



HAL
open science

Étude de l'homéostasie du fer dans des modèles cellulaires de l'ataxie de Friedreich et d'autres défauts de synthèse des centres Fe-S

Floriane Petit

► **To cite this version:**

Floriane Petit. Étude de l'homéostasie du fer dans des modèles cellulaires de l'ataxie de Friedreich et d'autres défauts de synthèse des centres Fe-S. Génétique humaine. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5073 . tel-04100242

HAL Id: tel-04100242

<https://theses.hal.science/tel-04100242v1>

Submitted on 17 May 2023

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 l'obtention du grade de :

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Génétique

Délivré par : Université de Paris - École doctorale BioSPC n°562

Préparé au sein du laboratoire de : Institut Imagine, INSERM U1163, Génétique des maladies mitochondriales

Présentée par :

Floriane PETIT

Étude de l'homéostasie du fer dans des modèles cellulaires de l'ataxie de Friedreich et d'autres défauts de synthèse des centres Fe-S

Soutenue publiquement le 22 Septembre 2020 devant le jury composé de :

Dr. Sylvie FRIANT	Directrice de recherche, GMGM, Strasbourg	Présidente du jury
Pr. Michel KOENIG	PU-PH, IURC, Montpellier	Rapporteur
Dr. Guy LENAERS	Directeur de recherche, PREMMi, Angers	Rapporteur
Pr. Alexandra DURR	PU-PH, ICM, Paris	Examinatrice
Dr. Sophie VAULONT	Directrice de recherche, Institut Cochin, Paris	Examinatrice
Dr. Benoît D'AUTREAUX	Chargé de recherche, I2BC, Gif-sur-Yvette	Examinateur
Dr. Agnès RÖTIG	Directrice de recherche, Imagine, Paris	Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Remerciements

Je remercie bien sincèrement tous les membres du jury qui ont accepté d'étudier mes travaux de recherche malgré la charge de travail supplémentaire que cela occasionne dans un contexte particulièrement troublé. Merci au Dr. Sylvie Friant de présider ce jury ; aux deux rapporteurs, Pr. Michel Koenig et Dr. Guy Lenaers ; ainsi qu'aux examinateurs, Pr. Alexandra Dürr, Dr. Sophie Vulont et Dr. Benoît d'Autréaux.

Merci à Agnès Rötig, ma directrice de thèse, de m'avoir accueillie durant mes stages de Master et ces trois années de thèse. Un grand merci à la liberté et l'indépendance que tu m'as accordées durant mes années passées dans ton équipe malgré ma présence physique parfois incertaine. Merci d'avoir laissé ta porte toujours grande ouverte et de m'avoir offert toutes ces opportunités de formations, congrès et collaborations. Je te remercie d'avoir toujours veillé à ce que l'on ne manque de rien au laboratoire pour nos recherches.

Merci également à mes deux tutrices, Francine Côté et Valérie Serre, pour leurs engagements dans ma thèse, leurs avis et leurs disponibilités.

Un grand merci au Pr. Arnold Munnich pour son immense générosité ainsi que sa passion de la médecine et son dévouement à me transmettre ses connaissances et sa vision de la recherche. Merci d'avoir donné vie à ce projet et de l'avoir toujours soutenu avec engouement.

A tous les patients Friedreich et leurs familles qui se battent au quotidien contre la maladie. Votre rencontre a été pour moi un bonheur d'encouragement et un élan d'espoir dans mes recherches. Un grand merci à vous pour votre engagement, votre confiance et votre participation dans ce projet.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe des MITOs qui ont participé à rendre une ambiance de travail si particulière dans notre labo. Merci à Lucas pour sa force tranquille et sa zen attitude à toute épreuve ! A Alessandra, notre pédiatre préférée. Merci pour ton caractère rayonnant, tes sourires et nos agréables conversations. Merci à Mirella pour tes efforts, ta franchise et tes conseils avisés au quotidien. A Cérane, ma partenaire de thèse avec qui j'ai partagé cette aventure et toutes ces épreuves. Tous mes encouragements vont vers toi. To Betty and Metodi for all the energy you are bringing to the lab, your disponibility and your advices. To Martin, a discreet and smiling person who always volunteers. Merci à Farah et Chloé pour leurs courts passages parmi nous et le grain de folie qu'elles ont apporté au labo. A

tous les médecins hospitaliers rattachés à notre équipe dont en particulier, Jean-Paul Bonnefont, Chris Ottolenghi, Clément Pontoizeau et Julie Steffann, pour leurs aides et discussions constructives sur mon projet.

Merci à l'équipe AAV et en particulier, Marcelo et Vincent, sans oublier les nouveaux venus Clovis et Irina, pour avoir participé à rendre l'ambiance du labo si agréable.

Merci à Anthony pour tous les efforts pédagogiques que tu as déployés pour mon apprentissage. A tes encouragements et tes coups de gueules toujours orchestrés d'une culture scientifique sans faille qui ont permis l'émergence de cette thèse.

Merci également à Antoine, qui m'a fait découvrir une nouvelle facette de la recherche toujours avec un esprit positif. Notre collaboration m'a permis d'étendre le spectre de mes recherches grâce aux longues heures que tu as passées à me transmettre tes connaissances médicales et scientifiques sur ton projet.

A mes anciens collègues partis trop vite du laboratoire : Vanessa, Leslie, Juliette, Coralie, et Christelle. A Vanessa, partie aux plus profondes entrailles d'Imagine, soit à l'autre bout du couloir ! Je te remercie pour tous les bons moments de joie et de râleries passés ensemble. Merci à Juju pour ses encouragements constants. Merci à Leslie, bien que ton passage ait été bref, il a été peuplé de bons moments et de péripéties partagées. Cela fut un vrai plaisir de travailler avec toi ! Merci à Coralie pour ton cœur en or, toujours un rayon de soleil d'encouragements et mon bras droit durant ces années passées ensemble. Merci à Christelle pour sa franchise et ses précieux conseils.

Merci à tous les stagiaires qui m'ont été confiés pour leur aide. A Clovis pour son sens gustatif très aiguisé et ses critères culinaires de qualité avec qui tous les déjeuners prennent une tournure de table gastronomique. Tu as été un stagiaire formidable, toujours souriant et volontaire pour les manip même quand tu n'avais plus de réactifs ! A Paul, pour avoir donné de sa personne et son expertise médicale dans mon projet. Sans oublier tous mes petits stagiaires de passage avec qui j'ai adoré partager ma culture scientifique et j'espère leur avoir donné envie de poursuivre dans le milieu de la recherche.

Merci à tous les membres du 4^{ème} étage et plus largement à l'institut IMAGINE pour avoir partagé cette aventure avec moi. A Iris, Sabrina, Clémentine et Camille pour avoir toujours pris le temps de me conseiller et m'avoir apporté votre aide dans les meilleurs et pires moments. Un grand merci également à Mike et plus largement aux personnels d'imagerie de l'institut (Nicolas, Meriem et Olivier) pour avoir partagé avec moi leur expertise et passion de la

microscopie. Merci à l'équipe des « Yeux », des « Moux », « d'Embryo », de thérapie génique, des « Colnots », des « Meilhacs », des « Casanovas », et d'O. Hermine pour leur aide et leurs conseils réguliers.

Merci à l'association de sport d'IMAGINE et plus particulièrement aux équipes de body combat et de yoga. Un grand merci à Bérangère, Clémentine, Loélia, Ekin, et Giulia pour leurs apports quotidiens de dépenses énergétiques et de sérénité indispensable durant ma thèse.

Merci à tous mes élèves de PACES et de licence de biochimie pour leur sympathie et leur ambiance pendant mes cours. J'ai été très heureuse de goûter aux joies de l'enseignement. Je tiens également à remercier tous mes collègues moniteurs avec qui j'ai pu partager cette aventure unique. Un grand merci à votre soutien et votre entraide.

A la meilleur équipe, Séréna, Caroline, Hugo, Bryann et Clem, avec qui les soirées durant ces six ans sont parmi mes meilleurs souvenirs. Leur soutien invétéré a été une source de réconfort indispensable durant toutes ces années. A notre amitié et tous les bons moments à venir !

A mon frère et ma belle-sœur, à leur joie de vivre et leur amour. A nos souvenirs partagés, à votre aventure américaine, à vos escapades tout autour de la planète et à toutes celles à venir.

A ma tante, la grande scientifique américaine de la famille. Tu as toujours été un exemple pour moi. Je te remercie pour ton expertise et nos discussions réconfortantes.

A mes parents à qui je suis reconnaissante de tout ce qu'ils ont fait pour moi. Merci pour vos encouragements de tous les instants, d'avoir toujours été mes plus grands fans et de m'avoir constamment conseillée et épaulée. Merci d'avoir toujours répondu présents dans mes plus grandes joies comme dans mes plus grandes souffrances. J'exprime ma plus grande gratitude face à toute l'énergie que vous avez fournie pour me rendre indépendante, épanouie, entreprenante et déterminée.

Résumé

Étude de l'homéostasie du fer dans des modèles cellulaires d'ataxie de Friedreich et d'autres défauts de synthèse des centres fer-soufre

L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie neurodégénérative autosomique récessive se caractérisant par une ataxie spinocérébelleuse et une cardiomyopathie hypertrophique. L'AF résulte de l'expansion intronique de triplets GAA dans le gène *FXN*, codant pour la frataxine, une protéine mitochondriale impliquée dans les premières étapes de l'assemblage des centres Fe-S (ISC). Un déficit en frataxine entraîne un défaut en protéine à centres Fe-S ainsi qu'une surcharge en fer dans le cerveau et le cœur des patients. Cependant, les mécanismes orchestrant cette accumulation ferrique et les conséquences du déficit en frataxine restent encore mal compris.

Le premier objectif de cette thèse a été d'étudier l'homéostasie du fer dans l'AF. L'étude de fibroblastes de patients a montré que le déficit en frataxine induit une réduction du contenu en coenzyme A (CoA) conduisant à un défaut de palmitoylation, une modification post-traductionnelle du récepteur de la transferrine (TfR1). Ce déficit en palmitate provoque l'accumulation du TfR1 à la membrane, une augmentation de son endocytose associée à un retard de recyclage, entraînant une accumulation de fer cytosolique et mitochondriale. L'utilisation de dichloroacétate, de CoA ou d'artésunate augmente la palmitoylation du TfR1 et diminue drastiquement la surcharge en fer, ouvrant la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'expansion de GAA dans *FXN* provoque une extinction en *cis* du gène *PIP5K1B* dans les fibroblastes de patients AF. *PIP5K1B* code pour la kinase pip5k1 β , jouant un rôle majeur dans l'endocytose de récepteurs membranaires. Néanmoins, les rôles respectifs de *FXN* et *PIP5K1B* sur la surcharge en fer dans l'AF restent flous. Le second axe de ma thèse a été de tester la fonction de chacun de ces deux acteurs dans des modèles déficitaires en frataxine et/ou pip5k1 β générés par des techniques d'ARN interférence. J'ai tout d'abord observé que la modification de l'expression de *FXN* ou *PIP5K1B* affecte significativement le second, démontrant que leurs expressions sont liées. D'autre part, la dérégulation de l'homéostasie du fer induite par une extinction partielle de la frataxine est accentuée par le déficit en pip5k1 β . A l'inverse, un déficit en pip5k1 β provoque une hausse de la frataxine et diminue la surcharge en fer, suggérant un possible effet bénéfique de son extinction.

La biogenèse des centres Fe-S implique une vingtaine de protéines mitochondriales dont les déficits conduisent à des phénotypes cliniques variables, rarement associés à une accumulation de fer. Mon troisième axe de recherche a été d'étudier si tous les déficits de synthèse des ISC conduisent à un défaut de l'homéostasie du fer. L'étude de fibroblastes de patients a révélé que seuls les déficits des premières étapes de la biogenèse des ISC (*FXN* et *FDXR*) provoquent une dérégulation de l'homéostasie du fer alors qu'un déficit en protéine des stades tardifs (*IBA57*, *NFUI* et *NUBPL*) n'a aucun impact sur le contenu en fer.

Mots clés : Ataxie de Friedreich, défauts de synthèse des centres Fe-S, surcharge en fer, récepteur de la transferrine, palmitoylation.

Abstract

Study of iron homeostasis in cellular models of Friedreich's Ataxia and other defects of iron-sulfur clusters synthesis.

Friedreich's ataxia (FRDA) is an autosomal recessive neurodegenerative disease characterized by spinocerebellar ataxia and hypertrophic cardiomyopathy. FRDA results from intronic expansion of GAA trinucleotide in *FXN* gene, encoding frataxin, a mitochondrial protein involved in early stages of the iron-sulfur clusters (ISCs) assembly. Frataxin deficiency results in ISC-containing proteins defect and iron overload in heart and brain. However, the mechanisms leading to iron accumulation and the consequences of frataxin defect are still poorly understood.

The first objective of this thesis was to study iron homeostasis in FRDA. Patient fibroblasts display frataxin deficiency that induces a reduction in coenzyme A (CoA) content leading to a palmitoylation defect, a post-translational modification of transferrin receptor 1 (TfR1). This palmitate deficiency causes an accumulation of membrane TfR1, increasing its endocytosis and delaying its recycling, resulting in cytosolic and mitochondrial iron accumulation. Dichloroacetate, CoA or artesunate increase the TfR1 palmitoylation and drastically reduce iron overload, paving the road for new therapeutic strategies.

FXN GAA-repeat expansion causes *cis*-silencing of the upstream *PIP5K1B* gene in FRDA fibroblasts. *PIP5K1B* encodes the pip5k1 β kinase, which plays a major role in membrane receptor endocytosis. Nevertheless, the respective roles of *FXN* and *PIP5K1B* on iron overload remain unclear. The second axis of my thesis was to test the function of each of them in frataxin and/or pip5k1 β deficient cells lines generated by RNA interference silencing. I first observed that modification of either *FXN* or *PIP5K1B* expression affects the second, suggesting that their expressions are related. On the other hand, the deregulation of iron homeostasis induced by a partial extinction of frataxin is exacerbated by a decreased *PIP5K1B* expression. Conversely, *PIP5K1B* defect induces an increase of frataxin steady-state levels and a decrease of iron overload, suggesting a possible protective effect of *PIP5K1B* knock down.

The ISCs biogenesis involves about twenty mitochondrial proteins whose deficiencies lead to variable clinical phenotypes, rarely associated with iron accumulation. My third research axis was to study whether all ISC synthesis defects result in abnormal iron homeostasis. This study of patient fibroblasts demonstrated that defects in the early stages of ISC synthesis (*FXN* and *FDXR*) cause iron homeostasis deregulation whereas a protein deficiency affecting late stages such as IBA57, NFU1 and NUBPL has no impact on iron content.

Keywords: Friedreich's ataxia, iron-sulfur clusters defects, iron overload, transferrin receptor, palmitoylation.

Table des matières

Liste des abréviations	1
<i>Introduction</i>	8
I. L'ataxie de Friedreich	9
1. Épidémiologie	9
2. Signes cliniques	9
3. Génétique de l'ataxie de Friedreich	13
4. Épигénétique dans l'ataxie de Friedreich	16
5. La frataxine	23
II. L'homéostasie du fer	36
1. L'absorption du fer par les entérocytes	37
2. Le transport et la distribution du fer dans l'organisme	39
3. L'absorption du fer dans les cellules	42
4. Le devenir du fer dans la cellule	50
5. La régulation de l'homéostasie du fer cellulaire	54
III. Les modèles de l'ataxie de Friedreich	57
1. Les modèles murins	57
2. Les autres modèles animaux	60
3. Les modèles cellulaires	63
IV. Les traitements de l'ataxie de Friedreich	65
1. Les chélateurs du fer	66
2. Les antioxydants et/ou stimulants de la biogenèse mitochondriale	66
3. La surexpression de la frataxine	68
4. La thérapie génique et cellulaire	69
Projet de thèse	71

<i>Matériels et méthodes</i>	73
Patients	74
Culture cellulaire	75
Extinction des gènes.....	75
Extraction d'ARN et qRT-PCR.....	76
Analyse de l'expression des protéines	76
Détermination du contenu en fer intracellulaire.....	77
Détection du TfR1 à la membrane plasmique	78
Internalisation et recyclage de la transferrine.....	78
Test de viabilité cellulaire	79
Analyses statistiques	79
 <i>Résultats</i>	 80
Partie I : Étude de l'homéostasie du fer dans des fibroblastes de patients Friedreich et applications thérapeutiques	81
Partie II : Étude de l'homéostasie du fer dans des modèles déficitaires en <i>FXN</i> et/ou <i>PIP5K1B</i>	127
Partie III : Étude de l'homéostasie du fer dans d'autres déficits de la biogenèse des centres Fe-S.....	143
Partie IV : Étude de l'homéostasie du fer dans les neurodégénérescences avec accumulation de fer dans le cerveau (NBIA)	164
 <i>Discussion générale</i>	 185
I. Dérégulation de l'homéostasie du fer dans les défauts précoces de la biogenèse des ISC et les NBIA.....	186
1. Surcharge en fer et stress oxydant.....	186
2. Régulation de l'homéostasie du fer cellulaire.....	187
3. Dérégulation de TfR1 et accumulation de fer.....	188

II. Palmitoylation de protéines, un nouveau niveau de régulation de l'entrée du fer cellulaire	188
1. Défaut de palmitoylation du TfR1	188
2. Palmitoylation et NTBI.....	190
3. Hypopalmitoylation liée à un défaut de synthèse du CoA.....	190
4. Rôle des protéines à centre Fe-S dans la synthèse du CoA	193
5. Ampleur du déficit du CoA et de l'acétyl-CoA	195
III. <i>PIP5K1B</i> , un gène d'atténuation ou d'amplification de la dérégulation de l'homéostasie du fer dans l'AF ?.....	198
IV. L'artésunate, une piste thérapeutique	201
Références bibliographiques	206
Liste des figures	218
Liste des tableaux	220

Liste des abréviations

2BP	2-bromopalmitate
Å	Ångström
AAV	Virus adéno-associé
ABCB7	Protéine B7 de la cassette de liaison à l'ATP (<i>ATP-binding cassette protein B7</i>)
ACLY	ATP citrate lyase
ACO1	Aconitase cytosolique ou aconitase 1 (c-aco)
ACO2	Aconitase mitochondriale ou aconitase 2 (m-aco)
ACSS	Acétyl-CoA synthétase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF	Ataxie de Friedreich
ALAS2	5'-aminolevulinates synthase 2 ou hème synthase 2
Alexa 555-Tf	Alexa fluor 555 conjugué à de la transferrine
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse de la variance
Apo-Tf	Transferrine sans fer
AP2	Protéine adaptatrice 2
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
Asn	Asparagine
ATG	Gène impliqué dans l'autophagie
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphate synthétase
BOLA1-2	Protéine de type BolA 1-2
Ca ²⁺	Calcium
CAT	Catalase
Cas9	Protéine 9 associée à CRISPR
CIA	Assemblage des ISCs cytosoliques
CoA	Coenzyme A
COASY	Coenzyme A synthase
CoQ ₁₀	Coenzyme Q ₁₀
Cp	Céruloplasmine
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
cPMP	Monophosphate de pyranoptérine cyclique
CRAT	Carnitine O-acétyltransférase

CRISPR	Courtes répétitions palindromique groupées et régulièrement espacées
CSH	Cellule souche hématopoïétique
Ct	Cycle seuil
CTT	Cytosine-Thymine-Thymine
CyaY	Homologue bactérien de <i>FXN</i>
Cys	Cystéine
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C16	Seize carbones
C16 :0	Acide palmitique
CI-III	Complexes I à III de la chaîne respiratoire
DCA	Dichloroacétate
DCYTB	Cytochrome b réductase 1
DHA	Dihydroartémisinine
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMT1	Transporteur de métaux divalents 1 (<i>Divalent Metal Transporter 1</i>)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNPB	2,4-dinitrophenylhydrazine
DTT	Dithiothréitol
ECG	Electrocardiogramme
EC50	Concentration efficace médiane
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EPO	Erythropoïétine
rhuEPO	EPO recombinante humaine
ER	Réticulum endoplasmique (<i>Endoplasmic reticulum</i>)
e ⁻	Electron
FAC	Citrate d'ammonium de fer
FA2H	Acide gras 2-hydroxylase
FBS	Sérum de vœu fœtal (<i>Fetal bovine serum</i>)
FBXL5	<i>F-Box and Leucine rich repeat protein 5</i>
FDX1-2	Ferrédoxine 1-2
Fdxh	Protéine de type adrénotoxine 1 (<i>D. melanogaster</i>)
Fdxh2	Protéine de type adrénotoxine 2 (<i>D. melanogaster</i>)
FDXR	Ferrédoxine réductase
Fe ²⁺	Fer ferreux
Fe ³⁺	Fer ferrique
FECH	Ferrochélatase
Fe-S	Fer-Soufre
Fh1	Homologue Drosophile de <i>FXN</i>
FPN	Ferroportine
FRDA	<i>Friedreich's ataxia</i>
Frh-1	Homologue nématode de <i>FXN</i>
FTH	Chaîne lourde de la ferritine
FTL	Chaîne légère de la ferritine

FTMT	Ferritine mitochondriale
FTN	Ferritine
FXN	Frataxine
GAA	Guanine-Adénine-Adénine
GAPDH	Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase
GLRX5	Protéine apparentée à la glutaredoxine 5
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GRD	Ganglions de la racine dorsale
GRPE1	Facteur d'échange de nucléotides
GSH	Glutathion
GTP	Guanosine triphosphate
GusB	β -glucoronidase
H ⁺	Ion hydrogène
HAT	Histone acétylase
HCl	Chlorure d'hydrogène
HCP1	Transporteur de folate couplé au proton
HDAC	Histone désacétylase
HEK293FT	Cellules rénales embryonnaires humaines (<i>Human Embryonic Kidney 293 Fast Transfection</i>)
HeLa	Lignée cellulaire humaine de cancer du col de l'utérus
Hem15	Homologue levure de la ferrochélatase (<i>S. Cerevisiae</i>)
Heph	Héphaestine
HERC2	Ubiquitine-protéine ligase E3
Hfe	Protéine d'hémochromatose héréditaire
HIF2 α	Facteur inductible de l'hypoxie 2 sous-unité alpha
HLA	Antigène leucocytaire humain
holo-Tf	Transferrine diférique (holo-transferrine)
HO ⁻	Radicaux hydroxyles
HO1	Hème oxygénase 1
HP1 β	Protéine d'hétérochromatine 1 bêta (<i>heterochromatin protein 1 beta</i>)
HSC20	Cochaperon, de l'assemblage de centre Fe-S mitochondriaux
HspA9	Membre 9 de la famille A des protéines de choc thermique
Hsp70, 20, 60	Famille des protéines de choc thermique
H ₂ O	Molécule d'eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H3K9	Histone H3 Lysine 9
IBA57	Facteur d'assemblage des centres Fe-S pour les protéines mitochondriales de type biotine synthase ou aconitase
IC50	Concentration inhibitrice médiane
indels	Insertions / délétions
IP	Immunoprécipitation
iPSC	Cellule souche pluripotente induite (<i>Induced pluripotent stem cell</i>)
IRE	Élément de réponse au fer (<i>Iron response element</i>)

IRP1-2	Protéine régulatrice du fer 1-2 (<i>Iron regulatory protein 1-2</i>)
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISC	Centre Fer-Soufre (<i>Iron-sulfur cluster</i>)
ISCU	Enzyme d'assemblage des centres Fe-S
ISR	Réponse intégrée au stress (<i>Integrated stress response</i>)
Isu	Protéine d'assemblage des centres Fe-S
K ⁺	Potassium
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramme
KGDH	α -cétoglutarate déshydrogénase
KIKI	Souris homozygotes <i>knock-in</i>
KIKO	Souris hétérozygotes <i>knock-in/ knock-out</i>
KMnO ₄	Permanganate de potassium
KO	Extinction totale d'un gène (<i>Knock down</i>)
LA	Acide lipoïque (<i>Lipoic acid</i>)
LAMP2	Glycoprotéine membranaire 2 associée au lysosome
LC3B	Protéine associée au microtubule 1B, chaîne légère 3
LIAS	Lipoyl synthase (<i>Lipoyl acid synthetase</i>)
LIP	Pool de fer labile (<i>Labile iron pool</i>)
LIPT1-2	Lipoyl transférase 1-2
LOFA	Ataxie de Friedreich tardive (<i>Late onset Friedreich ataxia</i>)
vLOFA	Ataxie de Friedreich très tardive (<i>Very late onset Friedreich ataxia</i>)
LPI	Fer plasmatique labile (<i>Labile plasma iron</i>)
LTCC	Canaux de calcium de type L
LYR	Leucine-Tyrosine-Arginine
LYRM4	Protéine 4 contenant un motif LYR
MCK	Créatine kinase musculaire (<i>Muscle Creatine Kinase</i>)
Mef2	Facteur enhancer 2 spécifique des myocytes
MELAS	Syndrome associant myopathie mitochondriale, encéphalopathie, acidose lactique et pseudo-épisodes vasculaires cérébraux
Mev-1	Succinate déshydrogénase mitochondriale (<i>C. elegans</i>)
MFRN1-2	Mitoferrine 1-2
mg	Milligramme
Mg ²⁺	Magnésium
min	Minute
ML4	Mucopolidose de type 4
Moco	Cofacteur Molybdène
MPP	Peptidase de traitement mitochondrial (<i>Mitochondrial processing peptidase</i>)
Mrs3-4p	Mitoferrine (<i>S. cerevisiae</i>)
mTP	Séquence peptidique d'import mitochondrial (<i>Mitochondrial transit peptide</i>)
Na ⁺	Sodium

