockop, D. J., 2006: Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **103**, 1283–1288.

Spiegel, R.; Saada, A.; Flannery, P. J.; Burté, F.; Soiferman, D.; Khayat, M.; Eisner, V.; Vladovski, E.; Taylor, R. W.; Bindoff, L. A.; Shaag, A.; Mandel, H.; Schuler-Furman, O.; Shalev, S. A.; Elpeleg, O.; Yu-Wai-Man, P., 2016: Fatal infantile mitochondrial encephalomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy and optic atrophy associated with a homozygous OPA1 mutation. *Journal of Medical Genetics.*, **53**, 127–131.

Spinazzi, M.; Radaelli, E.; Horr , K.; Arranz, A. M.; Gounko, N. V.; Agostinis, P.; Maia, T. M.; Impens, F.; Morais, V. A.; Lopez-Lluch, G.; Serneels, L.; Navas, P.; De Strooper, B., 2019: PARL deficiency in mouse causes Complex III defects, coenzyme Q depletion, and Leigh-like syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **116**, 277–286.

Stavarache, M. A.; Petersen, N.; Jurgens, E. M.; Milstein, E. R.; Rosenfeld, Z. B.; Ballon, D. J.; Kaplitt, M. G., 2019: Safe and stable noninvasive focal gene delivery to the mammalian brain following focused ultrasound. *Journal of Neurosurgery.*, **130**, 989–998.

- Steiner, J. L.; Murphy, E. A.; McClellan, J. L.; Carmichael, M. D.; Davis, J. M., 2011: Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *Journal of Applied Physiology.*, **111**, 1066–1071.
- Stenton, S. L.; Prokisch, H., 2020: Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine.*, **56**, 102784.
- Stewart, J. B.; Chinnery, P. F., 2020: Extreme heterogeneity of human mitochondrial DNA from organelles to populations. *Nature Reviews Genetics.*
- Summerford, C.; Samulski, R. J., 1998: Membrane-Associated Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Type 2 Virions. *Journal of Virology.*, **72**, 1438–1445.
- Suzuki-Hatano, S.; Saha, M.; Rizzo, S. A.; Witko, R. L.; Gosiker, B. J.; Ramanathan, M.; Soustek, M. S.; Jones, M. D.; Kang, P. B.; Byrne, B. J.; Cade, W. T.; Pacak, C. A., 2019: AAV-Mediated TAZ Gene Replacement Restores Mitochondrial and Cardioskeletal Function in Barth Syndrome. *Human Gene Therapy.*, **30**, 139–154.
- Sweeney, M. D.; Sagare, A. P.; Zlokovic, B. V., 2018: Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology.*, **14**, 133–150.
- Szymczak, A. L.; Workman, C. J.; Wang, Y.; Vignali, K. M.; Dilioglou, S.; Vanin, E. F.; Vignali, D. A. A., 2004: Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single ‘self-cleaving’ 2A peptide-based retroviral vector. *Nature Biotechnology.*, **22**, 589–594.
- Taguchi, N.; Ishihara, N.; Jofuku, A.; Oka, T.; Mihara, K., 2007: Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry.*, **282**, 11521–11529.
- Tan, A. S.; Baty, J. W.; Dong, L. F.; Bezawork-Geleta, A.; Endaya, B.; Goodwin, J.; Bajzikova, M.; Kovarova, J.; Peterka, M.; Yan, B.; Pesdar, E. A.; Sobol, M.; Filimonenko, A.; Stuart, S.; Vondrusova, M.; Kluckova, K.; Sachaphibulkij, K.; Rohlena, J.; Hozak, P. et al., 2015: Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metabolism.*, **21**, 81–94.
- Theunissen, T. E. J.; Nguyen, M.; Kamps, R.; Hendrickx, A. T.; Sallevelt, S. C. E. H.; Gottschalk, R. W. H.; Calis, C. M.; Stassen, A. P. M.; de Koning, B.; Mulder-Den Hartog, E. N. M.; Schoonderwoerd, K.; Fuchs, S. A.; Hilhorst-Hofstee, Y.; de Visser, M.; Vanoevelen, J.; Szklarczyk, R.; Gerards, M.; de Coo, I. F. M.; Hellebrekers, D. M. E. I. et al., 2018: Whole Exome Sequencing Is the Preferred Strategy to Identify the Genetic Defect in Patients With a Probable or Possible Mitochondrial Cause. *Frontiers in Genetics.*, **9**.
- Thévenot, E.; Jordão, J. F.; O’Reilly, M. A.; Markham, K.; Weng, Y. Q.; Foust, K. D.; Kaspar, B. K.; Hynynen, K.; Aubert, I., 2012: Targeted delivery of self-complementary adeno-associated virus serotype 9 to the brain, using magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound. *Human Gene Therapy.*, **23**, 1144–1155.
- Thomas, C. E.; Storm, T. A.; Huang, Z.; Kay, M. A., 2004: Rapid Uncoating of Vector Genomes Is the Key to Efficient Liver Transduction with Pseudotyped Adeno-Associated Virus Vectors. *Journal of Virology.*, **78**, 3110–3122.
- Thompson, A. A.; Walters, M. C.; Kwiatkowski, J.; Rasko, J. E. J.; Ribeil, J. A.; Hongeng, S.; Magrin, E.; Schiller, G. J.; Payen, E.; Semeraro, M.; Moshous, D.; Lefrere, F.; Puy, H.; Bourget, P.; Magnani, A.; Caccavelli, L.; Diana, J. S.; Suarez, F.; Monpoux, F. et al., 2018: Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. *New England Journal of Medicine.*, **378**, 1479–1493.
- Tilokani, L.; Nagashima, S.; Paupe, V.; Prudent, J., 2018: Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry.*
- Timbie, K. F.; Mead, B. P.; Price, R. J., 2015: Drug and gene delivery across the blood-brain barrier with focused ultrasound. *Journal of Controlled Release.*, **219**, 61–75.