NADPH	Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBIA	Neurodégénérescence avec accumulation de fer dans le cerveau (<i>Neurodegeneration with brain iron accumulation</i>)
NBP35	Facteur d'assemblage des centres Fe-S
NC	Rapport noyau/ cytoplasme
NCOA4	Récepteur nucléaire coactivateur 4
NFS1	Cystéine désulfurase
NFU1	Facteur d'échafaudage des centres Fe-S NFU1
NHE3	Echangeur sodium/hydrogène 3
NO	Oxyde nitrique (ou monoxyde d'azote)
NOX	NADPH oxydase
NSE	Enolase spécifique des neurones (<i>Neuron-specific enolase</i>)
NTBI	Fer non lié à la transferrine (<i>Non transferrin-bound iron</i>)
NUBPL	Pseudo protéine de liaison des nucléotides (<i>Nucleotide binding protein like</i>)
OCRL	Syndrome oculo-cérébro-rénal de Lowe
OFT	Oligonucléotide formant le triplex
O ₂ ⁻	Ion oxyde
PANK2	Pantothénate kinase 2
pb	Paire de bases
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PBS-T	Solution saline tamponnée au phosphate et supplémentée en Tween
PCBP1-2	Protéine de liaison poly(rC) 1-2
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
ddPCR	<i>Droplet Digital PCR</i>
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PDHK	Pyruvate déshydrogénase kinase
Pdk1	Protéine kinase 1 dépendante du phosphoinositide 3
pH	Potentiel hydrogène
PI4P	Phosphatidylinositol 4-phosphate
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (ou PtdIns(4,5)P ₂)
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (ou PtdIns(3,4,5)P ₃)
PIP5K1	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type 1
PIP5K1A	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type 1 alpha
PIP5K1B	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type 1 bêta
PIP5K1C	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type 1 gamma
PLA2G6	Phospholipase A2 indépendante du calcium
PPCDC	Phosphopantothénoyl-cystéine décarboxylase
PPCS	Phosphopantothénoyl-cystéine synthétase
PRKACG	Protéine kinase activée par l'AMPc, sous-unité catalytique gamma (<i>protein kinase cAMP-activated catalytic subunit gamma</i>)
PrP	Protéine prion
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>

RAB5	Protéine apparentée au Ras 5
RAB11A	Protéine apparentée au Ras 11A
RAB12	Protéine apparentée au Ras 12
REPS1	Protéine 1 contenant un domaine Eps associé à RalBP1
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	Réactifs de l'oxygène
RT	Transcription inverse
RT-PCR	Transcription inverse puis réaction en chaîne par polymérase
R*/R/Y	Purine/purine/pyrimidine
SDH	Succinate déshydrogénase
SDHB	Succinate déshydrogénase sous-unité B
SEM	Erreur standard autour de la moyenne
SHIP2	Inositol 5-phosphatase contenant un domaine SH2
shRNA	Petit ARN en épingle à cheveux (<i>short hairpin RNA</i>)
shFXN	Petits ARN en épingle à cheveux dirigés contre les ARN <i>FXN</i>
shFXN/PIP5K1B	Petits ARN en épingle à cheveux dirigés contre les ARN <i>FXN</i> et <i>PIP5K1B</i>
shPIP5K1B	Petits ARN en épingle à cheveux dirigés contre les ARN <i>PIP5K1B</i>
siRNA	Petit ARN interférent (<i>small interfering RNA</i>)
siFXN	Petits ARN interférents dirigés contre les ARN <i>FXN</i>
siFXN/PIP5K1B	Petits ARN interférents dirigés contre les ARN <i>FXN</i> et <i>PIP5K1B</i>
siPIP5K1B	Petits ARN interférents dirigés contre les ARN <i>PIP5K1B</i>
SIRT3	Sirtuine 3
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SO	Monoxyde de soufre
SOD1	Superoxyde dismutase cytosolique
SOD2	Superoxyde dismutase mitochondriale
SQSTM1	Séquestosome 1
SR2	Récepteur 2 dérivé des cellules du stroma
STEAP3	Antigène épithélial à six membranes de la prostate 3, Métalloréductase
SUMO	Petit modificateur de type ubiquitine
S ₂ ⁻	Ion sulfure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TBI	Fer lié à la transferrine (<i>transferrin-bound iron</i>)
Tf	Transferrine
TfR1-2	Récepteur à la transferrine 1-2 (<i>transferrin receptor 1-2</i>)
TFRC	Transcrit du récepteur à la transferrine 1
Thr	Thréonine
TJP2	Protéine de jonction serrée 2 (<i>tight junction protein 2</i>)
Tm	Température de fusion (<i>Melting temperature</i>)
TNT	Nanotube à effet tunnel
TRPML1	Mucopolipine 1

TSAT	Saturation de la transferrine
TTCC	Canaux de calcium de type T
UAS	Séquence d'activation en amont (<i>upstream activating sequence</i>)
UI	Unité internationale
UTR	Région transcrite non traduite
VDAC	Canaux anioniques voltage-dépendants
VEP	Variégation d'effet de position
WDR45	<i>WD repeat domain 45</i>
YAC	Chromosome artificiel de levure (<i>Yeast artificial chromosomes</i>)
Yfh1	Homologue levure de <i>FXN</i>
Y*R/Y	Pyrimidine/purine/pyrimidine
ZIP8	Zinc transporter 8
ZIP14	Zinc transporter 14
Zn	Zinc

Introduction

I.L'ataxie de Friedreich

1. Épidémiologie

L'ataxie de Friedreich (AF) (OMIM 229300) est l'ataxie récessive la plus fréquente dans la population Caucasienne avec une prévalence estimée entre 1 cas sur 20 000 et 1 cas sur 50 000 individus et une incidence de 1 cas sur 30 000 naissances¹.

Globalement, cette pathologie touche préférentiellement les pays européens, le Moyen-Orient, l'Inde et l'Afrique du Nord. Cette maladie aurait émergé à l'Ouest de l'Europe il y a environ 600 générations². La rareté des cas recensés dans l'Asie de l'Est (Chine, Japon et Sud-Est de l'Asie), l'Afrique Sub-saharienne et les zones amérindiennes appuie cette hypothèse³. De plus, l'AF touche indifféremment les hommes et les femmes. Cependant le sex-ratio varie selon la localisation géographique.

En France, les chiffres d'occurrence de l'AF sont dans la moyenne européenne avec une prévalence moyenne nationale estimée à 1 cas pour 43 000 individus et une incidence de 1 cas sur 29 000 naissances¹. Toutefois, il existe de fortes disparités régionales : prévalence de 1 cas pour 65 000 individus seulement dans le Nord-Est alors que les régions du Sud-Ouest ont des taux culminant à 1 cas pour 25 000 individus². La Bretagne et le sud des Pyrénées sont les régions les plus touchées par cette maladie. Statistiquement, la France compterait près de 1500 personnes atteintes d'AF et serait le troisième pays européen le plus touché par cette pathologie, derrière l'Espagne et l'Irlande².

2. Signes cliniques

a. *Symptômes neurologiques*

L'AF est une maladie neurodégénérative affectant à la fois le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP). Dans près de 75% des cas, les symptômes neurologiques surviennent avant l'âge de 25 ans avec une apparition moyenne de la maladie autour de la puberté (entre 9 et 14 ans). L'AF se manifeste par une ataxie spinocérébelleuse et sensitive progressive. Ces manifestations se définissent par une aréflexie (*via* un déficit des motoneurones), une dysarthrie, un syndrome pyramidal, une neuropathie axonale, une atrophie de la moelle épinière et une perte du réflexe cutané plantaire (réflexe de Babinski) associée à une faiblesse musculaire importante notamment au niveau des membres inférieurs. L'ataxie résulte de la combinaison

de dysfonctionnements afférents (neuropathie sensitive et périphérique), cérébelleux (dysarthrie) et parfois vestibulaires (trouble de l'équilibre)⁴.

La neuropathie périphérique sensitive se traduit par la perte de réflexes tendineux profonds qui est la conséquence d'une dégénérescence lente et progressive de neurones sensitifs ancrés dans les ganglions de la racine dorsale (GRD) affectant également leurs projections axonales s'étendant dans la colonne postérieure. Outre une ataxie statique et dynamique, les patients présentent une atteinte du tronc (au niveau des nerfs). L'atrophie des GRD est due à une destruction des gros neurones ainsi qu'à la perte de grandes fibres myélinisées des axones centraux et des nerfs de la racine dorsale⁵. L'axonopathie résultante d'un transport axonal et mitochondrial défectueux le long des axones conduit à un mécanisme de mort rétrograde s'étendant au SNC. Les impacts de la dégénérescence du GRD sur les structures efférentes situées en aval de la moelle épinière et du tronc cérébral constituent des dommages secondaires s'établissant au cours de la progression de la maladie et affectant les noyaux dorsaux de Clarke, les noyaux cunéiformes et graciles, la colonne dorsale ainsi que le tractus spinocérébelleux^{5,6}.

L'IRM montre généralement une réduction de l'épaisseur corticale (dans les zones motrices), des zones fronto-cérébelleuses ainsi qu'une atrophie de la moelle épinière et du système moteur extrapyramidal s'accompagnant d'une concentration élevée en fer dans ces structures (noyaux dentelés et noyaux rouges du mésencéphale)^{7,8}.

L'atteinte fronto-cérébelleuse et la diminution des fonctions motrices sont souvent accompagnées de déficits proprioceptifs dans la quasi-totalité des patients AF. Des signes de neuropathies sensorielles se traduisent par des potentiels d'action nerveux très réduits voire totalement absents dans certains cas. Une atrophie optique est présente dans près d'un patient sur cinq et peut conduire à une cécité partielle ou complète à des stades avancés⁹. Les patients peuvent souffrir d'une atteinte optique et auditive combinée évolutive. Ce déficit auditif affecte essentiellement les voies centrales, correspondant à des neuropathies auditives définies électrophysiologiquement par des potentiels évoqués auditifs anormaux (seuils, latences et amplitudes), contrastant avec une normalité des otoémissions acoustiques¹⁰.

b. Symptômes cardiaques

L'AF se traduit également par des manifestations primaires non-neurologiques telles que le développement d'une cardiomyopathie hypertrophique chez plus de 80% des patients. Cette atteinte est causée par une dilatation cardiaque promouvant la mort importante des

cardiomyocytes dont le remplacement par du tissu fibreux mène à de sévères dysfonctionnements diastoliques et systoliques¹¹. Le développement précoce d'une fibrose de remplacement détectée par IRM se développe lentement avec le temps et entraîne une dilatation du ventricule¹¹. Des analyses histologiques au niveau des zones de fibrose ont montré une infiltration de cellules inflammatoires ainsi que l'accumulation de fer au niveau du ventricule¹². Ce dysfonctionnement cardiaque touche principalement les patients de moins de 40 ans et elle constitue la cause majeure de décès.

Une échographie cardiaque complétée d'un électrocardiogramme (ECG) permet de diagnostiquer une hypertrophie généralement du ventricule gauche et dans une moindre mesure du ventricule droit sans obstruction des voies d'évacuations¹³. Seuls 20% des patients ont une fraction d'éjection anormale à des stades avancés de la maladie. L'ECG se caractérise par une inversion des ondes T ou une inversion inféro-latérale (onde T négative) ainsi qu'une dépression ou élévation du segment ST¹³.

c. Autres symptômes

Le tableau clinique des patients atteints d'AF peut s'accompagner d'autres atteintes métaboliques avec notamment une augmentation de la prévalence du diabète. Le jeune âge d'apparition de l'AF ainsi que l'évolution de la pathologie augmentent le risque de développement d'un diabète sucré tardif (généralement 15 ans après le début de la maladie)¹⁴. Cette atteinte de la partie exocrine du pancréas résulte d'une combinaison entre une insuffisance de la sécrétion d'insuline due à la perte des cellules bêta des îlots de Langerhans ainsi qu'une résistance accrue à l'insuline¹⁵.

De plus, des anomalies squelettiques typiques de l'AF se caractérisent par la présence d'une scoliose dont la progression dans le temps est très variable en fonction des patients¹⁰. Les déformations des pieds peuvent significativement contribuer à la perte de mobilité pour plus de la moitié des patients.

d. Phénotypes atypiques

Dans la majorité des cas, les symptômes surviennent avant l'âge de 25 ans et les patients sont correctement diagnostiqués selon les critères essentiels de Harding établis en 1981. Cependant dans 25% des cas, des formes atypiques ont été décrites comme AF tardive (*Late onset Friedreich ataxia - LOFA*) ou très tardive (*very late onset Friedreich ataxia - vLOFA*) survenant respectivement entre 25 et 40 ans ou après 40 ans¹⁶. Cette variabilité clinique de l'âge

d'apparition et de la sévérité de la maladie est due à la présence de variants rares dans le même gène que les AF classiques. Les cas atypiques d'AF ont une fréquence moindre de dysarthrie, de la perte des réflexes ostéo-tendineux, de l'atrophie cérébelleuse, des atteintes cardiaques et de la scoliose comparés aux AF typiques^{17,18}.

L'AF tardive et l'AF très tardive sont considérées comme des phénotypes hétérogènes de la maladie incluant une ataxie spastique modérée, des réflexes retenus et une prévalence faible d'apparition des signes extra-neurologiques (tels que la cardiomyopathie, le diabète et les déformations du squelette). Ces formes tardives sont associées à un retard de l'apparition des symptômes et à une progression lente de la maladie évoluant bien souvent par poussées¹⁸. Les individus ayant une apparition des symptômes après l'âge de 60 ans ont bien souvent très peu de critères caractéristiques de l'AF.

e. Évolution de la maladie

L'AF est une maladie progressive mais dont l'évolution est variable. En effet, tous les symptômes cliniques ne progressent pas à la même vitesse selon les patients. De plus, l'âge d'apparition des symptômes est corrélé positivement avec la sévérité de la maladie. Certains patients présentent une AF précoce avec un diagnostic établi avant l'âge de 5 ans. Cette variabilité de l'âge d'apparition des symptômes est maintenant en grande partie expliquée par la nature de la mutation.

L'AF survient en général autour de l'adolescence par des troubles de la marche et une instabilité en position debout associés parfois à une scoliose⁴. La plupart des patients ont une perte totale de mobilité dans les huit ans qui suivent l'apparition de la maladie, contraignant leur déplacement au fauteuil roulant. Cette perte de la marche s'accompagne bien souvent par une dysarthrie (difficulté d'élocution et d'articulation se manifestant environ 5-10 ans après les premiers symptômes) et des anomalies squelettiques fréquentes. Plus tardivement, l'atteinte cardiaque apparaît avant l'âge de 20 ans suivie de l'apparition souvent brutale d'un diabète sucré (en moyenne 15 ans après le début de la maladie) puis d'une perte de proprioception vers l'âge de 40 ans en moyenne⁴. Une diminution partielle de l'acuité visuelle ou auditive peut également se faire ressentir après plusieurs années de développement de la maladie.

Bien que l'espérance de vie des patients ait augmenté ces dernières années, l'évolution de la maladie reste fortement liée au développement ou non d'une cardiomyopathie. En effet, l'âge de décès des patients a été établi à 33 ans pour des AF avec atteinte ventriculaire, contre plus

de 40 ans pour les AF sans signe cardiaque¹⁹. Cette variabilité est étroitement corrélée aux risques élevés de complications cardiaques à l'origine de plus de 60% des décès. Les autres causes sont principalement des infections respiratoires (pneumonies), un coma diabétique ou un accident vasculaire cérébral^{4,19}.

3. Génétique de l'ataxie de Friedreich

a. Expansion de triplet du gène *FXN*

L'AF est une maladie héréditaire autosomique récessive qui est induite par une expansion anormale de trinuécléotides GAA situés dans le premier intron du gène *FXN* localisé sur le chromosome 9 (chr9q21.11)²⁰. Ce gène code pour une petite protéine mitochondriale, la frataxine. Près de 96% des patients présentent une expansion du nombre de répétitions sur chacun des deux allèles. Chez un sujet sain, le nombre de répétitions de trinuécléotides n'excède pas 40 GAA tandis que les patients AF peuvent avoir entre 60 et 1700 GAA²⁰ avec une moyenne se situant plutôt entre 600 et 900 répétitions^{17,21}. Des tailles intermédiaires d'expansion sont considérées comme des pré-mutations pouvant s'étendre dans les lignées germinales maternelles ou dans les tissus somatiques²¹. En fait, l'allèle d'origine maternelle serait sujet à une expansion naturelle de GAA tandis que l'allèle d'origine paternelle aurait plutôt tendance à une légère réduction du nombre de triplets²⁰⁻²². Cette instabilité germinale augmente la fréquence de transmission d'allèles possédant des expansions variables à la génération suivante.

De plus, une instabilité somatique dans les GRD a été rapportée à des stades précoces du développement embryonnaire jusqu'à plusieurs années après la naissance²³. Une accumulation progressive du nombre de triplets contribue à la progression de la dégénérescence des cellules du cervelet et du GRD au cours de la vie^{23,24}. Cependant cette expansion âge-dépendante est restreinte à certains tissus car aucune augmentation significative du nombre de GAA n'a été détectée dans des échantillons sanguins de patients²⁴. Ce mosaïcisme somatique couplé à une instabilité germinale contribue fortement à l'induction d'une variabilité phénotypique.

D'autre part, le nombre de répétitions de triplets est corrélé négativement avec l'âge d'apparition de la maladie et positivement avec la sévérité des symptômes¹⁷. En outre, une expansion importante entraîne un phénotype plus sévère avec une apparition précoce et une progression rapide de la maladie tandis que des tailles intermédiaires de répétitions sont responsables de formes légères d'AF très tardives²². De plus, une augmentation de la fréquence

des signes non neurologiques a été décrite chez les patients à longue expansion GAA²⁵. Cependant, la taille de l'expansion ne permet d'expliquer que la moitié de la variabilité phénotypique observée⁴. D'autres facteurs tels que l'implication de gènes modificateurs, le mosaïcisme somatique, l'instabilité de l'expansion ainsi que des phénomènes épigénétiques doivent également être pris en considération⁴.

b. Autres mutations du gène FXN

Des phénotypes atypiques ont été attribués à un faible pourcentage de patients (4%) qui sont qualifiés d'hétérozygotes composites car ils présentent une répétition anormale sur un allèle et une mutation ponctuelle sur le second. Plus d'une quarantaine de mutations de type substitutions (non-sens, faux-sens) ou indels (insertions/délétions avec décalage du cadre de lecture) ont été recensées dans le gène *FXN*, occasionnant parfois des modifications ou des suppressions importantes de nucléotides²⁶. La plupart des mutations non-sens, les grandes délétions ou celles affectant le codon initiateur sont prédites pour donner une frataxine non fonctionnelle²⁷. Ces mutations sont associées à une sévérité accrue et à une apparition précoce de la maladie²⁸.

En revanche, les mutations faux-sens retrouvées dans le corps hydrophobique de la protéine (c'est-à-dire à l'intérieur de la frataxine) telle que D122Y, Y123D, L106S et I154F (**Figure 1**) mènent à une instabilité protéique ainsi qu'à un taux de protéine résiduelle très faible. Ces mutations faux-sens sont généralement associées à des phénotypes très sévères de l'AF incluant le développement d'un diabète ainsi qu'une atrophie optique et auditive²⁷. D'autre part, les mutations W155R, N146K, R165C/P et G130V (**Figure 1**) localisées à la surface de la protéine touchent principalement des résidus très conservés altérant la structure, la fonction ainsi que ses interactions avec d'autres partenaires protéiques sans que son niveau d'expression ne soit systématiquement altéré^{26,29,30}. Des anomalies d'épissage dans les introns 1, 3 et 4 ont également été décrites dans des cas d'AF typiques et donnent lieu à une réduction de la quantité de protéine^{20,27,31,32}.

Bien que les mutations ponctuelles soient généralement associées à des phénotypes typiques ou plus sévères de l'AF avec une apparition précoce, certaines d'entre elles (comme R165C et L182F) sont davantage recensées dans des cas de progression modérées de la maladie³³. De plus, les patients hétérozygotes composites possédant une mutation dans une moitié aminoterminal différent habituellement des AF typiques en présentant une atteinte cérébelleuse légère, une conservation des réflexes ostéo-tendineux et une progression modérée des

symptômes malgré leur apparition précoce³². Ces atteintes plus légères pourraient s'expliquer par l'absence complète de la partie N-terminale (résidus 70 à 90) chez les procaryotes³⁴. En revanche, la partie C-terminale (résidus 100 à 120) étant très conservée au cours de l'évolution des espèces, les patients présentant une mutation ponctuelle dans la partie carboxy-terminale ont des phénotypes semblables à des AF typiques avec une maladie se déclarant vers la puberté et une incidence élevée des symptômes extraneurologiques²⁸. À noter que trois sujets dans d'une même famille consanguine présentant un phénotype similaire à la maladie de Charcot-Marie-Tooth possèdent la mutation faux-sens c.493C>T (p.Arg165Cys) sur chacun des allèles du gène *FXN*³⁵. Bien que cette altération n'affecte pas le niveau d'expression de la frataxine chez les patients³⁵, ces premiers cas d'homozygotie rapportés remettent en considération l'absence de recensement de sujets porteurs de mutation ponctuelle sur les deux allèles *FXN* en raison de la sévérité de la maladie qu'elles induiraient, à l'image de la létalité embryonnaire provoquée par une absence complète de *FXN* chez les souris³⁶ et complexifient notre compréhension de la pathogénicité l'AF.

Enfin, la plupart des mutations ponctuelles sont des mutations présentes dans des cas isolés. Seules quelques mutations telles que G130V et R165C ont été retrouvées dans plusieurs familles non consanguines, suggérant l'hypothèse d'un effet fondateur antérieur^{2,32}.

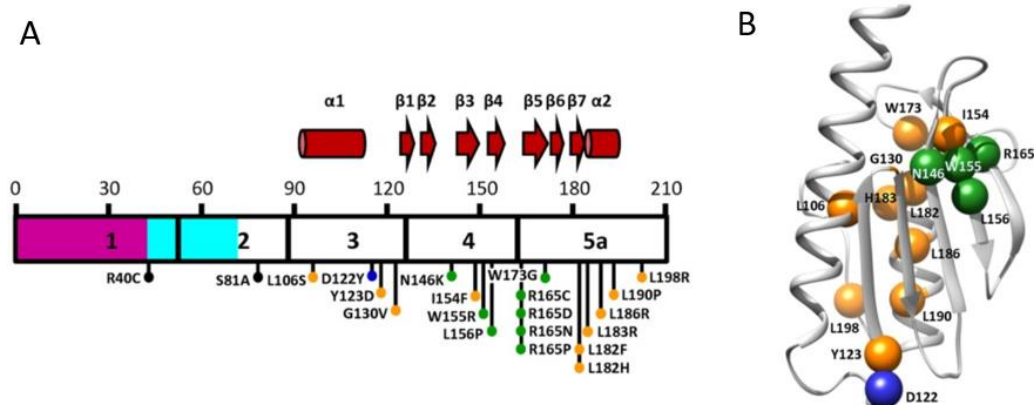


Figure 1 : Localisation de mutations dans la séquence nucléotidique (A) et dans la structure protéique (B)³⁴. La séquence colorée en violet correspond au peptide signal d'import à la mitochondrie. La zone en bleu clair représente la partie N-terminale de la protéine tandis que l'ensemble de la région blanche correspond à la séquence de la frataxine mature. Les mutations représentées par des points noirs sont des résidus clivés lors de la maturation de la protéine. Les points verts représentent des mutations au niveau du site de liaison de la frataxine à l'ISCU lors de la biogenèse des centres Fe-S. Le résidu Asp122 indiqué en bleu se lie au complexe des ISC et à d'autres protéines. Les points orange correspondent à des mutations touchant des résidus qui ne semblent pas être impliqués dans des liaisons avec d'autres partenaires protéiques. Les motifs de la structure secondaire de la frataxine sont indiqués au-dessus de la séquence protéique.

4. Épigénétique dans l'ataxie de Friedreich

La présence d'une expansion de triplets sur chacun des deux allèles chez les patients AF conduit à une diminution de la quantité de transcrits matures et à une réduction du taux de protéine fonctionnelle, conduisant à un taux résiduel en frataxine de l'ordre de 5 à 30%³⁷. Les parents hétérozygotes présentant une répétition GAA sur un des deux allèles ont une diminution de moitié du taux de frataxine dans des cellules buccales³⁸, suggérant un effet de seuil à partir duquel la quantité de protéine est insuffisante pour permettre le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ce taux résiduel de frataxine mature et fonctionnelle est négativement corrélé à la taille de l'expansion³⁷. En effet, moins le nombre de répétitions est important et plus la quantité de frataxine est élevée dans les lymphocytes de patients, engendrant une forme modérée d'AF³⁷.

La défaut quantitatif d'ARNm *FXN* (estimé entre 4 à 29% du taux normal³⁷) induit par l'expansion de triplets pourrait survenir suite à une altération de la transcription du gène ou à des modifications post-transcription affectant la stabilité du transcrit. Cependant, aucune modification du taux de dégradation des ARNm matures n'a été détectée chez les patients AF³⁹. L'expansion intronique n'affecte que le niveau de synthèse des transcrits dans des lymphocytes AF³⁹. Par conséquent, les mécanismes majeurs identifiés à l'origine du déficit en ARNm matures affectent à la fois le niveau de transcription et la formation de transcrits par épissage alternatif. L'effet de l'expansion GAA sur le niveau de la transcription du gène *FXN* peut être dû à la formation de structures secondaires (triplex d'ADN ou d'ARN/ADN) ainsi qu'à la présence d'une zone d'hétérochromatine au niveau du locus du gène⁴⁰. Cependant, cette liste n'est pas exhaustive et d'autres mécanismes à l'origine d'un déficit en ARNm induit par l'expansion de triplets pourraient exister.

a. Formations de triplex d'ADN et de boucles R

Les répétitions introniques GAA induisent la formation des structures inhabituelles de l'ADN qui affectent l'expression du gène *FXN*. Ces structures induisent des interactions en triplex entre pyrimidine/purine/pyrimidine (Y*R/Y) ou purine/purine/pyrimidine (R*R/Y). La structure triplex se produit lorsqu'un troisième oligonucléotide (communément appelé oligonucléotide formant le triplex ou OFT) se lie à une séquence cible de triplex dans le sillon principal de l'ADN double brin par des liaisons hydrogènes (liaison de Hoogsteen). Cette liaison contraint structurellement de manière intrinsèque la liaison entre une purine répétitive (guanine ou adénine contenue dans la séquence répétée GAA, désignée R) et une séquence complémentaire

polypyrimidique (cytosine ou thymine/uracile, séquence CTT complémentaire à l'expansion de triplet GAA, désignée Y) de manière parallèle ou antiparallèle (**Figure 2A**)^{41,42}. Ainsi, l'expansion de triplets induit des structures en triple hélice de type $(GAA)_n^*(GAA)_n/(CTT)_n$ (soit Y^*R/Y) ou $(CTT)_n^*(GAA)_n/(CTT)_n$ (soit R^*R/Y). L'astérisque représente la liaison entre le brin central et le OFT tandis que la barre représente un appariement de bases de la structure en double hélice de Watson-Crick. Ainsi, le brin d'ADN non transcrit $(GAA)_n$ ou l'ARN naissant $(CTT)_n$ peuvent se replier pour former respectivement un triplex d'ADN (aussi connu sous le nom de « ADN collant ») (**Figure 2B**)⁴³ ou un triplex ARN/ADN (communément appelé boucles R ou R-loops) (**Figure 2C**)⁴⁰.

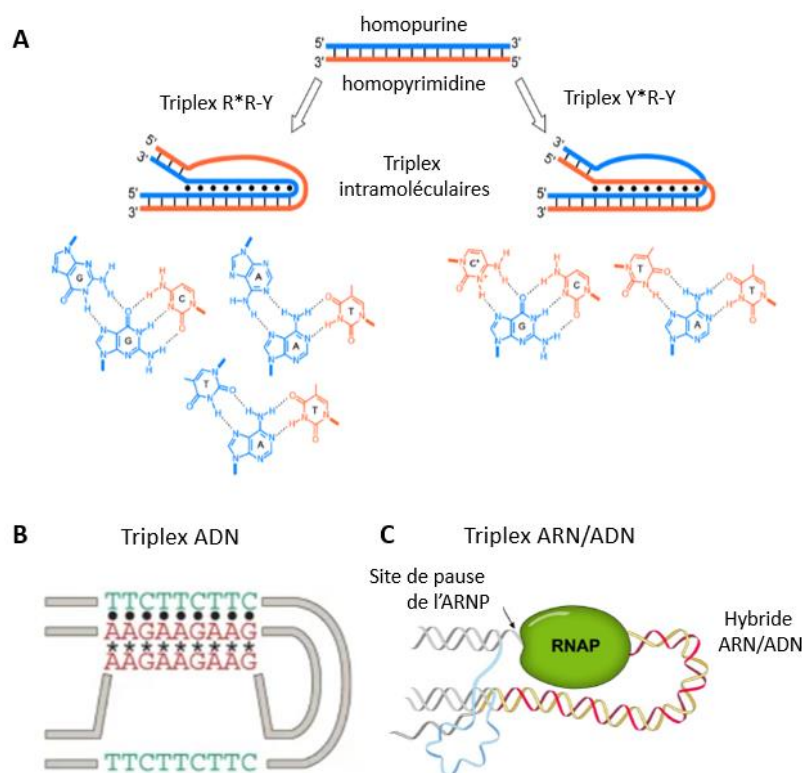


Figure 2 : Différents modèles de structures en triplex dans l'AF. (A) Exemples de triplex d'ADN intramoléculaires pouvant former deux types de structures différentes : le triplex R^*R/Y avec une interaction entre deux brins antiparallèles riches en purines ou le triplex Y^*R/Y dans lequel un brin riche en purines interagit avec un brin parallèle riche en pyrimidines⁴¹. (B) Modèle d'ADN, ou structure de l'ADN collant, formé par l'interaction entre les répétitions GAA et CTT des brins sens et antisens d'ADN ou entre le brin d'ADN non synthétisé et l'ARN naissant⁴³. Le point représente un appariement entre deux bases de la structure en double hélice de Watson-Crick tandis que l'étoile indique la liaison hydrogène supplémentaire (liaison de Hoogsteen). (C) Modèle de triplex ARN/ADN avec l'ARN polymérase (RNAP). Cette dernière se retrouve ainsi piégée à la fin de l'expansion de triplets⁴⁰.

L'utilisation de polyamides capables de se lier au niveau des séquences répétées GAA permet de bloquer la formation de triplex ADN afin d'augmenter la transcription de *FXN*⁴⁴. De plus, la

formation de triplex ARN/ADN lors de la transcription bloque l'ARN polymérase à la fin de la répétition afin de stopper sa progression. Ces structures en triplex séquestrent les facteurs de transcription ainsi que l'ARN polymérase au sein de leur complexe par des liaisons directes avec l'ADN, ayant pour conséquence d'empêcher ou d'interrompre la transcription du gène *FXN*^{45,46}.

Par conséquent, les structures triplex inter ou intramoléculaires inhibent la transcription de *FXN* en constituant un bloc à l'élongation de la transcription via la séquestration de l'ARN polymérase⁴⁷ ou en interférant avec des facteurs de trans-activation de la transcription⁴⁸. Une corrélation a été décrite entre la longueur de l'expansion GAA et la formation de l'ADN collant, suggérant l'implication de cette structure dans l'étiologie de la maladie⁴⁵. Cependant, les preuves directes de la formation de triplex ARN/ADN restent encore à démontrer. Seule la surexpression d'enzymes de réparation des mésappariements a été rapportée dans des cellules iPSCs dérivées de patients, en cohérence avec la présence de conformation inhabituelle d'ADN⁴⁹. Bien qu'un niveau réduit de transcrit *FXN* soit observé dans divers modèles cellulaires et murins⁵⁰, l'inhibition constante de l'élongation de la transcription reste à confirmer *in vitro* et *in vivo*.

b. Compaction de la chromatine au niveau du locus

Les régions flanquant l'expansion GAA dans le gène *FXN* sont enrichies en marques épigénétiques caractéristiques de régions répressives du génome. La présence de méthylation constitue l'une des premières marques d'hétérochromatisation. Cependant, les répétitions GAA ne contiennent pas de résidus CpG. Des travaux portant sur la structure de la chromatine ont mis en évidence qu'une expansion de 200 GAA conférait une variabilité de l'expression du gène rapporteur *in vivo* dans un modèle murin, par un mécanisme analogue à la variabilité de l'effet de position (VEP) décrite chez la *Drosophile*⁵¹. Malgré l'absence de méthylation, l'expansion pourrait déclencher la formation d'hétérochromatine qui se propagerait aux séquences adjacentes. En effet, il existe trois sites CpG dans le promoteur du gène *FXN* ainsi qu'un site CpG dans l'exon 1. Une diminution de l'acétylation des histones H3 lysine K9 (H3K9) ainsi que leur hyperméthylation en amont de l'expansion ont été rapportées dans les tissus cérébraux de patients AF et de souris⁵², confirmant la présence d'une zone d'hétérochromatine au locus.

L'analyse de séquences adjacentes aux répétitions GAA a révélé un changement dans le profil de méthylation de l'ADN des allèles AF. Les zones situées en amont de l'expansion sont

constamment hyperméthylées tandis que celles localisées en aval deviennent hypométhylées (**Figure 3**). L'hyperméthylation des lysines K9 permet d'établir des sites de liaisons pour la protéine d'hétérochromatisation HP1 β (*heterochromatin protein 1 beta*) qui se retrouve largement surexprimée dans un modèle de souris avec expansion GAA⁵¹. D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité histone désacétylase (HDAC) ou méthyltransférase sur des cellules de patients ou un modèle murin AF permet de restaurer l'expression du gène *FXN* de manière dose dépendante^{53,54}. Ainsi, la répression transcriptionnelle induite par l'expansion GAA semble se propager vers l'extrémité 5' du gène *FXN*, étendant ainsi la zone de condensation de la chromatine.

Une relation directe entre la longueur de l'expansion et l'étendue de la région de méthylation de l'ADN ainsi que l'extinction du promoteur du gène *FXN* ont été décrites dans des leucocytes de patients AF^{55,56}. En effet, les cellules lymphoblastiques contenant une expansion intronique supérieure à 400 répétitions GAA ont une extinction sévère de cette région promotrice⁵⁶. D'autre part, l'hyperméthylation conduit à la formation d'hétérochromatine compacte bloquant la liaison des facteurs de transcription sur leurs sites de prédilection⁵⁵. Par conséquent, un défaut d'accumulation de transcrit *FXN* dû à une diminution de l'activité promotrice entrave l'étape d'initiation de la transcription.

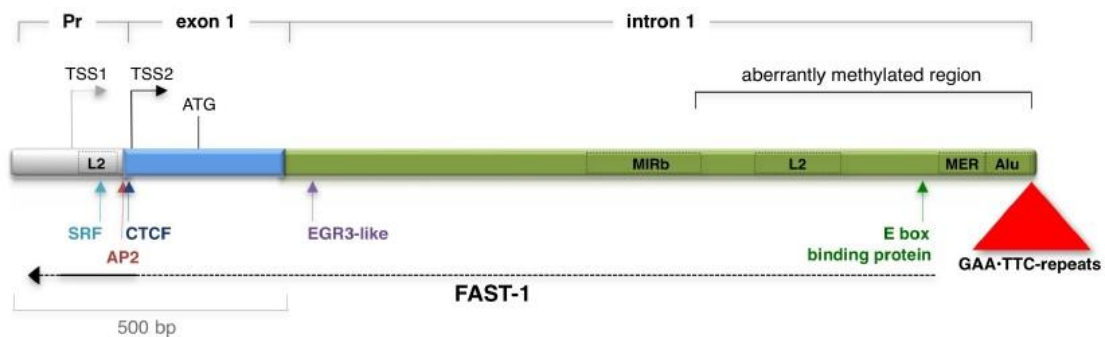


Figure 3 : Composition de la région 5' du gène *FXN*, composé du promoteur, de l'exon 1 et de l'extrémité proximale de l'intron 1⁴⁰. Les TSS1 et 2 font référence aux sites d'initiations de la transcription. La position des répétitions de triplets GAA est indiquée par un triangle rouge. La flèche noire en pointillée indique l'étendue de la transcription antisens de *FXN* (FAST-1). Les flèches montrent les emplacements des sites de liaisons du facteur de réponse sérique (SRF), de la protéine d'activation 2 (AP2) et du facteur de liaison CCCTC (CTCF), de la protéine de réponse de croissance précoce 3 (EGR3-like) et de la protéine de liaison à la box E (*E box binding protein*) qui se sont révélés être des régulateurs positifs de l'expression de *FXN*. La région de méthylation de l'ADN est également indiquée par une encoche noire à proximité de la mutation à expansion de triplets.

Face à cette intensité de marque épigénétique répressive au locus *FXN*, l'apparition de mécanismes de « sauvegarde » a été mise en évidence dans des cellules lymphoblastiques de

patients AF⁵⁷. La présence de répétitions induit le recrutement d'origines de réplication dormantes au sein du gène causant un changement directionnel de la fourche de réplication⁵⁷. L'activation des origines dormantes est un évènement rare et stochastique survenant dans des conditions de stress réplicatif comme lorsque la fourche est ralentie ou stoppée. La réplication des allèles avec expansion GAA est plus lente et retardée durant la première moitié de la phase S comparée aux allèles sauvages. De nombreuses pauses et arrêts transitoires de la fourche de réplication ont également été rapportés dans une région de 850 kb autour de l'expansion de triplets. Des changements dans le choix de l'origine dormante se sont ainsi produits à plusieurs kilobases en amont et en aval de la répétition GAA, avec une augmentation importante de l'activation des origines situées en aval de la mutation. Cette activation d'origines dormantes notamment sur les brins retardés AF permettrait ainsi d'augmenter le nombre de fourches de réplifications actives au niveau de la région d'expansion GAA. Par conséquent, les problèmes d'extinction de la région promotrice et de stagnation des fourches liées à des mécanismes épigénétiques peuvent être en partie résolus par l'activation d'origines dormantes considérées comme un phénomène de sauvetage de la réplication du gène *FXN*.

c. Altération de l'épissage alternatif

Malgré ces efforts de résolution du processus de réplication, les transcrits *FXN* produits en faible quantité subissent de nombreuses erreurs d'épissage alternatif. En effet, la construction d'un minigène *FXN* (contenant l'exon 1, l'intron 1 et l'exon 2) dans des cellules HeLa ainsi que l'insertion d'un gène chimérique URA3 contenant une cassette d'au moins 100 GAA chez la levure ont permis de mettre en évidence que le déficit en ARNm mature résulte d'un défaut d'épissage de l'intron 1 dû à une augmentation de la taille de l'intron^{58,59}. Aucune réduction de la quantité de transcrits n'a été détectée pour des expansions inférieures à 10 GAA. En revanche, un défaut d'épissage commence à apparaître à partir d'une répétition de 46 GAA et s'accroît avec la longueur de l'expansion⁶⁰. En effet, un nombre de répétitions GAA supérieures à 90 induit une délocalisation des facteurs d'épissage de part et d'autre du premier intron de l'ARN pré-messager *FXN* ne pouvant ainsi pas éliminer cette région intronique (

Figure 4)^{40,58}. Le transcrit naissant se retrouve ainsi fortement instable et sera rapidement dégradé par les mécanismes de contrôle.

L'étude de la localisation de l'expansion au sein de l'intron du gène *FXN* a permis de démontrer que des répétitions situées aux extrémités introniques n'affectent pas le processus d'épissage des pré-ARNm. Seule une position centrale de triplets (GAA)₁₀₀ a montré une baisse significative du taux de transcrits matures produits⁵⁸. De plus, aucune variation de l'expression du gène *FXN* n'a été détectée par insertion de répétition CTT^{58,60}. Ainsi, l'expansion de triplets GAA au centre du premier intron de *FXN* induit une diminution d'expression de ce gène par un défaut d'épissage alternatif. Ce phénomène dépend de la position et de la taille de cette expansion.

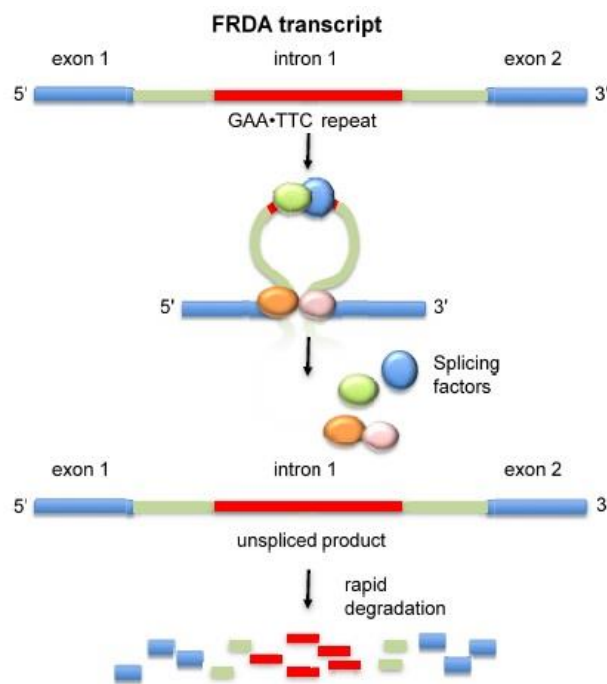


Figure 4 : Modèle d'épissage alternatif dans l'ataxie de Friedreich⁴⁰. L'expansion intronique GAA, marquée en rouge, induit une délocalisation des facteurs d'épissage (représentés par des ronds de différentes couleurs) en dehors des sites de jonctions exoniques, empêchant l'élimination de l'intron 1. Cet épissage anormal aboutit à la dégradation du transcrit.

d. Extinction du gène *PIP5K1B*

La capacité de l'expansion GAA à générer une inactivité de la chromatine au locus *FXN* dans un contexte d'AF a de plus amples conséquences sur le paysage génomique alentour. Une extinction en *cis* d'un gène voisin, *PIP5K1B* (*phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type I beta*), a été rapportée à la fois dans les cellules sanguines et dans les fibroblastes de patients AF⁶¹. *PIP5K1B* est situé à 26 kb en amont du gène *FXN* et dans la même orientation transcriptionnelle (**Figure 5**) tandis que les autres gènes avoisinants tels que les gènes *PRKACG* (*protein kinase cAMP-activated catalytic subunit gamma*) et *TJP2* (*tight junction protein 2*)

localisés respectivement en amont et en aval du gène *FXN* à environ 20 kb ne sont pas affectés par l'expansion de triplets⁶¹. De plus, la taille de l'expansion GAA est corrélée positivement au degré d'extinction du gène *PIP5K1B*. En effet, des fibroblastes de patients ayant une expansion d'environ 3000 pb ont une diminution de la quantité d'ARNm et de protéine pip5k1β plus prononcée que les cellules de patients contenant seulement une expansion de 2000 pb⁶¹.

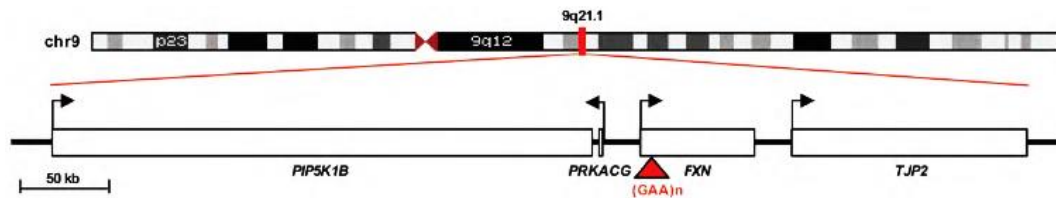


Figure 5 : Carte chromosomique du locus *FXN* avec les gènes avoisinants⁶¹. Le site intronique contenant les expansions GAA causant l'AF est marqué en rouge. L'orientation de la transcription des gènes est indiquée par une flèche.

La famille de phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases de type 1 (PIP5K1) regroupe trois isoenzymes pip5k1α, pip5k1β et pip5k1γ encodées respectivement par les gènes *PIP5K1A* (chr1q21.3), *PIP5K1B* (chr9q21.11) et *PIP5K1C* (chr19p13.3). Ces trois isoformes sont responsables de la synthèse du pool cellulaire de phosphatidylinositol 4-5 biphosphate (PtdIns(4,5)P₂ ou PI(4,5)P₂) à partir de phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P). Les enzymes PIP5K1 forment des homo ou hétérodimères entre-elles. En effet, l'étude de cellules humaines *in vitro* a montré la présence d'hétérodimères pip5k1α/ pip5k1β et pip5k1β/ pip5k1γ ainsi que des homodimères pip5k1β/ pip5k1β⁶².

PI(4,5)P₂ est très abondant dans la membrane plasmique en constituant près de 1 à 3% des lipides membranaires. PI(4,5)P₂ est impliqué dans de nombreux processus cellulaires en tant que régulateur direct de l'activité et de la localisation subcellulaire de nombreuses protéines de liaison à l'actine⁶¹. Une diminution de l'expression de Pip5k1β dans des cellules de patients AF entraîne une déstabilisation du réseau d'actine⁶¹ alors que sa dimérisation est indépendante du remodelage du cytosquelette d'actine⁶². La mutation de la partie N-terminale de pip5k1β induit une diminution de la production de PI(4,5)P₂ sans que son attachement à la monocouche lipidique ne soit affecté⁶².

De plus, PI(4,5)P₂ a un rôle central pour initier le processus d'endocytose dépendant de la présence d'un manteau de clathrine. Sa concentration est finement régulée lors du processus d'endocytose. En effet, le taux de PI(4,5)P₂ augmente lors de l'assemblage de la vésicule pour ensuite diminuer lors de son désassemblage⁶³. La déplétion de PI(4,5)P₂ entraîne la disparition des zones de clathrine ainsi que l'inhibition de l'assemblage de filaments d'actine au niveau

des sites d'endocytose⁶³. La présence de PI(4,5)P₂ a également été décrite au sein du réticulum endoplasmique et dans des endosomes tardifs. Sa présence serait permise grâce à l'activité de la protéine pip5k1 γ localisée dans ces mêmes structures et il joue un rôle clé dans l'étape d'initiation de l'autophagie⁶⁴. Ainsi, le PI(4,5)P₂ est impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires notamment dans la dynamique du cytosquelette⁶¹, la motilité cellulaire, le trafic des vésicules mais aussi dans la transcription de gènes.

Des études ont révélé que les phosphatidylinositol (PIP5K) nucléaires régulent l'exportation de l'ARNm, l'expression des gènes et la réparation de l'ADN. Pip5k1 α peut être modifiée par ajout un groupement SUMO au niveau d'une lysine (Lys 490). La sumoylation de pip5k1 α est importante pour son interaction avec des composants du complexe d'hétérochromatine : H3K9 méthylé et la protéine HP1 α ⁶⁵. Par conséquent, les enzymes PIP5K jouent un rôle épigénétique substantiel dans l'extinction de l'expression de gènes.

5. La frataxine

a. Caractéristiques structurales et physico-chimiques

a.1. Conservation et stabilité

La frataxine est une petite protéine mitochondriale essentielle et hautement conservée (**Figure 6**). Comme toutes les protéines mitochondriales, cette protéine est ubiquitaire mais exprimée à des taux relativement faibles. Cependant, son expression est plus importante dans les ganglions de la racine dorsale (GRD), dans la couche granuleuse du cervelet ainsi que dans les tissus ayant une haute demande énergétique (le cœur, le foie, les muscles squelettiques, la graisse brune et le pancréas)⁴⁰.

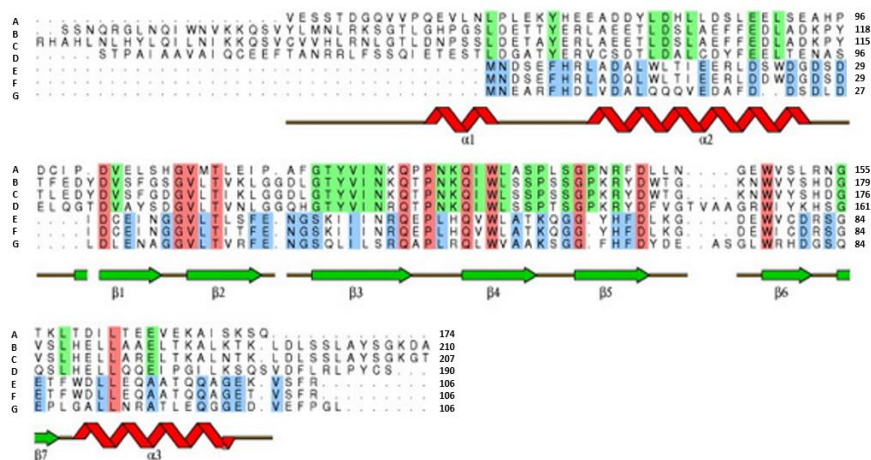


Figure 6 : Alignement de la séquence d'acides aminés de la frataxine provenant de la levure (A), de l'homme (B), de la souris (C), de la drosophile (D) et de bactéries issues de *S. typhimurium* (E), *E.Coli* (F) et *P.*

aeruginosa (G) adapté de Karlberg *et al.* ⁶⁶. Les résidus conservés uniquement dans les séquences eucaryotes sont surlignés en vert. Les résidus présents spécifiquement dans les séquences bactériennes sont marqués en bleu. Les résidus invariants sont surlignés en rouge. Les positions des éléments de la structure secondaire de la protéine sont indiquées en bas de l'alignement de la séquence avec les feuilletts bêta représentés en vert et les hélices alpha en rouge.

La stabilité d'une protéine est établie sur la base de sa température de fusion moléculaire, communément appelée T_m. Le T_m correspond à la température à laquelle la moitié de la protéine est dénaturée. La forme mature et fonctionnelle de la frataxine humaine a une demi-vie d'environ 50h *in vitro*⁶⁷ avec une température de fusion autour de 60°C. Cette T_m reste quasi-inchangée pour les homologues de la frataxine Cya Y et Ct respectivement retrouvés chez la bactérie *E. coli* et le champignon thermophile *Chaetomium thermophilum* avec une T_m avoisinant les 65°C⁶⁸. De manière intéressante, la présence de cations (calcium, fer, ...) fait varier la T_m entre 58 et 65°C dans ces organismes eucaryotes^{68,69}. En revanche, la température de fusion de l'homologue levure, Yfh1, est plus basse que dans les autres modèles avec un T_m proche de 35°C⁶⁹. Ce phénomène peut s'expliquer par des longueurs variables des extrémités N et C-terminales. Les températures de fusion pour une version N-terminale normale ou étendue sont comparables, suggérant que la queue N-terminale ne joue aucun rôle dans la stabilité de la protéine. Néanmoins, la levure possède l'extrémité C-terminale la plus courte que ces orthologues bactériens, murins et humains avec seulement quatre résidus présents. On remarque également l'absence de résidus hautement conservés tels que les leucines 198 et 200 chez la levure.