- Towne, C.; Schneider, B. L.; Kieran, D.; Redmond, D. E.; Aebischer, P., 2010: Efficient transduction of non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV serotype 6. *Gene Therapy*, **17**, 141–146.
- Tsang, W. Y.; Lemire, B. D., 2003: The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, **1638**, 91–105.
- Twig, G.; Elorza, A.; Molina, A. J. A.; Mohamed, H.; Wikstrom, J. D.; Walzer, G.; Stiles, L.; Haigh, S. E.; Katz, S.; Las, G.; Alroy, J.; Wu, M.; Py, B. F.; Yuan, J.; Deeney, J. T.; Corkey, B. E.; Shirihai, O. S., 2008: Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO Journal*, **27**, 433–446.
- Ugalde, C.; Triepels, R. H.; Coenen, M. J. H.; Van Den Heuvel, L. P.; Smeets, R.; Uusimaa, J.; Briones, P.; Campistol, J.; Majamaa, K.; Smeitink, J. A. M.; Nijtmans, L. G. J., 2003: Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Annals of Neurology*, **54**, 665–669.
- Valori, C. F.; Ning, K.; Wyles, M.; Mead, R. J.; Grierson, A. J.; Shaw, P. J.; Azzouz, M., 2010: Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy. *Science Translational Medicine*, **2**, 1–9.
- Valsecchi, F.; Monge, C.; Forkink, M.; De Groof, A. J. C.; Benard, G.; Rossignol, R.; Swarts, H. G.; Van Emst-De Vries, S. E.; Rodenburg, R. J.; Calvaruso, M. A.; Nijtmans, L. G. J.; Heeman, B.; Roestenberg, P.; Wieringa, B.; Smeitink, J. A. M.; Koopman, W. J. H.; Willems, P. H. G. M., 2012: Metabolic consequences of NDUFS4 gene deletion in immortalized mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1817**, 1925–1936.
- Valsecchi, F.; Grefte, S.; Roestenberg, P.; Joosten-Wagenaars, J.; Smeitink, J. A. M.; Willems, P. H. G. M.; Koopman, W. J. H., 2013: Primary fibroblasts of NDUFS4<sup>-/-</sup> mice display increased ROS levels and aberrant mitochondrial morphology. *Mitochondrion*, **13**, 436–443.
- van de Wal, M.; Adjobo-Hermans, M.; Keijer, J.; Schirris, T.; Homberg, J.; Wieckowski, M. R.; Grefte, S.; van Schothorst, E. M.; van Karnebeek, C.; Quintana, A.; Koopman, W. J. H., 2021: NDUFS4 knockout mouse models of Leigh syndrome: pathophysiology and intervention. *Brain*, 1–51.
- van den Ameele, J.; Li, A. Y. Z.; Ma, H.; Chinnery, P. F., 2020: Mitochondrial heteroplasmy beyond the oocyte bottleneck. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **97**, 156–166.
- Van Maldergem, L.; Trijbels, F.; DiMauro, S.; Sindelar, P. J.; Musumeci, O.; Janssen, A.; Delberghe, X.; Martin, J. Jacques; Gillerot, Y., 2002: Coenzyme Q- responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Annals of Neurology*, **52**, 750–754.
- Vercauteren, K.; Hoffman, B. E.; Zolotukhin, I.; Keeler, G. D.; Xiao, J. W.; Basner-Tschakarjan, E.; High, K. A.; Ertl, H. C. J.; Rice, C. M.; Srivastava, A.; De Jong, Y. P.; Herzog, R. W., 2016: Superior in vivo Transduction of Human Hepatocytes Using Engineered AAV3 Capsid. *Molecular Therapy*, **24**, 1042–1049.
- Vignais, M. L.; Caicedo, A.; Brondello, J. M.; Jorgensen, C., 2017: Cell connections by tunneling nanotubes: Effects of mitochondrial trafficking on target cell metabolism, homeostasis, and response to therapy. *Stem Cells International*, **2017**.
- Viscomi, C.; Bottani, E.; Civiletto, G.; Cerutti, R.; Moggio, M.; Fagiolari, G.; Schon, E. A.; Lamperti, C.; Zeviani, M., 2011: In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 $\alpha$  axis. *Cell Metabolism*, **14**, 80–90.
- Vykhodtseva, N. I.; Hynynen, K.; Damianou, C., 1995: Histologic effects of high intensity pulsed ultrasound exposure with subharmonic emission in rabbit brain in vivo. *Ultrasound in Medicine and Biology*, **21**, 969–979.
- Wagner, J. A.; Reynolds, T.; Moran, M. L.; Moss, R. B.; Wine, J. J.; Flotte, T. R.; Gardner, P., 1998:



Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *The Lancet.*, **351**, 1702–1703.

Wagner, J. A.; Nepomuceno, I. B.; Messner, A. H.; Moran, M. L.; Batson, E. P.; Dimiceli, S.; Brown, B. W.; Desch, J. K.; Norbash, A. M.; Conrad, C. K.; Guggino, W. B.; Flotte, T. R.; Wine, J. J.; Carter, B. J.; Reynolds, T. C.; Moss, R. B.; Gardner, P., 2002: A Phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Human Gene Therapy.*, **13**, 1349–1359.

Wagner, M.; Berutti, R.; Lorenz-Depiereux, B.; Graf, E.; Eckstein, G.; Mayr, J. A.; Meitinger, T.; Ahting, U.; Prokisch, H.; Strom, T. M.; Wortmann, S. B., 2019: Mitochondrial DNA mutation analysis from exome sequencing—A more holistic approach in diagnostics of suspected mitochondrial disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease.*, **42**, 909–917.

Wainwright, L.; Hargreaves, I. P.; Georgian, A. R.; Turner, C.; Dalton, R. N.; Abbott, N. J.; Heales, S. J. R.; Preston, J. E., 2020: CoQ10 deficient endothelial cell culture model for the investigation of CoQ10 blood–brain barrier transport. *Journal of Clinical Medicine.*, **9**, 1–21.

Wallace, D.; Singh, G.; Lott, M.; Hodge, J.; Schurr, T.; Lezza, A.; Elsas, L.; Nikoskelainen, E., 1988: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber’s hereditary optic neuropathy. *Science.*, **242**, 1427–1430.

Wang, C.; Youle, R. J., 2009: The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics.*, **43**, 95–118.

Wang, C.; Mulagapati, S. H. R.; Chen, Z.; Du, J.; Zhao, X.; Xi, G.; Chen, L.; Linke, T.; Gao, C.; Schmelzer, A. E.; Liu, D., 2019a: Developing an Anion Exchange Chromatography Assay for Determining Empty and Full Capsid Contents in AAV6.2. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.*, **15**, 257–263.

Wang, D.; Tai, P. W. L.; Gao, G., 2019b: Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery.*

Wang, H. L.; Lai, T. W., 2014: Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples. *Scientific Reports.*, **4**, 1–7.

Wang, L.; Klingeborn, M.; Travis, A. M.; Hao, Y.; Arshavsky, V. Y.; Gospe, S. M., 2020a: Progressive optic atrophy in a retinal ganglion cell-specific mouse model of complex I deficiency. *Scientific Reports.*, **10**, 1–13.

Wang, X.; Yu, C.; Tzekov, R. T.; Zhu, Y.; Li, W., 2020b: The effect of human gene therapy for RPE65-associated Leber’s congenital amaurosis on visual function: A systematic review and meta-analysis. *Orphanet Journal of Rare Diseases.*, **15**, 1–9.