La mutation de résidus de la partie C-terminale de CyaY (1-103) montre une diminution importante de la stabilité thermique, comparable à celle de Yfh1⁷⁰. De plus, l'ajout de résidus hydrophobes de la séquence de la frataxine humaine (Asp-Leu-Ser) a permis d'augmenter de 6°C la température de fusion de la protéine mutante Yfh1⁷⁰. Par conséquent, la longueur de la partie C-terminale ainsi que la conservation de certains résidus hydrophobes déterminent la stabilité de la frataxine *in vitro*.

a.2. Location et maturation

La frataxine humaine est une protéine de 210 acides aminés qui est synthétisée dans le cytosol en tant que précurseur (1-210, 24 kDa, t_{1/2}: environ de 10 min⁶⁷) puis importé dans la mitochondrie grâce à la présence d'un peptide signal d'import mitochondrial (mTP) d'une quarantaine d'acides aminés situé dans la partie N-terminale (acides aminés 1-41, mTP : MWTLGRRVAVAGLLASPSQAQTLTRVPRPAELAPLCGRRG). Deux étapes protéolytiques sont nécessaires au sein de la mitochondrie pour générer la forme mature de la

frataxine. Ces clivages entraînent la production de trois isoformes de longueurs différentes au niveau de la partie N-terminale et ayant des propriétés structurales distinctes. Les isoformes de la frataxine sont générées par l'action de la sous-unité bêta de la protéine MPP (*Mitochondrial processing peptidase*) au sein de la mitochondrie⁷¹. Le premier clivage a lieu entre la glycine 41 et la lysine 42 pour former une première isoforme intermédiaire (42-210, 19 kDa, $t_{1/2}$: environ 2h⁶⁷). Une seconde coupure entre la lysine 80 et la sérine 81 permet de générer la forme mature et fonctionnelle de la frataxine⁷¹ (81-210, 14 kDa, $t_{1/2}$: environ 50 h⁶⁷). La frataxine se localise ainsi dans la matrice mitochondriale où elle est associée à la membrane interne des mitochondries⁴.

L'isoforme la plus longue (41-210) est sujette à l'oligomérisation et elle est très abondante dans le cœur et le cervelet en cours de division. Dans la levure, l'isoforme majoritaire Yfh1 (52-174) est détectée dans la mitochondrie sous forme de trimère. Des conditions de stress ou une surexpression importante de cette protéine pourraient conduire à la formation d'oligomères. Effectivement, des isoformes additionnelles de la frataxine humaine considérées comme des formes tronquées (56-210 de 14,5 kDa et 78-210 à 14,2 kDa) ont été rapportées *in vivo* et *in vitro* lorsque le processus normal de maturation est altéré^{72,73}. Ces données suggèrent l'existence de mécanismes de contrôles protéolytiques régulant la taille de la protéine mature.

a.3. Structure

La structure de la frataxine humaine et de ces orthologues bactériens (Cya Y) ou levures (Yfh1) a pu être établie à partir d'études cristallographiques^{74,75} ou par des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN)⁷⁶. Le repliement de la frataxine est unique. Il est caractérisé par une forme globulaire et un motif en sandwich α - β comprenant cinq feuillets β antiparallèles bordés de deux hélices terminales α localisées respectivement dans les parties N- et C-terminales (**Figure 7**). Cette structure permet d'établir deux plans distincts : l'un étant constitué uniquement de brins α et l'autre seulement des feuillets β .

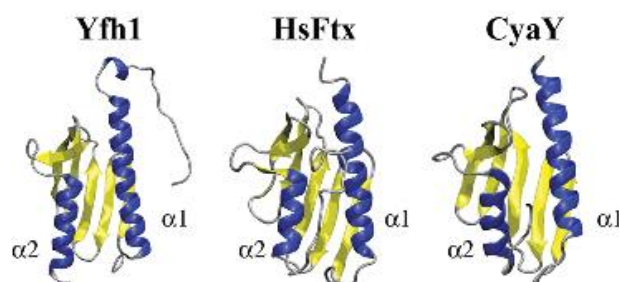


Figure 7 : Structures de la frataxine humaine (HsFtx), de levure (Yfh1) et de bactérie (CyaY)⁷⁷.

Les résidus de charge négative sont présents à la surface de la protéine tandis que les résidus non chargés localisés à la surface des feuillets β sont situés dans le corps protéique. Cette région non ionisée à pH physiologique constitue la zone la plus conservée de la protéine (127-182) au cours de l'évolution, s'étendant du premier au dernier brin β (β 1- β 5)⁷⁰. Les autres parties de la protéine constituant les régions N- et C-terminales ont des longueurs variables selon les organismes afin d'adapter la localisation et la stabilité de la protéine.

Une région importante pour le repliement de la frataxine est la structure dite « acide » car elle comprend un ensemble de résidus acides localisés dans la première hélice α (α 1) ainsi que sur le bord du premier brin β (β 1). Ces charges négatives ont été prédites pour avoir un rôle fonctionnel de liaison avec le fer. En effet, la délétion d'au moins cinq résidus conservés dans cette région diminue fortement l'affinité de Yfh1 pour le fer sans entraver sa capacité de liaison⁷⁸. De plus, les mutations de résidus présents dans le feuillet β (N122, K123 et Q124) affectent l'interaction de la frataxine avec une protéine des premières étapes de la biogenèse des centres Fe-S, la protéine Isu. Cependant, cette région a également une importance structurale en entravant la stabilité de la protéine. Effectivement, une délétion de cette zone homologue chez la levure entraîne une augmentation spectaculaire de la stabilité de Yfh1⁷⁸.

La frataxine est capable de subir des réactions d'oligomérisation afin de s'assembler en structures plus complexes telles que des trimères, des hexamères voire parfois des assemblages de 24 ou 48 mères⁷⁹. Néanmoins, la pertinence fonctionnelle d'une telle conformation n'a pas été démontrée *in vivo*.

Enfin, le positionnement des mutations ponctuelles dans la structure cristallographique de la frataxine a permis de mieux appréhender l'importance fonctionnelle de certaines régions et de les corrélérer à la sévérité de la maladie. Les variants I154F et W155R affectant des acides aminés des feuillets β du corps de la protéine induisent une perte de stabilité thermodynamique de la frataxine³⁰ tandis que des mutations plus précoces D122Y et G130V provoquent une altération de la fonction de la frataxine en diminuant son interaction avec le fer Fe²⁺⁸⁰. Enfin, les variants N146K, Q148R et R165C affectent la liaison de la frataxine au complexe ISCU d'initiation de la synthèse des centres Fe-S⁸⁰. Les mutations faux-sens qui altèrent la fonction de la protéine ont en général des phénotypes plus sévères que des mutations occasionnant une baisse de stabilité.

b. Caractéristiques fonctionnelles

Le rôle déterminant de la frataxine dans la survie cellulaire se reflète par la létalité embryonnaire précoce observée chez les souris KO *FXN*³⁶. La frataxine est impliquée dans la biogenèse des centres Fe-S (ISC) dans la mitochondrie. Ces structures inorganiques sont des cofacteurs essentiels de plusieurs enzymes du métabolisme de la mitochondrie, du cytosol ou du noyau. Bien que son rôle précis ne soit actuellement pas encore bien compris, de nombreuses données biochimiques ainsi que la détermination de la structure de plusieurs homologues de la frataxine ont contribué à des progrès substantiels dans la compréhension de sa fonction. Cependant, d'autres fonctions de la frataxine dans la synthèse de l'hème, la détection, le transport ou le stockage du fer ainsi que sa protection contre des réactifs de l'oxygène restent encore controversés.

b.1. Fonction dans la biogenèse des centres Fe-S

La mitochondrie est un organe important pour l'utilisation du fer cellulaire par la génération des ISC, la synthèse de l'hème ou le stockage du fer mitochondrial. Ces processus métaboliques sont indispensables pour la survie cellulaire. Les ISC sont des groupements prosthétiques se liant à de nombreuses protéines mitochondriales, cytosoliques, ou nucléaires au niveau de résidus cystéines. Ces protéines à centres Fe-S jouent un rôle majeur dans divers processus cellulaires vitaux tels que le transfert d'électrons, le métabolisme cellulaire en tant que catalyseur réactionnel, la régulation de l'homéostasie du fer et de l'expression des gènes (**Tableau 1**) ainsi que dans la chaîne respiratoire (**Figure 8**)^{81,82}.

Tableau 1 : Liste des protéines à centre Fe-S.

Protéines	Type	Localisation cellulaire	Type d'ISC	Fonction
ADN hélicases	DDX11	Nucléaire	[4Fe-4S]	Réplication et réparation de l'ADN
	ERCC2	Nucléaire	[4Fe-4S]	Transcription et réparation de l'ADN
	RTEL1	Nucléaire	[4Fe-4S]	Hélicase ADN
	BRIP1	Nucléaire	[4Fe-4S]	Hélicase ADN
	FANCF	Nucléaire	[4Fe-4S]	Hélicase ADN
ADN polymérases	POLD1	Nucléaire	[4Fe-4S]	Synthèse et réparation de l'ADN
	POLA1	Nucléaire	[4Fe-4S]	Initiation de la synthèse de l'ADN
	POLE	Nucléaire	[4Fe-4S]	Réplication de l'ADN
	REV3L	Nucléaire	[4Fe-4S]	Synthèse de l'ADN
	PRIM2	Nucléaire	[4Fe-4S]	Primase de l'ADN
	DNA2	Nucléaire	[4Fe-4S]	Réplication et réparation de l'ADN

Elongation de l'ARN	ELP3	Nucléaire	[4Fe-4S]	Composant du complexe de l'ARN polymérase II et modification des ARNt	
Excision de l'ADN ou exonucléases	EXO5	Nucléaire	[4Fe-4S]	Réparation de l'ADN	
	CPSF4	Nucléaire	[4Fe-4S]	Facteur de polyadénylation	
	MUTYH	Nucléaire	[4Fe-4S]	Réparation de l'ADN oxydé	
	NTHL1	Nucléaire	[4Fe-4S]	Réparation d'excision de base (BER)	
Assemblage des centres Fe-S cytosoliques	CIAPIN1	Cytosolique	[2Fe-2S]	Maturation Fe-S cytosolique	
	NUBP1	Cytosolique	[4Fe-4S]	Maturation Fe-S cytosolique	
	NUBP2	Cytosolique	[4Fe-4S]	Maturation Fe-S cytosolique	
	GRLX3/ BOLA3	Cytosolique	[2Fe-2S]	Insertion Fe-S à des protéines	
	MOCS1	Cytosolique	[4Fe-4S]	Lyase convertissant le GTP en cPMP	
Métabolisme cytosolique	ABCE1	Cytosolique	[4Fe-4S]	Régulation des ARNm	
	ACO1	Cytosolique	[4Fe-4S]	Régulation de l'homéostasie du fer	
	PPAT	Cytosolique	[4Fe-4S]	Catalyse la conversion de L-glutamate en L-glutamine	
Métabolisme des nucléotides et des acides aminés	CISD1-2	Cytosolique	[2Fe-2S]	Réaction redox	
	XDH	Cytosolique	[2Fe-2S]	Dégradation des purines	
	GPAT	Cytosolique	[4Fe-4S]	Biosynthèse des glycérolipides : Estérification des groupements acyls	
	DPYD1-2	Cytosolique	[4Fe-4S]	Dégradation des bases pyrimidiques et traduction	
	AOX1	Cytosolique	[2Fe-2S]	Réaction redox et production d'oxyde nitrique (NO)	
Chaîne respiratoire	NUBPL	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Sous-unité CI	
	NDUFS8	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Sous-unité CI	
	NDUFS1	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Sous-unité CI	
	NDUFS2	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Sous-unité CI	
	NDUFS7	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Sous-unité CI	
	NDUFV1-2	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Sous-unité CI	
	SDHB	Mitochondriale	[2Fe-2S]	Sous-unité CII	
	UQCRCF1	Mitochondriale	[2Fe-2S]	Sous-unité CIII	
	UQCRCF1P1	Mitochondriale	[2Fe-2S]	Sous-unité CIII	
Métabolisme mitochondrial	FDX1	Mitochondriale	[2Fe-2S]	Synthèse des hormones stéroïdes	
	FDX2	Mitochondriale	[2Fe-2S]	Synthèse ISC et de l'hème	
	RSAD1	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Synthèse de l'hème	
	CISD3	Mitochondriale	[2Fe-2S]	Réactions redox	
	ETFDH	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Transfert d'électrons	
	LIAS	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Lipoylation des protéines	
	GLRX5	Mitochondriale	[2Fe-2S]	Biogenèse des ISC	
	ACO2	Mitochondriale	[4Fe-4S]	Cycle de Krebs	
	Métabolisme du réticulum endoplasmique	CDKAL1	Réticulum endoplasmique	[4Fe-4S]	Modification des ARNt : catalyse la méthylthiolation de N6-t ₅ A en m ₂ t ₆ A
		TYW1	Réticulum endoplasmique	[4Fe-4S]	Modification des ARNt : catalyse la condensation de N-méthylguanine
RSAD2		Réticulum endoplasmique et	[4Fe-4S]	Réponse antivirale par la production d'interféron	

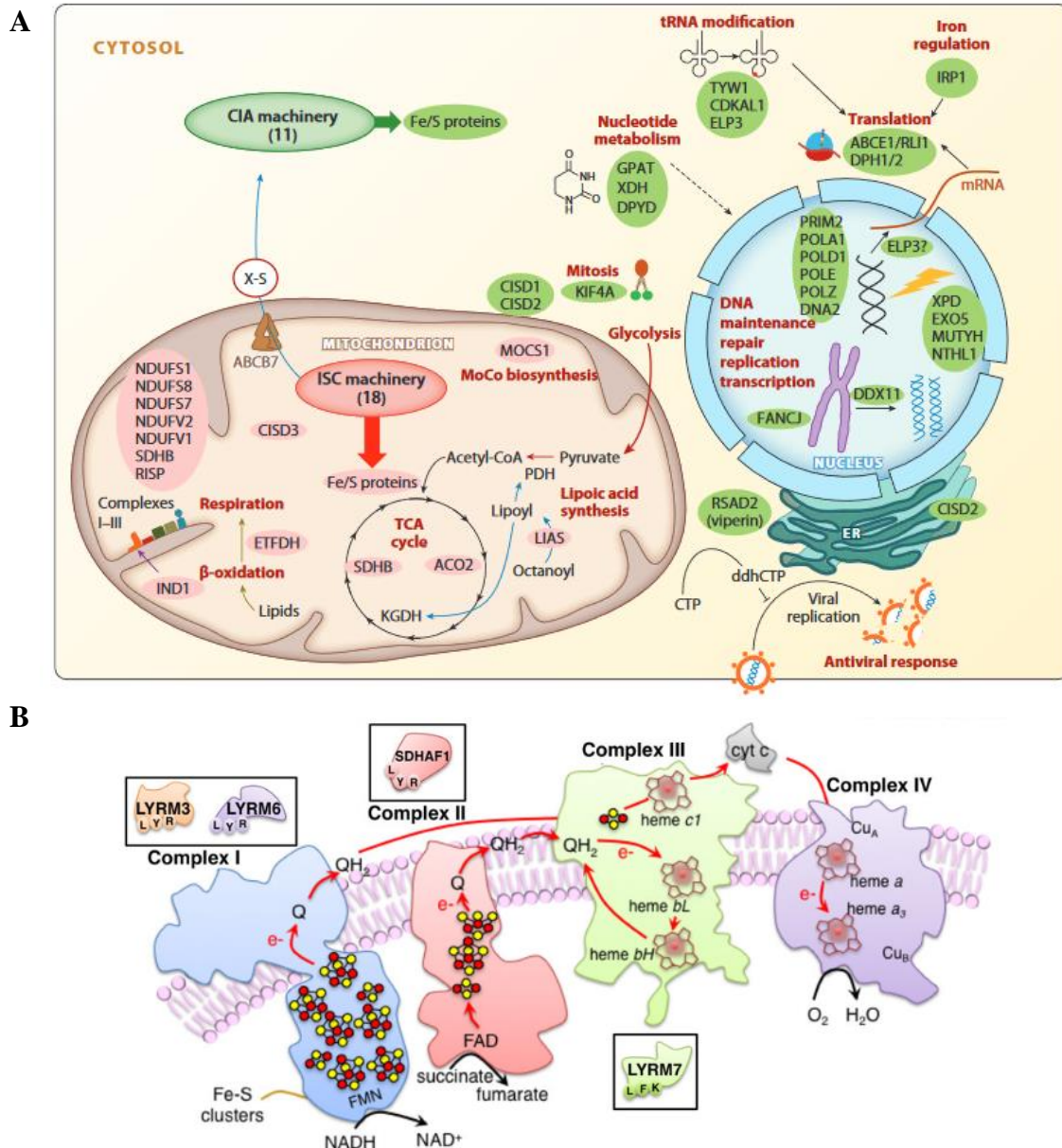


Figure 8 : Rôles des protéines à centre Fe-S dans différentes voies métaboliques (A)⁸³ et les complexes de la chaîne respiratoire (B)⁸⁴. (A) Les protéines mitochondriales à centre Fe-S (entourées en rose) sont impliquées dans la chaîne respiratoire (CI-CIII), la β -oxydation des acides gras, la synthèse de l'acide lipoïque, le cycle de Krebs et la biosynthèse du cofacteur Molybdène (Moco). Les protéines à centres Fe-S cytosoliques et nucléaires (entourées en vert) sont impliquées dans l'homéostasie du fer, la traduction, la mitose, la défense antivirale aussi bien que dans la maintenance, la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. (B) Complexes de la chaîne respiratoire possédant des protéines à centre Fe-S.

La biogenèse des ISC s'effectue en deux phases : la synthèse *de novo* de groupes Fe-S au sein d'un complexe de protéines échafaudage (ISCU) et le transfert des groupements Fe-S sur les protéines cibles (**Figure 9**). Ces ISC sont composés de fer non hémunique ainsi que de sulfure inorganique se retrouvant principalement sous deux formes majoritaires chez les mammifères : la forme rhombique constituée de deux atomes de fer et deux atomes de soufre [2Fe-2S] ou la

forme cubique composée de quatre atomes de fer et quatre atomes de soufre [4Fe-4S]⁸⁵. La première étape de la synthèse des ISC consiste en l'assemblage d'un complexe de cystéines désulfurases (NFS1/ISD11) sur la protéine d'échafaudage ISCU. Ce complexe permet d'apporter le soufre nécessaire à la formation des ISC grâce à la formation de persulfure de soufre au niveau de résidus cystéines⁸⁶. L'arrivée d'une ferrédoxine réductase (FDXR ou adrénodoxine réductase) sur le complexe réduit le groupement SO du persulfure en soufre S₂⁻ pour son incorporation dans les centres Fe-S. Cette étape nécessite un transfert d'électrons qui est assuré par la ferredoxidase réductase ainsi que les ferrédoxines (FDX1-2) présentes dans la machinerie d'assemblage. Du fer est également livré au niveau des protéines d'échafaudage pour la synthèse *de novo* des centres Fe-S⁸⁷.

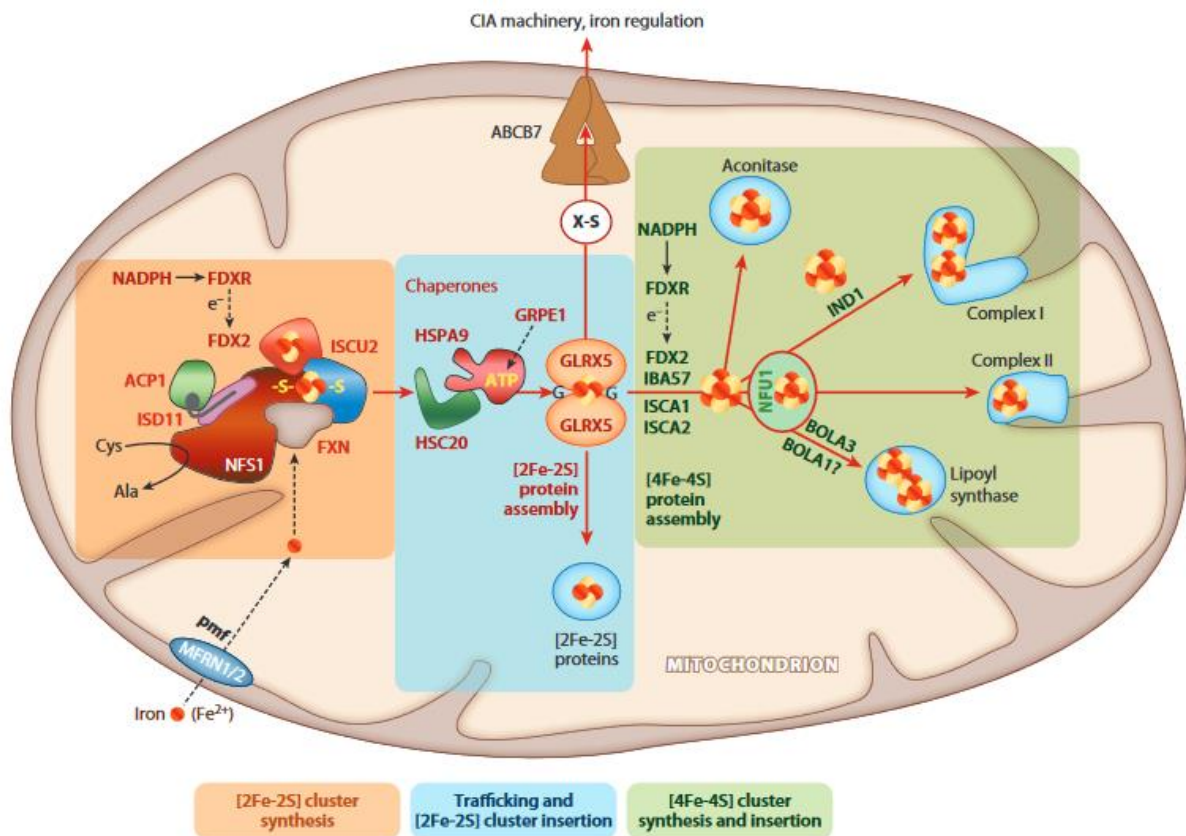


Figure 9 : Biogenèse des centres Fe-S⁸³.

Le fer est importé dans la mitochondrie grâce à des transporteurs membranaires, les mitoferrines 1 et 2 (MFRN1-2). La première étape (encadrée en orange) de la synthèse des ISC consiste à l'assemblage *de novo* d'un centre [2Fe-2S] sur la protéine d'échafaudage ISCU2. La protéine NFS1 est sous forme de dimère sur laquelle des monomères d'ISCU2 s'assemblent pour former la structure principale d'assemblage des ISC. Cette synthèse implique également cinq autres protéines, dont le complexe de désulfurase NFS1-ISD11-ACP1 fournissant les atomes de soufre. La frataxine ainsi d'une chaîne de transfert d'électrons (e⁻) impliquant des ferrédoxines réductases (FDXR et FDX2) viennent se lier dans le complexe de base entre les protéines NFS1 et ISCU. Dans la deuxième étape (encadrée en bleue), un complexe formé des protéines chaperons HSPA9, HSC20 et GRPE1 facilite le transfert du centre [2Fe-2S] synthétisé *de novo* de la protéine d'échafaudage ISCU2 sur la glutaredoxine monothiol (GRLX5). Cette dernière transfère ensuite le centre [2Fe-2S] à d'autres protéines (ISCA1-2 et IBA57)

intervenant dans la dernière étape de la biogenèse ou à des apoprotéines réceptrices. La présence d'un motif LYR (Leu-Tyr-Arg) sur les protéines réceptrices constitue le site de liaison à la protéine HSC20 lors du transfert des ISC dans le complexe avec l'holo-ISCU et la chaperon HSPA9. Ces protéines d'action tardive permettent la synthèse des centres [4Fe-4S] ainsi que le transfert sur les apoprotéines réceptrices via un apport d'électrons par la ferrédoxine FDX2 et l'implication de certaines protéines de transfert telles que NFU1 et IND1 (encadré en vert). Les protéines BOLA sont impliquées dans le transfert du centre Fe-S et la maturation de la lipoyl synthase (LIAS). A noter que les protéines des deux premières étapes de la biogenèse des ISC permettent également la synthèse d'un facteur contenant du soufre (X-S). Ce facteur est un composant essentiel du mécanisme d'assemblage des ISC cytosoliques (CIA).

L'assemblage des ISC générés dans la mitochondrie sur des apoprotéines peut s'effectuer directement au sein de ce compartiment via la présence d'un complexe de protéines chaperons Hsp70, Hsp66, Hsp20, GrpE et GLRX5. Cependant certaines protéines telles que ACO2, HCS, et LIAS requièrent la présence de protéines spécifiques pour le transfert du centre Fe-S (ISCA1-2 et IBA57)⁸¹. La machinerie ISC permet également de générer des groupements X-S qui sont exportés de la mitochondrie par les protéines ABCB7 (*ATP-binding cassette protein B7*) pour être pris en charge par la machinerie d'assemblage des ISC cytosoliques (CIA). Cette dernière incorpore du fer cytosolique pour la biogenèse des centres Fe-S et le transfert sur des apoprotéines cytosoliques ou nucléaires (**Figure 10**)^{81,87}.