Wang, Y.; Cui, J.; Sun, X.; Zhang, Y., 2011: Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death and Differentiation.*, **18**, 732–742.

Wang, Z.; Zhu, T.; Qiao, C.; Zhou, L.; Wang, B.; Zhang, J.; Chen, C.; Li, J.; Xiao, X., 2005: Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature Biotechnology.*, **23**, 321–328.

Wang, Z.; Kuhr, C. S.; Allen, J. M.; Blankinship, M.; Gregorevic, P.; Chamberlain, J. S.; Tapscott, S. J.; Storb, R., 2007: Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Molecular Therapy.*, **15**, 1160–1166.

Wang, Z.; Lisowski, L.; Finegold, M. J.; Nakai, H.; Kay, M. A.; Grompe, M., 2012: AAV vectors containing rDNA homology display increased chromosomal integration and transgene persistence. *Molecular Therapy.*, **20**, 1902–1911.

Whelan, R.; Hargaden, G. C.; Knox, A. J. S., 2021: Modulating the Blood–Brain Barrier: A Comprehensive Review. *Pharmaceutics.*, **13**, 1980.

- Wick, M. J.; Harral, J. W.; Loomis, Z. L.; Dempsey, E. C., 2018: An optimized evans blue protocol to assess vascular leak in the mouse. *Journal of Visualized Experiments.*, **2018**, 1–9.
- Wolf, D. A.; Lenander, A. W.; Nan, Z.; Belur, L. R.; Whitley, C. B.; Gupta, P.; Low, W. C.; McIvor, R. S., 2011: Direct gene transfer to the CNS prevents emergence of neurologic disease in a murine model of mucopolysaccharidosis type I. *Neurobiology of Disease.*, **43**, 123–133.
- Wolf, D. A.; Hanson, L. R.; Aronovich, E. L.; Nan, Z.; Low, W. C.; Frey, W. H.; McIvor, R. S., 2012: Lysosomal enzyme can bypass the blood-brain barrier and reach the CNS following intranasal administration. *Molecular Genetics and Metabolism.*, **106**, 131–134.
- Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P. L., 1990: Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science.*, **247**, 1465–1468.
- Wong, L. jun C.; Naviaux, R. K.; Brunetti-Pierri, N.; Zhang, Q.; Schmitt, E. S.; Truong, C.; Milone, M.; Cohen, B. H.; Wical, B.; Ganesh, J.; Basinger, A. A.; Burton, B. K.; Swoboda, K.; Gilbert, D. L.; Vanderver, A.; Saneto, R. P.; Maranda, B.; Arnold, G.; Abdenur, J. E. et al., 2008: Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Human Mutation.*, **29**, E150–E172.
- Xiao, X.; Li, J.; Samulski, R. J., 1998: Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus. *Journal of Virology.*, **72**, 2224–2232.
- Yang, A. C.; Stevens, M. Y.; Chen, M. B.; Lee, D. P.; Stähli, D.; Gate, D.; Contrepolis, K.; Chen, W.; Iram, T.; Zhang, L.; Vest, R. T.; Chaney, A.; Lehallier, B.; Olsson, N.; du Bois, H.; Hsieh, R.; Cropper, H. C.; Berdnik, D.; Li, L. et al., 2020a: Physiological blood–brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis. *Nature.*, **583**, 425–430.
- Yang, B.; Li, S.; Wang, H.; Guo, Y.; Gessler, D. J.; Cao, C.; Su, Q.; Kramer, J.; Zhong, L.; Ahmed, S. S.; Zhang, H.; He, R.; Desrosiers, R. C.; Brown, R.; Xu, Z.; Gao, G., 2014: Global CNS transduction of adult mice by intravenously delivered rAAVrh.8 and rAAVrh.10 and nonhuman primates by rAAVrh.10. *Molecular Therapy.*, **22**, 1299–1309.
- Yang, L.; Slone, J.; Li, Z.; Lou, X.; Hu, Y. C.; Queme, L. F.; Jankowski, M. P.; Huang, T., 2020b: Systemic administration of AAV-Slc25a46 mitigates mitochondrial neuropathy in Slc25a46<sup>-/-</sup> mice. *Human Molecular Genetics.*, **29**, 649–661.
- Youle, R. J.; Narendra, D. P., 2011: Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, **12**, 9–14.
- Yu, A. K.; Song, L.; Murray, K. D.; Van Der List, D.; Sun, C.; Shen, Y.; Xia, Z.; Cortopassi, G. A., 2015: Mitochondrial complex I deficiency leads to inflammation and retinal ganglion cell death in the NDUFS4 mouse. *Human Molecular Genetics.*, **24**, 2848–2860.
- Yu, H.; Koilkonda, R. D.; Chou, T. H.; Porciatti, V.; Ozdemir, S. S.; Chiodo, V.; Boye, S. L.; Boye, S. E.; Hauswirth, W. W.; Lewin, A. S.; Guy, J., 2012: Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber’s hereditary optic neuropathy in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **109**.
- Yue, Y.; Pan, X.; Hakim, C. H.; Kodippili, K.; Zhang, K.; Shin, J. H.; Yang, H. T.; McDonald, T.; Duan, D., 2015: Safe and bodywide muscle transduction in young adult Duchenne muscular dystrophy dogs with adeno-associated virus. *Human Molecular Genetics.*, **24**, 5880–5890.
- Zabaleta, N.; Salas, D.; Paramo, M.; Hommel, M.; Sier-Ferreira, V.; Hernandez-Alcoceba, R.; Prieto, J.; Bilbao, J. I.; Gonzalez-Aseguinolaza, G., 2017: Improvement of Adeno-Associated Virus-Mediated Liver Transduction Efficacy by Regional Administration in Macaca fascicularis. *Human Gene Therapy Clinical Development.*, **28**, 68–73.
- Zabner, J.; Couture, L. A.; Gregory, R. J.; Graham, S. M.; Smith, A. E.; Welsh, M. J., 1993: Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell.*, **75**, 207–216.