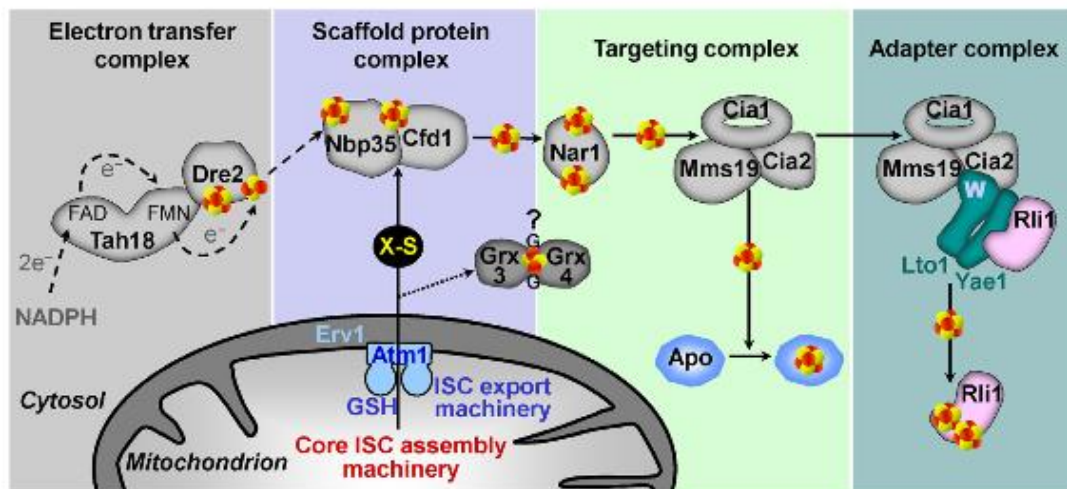


Figure 10 : Machinerie de synthèse des ISC cytosoliques (CIA) incorporés à des protéines du cytosol et du noyau⁸⁸. Le transporteur Atm1 (ABCB7) permet de transférer le composé X-S issu de la biosynthèse des ISC mitochondriaux vers le cytosol assisté par le glutathion (GSH) afin de constituer la source de soufre nécessaire. Dans le cytosol, l'assemblage et la maturation des ISC s'effectuent en deux étapes. Les ISC sont assemblés dans un premier temps sur la protéine Nbp35 grâce à l'intervention de Dre2 et de Tah18. Cette étape nécessite un apport d'électrons qui est fourni par la réduction du NADPH. Le centre Fe-S du complexe Cfp1/Nbp35 est ensuite capté par un second complexe formé des protéines Nar1, Cia1-2 et Mms19. La protéine Nar1 permet de rendre labile le centre Fe-S qui est ensuite transféré sur les apoprotéines cytosoliques et nucléaires grâce aux interactions de ces dernières avec Cia2 et Mms19. La protéine Cia1 assure le maintien du complexe.

L'ensemble des composants de la machinerie ISC est très conservé au cours de l'évolution. Ainsi les premiers travaux chez la levure *S. cerevisiae* ont permis d'établir le rôle primordial de la frataxine dans la biogenèse des centres Fe-S⁸⁹. En effet, un déficit en Yfh1, homologue levure de la frataxine, conduit à un défaut de plusieurs protéines à centres Fe-S dont notamment les aconitases (cytosolique et mitochondriale) ainsi que les complexes II et III de la chaîne respiratoire⁸⁹. Ces manifestations ont également été rapportées dans le cœur de patients AF⁸⁹ et de souris MCK^{90,91}. La frataxine interagit directement avec des protéines du cœur de la machinerie ISC (ISCU, NFS1 et ISD11) afin de stabiliser le complexe et favoriser l'activité de cystéine désulfurase par un changement de conformation qui modifie le site de liaison du substrat à l'enzyme^{86,92}. De plus, la quantité de la frataxine associée au complexe ISC est directement corrélée à la quantité de fer ferreux présent⁹³, suggérant que la frataxine pourrait être considérée comme un donneur de fer et ainsi contrôler son intégration dans les ISC comme un activateur allostérique. Par conséquent, la frataxine joue un rôle primordial dans les étapes précoces de la synthèse *de novo* des centres Fe-S dans la mitochondrie mais ses modalités de liaison au fer restent encore à démontrer.

b.2. Autres fonctions possibles

b.2.1. Fonction dans la biogenèse de l'hème

La mitochondrie est le lieu de synthèse de l'hème. Cette biogenèse est présente dans toutes les cellules de l'organisme mais principalement dans les cellules érythroïdes et les hépatocytes. La ferrochélatase (FECH) est une enzyme de type lyase intégrée dans la membrane interne de la mitochondrie et qui catalyse la dernière réaction de la biogenèse de l'hème en insérant le fer ferreux Fe²⁺ à la protoporphyrine IX (PPIX) pour former de l'hème. Plusieurs études ont mis en évidence une haute affinité de liaison de la frataxine pour la FECH^{94,95}. Cependant, seule la FECH humaine possède un centre [2Fe-2S] tandis que son homologue levure (Hem15) en est dépourvue. Par conséquent, la diminution de Hem15 ainsi que l'absence d'insertion de fer dans l'hème observés dans les levures $\Delta Yfh1$ démontrent que l'implication de la frataxine dans la synthèse de l'hème est indépendante de la synthèse des ISC⁹⁶. De plus, la surexpression de Yfh1 augmente la disponibilité du fer pour la formation de l'hème, montrant l'impact direct de la frataxine dans la biogenèse de l'hème⁹⁷. Ces données suggèrent ainsi que la frataxine contrôle l'utilisation du fer mitochondrial pour la biogenèse de l'hème⁹⁶.

b.2.2. Fonction dans l'acquisition, le stockage et le transport de fer

Depuis sa découverte, la frataxine est considérée comme une protéine pouvant donner du fer lors des premières étapes de la biogenèse des ISC. Cette hypothèse a longtemps été soutenue par l'absence d'identification des mécanismes d'apport du fer dans cette voie métabolique, sans qu'aucune preuve formelle n'ait été identifiée. Cependant, l'étude de la structure de la frataxine humaine ainsi que la découverte de la capacité d'oligomérisation de Yfh1 chez la levure ont permis de reconsidérer la fonction de liaison et de stockage du fer par la frataxine⁹⁸. L'utilisation de la technique de spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis d'identifier que la surface de l'hélice H1 possédait des résidus très conservés (D112, L113 et D115) impliqués dans la liaison avec le fer⁹⁵. La forme ferrique de la frataxine (holo-frataxine) a une forte affinité de liaison aux protéines du complexe ISCU pour la biogenèse des ISC contrairement à la forme apo-frataxine⁹⁹.

De plus, la présence de fer et d'oxygène favorise la forme oligomère (α_3) de la frataxine qui catalyse l'oxydation du fer Fe^{2+} . L'élévation de la concentration intracellulaire en fer induit la formation d'homopolymère sphérique de la frataxine d'approximativement 60 sous-unités (α_{60}) capable de séquestrer plus de 3000 atomes de fer ferrique dans un état inactif d'oxydo-réduction^{100,101}. La forme bactérienne de la frataxine, CyaY, est également capable de lier jusqu'à 10 atomes de fer par sous-unité. Des formes de frataxine de haut poids moléculaires ont été détectées dans du tissu cardiaque de souris ainsi que dans des souches de levures $\Delta Yfh1$ ¹⁰¹. Outre sa capacité à intégrer le fer disponible, la frataxine peut également le libérer pour le métabolisme cellulaire⁹⁸. Cependant, les frataxines humaine et bactérienne ont des capacités de liaison du fer inférieures à la frataxine de levure probablement dues à l'absence de ferritine chez *S. cerevisiae*¹⁰¹. De plus, l'incubation des cellules en présence de citrate d'ammonium de fer augmente l'expression de la frataxine *in vitro*. Par conséquent, la frataxine pourrait exercer à la fois une fonction de stockage du fer et de protéine chaperon comme la ferritine cytosolique (**Figure 11**).

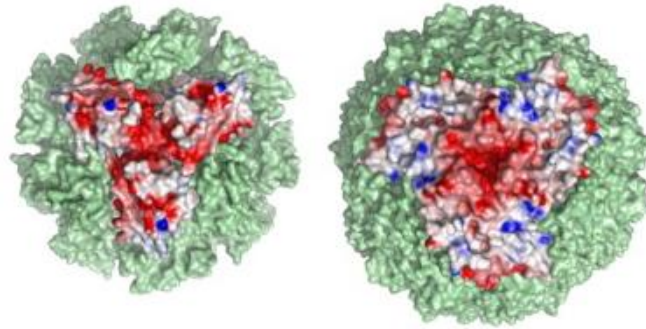


Figure 11 : Structure de la forme oligomère de la frataxine (à gauche) et de la ferritine (à droite)⁶⁶.

La présence d'une surcharge en fer mitochondrial dans les modèles murins⁹⁰ ou de levures $\Delta Yfh1$ ¹⁰² laisse penser que la frataxine pourrait contrôler le flux de fer dans ce compartiment. Une étude a démontré le rôle primordial de la frataxine dans la différenciation des précurseurs érythroïdes dans laquelle une augmentation de PPIX conduit à une baisse de l'expression de la frataxine et donc potentiellement à un détournement du fer de la synthèse des ISC vers la biogenèse de l'hème¹⁰³. De plus, une baisse de l'activité de la ferrochélatase est observée quand le taux de frataxine augmente, conduisant ainsi à une diminution de la synthèse de l'hème⁹⁴. Par conséquent, la frataxine pourrait agir comme un « interrupteur métabolique » dans la distribution du fer pour les voies métaboliques mitochondriales en fonction du niveau d'expression de son ligand¹⁰⁴.

b.2.3. Fonction dans la protection contre les réactifs de l'oxygène (ROS)

La présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) augmente le stress oxydant et perturbe l'équilibre redox en interférant avec des molécules intracellulaires. Une production transitoire de ROS provoque des modifications réversibles des protéines tandis qu'un stress oxydant prolongé ou chronique induit des dommages plus sévères dont notamment l'oxydation irréversible des protéines ou de l'ADN aussi bien que la peroxydation des lipides altérant ainsi l'intégrité des membranes. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est une molécule hautement oxydante naturellement produite par la cellule à partir d'anions superoxydes (O_2^-) issus de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (CI, CII et CIII). Le O_2^- libéré dans la matrice mitochondriale est rapidement converti en espèce moins toxique, le H_2O_2 via l'action de la superoxyde dismutase mitochondriale, SOD2 (**Figure 12**). Une partie des anions superoxydes

est libérée dans le compartiment cytoplasmique par le complexe III de la chaîne respiratoire. Ces anions sont alors pris en charge par la superoxyde dismutase cytosolique, SOD1, pour leur conversion en peroxyde d'hydrogène. En général, ce dernier est décomposé en H_2O grâce à la glutathion peroxydase (GPx) en présence de glutathion sous sa forme réduite (GSH). Cependant, une forte concentration de fer ferreux (Fe^{2+}) intracellulaire favorise son oxydation en fer ferrique (Fe^{3+}) par le H_2O_2 via la réaction de Fenton. Le fer agit comme catalyseur de cette réaction ayant pour conséquence la synthèse de radicaux hydroxyles (OH^\cdot) conduisant à des dommages cellulaires. L'absence de frataxine empêche l'assemblage et la production d'ISC et conduit à une surcharge en fer mitochondriale. La délétion de Yfh1 chez la levure provoque une augmentation de radicaux toxiques tel que le H_2O_2 provoquant une sensibilité accrue des cellules au stress oxydant¹⁰⁵ associée à une accumulation de protéines oxydées et à une inhibition du protéasome¹⁰⁶. La résistance aux agents oxydatifs peut être rétablie par la diminution de la production de peroxyde d'hydrogène via la surexpression endogène de frataxine⁹⁷.

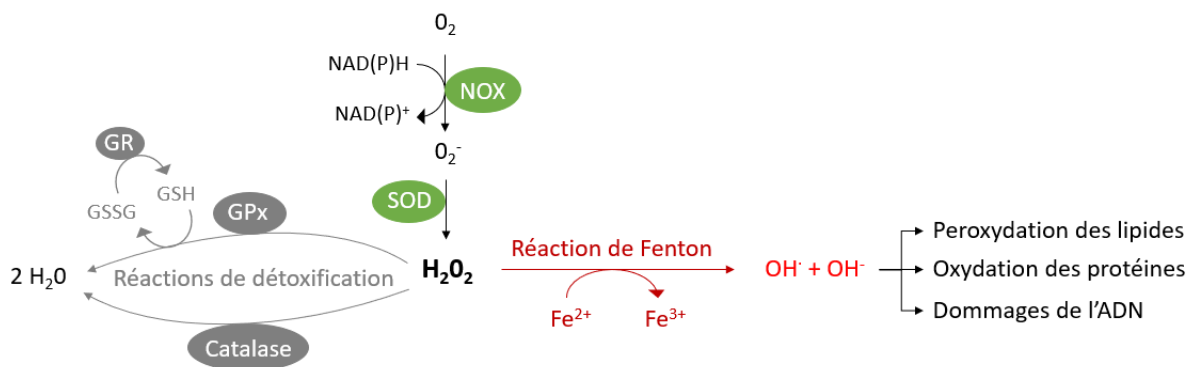


Figure 12 : Mécanisme cellulaire de production et de dégradation de l'anion superoxyde (O_2^-).

L'anion superoxyde est généré à partir de la dégradation d'oxygène par la NADPH oxydase (NOX). Le O_2^- produit est ensuite dégradé par l'action des superoxydes dismutases (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène peut être détoxifié par des mécanismes enzymatiques (flèches grises) impliquant le glutathion peroxydase (GPx) ou la catalase. Le glutathion oxydé peut ensuite être réduit par le glutathion réductase (GR). Le peroxyde d'hydrogène peut induire la production d'autres réactifs de l'oxygène dont notamment des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton (flèche rouge) en présence de cofacteur Fe^{2+} .

L'augmentation du niveau de stress oxydatif intramitochondrial interfère avec la structure de l'ADN. Contrairement à l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial (ADNmt) n'est pas protégé par des histones, le rendant plus vulnérable face aux agents oxydants. Une étude portant sur l'intégrité de l'ADNmt chez des sujets AF a montré la présence de délétions (entre 8 et 9 kb)¹⁰⁷. Ces dommages de l'ADN augmentent encore plus le risque de perturbation de l'activité des

complexes de la chaîne respiratoire car une partie des enzymes est codée par le génome mitochondrial.

De plus, la présence de radicaux hydroxyles favorise également la peroxydation des lipides. L'oxydation des lipides insaturés endommage les membranes cellulaires ainsi que les processus d'autophagie. L'autophagie représente un mécanisme de protection cellulaire face à la dégradation de certains composants en induisant la lyse d'organites cellulaires endommagés tel que la mitochondrie (mitophagie). En cas d'échec d'initiation de l'autophagie, la cellule déclenche des mécanismes d'apoptose conduisant à la mort cellulaire. Une induction de l'autophagie a été détectée dans le modèle nématode de l'AF ainsi que dans des cellules lymphoïdes de patients¹⁰⁸. De plus, la destruction des cellules β des îlots pancréatiques de souris déficientes en frataxine par le processus d'apoptose conduit à une diminution de la sécrétion d'insuline et au développement d'un diabète¹⁵. Les KO conditionnels de *FXN* dans différents tissus montrent une dégénérescence rapide de pratiquement tous les tissus testés incluant des structures cérébrales (GRD et neurones sensitifs) ainsi que cardiaques (myocarde)^{90,109}.

II.L'homéostasie du fer

Le fer est un oligo-élément essentiel pour de nombreuses voies métaboliques comme par exemple le transport et le stockage de l'oxygène, la production d'énergie, ainsi qu'en tant que catalyseur biologique de plusieurs réactions d'oxydo-réduction^{110,111}. Ce métal est indispensable à la vie en participant aux fonctions clés de la cellule telles que la croissance, la prolifération et la mort cellulaire. Son rôle de catalyseur dépend principalement de la capacité du fer ferreux (Fe^{2+}) et ferrique (Fe^{3+}) à donner ou à accepter les électrons dans des conditions physiologiques. En présence d'oxygène, le fer favorise la formation de radicaux hydroxyles toxiques qui peuvent endommager les protéines, les lipides, aussi bien que l'ADN comme nous avons pu le voir précédemment. Par conséquent un excès de fer peut causer une cytotoxicité cellulaire et tissulaire par la production de ROS tandis qu'une carence en fer peut mener à la mort des cellules. Des mécanismes bien conservés au cours de l'évolution permettent de réguler la quantité de fer par modulation de son apport, de son stockage et de sa distribution afin d'assurer le maintien de l'homéostasie et la survie cellulaire¹¹². Ces processus permettent de garantir une quantité de fer disponible suffisante pour les fonctions biologiques tout en préservant la cellule de tout phénomène de toxicité. Cependant, le fer présent dans l'environnement est principalement sous forme oxydée et peu soluble, le rendant ainsi

difficilement assimilable. L'évolution a donc favorisé l'apparition de mécanismes biologiques qui conservent et recyclent le fer dans l'organisme.

1. L'absorption du fer par les entérocytes

Le fer alimentaire est la seule source de fer externe de l'organisme, sauf lors de transfusion sanguine ou d'administration parentérale de fer. Étant donné que l'excrétion du fer n'est pas contrôlée, la régulation de la teneur en fer dans l'organisme dépend seulement du contrôle de son absorption. Ce phénomène explique aussi qu'une surcharge en fer augmente systématiquement toutes les formes de stockage de ce métal dans l'organisme. Seule une petite partie du fer (environ 1 à 2 mg) est perdue quotidiennement à cause de la desquamation de cellules intestinales ou cutanées ainsi qu'à des pertes de sang. Ces pertes sont donc compensées par une absorption de fer alimentaire. Ainsi environ 5% du fer de la circulation sanguine sont renouvelés quotidiennement.

Les deux formes principales de fer alimentaire sont la forme héminique et la forme non héminique. La forme héminique (ou organique) correspond à du fer emprisonné dans un anneau de protoporphyrine, communément rencontré dans les molécules d'hème de l'hémoglobine ou de myoglobine. Ce fer organique est présent dans la viande et les fruits de mer en raison de la présence en grande quantité d'hémoprotéines. Il représente la forme la plus assimilable par l'organisme. En revanche, la forme non héminique (ou inorganique) représente du fer non incorporé à de l'hème mais lié à d'autres molécules (autres que l'hémoglobine et la myoglobine). Ce fer inorganique est généralement présent dans les végétaux. Cependant les aliments d'origine animale contiennent également pour moitié du fer non héminique (principalement sous forme liée à la ferritine).

L'acidité gastrique ainsi que la présence de nombreuses enzymes protéolytiques permettent la libération des hémoprotéines alimentaires. Le fer est ensuite absorbé dans la première partie de l'intestin grêle car les sécrétions gastriques acides augmentent la solubilité du fer. Cependant la cellule n'est capable d'absorber que du fer ferreux (Fe^{2+}), alors que le fer présent dans la lumière intestinale est en grande partie sous forme ferrique (Fe^{3+}). Par conséquent, le fer inorganique soluble (Fe^{3+}) est réduit en Fe^{2+} grâce à la présence de ferriréductases telle que la cytochrome b réductase 1 (DCYTB ou CYBR1) (**Figure 13**). La suppression de DCYTB a des effets mineurs sur l'absorption du fer, ce qui suggère que d'autres réductases ou agents réducteurs non identifiés peuvent contribuer à la réduction du fer. Le fer Fe^{2+} est transporté à

travers la membrane plasmique grâce à la protéine DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*) localisée à la surface apicale des cellules du duodénum proximal ou du jejunum supérieur. L'action de DMT1 est dépendante du pH et son fonctionnement est optimal à pH acide. Malgré le faible pH, cette protéine transmembranaire tire profit de la présence d'un gradient de proton H^+ existant entre la lumière intestinale et le cytoplasme des entérocytes. Cette génération locale du gradient de protons au niveau de la membrane entérocytaire est essentielle pour l'absorption du fer par le DMT1 via la production d'un symport Fe^{2+} . Ce gradient de protons est principalement généré par l'échangeur $3 Na^+/H^+$ (NHE3). En cas de carence en fer ou d'hypoxie, l'expression intestinale de DMT1 est augmentée afin de favoriser l'apport en fer dans l'organisme.

L'absorption du fer héminique fait intervenir un phénomène d'endocytose de récepteur membranaire qui est assez faiblement caractérisé. Néanmoins, l'hème contenant du fer peut entrer dans les cellules grâce à la présence du transporteur de folate HCP1 (également connu sous le nom de SLC46A1) positionné à la surface des entérocytes (**Figure 13**). Une fois l'hème rompu par l'hème oxygénase 1 (HO1), le fer ferreux est libéré dans le cytoplasme de la cellule. A noter que la ferritine alimentaire peut aussi être absorbée par les entérocytes via un complexe de protéine adaptatrice AP2.

Une fois dans le cytoplasme, le fer est dirigé vers la membrane basolatérale des entérocytes pour y être exporté. Lors de son passage dans la cellule, le fer peut être stocké par la ferritine qui constitue la principale forme de stockage du fer cellulaire. L'exportation du fer Fe^{2+} vers le milieu extracellulaire est assurée par la protéine ferroportine (FPN). Durant cet efflux, le fer est oxydé par une ferriréductase transmembranaire, l'héphaestine (Heph) et une glycoprotéine extramembranaire, la céruloplasmine (Cp), afin de favoriser sa liaison à la transferrine (Tf) plasmatique. Le fer Fe^{3+} relargué dans la circulation sanguine se lie à l'apo-Tf pour former de l'holo-Tf.

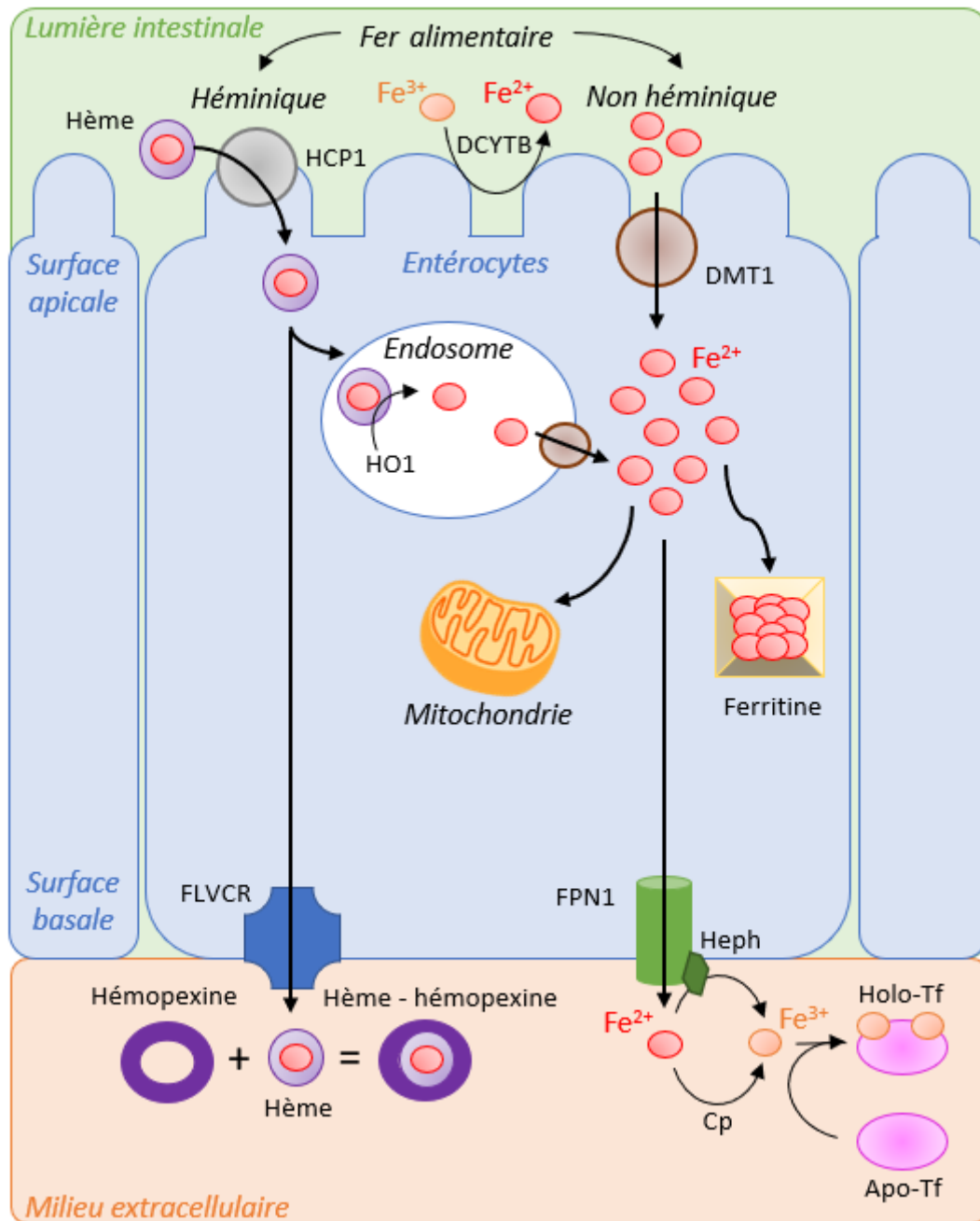


Figure 13 : Mécanisme d'absorption du fer alimentaire par les entérocytes.

2. Le transport et la distribution du fer dans l'organisme

On estime qu'un adulte possède l'équivalent de 3 à 4 g de fer dans son organisme. Dans la circulation sanguine, le fer est complexé à trois protéines majeures : la Tf, l'hème et la ferritine. Chez l'homme, plus de 95% du fer plasmatique est lié à la Tf dans des conditions physiologiques normales. Le fer est majoritairement recyclé à partir des érythrocytes sénescents

par les macrophages qui l'apportent ensuite à la Tf. Une toute petite partie du fer (1 à 2 mg) est issue de l'apport externe via l'alimentation quotidienne.