Zhang, W. W.; Li, L.; Li, D.; Liu, J.; Li, X.; Li, W.; Xu, X.; Zhang, M. J.; Chandler, L. A.; Lin, H.; Hu, A.; Xu, W.; Lam, D. M. K., 2018: The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Human Gene Therapy.*, **29**, 160–179.

Zhang, Y.; Bokov, A.; Gelfond, J.; Soto, V.; Ikeno, Y.; Hubbard, G.; Diaz, V.; Sloane, L.; Maslin, K.; Treaster, S.; Réndon, S.; Van Remmen, H.; Ward, W.; Javors, M.; Richardson, A.; Austad, S. N.; Fischer, K., 2014: Rapamycin extends life and health in C57BL/6 mice. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences.*, **69 A**, 119–130.

Zhang, Y.; Yu, Z.; Jiang, D.; Liang, X.; Liao, S.; Zhang, Z.; Yue, W.; Li, X.; Chiu, S. M.; Chai, Y. H.; Liang, Y.; Chow, Y.; Han, S.; Xu, A.; Tse, H. F.; Lian, Q., 2016: iPSC-MSCs with High Intrinsic MIRO1 and Sensitivity to TNF- $\alpha$  Yield Efficacious Mitochondrial Transfer to Rescue Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. *Stem Cell Reports.*, **7**, 749–763.

Zhao, R. Z.; Jiang, S.; Zhang, L.; Yu, Z. Bin, 2019: Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine.*, **44**, 3–15.

Zhao, Y.; Moon, E.; Carpenito, C.; Paulos, C. M.; Liu, X.; Brennan, A. L.; Chew, A.; Carroll, R. G.; Scholler, J.; Levine, B. L.; Albelda, S. M.; June, C. H., 2010: Multiple Injections of Electroporated Autologous T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor Mediate Regression of Human Disseminated Tumor. *Cancer Research.*, **70**, 9053–9061.

Zheng, X.; Boyer, L.; Jin, M.; Kim, Y.; Fan, W.; Bardy, C.; Berggren, T.; Evans, R. M.; Gage, F. H.; Hunter, T., 2016: Alleviation of neuronal energy deficiency by mtor inhibition as a treatment for mitochondria-related neurodegeneration. *eLife.*, **5**, 1–23.

Zincarelli, C.; Soltys, S.; Rengo, G.; Rabinowitz, J. E., 2008: Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular Therapy.*, **16**, 1073–1080.

Zolotukhin, S.; Byrne, B. J.; Mason, E.; Zolotukhin, I.; Potter, M.; Chesnut, K.; Summerford, C.; Samulski, R. J.; Muzyczka, N., 1999: Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy.*, **6**, 973–985.

Zufferey, R.; Nagy, D.; Mandel, R. J.; Naldini, L.; Trono, D., 1997: Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature Biotechnology.*, **15**, 871–875.