La Tf est une glycoprotéine de 77 kDa produite par le foie et ayant une demi-vie d'environ 8h dans le sang. Cette protéine possède une chaîne polypeptidique simple contenant un site de fixation au fer (Fe^{3+}) dans chacun de ses lobes (A et B) situés aux extrémités N et C-terminales, dont chacun est capable de lier un atome de fer ferrique. La Tf existe sous trois formes différentes : l'apo-Tf (ne contenant pas de fer), la Tf monoferrique (contenant un seul atome de fer) et la Tf diferrique (ou holo-Tf liant deux atomes de fer). La distribution du fer dans l'organisme dépend quasiment entièrement de la Tf mais la stabilité du complexe fer-Tf est sous l'influence de l'état d'oxydation du fer, du pH et de la conformation de la protéine¹¹⁰. Dans des conditions physiologiques, la concentration de Tf plasmatique est de l'ordre de 3 g/L, avec une capacité totale de fixation de deux atomes de fer par Tf, avoisinant 60 à 90 $\mu\text{mol/L}$ de fer. Cependant, la concentration du fer sérique est d'environ de 20 à 30 $\mu\text{mol/L}$, correspondant ainsi à un pourcentage de saturation de la Tf (TSAT) en fer de 30% en moyenne. La concentration d'holo-Tf plasmatique est ainsi approximativement de 1 g/L (soit 13 mM). Une TSAT inférieure à 20% est signe d'une carence en fer tandis qu'une saturation supérieure à 50% est synonyme d'une surcharge ferrique. Un déficit congénital de Tf conduit à une anémie sévère pouvant occasionner de graves problèmes postnatals en l'absence de transfusion de sang¹¹³. Paradoxalement, malgré cette anémie importante due à une carence en fer, les patients et les modèles murins développent une surcharge en fer massive dans de nombreux tissus dont le foie^{113,114}. A noter que cette accumulation de fer hépatique dépasse même les taux ferriques retrouvés dans le modèle murin d'hémochromatose (Hfe)¹¹³. Ces données montrent donc que la Tf n'est pas essentielle pour l'import du fer cellulaire dans tous les organes et suggère la présence d'une machinerie d'absorption du fer indépendant de la Tf.

Outre la Tf, le fer plasmatique peut être complexé à de l'hème qui est transporté sous la forme d'hémoglobine liée à l'haptoglobine ou à l'hémopexine. La troisième source de fer sanguin est le fer contenu dans la ferritine représentant une quantité infime du fer circulant car la teneur en ferritine plasmatique reste faible (environ 300 $\mu\text{g/L}$ pour un homme contre 200 $\mu\text{g/L}$ pour une femme).

Comparée à la teneur en fer total du corps, la circulation sanguine ne représente qu'une petite proportion de fer qui renouvelle la distribution du fer aux tissus environ huit fois par jour. Bien que tous les tissus aient des besoins en fer, certains ont des métabolismes cellulaires plus

consommateurs que d'autres ; c'est le cas notamment des précurseurs érythrocytaires qui sont les principaux consommateurs de fer de l'organisme avec des besoins avoisinant les 24 mg de fer par jour pour la synthèse de l'hème et le renouvellement des érythrocytes sénescents.

Outre la liaison du fer à ces trois protéines majeures, une autre espèce de fer a été identifiée sous le nom de fer non-lié à la transferrine (NTBI : *Non Transferrin-Bound Iron*). Non seulement ce fer n'est pas lié à la Tf, mais il n'est pas, non plus, associé à toutes les autres protéines de transporteurs du fer dans la circulation y compris l'hème et la ferritine. La présence de NTBI dans le plasma jouerait un rôle majeur dans la survenue de phénomènes pathologiques dans des maladies à surcharge en fer. Lorsque la saturation en Tf dépasserait les 80-85%, des formes de NTBI apparaîtraient dans le sang et provoqueraient des lésions tissulaires dues à son caractère toxique. En effet, l'étude de sang de patients atteints d'hémochromatose ou de thalassémie a permis d'identifier la nature du fer NTBI qui se retrouve majoritairement complexé avec du citrate sous forme de Fe^{3+} ^{115,116}. Des complexes monomériques ou oligomériques se formant par la liaison entre un anion et le fer ferrique avec de l'acétate ont également été décrits¹¹⁶. Le fer peut aussi se lier à une autre protéine plasmatique présente en très grande quantité telle que l'albumine. Cette protéine possède à sa surface de nombreux sites chargés négativement capables de fixer des atomes de fer ferrique quel que soit le pourcentage de saturation de la Tf dans la circulation¹¹⁷. L'albumine sérique est la protéine majoritaire du sang avec une concentration de 40 g/L ayant la capacité de lier de nombreuses molécules incluant l'eau, le calcium (Ca^{2+}), le sodium (Na^+), le potassium (K^+), le magnésium (Mg^{2+}), le zinc (Zn), des acides gras, des hormones et de la bilirubine. La nature du NTBI étant encore faiblement caractérisée, il est probable que différentes formes coexistent et que ces espèces varient selon le pourcentage de saturation de la Tf, la présence d'une accumulation en fer et la durée de cette surcharge.

Néanmoins, toutes les formes de NTBI ne donnent pas lieu à une réaction d'oxydo-réduction et n'agissent pas comme catalyseur dans la production des ROS. C'est pourquoi le terme de fer plasmatique labile (LPI pour *labile plasma iron*) a été mentionné pour désigner l'ensemble du fer libre qui était actif chimiquement dans les réactions redox pour induire un stress oxydatif¹¹⁸.

3. L'absorption du fer dans les cellules

Les cellules importent le fer sous différentes formes. La forme majoritaire d'absorption du fer cellulaire est celle liée à la transferrine par la voie TBI (*Transferrin-Bound Iron*). Cependant, certaines cellules comme les hépatocytes sont connues pour absorber rapidement et en grande quantité la forme de fer non liée à la transferrine, le NTBI (*Non Transferrin-Bound Iron*), notamment chez les patients souffrant de surcharge en fer. Enfin, quelques formes minoritaires telles que le fer contenu dans l'hémoglobine, l'hème ou la ferritine sérique peuvent être captées par la cellule. Néanmoins, les voies d'absorption du fer hémérique ne contribuent pas significativement aux réserves de fer cellulaire dans les conditions physiologiques (à l'exception des cellules intestinales).

a. La voie TBI

Les cellules reçoivent du fer sous sa forme réduite (Fe^{3+}) apporté par la Tf. La Tf mono ou diférrique agit comme un ligand sur un récepteur présent à la surface des cellules, le récepteur à la transferrine 1 ou 2 (TfR1 ou TfR2 selon le type cellulaire). Le TfR est une protéine membranaire de 97 kDa exprimée de manière ubiquitaire dans l'ensemble des cellules de l'organisme sous forme d'homodimère à la surface cellulaire. Le TfR1 est majoritairement présent dans les érythroblastes où il constitue l'apport de fer essentiel pour la synthèse de l'hémoglobine. Une extinction complète de TfR1 chez la souris est létale à l'état embryonnaire¹¹⁹. L'établissement de modèles murins présentant un KO conditionnel a permis de démontrer l'importance du TfR1 dans l'homéostasie du fer cellulaire en particulier dans les muscles squelettiques et les cardiomyocytes^{120,121}. Ces souris déficientes en TfR1 dans le muscle présentent un déficit en fer dans ce tissu mais également dans le foie et le tissu adipeux¹²⁰. En revanche, un défaut d'expression de TfR1 dans le cœur a des conséquences plus importantes sur la survie des souris avec des décès recensés dès deux semaines de vie. Cette létalité précoce fait suite à une défaillance cardiaque résultant d'une mauvaise respiration mitochondriale et d'une mitophagie inefficace¹²¹.

Au contraire de son homologue, la présence de TfR2 est restreinte aux cellules du foie et aux précurseurs érythroïdes¹²². La Tf complexée au fer est capable de se lier à la fois au TfR1 et au TfR2 car leur similitude avoisine les 65% au niveau de leurs parties extracellulaires. Cependant sa liaison au TfR1 induit l'internalisation du complexe Tf-TfR tandis que son interaction avec TfR2 agit également comme un senseur du statut de fer systémique¹²³. Une seconde particularité entre ces deux homologues est la restriction de la liaison Tf-TfR en fonction de la nature de la

Tf. En effet, l'interaction du TfR1 est restreinte à de la Tf humaine au contraire du TfR2 qui est capable de lier à la fois de la Tf humaine et bovine. De plus, l'analyse de l'ARNm TfR2 n'a révélé aucune région d'homologie avec les séquences consensus des éléments sensibles au fer (motif IRE pour *Iron Responsive Elements*) contrairement au transcrite du TfR1¹²² (**Figure 14**) car leurs domaines cytoplasmiques ne présentent aucune similitude. Par conséquent, le niveau de régulation de ces deux homologues est totalement différent. Le TfR1 est régulé selon le contenu en fer intracellulaire tandis que le TfR2 est contrôlé en fonction de la concentration en ligand, l'holo-Tf¹²⁴.

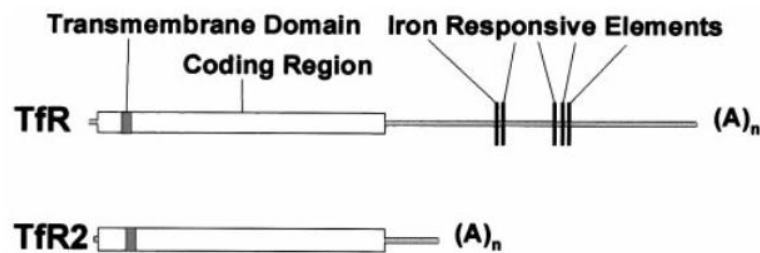


Figure 14 : Comparaison des transcrits du TfR1 et du TfR2¹²².

Le fer lié à la Tf pénètre dans la cellule via un mécanisme faisant intervenir l'internalisation du récepteur TfR1 couplée à son ligand, la Tf mono ou différique. L'entrée du fer cellulaire est médiée par l'endocytose du complexe fer-Tf et TfR1 nécessitant la création d'un manteau de clathrine (**Figure 15**). Ce processus finement contrôlé permet de réguler les besoins en fer de la cellule. L'interaction de l'holo-Tf sur le TfR1 est dépendante du pH. En effet, à pH physiologique (pH=7,4), le TfR1 possède une forte affinité de liaison pour la Tf chargée en fer. En revanche, en milieu acide l'affinité de liaison est en faveur de la forme apo-Tf. Ainsi, une acidification de l'endosome grâce à l'activation de pompe à protons ATPase entraîne une réduction de l'affinité de la Tf pour le fer permettant ainsi de le dissocier de l'holo-Tf. Ce dernier se transforme ainsi en apo-Tf. Le complexe apo-Tf/TfR1 est ensuite transporté à la membrane plasmique dans l'endosome de recyclage afin de dissocier l'apo-Tf du TfR1 à un pH proche de la neutralité. L'apo-Tf est relarguée dans le milieu plasmatique où elle pourra capter d'autres molécules de fer. A la surface cellulaire, le récepteur TfR1 est désormais prêt à interagir avec de nouvelles molécules de Tf pour un prochain cycle d'absorption du fer cellulaire.

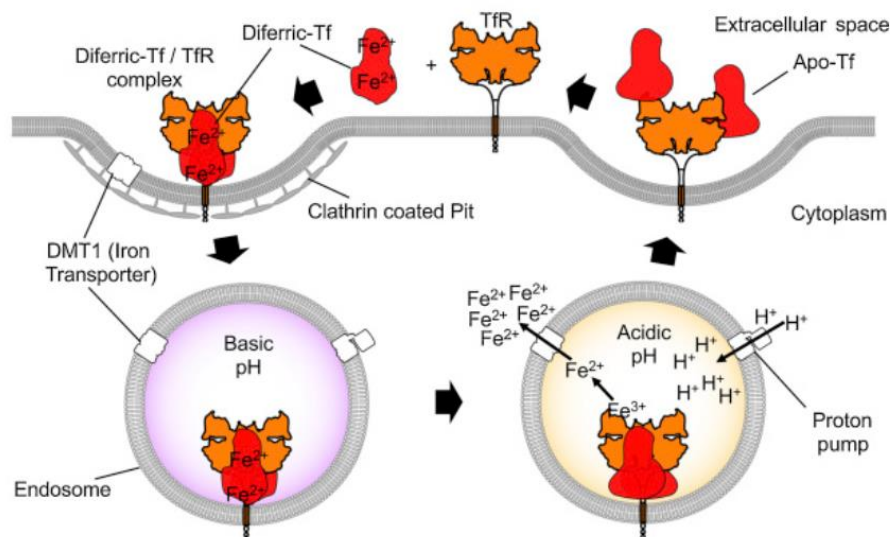


Figure 15 : Import du fer cellulaire par la voie TBI¹²⁵.

Au sein de l'endosome, le fer Fe^{3+} libéré de l'holo-Tf est réduit en Fe^{2+} par une métallo-réductase, STEAP3 (*Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3*), puis exporté dans le cytosol grâce au transporteur de métal divalent 1 (DMT1) et au récepteur de la mucopolipine 1 (TRPML1)¹²⁶ localisés à la membrane endosomale. Les souris déficientes de STEAP3 présentent une anémie sévère ainsi qu'un défaut de l'entrée du fer cellulaire à partir de la voie TBI dans les érythroblastes¹²⁷. A l'inverse des souris KO TfR1, aucune létalité embryonnaire n'est observée pour les souris KO STEAP3¹²⁷, suggérant la présence possible d'autres protéines permettant de réduire le fer ferrique ou d'autres sources d'apports de fer cellulaire. De plus, des embryons de souris déficients pour DMT1 sont capables d'obtenir du fer à partir du placenta via l'internalisation du TfR1. Ces nouveaux nés naissent avec une accumulation de fer dans le foie¹²⁸, démontrant ainsi que d'autres protéines sont capables d'exporter le fer de l'endosome vers le cytosol pendant le développement embryonnaire. Cependant, l'activité de DMT1 est essentielle pour l'absorption du fer intestinal non hémique et la production d'hémoglobine après la naissance¹²⁸. Enfin, des mutations de TRPML1 provoquent la mucopolipidose de type 4 (ML4) se traduisant par une anémie ferriprivée importante chez les patients associée à une dégénérescence rétinienne et une déficience motrice¹²⁶. Les cellules des patients ML4 présentent une augmentation du contenu en fer Fe^{2+} dans les endosomes tardifs et les lysosomes au détriment du compartiment cytosolique¹²⁶, démontrant l'importance de TRPML1 dans le transport du fer des vésicules vers le cytosol.

Parmi l'ensemble des protéines nécessaires à l'import cellulaire du fer par la voie TBI, seule l'extinction complète du TfR1 est létale à l'état embryonnaire, démontrant ainsi son importance

fonctionnelle au sein de ce processus. Ce récepteur dimérique possède une petite partie intracellulaire de 67 acides aminés, un court domaine transmembranaire d'une vingtaine de résidus et un long domaine extracellulaire de 672 acides aminés. Ce dernier est séparé de la membrane par un pédoncule de 30Å où se situe deux ponts disulfures intermoléculaires au niveau des Cys89 et Cys98 permettant de relier de manière covalente deux monomères (**Figure 16A**)¹²⁹. Le TfR appartient à la classe des récepteurs transmembranaires de type II grâce à la présence d'un passage unique au sein de la membrane plasmique et d'une séquence d'ancrage à la surface cellulaire dans son domaine C-terminal.

Le domaine cytoplasmique en N-terminal contient un motif YTFR en position 20-23 permettant de promouvoir l'internalisation et le recyclage du TfR1 à la surface cellulaire par les endosomes^{130,131}. La délétion de ce domaine cytoplasmique induit une perte complète de l'internalisation du récepteur¹³¹. Des modifications post-traductionnelles telles que l'attachement de palmitate de manière covalente et réversible sur les résidus cystéines 62 et 67 contribue également à la régulation de l'endocytose du récepteur (**Figure 16B**). En effet, la mutation de Cys62 et Cys67 conduit à un défaut de palmitoylation du TfR1 provoquant une accumulation du récepteur à la membrane, une augmentation de Tf-diférique ainsi qu'une augmentation de son taux d'endocytose¹³². La palmitoylation du TfR1 permet ainsi de limiter l'internalisation du TfR1 mais n'a aucun impact sur sa cinétique de recyclage¹³². En revanche d'autres modifications post-traductionnelles dans la partie intracellulaire, telle que la phosphorylation de la sérine 24 par l'action de la protéine C kinase, n'ont aucun impact significatif sur le niveau d'endocytose et de recyclage du récepteur¹³¹.

Cependant, les N-glycosylations sur des résidus de la partie extracellulaire (Asn 251, 317, 727) sont essentielles pour garantir la stabilité et l'interaction du récepteur à ses ligands contrairement à la O-glycosylation de Thr104 qui n'a aucun impact fonctionnel avéré¹³³. En effet, une mutagenèse dirigée contre ces trois résidus asparagines conduit à une perte de l'affinité de liaison du TfR1 pour la Tf, une réduction de l'expression du récepteur à la surface cellulaire ainsi qu'une baisse des liaisons interchaînes¹³⁴. Par conséquent, la présence de N-glycosylation est indispensable pour la dimérisation du TfR1, le maintien d'une conformation stable et son interaction avec ses ligands. Le TfR1 a la capacité d'interagir à la fois avec la Tf (**Figure 16C**) mais aussi avec la ferritine sérique¹²⁹. Ces deux ligands ne présentent aucune compétition de liaison pour le TfR1 car chacun d'entre eux se fixe sur des épitopes différents du domaine extracellulaire du récepteur. De nombreux aspects de l'internalisation du complexe

TfR1-ferritine restent encore à éclaircir. Seule la sous-unité H de la ferritine serait capable de se lier au TfR1. Mais cette interaction nécessite un niveau élevé de récepteur à la membrane plasmique. Il semblerait qu'un complexe formé de plusieurs TfR1 serait requis pour l'endocytose à médiation de clathrine de la ferritine. Cette dernière est ensuite dégradée par les lysosomes afin de libérer le fer qu'elle contient. Par conséquent, le TfR1 est capable d'interagir avec les deux transporteurs majoritaires du fer plasmatique ayant des structures totalement différentes.

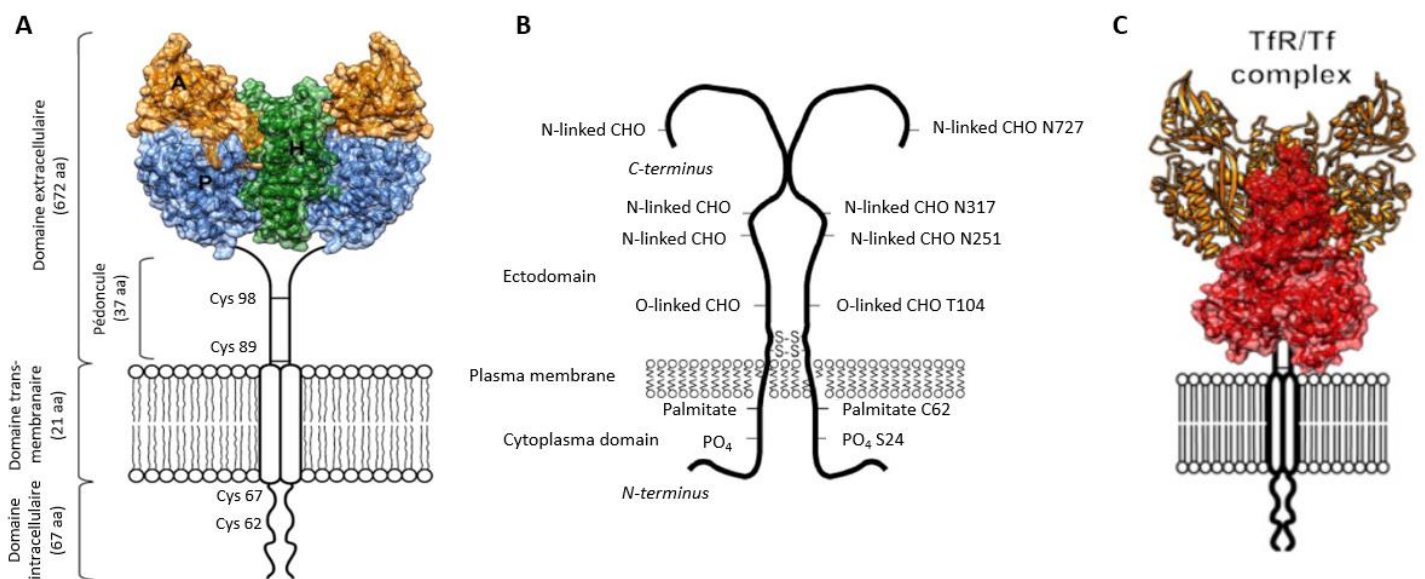


Figure 16 : Structure du récepteur à la transferrine TfR1. (A) Schéma de la forme homodimère du TfR1 à la surface membranaire constituée de deux monomères liés par des ponts disulfures au niveau des cystéines 89 et 98 (adapté de Luria-Pérez *et al.*¹²⁵). Le TfR1 possède un domaine intracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire contenant trois sous-domaines : apical (en orange), hélical (en vert) et un domaine de type protéase (en bleu). (B) Localisation des différentes modifications post-traductionnelles du TfR1¹³⁵. (C) Représentation schématique de la fixation de la Tf (en rouge) sur le TfR1 (en orange)¹²⁵.

b. La voie NTBI

Dans des conditions physiologiques, la totalité du fer est quasiment liée à la Tf dans la circulation sanguine. Cependant, lors d'une supplémentation en fer (avec du citrate ou de l'acétate de fer par exemple), du fer sous forme de NTBI peut apparaître dans le plasma. La présence de NTBI montre ainsi que la liaison du fer à la Tf est un phénomène saturable. Plus généralement, le NTBI est présent quand la concentration de fer plasmatique excède de manière chronique la capacité de saturation de la Tf. Dans ce cas, on parle de surcharge en fer systémique.

L'origine et les mécanismes impliqués dans l'absorption cellulaire du NTBI plasmatique restent incertains. On sait qu'il a une forte affinité pour les hépatocytes et son absorption semble être associée à un mécanisme indépendant de l'endocytose. L'analyse de cellules hépatiques saines et d'hépatocarcinome a permis de mettre en évidence le rôle primordial de DMT1 dans l'entrée du NTBI intracellulaire. En effet, malgré un taux constant d'entrée du fer par la voie TBI, les cellules du foie continuent à importer massivement du fer tout en augmentant l'expression de DMT1 à la surface cellulaire¹³⁶. Ces éléments suggèrent également que la concentration de DMT1 pourrait être régulée par le contenu en fer. De plus, les souris atteintes d'hémochromatose (*Hfe*^{-/-}) montrent une augmentation du NTBI plasmatique corrélée à une hausse de l'expression de DMT1 et une surcharge en fer hépatique¹³⁷, démontrant l'implication de cette protéine dans l'absorption du NTBI au niveau des cellules du foie.

Cependant, une telle fonction de DMT1 aurait pu sembler improbable étant donné que cette protéine transporte le fer de manière optimale à un pH de 5,5 dans les endosomes ou au niveau de la barrière intestinale. Ainsi sa présence à la surface des cellules dans un environnement proche de la neutralité (pH 7,4) pourrait fortement affecter son activité, voire le rendre non fonctionnel. Néanmoins, il faut prendre en considération qu'il existe quatre isoformes différentes de DMT1 (DMT1A/IRE(+), DMT1A/IRE(-), DMT1B/IRE(+), et DMT1B/IRE(-)) dont la localisation, l'expression et la réponse au fer peuvent considérablement varier d'un tissu à un autre¹³⁸. Les formes DMT1B se situeraient majoritairement dans les endosomes tandis que l'isoforme DMT1A/IRE(+) se localiserait au niveau de la membrane plasmique et serait sujet à une régulation post-transcriptionnelle dépendante du contenu en fer intracellulaire¹³⁹.

Toutefois, les souris déficientes en DMT1 sont toujours capables d'accumuler du fer hépatique¹²⁸, démontrant que DMT1 n'est pas indispensable dans l'absorption du NTBI¹⁴⁰ et d'autres protéines seraient nécessaires dans ce processus d'import. Le second transporteur de NTBI le plus probable est le transporteur de zinc ZIP14 (*Zrt-Irt-like protéine 14*). ZIP14 jouerait un rôle dans plusieurs tissus incluant le foie, le pancréas et le cœur, où le fer a tendance à s'accumuler majoritairement lors de pathologies à surcharge en fer¹⁴¹. L'administration intraveineuse de citrate de fer marqué au ⁵⁹Fe a révélé que les souris KO ZIP14 (*Slc39a14*^{-/-}) réduisent drastiquement le contenu en fer hépatique et pancréatique de près de 70% par rapport à des souris témoins¹⁴². Cette diminution de l'absorption du NTBI dans le foie et le pancréas s'accompagne d'une augmentation significative de l'entrée du fer dans le rein et la rate¹⁴². Ces

données laissent supposer que les mécanismes d'import du NTBI peuvent faire intervenir des transporteurs protéiques différents selon les tissus.

De plus, des analyses immunohistochimiques d'échantillons de nouveau-nés atteints d'hémochromatose ont mis en évidence une forte colocalisation entre l'expression de ZIP14 et la présence de dépôts de fer dans des tissus extra-hépatiques tels que le pancréas, la thyroïde ou les glandes salivaires¹⁴³. Tout comme DTM1, la régulation de ZIP14 pourrait être induite par le fer. Une carence en ce métal conduit à l'endocytose et à la dégradation de ZIP14 par le protéasome. Une augmentation de l'expression de ce transporteur en cas de surcharge en fer dans le foie et le pancréas provoque une diminution du TfR1, suggérant que ces tissus importent majoritairement du fer par la voie NTBI au détriment de la voie TBI¹⁴⁴. Cependant, le statut en fer n'affecte pas la quantité d'ARNm ZIP14 au contraire du transcrite DMT1 qui se retrouve fortement diminué en cas de surcharge en fer¹⁴⁴. Ainsi la régulation de ZIP14 par le fer pourrait se faire au niveau traductionnel ou post-traductionnel.

Une autre protéine ZIP, ZIP8, présentant une très forte homologie avec ZIP14, a révélé des propriétés de transports de métaux plus diversifiées que le zinc. En effet, l'étude d'hépatome murin a mis en évidence une augmentation de la quantité de protéine ZIP8 à la surface cellulaire en réponse à un apport de fer tandis que le niveau de transcrite reste inchangé¹⁴⁵. Le niveau de régulation de ZIP8 serait semblable à celui de ZIP14. Cependant, leur distribution tissulaire semble différente. ZIP8 est majoritairement présent dans le poumon, le placenta et le rein. Son abondance placentaire conduit à une létalité embryonnaire chez la souris¹⁴⁶. Des taux très faibles de ZIP8 (inférieur à 10%) provoquent une mort précoce des nouveau-nés dans 48h suivant leur naissance en raison d'une anémie ferriprive importante¹⁴⁶. Les souris KO conditionnel pour ZIP8 n'ont montré aucune anomalie du contenu en fer dans le foie, le cœur, le cerveau et le rein, suggérant que ce transporteur n'est pas requis pour l'absorption du NTBI dans ces tissus¹⁴¹. Cependant, des dépôts de fer associés à une augmentation des transporteurs ZIP8 et ZIP14 ont été rapportés dans des tubules rénaux de patients présentant des maladies chroniques du rein¹⁴⁷. De plus, ZIP8 a été localisé à la surface de neurones primaires de l'hippocampe murin et la diminution de son expression conduit à une réduction de l'import de NTBI dans ce tissu¹⁴⁸. ZIP8 pourrait ainsi contribuer à l'absorption du NTBI.

L'entrée du NTBI dans les cardiomyocytes pourrait nécessiter l'action de canaux de calcium de type L (LTCC) car l'utilisation de bloqueurs de canaux de calcium permet de prévenir l'accumulation de fer dans le cœur¹⁴⁹ en diminuant sa surcharge de près de 50%¹⁵⁰. A l'inverse

la stimulation de ces canaux favorise l'absorption du fer dans le myocarde¹⁴⁹. Les LTCC sont des canaux formant des pores dans la membrane plasmique afin de permettre aux ions divalents tels que le Ca^{2+} , le Fe^{2+} , le Zn^{2+} et le Mn^{2+} d'entrer dans la cellule lors de la dépolarisation de la membrane¹⁴¹. Ces canaux sont majoritairement exprimés dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau. Un second type de canaux calciques, type T (TTCC), est fortement présent dans le cœur en cas d'hypertrophie ventriculaire et de thalassémie. Le blocage spécifique des canaux TTCC a également la capacité de limiter l'accumulation de fer cardiaque. Son utilisation combinée à des chélateurs du fer tels que la déféroxamine ou l'éfonidipine permet de réduire le contenu en fer dans le cœur d'environ de moitié dans un contexte de thalassémie murine¹⁵¹.

Quel que soit le transporteur cellulaire engagé dans l'absorption du fer, le prérequis de son import est la réduction du fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . En effet, les transporteurs identifiés jusqu'à présent sont incapables de capter le fer ferrique malgré la prédominance de cette forme de fer dans le plasma. Cette exigence stricte nécessite ainsi la présence de ferriréductases à la membrane plasmique pour réduire le fer à l'état ferreux. Un certain nombre d'entre-elles a déjà été identifié ; c'est le cas notamment de protéines de la famille des cytochromes B (DCYTB et SR2 (*stromal-cell derived receptor 2*)), des Steap (Steap 2, 3 et 4), de la protéine prion (PrP) et de l'alpha-synucléine. La protéine DCYTB est connue pour son rôle de réduction du fer ferrique à la membrane apicale des entérocytes. Tout comme le récepteur 2 dérivé des cellules du stroma (SR2), DCYTB contribuerait également à la conversion du fer Fe^{3+} en fer Fe^{2+} au niveau des astrocytes¹⁵². La surexpression des protéines Steap favorise l'absorption du NTBI dans des cellules rénales en culture grâce à leur activité de ferriréductase. Bien que Steap3 ait été décrite pour favoriser la libération du fer par les endosomes dans la voie TBI, toutes les protéines Steap peuvent se positionner à la surface cellulaire¹⁵³. Cependant, la seule preuve actuelle de l'implication des Steap est la présence de Steap2 à la surface de neurones en colocalisation avec ZIP8¹⁴⁸, suggérant une coopération de ces deux partenaires.

La protéine prion (PrP) est exprimée de manière ubiquitaire à la surface de l'ensemble des cellules et joue un rôle dans l'assimilation du NTBI. En effet, l'administration de citrate de fer couplé à du ^{59}Fe dans des souris KO PrP s'est révélée diminuée dans le foie, le pancréas et le rein¹⁵⁴. De plus, une colocalisation de PrP avec ZIP8, ZIP14 et DMT1 a été démontrée dans des cellules d'hépatocarcinome¹⁵⁴, suggérant encore une fois un phénomène de collaboration entre

ferriréductase et transporteurs du fer. Enfin, un rôle possible de la protéine α -synucléine, impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives dont la maladie de Parkinson, pourrait avoir une activité de ferriréduction dans les neurones dopaminergiques¹⁵⁵. Néanmoins, son implication directe reste encore à démontrer.

Le NTBI est avidement absorbé par plusieurs tissus de l'organisme, notamment dans les organes touchés par les pathologies à surcharge en fer. Ces faits soutiennent le rôle du NTBI en tant que source de fer majoritairement impliquée dans les dépôts de fer au sein des tissus. Néanmoins, les transporteurs et ferriréductases impliqués dans l'apport du NTBI peuvent varier considérablement d'un organe à un autre (**Figure 17**) et un grand nombre d'entre-eux restent encore à découvrir.

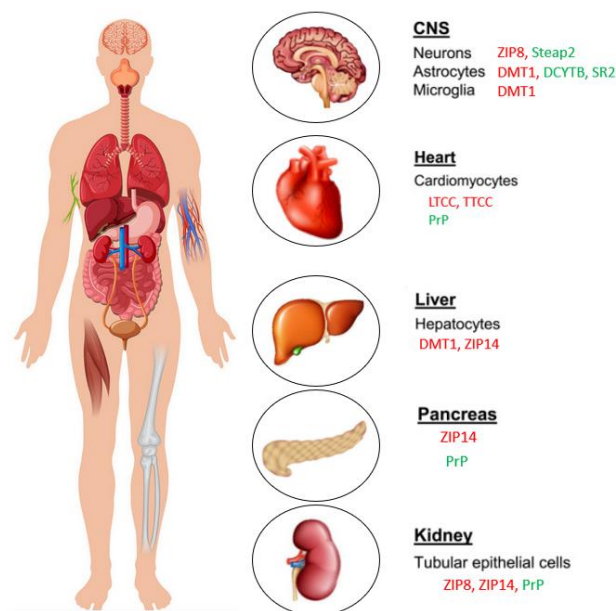


Figure 17 : Transporteurs (en rouge) et ferriréductases (en vert) impliqués dans l'absorption du NTBI selon les organes (adapté de Knutson *et al.* 141).

4. Le devenir du fer dans la cellule

Dans la cellule, le fer ferreux constitue un pool fonctionnel pouvant être utilisé pour les besoins cellulaires, importé dans la mitochondrie pour son métabolisme ou stocké sous forme de ferritine (**Figure 18**). Le fer peut participer à de nombreuses réactions biologiques en tant que catalyseurs dans les complexes de la chaîne respiratoire, la synthèse d'ADN, ... Le pool de fer en transit d'un compartiment à un autre ou d'une protéine à une autre constitue un pool de fer labile (LIP pour *labile iron pool*) intracellulaire. Plusieurs études rapportent que le LIP serait une forme de « NTBI intracellulaire ». Cependant, il reste encore mal défini et il pourrait

englober à la fois le LIP potentiellement hautement réactif avec l'oxygène, tout comme le fer lié de manière non covalente à de petites protéines ou à des ligands de faibles poids moléculaires tel que le citrate. Des protéines chaperons présentes dans le cytosol, comme la PCBP1-2 (protéine de liaison poly(rC) 1 et 2) qui sert à fournir le fer à la ferritine (FTN) ou la ferroportine (FPN)¹⁵⁶, pourraient constituer une forme de NTBI intracellulaire. Le fer peut également être exporté de la cellule grâce à la FPN.

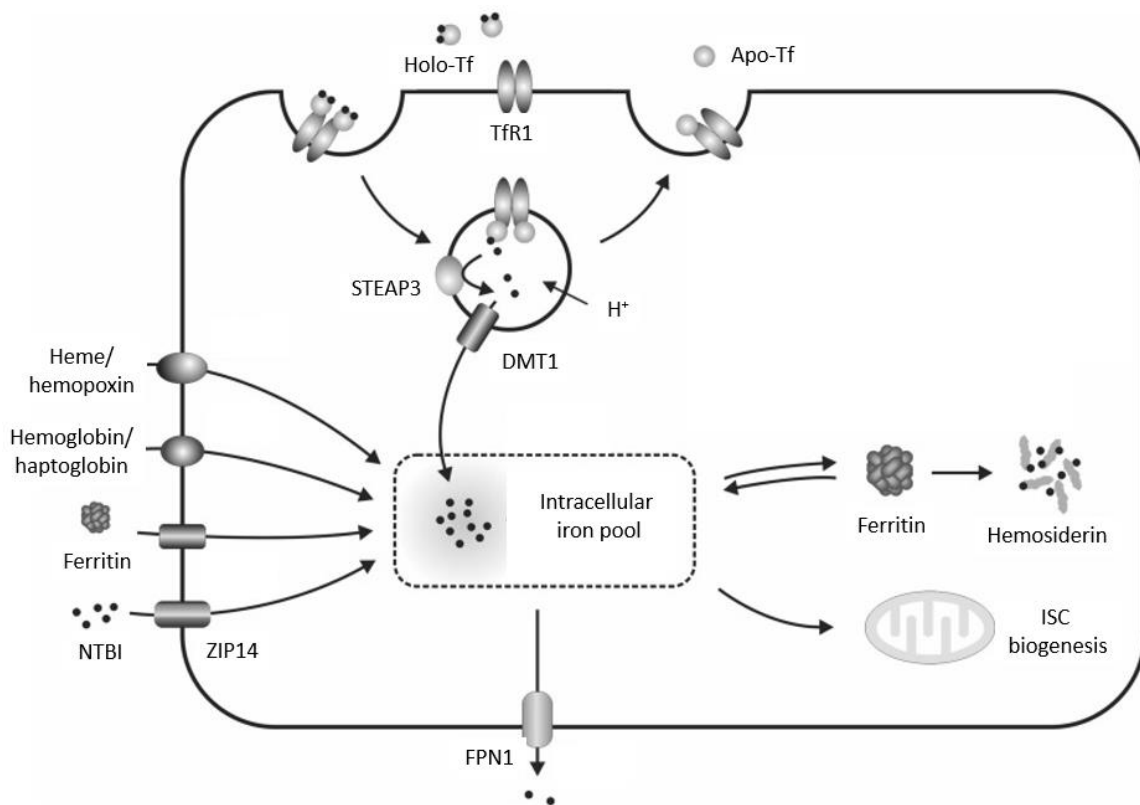


Figure 18 : L'homéostasie du fer cellulaire (adapté de Anderson *et al.*¹⁵⁷). Les cellules peuvent absorber le fer sous différentes formes. Toutes les cellules nucléées peuvent internaliser le fer lié à la Tf *via* l'endocytose du TfR1 à la membrane plasmique. L'acidification de l'endosome permet la libération du fer de la Tf et sa réduction par les protéines Steap. Le fer traverse ensuite la membrane endosomale *via* DMT1 pour constituer le pool de fer labile (LIP) intracellulaire. Le fer peut être incorporé aux ferritines ou importé dans la mitochondrie. L'excédent de fer est exporté de la cellule par la ferroportine (FPN). Certains types cellulaires peuvent capter du fer sous d'autres formes, le NTBI, ou contenu dans la ferritine plasmatique, l'hème ou l'hémoglobine.

a. Le stockage par les ferritines

La ferritine (FTN) est la principale protéine de stockage du fer dans les cellules. Son expression est quasiment ubiquitaire et sa localisation est principalement cytosolique. Cependant, la ferritine peut également être présente dans le noyau, dans la mitochondrie ou être excrétée dans la circulation sanguine¹⁵⁸. La FTN cytoplasmique humaine est constituée de 24 sous-unités H (FTH) et L (FTL) dans des proportions variables selon les tissus, formant un hétéropolymère en forme de cage dans laquelle plus de 4000 atomes de fer peuvent être emprisonnés¹⁵⁸. La

formation d'hétéropolymère FTH/FTL est favorisée par rapport à la production d'homopolymère FTH/FTH dans la cellule¹⁵⁹. La cinétique d'assemblage de ces polymères est rapide et nécessite moins d'une heure¹⁵⁹. Une faible concentration intracellulaire en fer entraîne une répulsion électrostatique entre les différentes sous-unités de la FTN¹⁶⁰. En revanche, plus la présence d'ions ferriques est importante, plus le taux d'assemblage du polymère augmente de manière croissante¹⁶⁰. Ces données révèlent que la ferritine est régulée par la quantité de fer cellulaire.

Dans le cytosol, les protéines chaperons de liaison poly-r(C) 1 et 2 (PCBP1-2) sont impliquées dans l'acheminement du fer des endosomes vers la ferritine¹⁵⁶. Avant d'être emprisonné dans la ferritine, le Fe^{2+} est oxydé en Fe^{3+} grâce à l'activité ferroxidase de la sous-unité H. Cette réaction catalytique est permise grâce à la présence d'oxygène dans la cavité centrale de la FTN et conduit à la formation de fer ferrique et de peroxyde. Ce dernier est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le fer oxydé produit rentre rapidement à l'intérieur de la cavité pour y être stocké de manière réversible. Le peroxyde d'hydrogène n'induit pas la formation de radicaux libres car il est utilisé rapidement *in loco* au niveau de son site de production pour l'oxydation de nouvelles molécules de fer¹⁵⁸. Le fer stocké dans la ferritine peut être rapidement libéré en fonction des besoins de la cellule par protéolyse lysosomale lors du processus de ferritinophagie.

Une déficience totale de la sous-unité H de la ferritine est létale à l'état embryonnaire, tandis que son inactivation conditionnelle dans le foie et la rate conduit à une surcharge en fer et une sensibilité accrue au stress oxydant s'accompagnant de dommages hépatiques sévères chez la souris adulte¹⁶¹. En revanche, un défaut de synthèse de la sous-unité L provoque une dérégulation de l'homéostasie du fer systémique avec une augmentation importante du taux d'homodimère FTH/FTH¹⁶² sans signe notable de neurodégénérescence¹⁶³. Dans ce modèle, l'expression seule de FTH n'est pas suffisante pour garantir la survie des souris en raison de la réduction importante de la biodisponibilité cellulaire du fer qu'elle engendre^{162,163}. Par conséquent, la présence d'un certain degré de complémentarité entre les deux sous-unités est nécessaire pour garantir les fonctions de stockage du fer et de protection contre la production de réactifs de l'oxygène exercée par la ferritine.

b. L'apport du fer à la mitochondrie

La mitochondrie reçoit le fer dont elle a besoin pour son métabolisme soit directement de l'endosome via l'internalisation du complexe Tf-TfR1, soit du LIP présent dans le cytosol.

L'étude des cellules érythrocytaires laisse penser que l'endosome contenant de la Tf pourrait entrer en contact avec la mitochondrie par des interactions transitoires avec le TfR1^{164,165}. Ce système évite ainsi la libération du fer dans le cytoplasme en facilitant le transfert direct du fer de l'endosome à la mitochondrie. Pour atteindre son site d'utilisation, la matrice mitochondriale, le fer doit traverser la membrane de l'endosome ainsi que les deux membranes de la mitochondrie. Le passage du fer au travers de l'endosome est possible grâce à DMT1¹⁶⁶. La présence de ce transporteur permettrait également la traversée du fer au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Une autre hypothèse est la présence de canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC), permettant le passage de nombreux solutés tels que le calcium et le magnésium, pour favoriser la traversée du fer. En revanche, le passage de la membrane interne de la mitochondrie est bien décrit et il fait intervenir les transporteurs mitoferrines 1 et 2 (Mfrn 1-2)¹⁶⁷. La Mfrn 2 est exprimée à des taux faibles de manière ubiquitaire tandis que la Mfrn 1 est majoritairement présente dans les cellules érythroïdes. La délétion des orthologues levures des mitoferrines, MRS3 et MRS4, conduit à un défaut de l'homéostasie du fer s'accompagnant d'une diminution de la biogenèse des centres Fe-S¹⁶⁷. Chez la souris, l'inactivation de la Mfrn provoque une réduction sévère de la synthèse de l'hème¹⁶⁷. Ces éléments mettent en évidence le rôle primordial des mitoferrines dans l'absorption du fer mitochondrial pour garantir les trois fonctions essentielles de la mitochondrie : la biogenèse des ISC, la synthèse de l'hème et le stockage du fer, qui sont également affectées lors d'une diminution en frataxine^{168,169}.

Le fer peut être stocké dans la mitochondrie par sa séquestration dans la ferritine mitochondriale (FTMT). Ce stockage empêche l'activation de réactions d'oxydo-réductions générées par le fer libre. Cependant la ferritine mitochondriale n'est pas exprimée dans tous les tissus. On la retrouve majoritairement dans le cerveau, le cœur, les reins, et les muscles lisses mais absolument pas dans le foie¹⁷⁰. Ces données laissent penser qu'outre son rôle majeur dans la régulation du fer mitochondrial, la FTMT a surtout une capacité de mito-protection contre les dommages oxydatifs¹⁵⁸. Même si la délétion totale du gène de la FTMT ne conduit pas à un phénotype évident chez la souris¹⁵⁸, sa surexpression importante dans des maladies neurodégénératives telles que l'AF mais également la maladie d'Alzheimer a un effet notable dans la prévention des dommages oxydatifs dans les neurones dopaminergiques¹⁷¹.

c. L'export du fer

L'utilisation du fer dans la cellule est finement régulée. Le fer excédentaire peut être exporté grâce au transporteur membranaire, la ferroportine (FPN) présente à la surface cellulaire grâce à ses 12 segments transmembranaires. Une fois dans le milieu extracellulaire ou dans la circulation sanguine, le fer libéré va être oxydé par des ferroxidases (céruloplasmine, héphaestine, ..) avant d'être incorporé à des protéines de transports (**Figure 13**).

La ferroportine est fortement exprimée dans les cellules jouant un rôle prépondérant dans l'homéostasie du fer tels que les entérocytes, les macrophages, les hépatocytes ainsi que les cellules du placenta¹⁷². Les souris présentant une délétion homozygote du gène *FPN* sont incapables d'achever leur développement embryonnaire. Une inactivation conditionnelle de *FPN* conduit à l'apparition d'une anémie sévère, démontrant le rôle essentiel de la ferroportine dans la libération du fer dans l'organisme pour les besoins tissulaires. De plus, une déficience en fer affecte l'expression de ferroportine en diminuant sa quantité de transcrits¹⁷², démontrant que cet acteur est régulé par le fer via un mécanisme post-transcriptionnel.

5. La régulation de l'homéostasie du fer cellulaire

a. La régulation post-transcriptionnelle par les IRPs

En raison de sa toxicité accrue, la présence de fer intracellulaire est finement régulée au niveau post-transcriptionnel par des protéines régulatrices qui dépendent de la concentration en fer. Les protéines régulatrices du fer 1 et 2 (IRP1-2 pour *Iron regulatory proteins*) régulent l'expression des protéines impliquées dans l'absorption, le transport, le stockage, et l'exportation du fer cellulaire. Ces IRP agissent comme des adaptateurs qui contrôlent le niveau de ces protéines en se fixant sur des éléments de réponse au fer (IRE pour *Iron regulatory elements*) présents dans les régions non codantes (UTR pour *Untranslated regions*) en 5' et en 3' des transcrits. Les IRE sont des structures en épingle à cheveux d'environ 30 nucléotides sur lesquelles les IRP peuvent venir se fixer en fonction du statut en fer. La liaison d'IRP au niveau d'un motif IRE présent en 5' UTR de l'ARNm conduit à sa répression traductionnelle. En effet, la présence de protéines régulatrices empêche le recrutement des sous-unités du ribosome sur le transcrit, bloquant ainsi l'étape d'initiation de la traduction de protéine responsable du stockage du fer, la ferritine (FTN), et de son exportation, la ferroportine (FPN). D'autres acteurs impliqués plus largement dans le métabolisme du fer possèdent également des éléments de réponses au fer dans la partie 5' de l'UTR de transcrit participant à la synthèse de l'hème (l'hème synthase ou ALAS2), de l'érythropoïèse (HIF2 α) et de l'aconitase mitochondriale

(mtAconitase ou ACO2). En revanche, l'interaction des IRP sur la région 3'UTR de l'ARNm augmente leur stabilité, conduisant à une hausse de la traduction des protéines responsables de l'absorption du fer telles que le TfR1 et le transporteur DMT1. Par conséquent, la fixation des IRP à l'une ou l'autre des extrémités du transcrit induit des effets opposés sur l'expression de l'ARNm.

Le niveau de fer cellulaire contrôle l'activité des IRP, qui à leur tour régulent le niveau d'expression des protéines de l'homéostasie du fer. Lors d'une carence en fer, les IRP possèdent une forte affinité de liaison pour les motifs IRE. Cette interaction IRP/IRE favorise ainsi la traduction des protéines permettant l'entrée du fer dans la cellule (TfR1 et DMT1) au détriment des protéines d'export et de stockage (FPN et FTN). La régulation de l'homéostasie du fer conduit ainsi à une meilleure absorption du fer pour maintenir le métabolisme cellulaire tout en limitant les pertes afin de prévenir toute toxicité liée à une carence en fer. En revanche, lors d'un excès de fer intracellulaire, l'activité des IRP est totalement désactivée par deux mécanismes différents. Dans un premier temps, IRP2 est polyubiquitinylée par l'action d'une protéine senseur du fer, FBXL5 (*F-Box Leucin-rich repeat protein 5*). Cette modification post-traductionnelle conduit à sa dégradation par le protéasome. Dans un deuxième temps, l'IRP1 va acquérir un centre Fe-S, entraînant un changement conformationnel de la protéine qui va devenir une aconitase (ACO1 ou aconitase cytosolique). La modification structurale engendrée par la liaison du centre Fe-S provoque une perte de la capacité de liaison aux IRE. Par conséquent, une augmentation du fer intracellulaire entraîne une diminution de l'expression des protéines d'absorption du fer (TfR1 et DMT1) afin de favoriser les protéines de stockage (FTN) et d'exportation (FPN). De cette manière, les protéines IRP veillent au maintien de l'homéostasie du fer pour les besoins métaboliques cellulaires, tout en limitant la production de substances redox actives dues à un excès de fer.

b. La ferritinophagie

La libération du fer contenu dans les ferritines dépend du processus de ferritinophagie. Ce mécanisme permet, par la dégradation des ferritines, de recycler le fer intracellulaire grâce à l'activité des lysosomes. Dans des cellules carencées en fer, la ferritine est ciblée par la voie de dégradation lysosomale *via* un processus impliquant une autophagie sélective. Ce processus catabolique est initié par la formation d'un autophagosome sous le contrôle de gènes de la famille *ATG* (*autophagy-related gene*). Ces gènes codent pour de nombreuses protéines

vésiculaires dont la protéine ATG8 qui permet le recrutement d'autres récepteurs cargos dans le but de séquestrer tous les éléments nécessaires au sein de la vésicule.

La ferritine est tout d'abord recrutée par la protéine de co-activation du récepteur nucléaire 4 (NCOA4) dans les autophagosomes. L'extrémité C-terminale de NCOA4 est capable d'interagir directement avec la sous-unité H de la ferritine pour l'adresser au lysosome et permettre sa dégradation. Ce domaine de NCOA4 est également un lieu reconnu par l'ubiquitine ligase HERC2 qui provoque sa polyubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome en cas d'excès de fer. NCOA4 agit ainsi comme un capteur du fer qui se lie à la ferritine en cas de carence. Ce système peut être considéré comme un deuxième niveau de régulation de la concentration en fer intracellulaire après le mécanisme IRP/IRE.

Au sein des lysosomes, la ferritine est dégradée par les hydrolases lysosomales et le noyau de fer est libéré. Ce phénomène est favorisé par la répulsion des sous-unités du polymère FTH/FTL à un faible pH. Les conditions de réduction du noyau de fer, de sa solubilisation et de son transport dans le cytosol restent encore à clarifier. Plusieurs hypothèses laissent penser que ces processus sont semblables à ceux rencontrés dans l'endosome avec la participation des protéines Steap et de DMT1. En raison de l'environnement acide, le fer présent dans le lysosome est principalement sous sa forme ferreuse Fe^{2+} , pouvant potentiellement induire des composés réactifs de l'oxygène.

c. Les autres protéines pouvant être régulées par le fer

La régulation de l'expression de certains transporteurs du fer de la voie NTBI tels que les protéines ZIP (ZIP8 et ZIP14) semble différer de celles des transporteurs classiques de la voie TBI (TfR1). La quantité et la stabilité des transcrits ZIP8 et ZIP14 ne sont pas affectées par le statut en fer contrairement au niveau d'expression des protéines. En effet, la quantité de protéines ZIP est positivement corrélée à la concentration en fer¹⁴⁴, laissant entrevoir la présence d'une régulation traductionnelle ou post-traductionnelle dépendant du statut en fer.

d. Un second niveau de régulation du TfR1

Le TfR1 pourrait être sujet à un processus d'endocytose constitutif indépendant de tout stimulus externe. Cependant, ce récepteur est sujet à plusieurs modifications post-traductionnelles pouvant affecter son activité ou ses capacités de liaison à la Tf. L'absence de glycosylation du TfR1 ne permet pas de détecter des formes dimériques du récepteur obtenues à partir de l'établissement de ponts disulfures¹³⁴. L'absence de glycosylation de résidus asparagine sur la

surface extracellulaire du récepteur conduit à une altération du transport du TfR1 à la surface cellulaire et une faible capacité de la liaison à la Tf¹³⁴. Dans la partie intracellulaire, le TfR1 peut subir des phosphorylations et des palmitoylations (ou acylations). Des modifications de phosphorylations ne provoquent aucun changement d'activité du TfR1¹³¹. En revanche, un défaut d'acylation augmente la concentration de TfR1 dimérique à la surface cellulaire ainsi que son internalisation se traduisant par une hausse de l'absorption du fer cellulaire¹³². La stearoylation du TfR1 inhibe des cascades de signalisation intracellulaire promouvant la fusion des mitochondries¹⁶⁵. La morphologie de la mitochondrie est ainsi dépendante de l'état de stearoylation du TfR1, laissant entrevoir la possibilité d'une interaction entre ces deux éléments. Par conséquent, l'ajout de groupements prosthétiques réversibles module la fonction du TfR1 et peut affecter le contenu en fer intracellulaire de manière indépendante de son statut.