Zufferey, R.; Dull, T.; Mandel, R. J.; Bukovsky, A.; Quiroz, D.; Naldini, L.; Trono, D., 1998: Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology.*, **72**, 9873–9880.



**Résumé :** Des mutations de l'ADN mitochondrial ou des gènes nucléaires impliqués dans le fonctionnement de chaîne respiratoire mitochondriale sont à l'origine des maladies mitochondriales. Le syndrome de Leigh (SL) est la maladie mitochondriale infantile la plus commune. Cette pathologie est principalement caractérisée par une atteinte cérébrale. Elle est fatale durant les premières années de vie et aucun traitement n'est actuellement disponible. Un des challenges de la thérapie génique pour cette pathologie concerne le transfert d'un gène dans le système nerveux central du fait de l'imperméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Notre hypothèse est que le développement de nouvelles stratégies permettant d'améliorer la transduction cérébrale des vecteurs viraux permettrait d'obtenir un bénéfice thérapeutique dans le cas du SL. Nous avons tout d'abord montré que la pathologie n'impactait pas l'anatomie et la fonction de la BHE chez les souris *NDUFS4* KO, un modèle standard du SL. Ce résultat confirme la nécessité d'utiliser des stratégies permettant de contourner la BHE. Pour cela nous avons tout d'abord utilisé un vecteur AAV-PHP.B. qui est un nouveau variant traversant la BHE. Le remplacement du gène *NDUFS4* avec ce vecteur viral a permis d'améliorer le phénotype et de prolonger la survie des animaux. Cette approche apporte une preuve de concept qu'une restauration généralisée de l'expression du gène permet d'obtenir un effet thérapeutique dans un modèle de maladie mitochondriale sévère. Notre deuxième approche a consisté en la combinaison de l'injection d'un vecteur AAV9 et de l'application d'ultrasons focalisés destinés à perméabiliser la BHE. Après avoir défini des paramètres ultrasonores permettant d'augmenter efficacement et sans danger la perméabilité de BHE sur une large partie du cerveau, nous avons montré que cette stratégie permettait de prolonger la survie des souris *NDUFS4* KO. Cette approche expérimentale combine deux technologies déjà utilisées en clinique et pourrait donc représenter une perspective intéressante pour le traitement du SL. Enfin, nous avons mis au point une nouvelle construction génétique permettant d'étudier si le transfert intercellulaire de mitochondries participe à l'effet de la thérapie génique. Cet outil représente un nouveau moyen d'étudier le transfert des mitochondries à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ce travail de thèse apporte la démonstration que des stratégies permettant d'améliorer le transfert de gènes vers le cerveau offre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le SL ainsi que pour d'autres pathologies affectant le système nerveux.

**Abstract :** Mutations in mitochondrial DNA or in nuclear genes involved in the mitochondrial respiratory chain complexes are responsible for mitochondrial disorders. Mutations affecting mitochondrial complex I are responsible for a broad spectrum of disorders among which Leigh syndrome (LS) is the most common in infancy. This condition is fatal during the first years of life and no treatment is currently available. Brain pathology is critical in LS and one of the challenges of gene therapy is the limited transfer of genes to the central nervous system due to the impermeability of the blood-brain barrier (BBB). Our hypothesis is that the development of new strategies to improve the cerebral transduction of viral vectors would provide a therapeutic benefit for LS. We first showed that the pathology does not cause anatomical or functional changes of the BBB in *NDUFS4* KO mice, a standard model of LS. This result confirms the necessity to overcome the BBB. To this end, we first used an AAV-PHP.B vector, a new variant able to cross the BBB. Gene replacement with this viral vector improved the phenotype and increased the lifespan in *NDUFS4* KO mice. This approach provides a proof of concept that widespread restoration of gene expression can alleviate the pathology in a model of severe mitochondrial diseases. Our second method was to combine the injection of an AAV9 vector with the application of focused ultrasound enabling the BBB opening. We first set up ultrasonic parameters affording an efficient and safe increase in BBB permeability. We then showed that this strategy extends the survival of *NDUFS4* KO mice. This approach combines two technologies currently used in clinic and therefore represents an interesting prospect for the treatment of LS. Finally, we developed a new genetic construct to study whether the intercellular transfer of mitochondria contributes to the effect of gene therapy. This tool represents a new way of studying mitochondrial transfer both *in vitro* and *in vivo*. Overall, my thesis work demonstrates that strategies improving gene delivery to the brain offers new therapeutic perspectives for LS and other conditions affecting the nervous system.