III. Les modèles de l'ataxie de Friedreich

1. Les modèles murins

a. Les souris à délétion conditionnelle de FXN

Chez la souris, une absence totale d'expression de *FXN* est létale au stade embryonnaire à partir d'environ six jours en raison d'un arrêt du développement et d'une apoptose importante³⁶. De plus, la suppression complète de *FXN* dans des cellules en prolifération est également létale¹⁷³. Dans ce contexte, les premiers modèles murins viables ont été générés par approche conditionnelle en utilisant le système Cre-LoxP permettant d'aboutir à une délétion exonique dans un tissu précis de manière inductible. Ces modèles conditionnels ne présentent aucune expression de *FXN* spécifiquement dans les muscles cardiaques et squelettiques (MCK, *muscle creatine kinase*)⁹⁰ ou dans les neurones (NSE, *neuron specific enolase*⁹⁰, Prp-CreER¹⁰⁹). Ensembles, ils permettent de reproduire les principales caractéristiques de l'AF dont notamment une cardiomyopathie hypertrophique ainsi qu'une ataxie spinocérébelleuse et sensitive. Néanmoins, il est important de considérer que l'étude de ces souris conditionnelles fait référence à une perte totale de *FXN* dans les tissus considérés. Or, jusqu'à présent, aucun patient atteint d'AF ne présente une absence complète de frataxine, qui reste à l'état résiduel dans l'organisme.

Les analyses moléculaires du modèle MCK ont mis en évidence un déficit de la biogenèse des centres Fe-S précédant une accumulation de fer mitochondriale et les premiers signes de dysfonctionnement cardiaque⁹⁰. Bien qu'aucune production anormale d'espèces réactives de l'oxygène n'ait été rapportée⁹⁰, une seconde étude a révélé l'induction de réponses intégrées au

stress (ISR) consécutive aux perturbations des processus anaboliques mitochondriaux (synthèse de l'hème et des ISC)¹⁷⁴. L'activation de l'ISR favorise l'expression d'un ensemble de marqueurs d'autophagie et d'apoptose jouant un rôle prépondérant dans la fibrose et la dégénérescence des cardiomyocytes. Même si l'accumulation de fer apparaît comme la première manifestation histologique observable (entre 5 à 10 semaines de vie), il est admis que les altérations moléculaires s'établissent dès les premiers jours de vie conduisant à un ensemble de dysfonctionnements métaboliques et des réponses apoptotiques exagérées plusieurs semaines plus tard¹⁷⁴.

Les études menées sur le modèle murin conditionnel spécifique du cœur ont montré une augmentation anormale des taux de fer dans d'autres organes que le tissu cardiaque. Malgré une quantité de frataxine normale dans les tissus non musculaires, une hausse de la charge de fer a été détectée dans le foie, les reins et la rate¹⁶⁹. Ce phénomène pourrait résulter d'une altération du métabolisme systémique du fer impliquant l'hepcidine qui est orchestrée par une absence d'expression de *FXN* dans le cœur et les muscles squelettiques. Néanmoins, les patients présentant des accumulations de fer restreintes au cœur et au cerveau, il semblerait que ce processus ne soit pas transposable à l'homme dans un contexte de présence de frataxine résiduelle.

De plus, le fer serait principalement lié à la ferritine dans ces tissus non musculaires. En revanche, des agrégats de fer mitochondriaux indépendant de la ferritine ont été retrouvés dans le cœur de souris MCK¹⁶⁹. Dans ce sens, il apparaît que le tissu cardiaque présente une altération de l'homéostasie du fer cellulaire nettement plus prononcée que les autres tissus en raison de l'absence de frataxine. Ce dysfonctionnement passe notamment par une augmentation des protéines d'entrées du fer dans la cellule (TfR1) et la mitochondrie (MFRN2) au détriment des protéines d'export telles que la ferroportine (FPN)¹⁶⁸. Une diminution des taux de ferritine a également été rapportée, ce qui pourrait expliquer la réduction de l'incorporation du fer à cette protéine. Cependant, un excès de fer non lié à la ferritine (FTN) peut être toxique pour la cellule ; c'est pourquoi le mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'homéostasie du fer par les IRP s'active pour limiter l'absorption du fer et favoriser son stockage. Les IRP semblent maintenir une forte capacité de liaison des IRE malgré une surcharge en fer dans les cellules de patients⁶⁷. Cependant, cette hausse d'activité des IRP n'est pas constante d'un tissu à un autre. L'IRP1 paraît augmenté dans de nombreux modèles^{67,175} tandis que l'IRP2 n'est pas affectée dans le foie¹⁷⁶ et le cœur de modèles murins AF¹⁷⁵.

Les modèles neuronaux conditionnels de *FXN* présentent un déficit modéré en enzyme SDH (succinate déshydrogénase), une protéine à centre Fe-S, dans le cervelet avec quelques rares dépôts de fer dans plusieurs zones cérébrales (dans le tronc, le cortex et la couche granulaire cérébelleuse) à un stade tardif de la maladie¹⁰⁹. Ce phénomène s'accompagnant d'une neurodégénérescence lente et progressive, ainsi que d'une perte importante de neurones pouvant entraver les observations effectuées à un niveau avancé de la pathogénicité. Les études histologiques ont également rapporté des anomalies de la moelle épinière et des GRD avec une large densité de vésicules d'autophagie dans ces tissus, conformément au signe clinique de l'AF¹⁰⁹.

b. Les souris avec expansion GAA

Une seconde approche pour contrer la létalité embryonnaire de l'absence complète de *FXN* consistait à générer des souris transgéniques contenant la séquence *FXN* humaine avec des expansions GAA dans un fond génétique murin. Cette méthode a l'avantage de conduire à la production d'une quantité résiduelle de frataxine, comme observé chez les patients AF, plutôt que d'introduire un déficit complet et soudain de l'expression de *FXN* déclenchée par l'approche conditionnelle. Les modèles de souris avec une expansion GAA ont été générés dans un premier temps par une approche de recombinaison homologue. Les souris homozygotes *knock-in* (KIKI) ou hétérozygotes *knock-in/ knock-out* (KIKO) contenant des expansions d'environ 200 bp montrent une expression d'environ 66 à 82% du niveau normal de frataxine pour les souris KIKI contre 25 à 36% pour les souris KIKO¹⁷⁷. Les patients présentant des taux résiduels de frataxine de l'ordre de 5 à 30%, il n'est pas surprenant qu'aucun phénotype n'ait été observé dans le modèle KIKI. Cependant, les altérations cardiaques et neurologiques ne sont également pas présentes dans les souris KIKO.

Dans ce contexte, une autre méthode passant par une approche transgénique d'insertion de chromosome artificiel de levure (YAC) contenant une expansion instable de 190 GAA dans un contexte génomique humain favorable a été utilisée. Le transgène inséré contient le locus *FXN* en entier avec certaines régions flanquantes y compris la séquence du gène *PIP5K1B* (exon 14-16), *PRKACG*, et *TJP2*. Cette insertion complète dans des souris hétérozygotes *fxn*^{-/+} permet l'expression d'au moins une copie humaine de *FXN* ainsi que la viabilité du modèle¹⁷⁸, démontrant ainsi la complémentarité de fonction entre la frataxine humaine et murine. Sur ce principe, deux lignées de souris transgéniques YAC (YG22 et YG8R) contenant respectivement au moins une expansion instable de 190 GAA ou 190 GAA/90 GAA sauvent les souris KO *fxn*⁻

de la létalité embryonnaire grâce à l'expression uniquement de frataxine humaine⁵⁰. Ces modèles provoquent une diminution d'un peu plus de 50% de frataxine et permettent de reproduire plusieurs caractéristiques de l'AF telles qu'une réduction des complexes I-III de la chaîne respiratoire, une accumulation de fer mitochondrial et une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la racine dorsale⁵⁰. Cependant, aucune anomalie de la fonction cardiaque n'a été détectée⁵⁰.

Les variations phénotypiques entre les souris KIKO et YAC pourraient s'expliquer par l'environnement génétique au locus *FXN*. En effet, dans les modèles KIKO, l'expansion GAA est dans un fond génétique murin tandis que pour les modèles YAC, l'environnement génomique humain borde l'expansion de triplets. Par conséquent, il est probable que les gènes avoisinants de *FXN* joueraient un rôle dans le déclenchement de la physiopathologie de l'AF. De plus, la taille maximale d'expansion insérée n'excède pas 200 GAA dans ces modèles alors que la moyenne d'expansion présente chez les patients se situe entre 600 et 900 GAA. Des tentatives d'introduction de répétitions beaucoup plus importantes ont été menées en vain, suggérant l'existence de possibles mécanismes endogènes qui limitent le nombre de triplets.

2. Les autres modèles animaux

a. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

Les modèles générés par l'interférence d'ARN (ARNi) de l'homologue *FXN*, *frh-1* chez *C. elegans* ont montré des résultats fortement contradictoires conduisant à la fois à une diminution et à une augmentation de la durée de vie des nématodes. Les constructions d'ARNi dirigées contre *frh-1* peuvent entraver la consommation d'oxygène due à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire provoquant une réduction de la longévité de cet eucaryote multicellulaire¹⁷⁹. Cette croissance lente est associée à un comportement léthargique des animaux avec une sensibilité accrue au stress oxydatif. Malgré des divergences de leur durée de vie, une réponse altérée face aux agents oxydants semble être un point commun partagé dans ces modèles ARNi. La réduction de l'expression de la protéine frataxine affecte également le métabolisme des lipides en déclenchant des phénomènes d'autophagie mitochondriale, communément appelée mitophagie¹⁸⁰. La mitophagie est une réponse cellulaire consécutive à un stress de type hypoxie ou à une carence en fer qui est déclenchée à la suite d'un stress mitochondrial important. Bien que le contenu en fer ne soit pas déterminé dans ce modèle, l'induction de la mitophagie semble être une réponse conservée suite à la réduction de frataxine.

L'augmentation de la longévité par un déficit partiel en frataxine est un effet partagé par la réduction de l'expression d'autres protéines mitochondriales dont notamment mev-1, codant pour une sous-unité du complexe II de la chaîne respiratoire. L'impact de la quantité d'ARNi dirigée contre mev-1 sur la durée de vie des animaux a permis de mettre en évidence un certain effet-dose. Effectivement, l'administration d'une faible concentration en ARNi conduit à une augmentation légère de la longévité des nématodes tandis qu'une faible dilution de ARNi provoque une baisse significative de la durée de vie¹⁷⁹. Cette variation s'explique ainsi par les altérations plus ou moins importantes de la chaîne respiratoire consécutive à un déficit en mev-1¹⁷⁹. La transposition de ces résultats pourrait ainsi permettre d'expliquer la variabilité phénotypique importante présente dans les modèles ARNi frh-1.

b. Drosophila melanogaster (D. melanogaster)

Dans le modèle de *D. melanogaster*, une suppression complète de la frataxine affecte sérieusement la viabilité et le développement des larves qui n'atteignent pas la phase adulte. Une réduction de l'homologue Drosophile de la frataxine, fh1, dans les tissus musculaires et cardiaques en développement est également létale au stade nymphal, c'est-à-dire lors du passage de l'état larvaire à l'état adulte. En revanche, une diminution de son expression par ARNi dans certains types de neurones du système nerveux périphérique (SNP) permet le développement d'adultes viables mais avec une durée de vie réduite¹⁸¹. Malgré le caractère ubiquitaire de la frataxine, les différents tissus semblent avoir une sensibilité différente à son extinction. Le modèle de Drosophile permet ainsi d'approfondir notre compréhension de l'établissement de la neuropathie cellulaire dans un contexte de carence en frataxine au niveau notamment des motoneurones. Au stade larvaire, une perte du potentiel de membrane mitochondriale associée à une réduction de la production d'ATP a été détectée dans les axones ainsi qu'au niveau de la jonction neuromusculaire des nerfs¹⁸². Ces manifestations s'accompagnent d'un défaut du transport rétrograde dans les axones, conduisant au développement d'une neuropathie¹⁸².

Au-delà d'un transport axonal mitochondrial défaillant, le second mécanisme possible d'atteinte neurologique passe par la production d'espèces réactives de l'oxygène. Néanmoins, l'implication du stress oxydatif dans l'émergence de la neurodégénérescence reste quelque peu controversée dans les modèles de Drosophiles. Aucune augmentation de la formation de ROS n'a été détectée dans diverses régions neuronales adultes ou à des stades larvaires. De même, la suppression d'enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutases cytosolique

(SOD1) et mitochondriale (SOD2) ou la catalase (CAT) n'a aucun effet sur la neurodégénérescence et la létalité nymphale des clones fh1¹⁸¹. A l'inverse, un déficit conditionnel en frataxine dans les cellules gliales ou le système nerveux central (SNC) provoque une sensibilité accrue des mouches aux agressions oxydatives externes (hyperoxie et peroxyde d'hydrogène)¹⁸³. L'augmentation de l'expression de la catalase mitochondriale permet notamment de restaurer l'activité d'enzyme mitochondriale à centre Fe-S telle que l'aconitase et ainsi de prolonger la durée de vie réduite des mutants¹⁸³. Ces données suggèrent que les dommages conduisant à la dégénérescence neuronale pourraient être imputés à la production de ROS suite à une fonction mitochondriale défaillante dans la biogenèse des ISC.

Cette hypothèse est soutenue par des études menées sur des lignées transgéniques UAS-Gal4 présentant une diminution de protéine frataxine. Ces mutants se caractérisent par une diminution de l'activité de nombreuses protéines de la synthèse de l'hème et de la biogenèse des ISC, une altération de l'homéostasie du fer et une sensibilité accrue à une toxicité ferreuse¹⁸¹. Une carence en enzyme de synthèse des ISC telles que les ferrédoxines (Fdxh et Fdxh2) a des conséquences plus vastes sur le plan physiologique. En effet, la baisse de certaines hormones stéroïdes intervenant dans le processus de mue des larves, telle que l'ecdysone synthétisée à l'aide des ferrédoxines, conduit à des transitions défectueuses entre les stades larvaires et adultes. Ces manifestations expliquent ainsi le phénotype de larve géante à longue durée de vie observé sur des mutants fh1. Par conséquent, une diminution de l'activité mitochondriale provoque ainsi une accumulation du fer notamment dans le système nerveux de drosophiles déficientes en fh1¹⁸⁴ ainsi que des troubles dans l'homéostasie des lipides¹⁸⁵.

En effet, la perte de fonction mitochondriale s'accompagne d'un défaut du processus de β -oxydation des acides gras, entraînant l'accumulation de certaines espèces lipidiques dont l'acide palmitique (C16) ainsi que la synthèse de sphingolipides¹⁸⁵. La biogenèse des sphingolipides augmente l'expression de certaines enzymes telle que la sérine palmitoyltransférase (dégradant le palmitoyl-CoA) et de certains gènes comme Pdk1 (*3-phosphoinositide dependant protein kinase-1*) et Mef2 (*myocyte enhancer factor-2*) impliqués dans un phénotype neurodégénératif¹⁸⁵. Par conséquent, l'altération de l'activité mitochondriale due à un déficit en frataxine joue un rôle prépondérant dans la dégénérescence neuronale par une toxicité ferreuse associée ou non à des dommages oxydatifs. La présence d'un phénotype distinct et de la caractérisation des mécanismes neurodégénératifs ont permis l'utilisation de ces modèles Drosophile dans des essais thérapeutiques utilisant des chélateurs du fer¹⁸⁶.

3. Les modèles cellulaires

a. Bactérie et levure

Les organismes unicellulaires ont été parmi les premiers modèles établis pour mieux comprendre la localisation, l'organisation et la fonction de la frataxine. Bien qu'un défaut de CyaY, l'homologue bactérienne de *FXN*, ne conduit pas à un phénotype, la caractérisation de cette protéine par cristallographie et RMN a permis une avancée majeure dans notre connaissance des variations structurales induites par les mutations ponctuelles de *FXN*, de ses possibilités d'oligomérisation ainsi que de ses interactions avec d'autres partenaires protéiques de la biogenèse des ISC et avec le fer. Cependant, seuls les travaux menés sur *Saccharomyces cerevisiae* ont permis d'apporter des preuves directes *in vivo* de l'implication de la frataxine dans la synthèse des centres Fe-S au sein de la mitochondrie⁸⁹. En effet, les mutants de levure avec délétion de l'homologue frataxine, *ΔYfh1*, présentent un défaut de biogenèse des ISC occasionnant un déficit dans plusieurs enzymes à centre Fe-S dont l'aconitase ainsi que des protéines des complexes II-III de la chaîne respiratoire⁸⁹. Yfh1 a la capacité d'interagir directement avec certains composants de la machinerie des ISC comme par exemple Isu1¹⁸⁷ et la ferredoxine¹⁸⁸ dans les premières étapes de formation des centres Fe-S. Un déficit en frataxine conduit ainsi à une diminution d'interactions avec ses partenaires et à déséquilibrer la machinerie d'assemblage des ISC. Tout comme les souches *ΔIsu*, les levures déficitaires en Yfh1 présentent une accumulation de fer mitochondrial associée à une sensibilité accrue aux radicaux libres^{89,189}. Sa fonction de protection contre le stress oxydant n'a été découverte que récemment grâce à la possibilité de liaison de Yfh1 avec les superoxydes dismutases mitochondriale (SOD2) et cytosolique (SOD1). Ces complexes protéiques Yfh1/SOD permettent notamment d'augmenter l'activité enzymatique des SOD¹⁹⁰.

b. Cellules dérivées de patients

Les modèles unicellulaires bactériens et de levures récapitulent de nombreux aspects moléculaires de l'AF. Pourtant les mécanismes de pathogenèse propres à l'homme ne peuvent être appréhendés que dans des lignées cellulaires dérivées de patients. Dans ce sens, de nombreuses études *in vitro* ont été et sont toujours menées sur des lymphoblastes immortalisés, des fibroblastes primaires ou encore des lymphocytes issus de sang périphérique de patients. Ces différents types cellulaires ne sont pas les cibles de la maladie et les observations réalisées sur ces modèles ne sont pas toujours concordantes. Bien que l'ensemble des cellules dérivées de patients présentent toutes des caractéristiques d'extinction génique de *FXN* et les mêmes

phénomènes épigénétiques à son locus, leurs propriétés phénotypiques restent variables. Un défaut de la biogenèse des centres Fe-S couplé à une sensibilité accrue au stress oxydant ne conduisent pas systématiquement à une dérégulation globale de l'homéostasie de fer dans les mêmes types cellulaires^{89,191}. De plus, l'analyse de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire n'a montré aucun déficit dans les fibroblastes et les lymphocytes contrairement aux études menées sur des biopsies cardiaques de patients AF⁸⁹. Ces données suggèrent que seuls un certain nombre de défauts cellulaires peuvent être étudiés dans ces lignées comme par exemple les mécanismes physiopathologiques régissant une altération de l'homéostasie du fer. Néanmoins, les modèles les plus pertinents pour étudier les phénomènes de pathogénicité de l'AF dans leur ensemble sont les types cellulaires directement affectés par la maladie chez les patients, tels que les cardiomyocytes et les neurones sensitifs. Outre leurs intérêts majeurs, ces lignées n'en sont pas moins difficiles d'accès ; c'est pourquoi une première stratégie a été de manipuler des lignées cellulaires humaines ou même d'humaniser des cellules murines.

Une diminution de l'expression de la frataxine a été réalisée dans une variété de modèle cellulaire (cellules immortalisées, neurones, ..) par l'administration de petits ARN non codants (siRNA ou shRNA)¹⁹²⁻¹⁹⁵ aussi bien que par l'expression inductible du système de CRISPR/Cas 9¹⁹⁶. Malgré les efforts mis en œuvre pour l'établissement de ces lignées, des phénotypes divergents ont été rapportés en raison d'une efficacité variable d'extinction de l'expression de la frataxine (environ 10 à 40% de la quantité de frataxine résiduelle) ainsi que de la diversité des caractéristiques physiologiques de chacune des lignées testées.

Un second axe de recherche a été de développer des lignées de fibroblastes murins humanisés. Une absence complète de frataxine dans les cellules de souris étant létale, l'expression de plusieurs variants génétiques humains de *FXN* ont permis de mieux appréhender l'impact de plusieurs mutations ponctuelles (G130V, I154F et N146K) présentes chez les patients dans la pathogénicité de l'AF^{173,197}. Les différentes formes mutantes ont toutes conduit à un défaut de biogenèse des ISC, une accumulation mitochondriale de fer ainsi qu'une sensibilité au stress oxydatif^{173,197}. Cette approche a permis de mettre en évidence la sévérité phénotypique induite par certaines mutations par rapport à d'autre comme par exemple le variant I154F qui conduit à une surcharge en fer et une diminution de l'activité d'enzymes à centre Fe-S plus importante que la mutation G130V¹⁷³.

Enfin, une dernière stratégie de développement de nouveaux modèles cellulaires a été la génération de modèles cardiaques et neuronaux de cellules souches pluripotentes induites

(iPSC) à partir de cellules de patients AF. Cette approche expérimentale présente l'avantage de conserver les propriétés génétiques des cellules de patients telles que l'expansion de GAA, l'extinction épigénétique du locus ainsi que la diminution de l'expression de frataxine. Ces propriétés ont pu être étudiées avec attention dans les modèles iPSC afin d'approfondir nos connaissances des mécanismes d'expansion de triplets et l'impact de l'environnement épigénétique dans la répression transcriptionnelle de *FXN*^{198,199}.

Des cardiomyocytes dérivés de cellules iPS ont été générés avec succès jusqu'au stade immature et présentent une désorganisation du réseau mitochondrial ainsi qu'un déficit d'activité des protéines de la chaîne respiratoire caractéristique d'un défaut en frataxine²⁰⁰. Ces manifestations s'accompagnent d'une dérégulation de l'homéostasie du fer qui a été utilisée pour déterminer les potentielles propriétés thérapeutiques de certains chélateurs du fer et d'antioxydants dans l'AF²⁰⁰. En parallèle de ces travaux, des modèles neuronaux issus de l'induction de cellules souches ont été générés et présentent des signes d'altération de la fonction mitochondriale avec une diminution du potentiel de membrane et une dégénération progressive²⁰¹. Cependant, ce phénotype n'a pas été retrouvé dans d'autres modèles de neurosphères dérivés de cellules de patients²⁰². Ce phénomène pourrait s'expliquer par la caractérisation d'un très faible nombre de clones d'iPS à chaque analyse (entre un à deux clones) en raison de la difficulté et de la durée à obtenir ces modèles. De plus, la présence de gènes modificateurs ou de l'environnement épigénétique de reprogrammation des cellules pourraient augmenter la variabilité entre chacun des clones étudiés. Par conséquent, il semble important de mettre au point des méthodes de reprogrammation plus robuste pour permettre de générer un plus grand nombre de lignées cellulaires tout en préservant au maximum leur programme épigénétique.

IV. Les traitements de l'ataxie de Friedreich

La recherche de molécules thérapeutiques a considérablement progressé depuis la découverte de mutation à expansion de triplets dans *FXN*. Néanmoins, les traitements actuels ne permettent pas de faire régresser tous les symptômes de la maladie. Dans un premier temps, des traitements visant à limiter la progression des manifestations cardiaques et neurologiques ont vu le jour. Ces stratégies thérapeutiques proposées ont pour but de limiter la surcharge en fer dans les tissus, de réduire le stress oxydatif, d'améliorer la fonction mitochondriale ou d'augmenter

l'expression de la frataxine. Dans un second temps, des thérapies géniques et cellulaires ont commencé émerger ces dernières années et semblent être très prometteuses.

1. Les chélateurs du fer

L'AF se traduit par une dérégulation de l'homéostasie du fer qui se manifeste par une surcharge chronique au niveau du myocarde ainsi que du système nerveux central et périphérique. Bien qu'il n'ait pas été établi que l'accumulation de fer soit la cause de l'émergence de tous les symptômes de la maladie, sa réduction ouvre de nouvelles voies thérapeutiques dans l'AF. Des premières études pilotes ont été menées avec un chélateur du fer, le déféripone, sur neuf jeunes patients. Le déféripone a la particularité de pouvoir passer à travers la barrière hémato-encéphalique ainsi que les membranes cellulaires, y compris celles des mitochondries. Cette molécule permet ainsi de redistribuer le fer intracellulaire dans le milieu extérieur ou de l'éliminer. L'étude menée avec des doses de 20 à 30 mg/kg/jour a permis de diminuer l'accumulation de fer présente dans les noyaux dentelés de cerveaux des patients ainsi que de réduire la production de ROS²⁰³.

Un second essai en double aveugle de six mois a été mis en place afin de tester trois doses de déféripone (20, 40 et 60 mg/kg/jour) sur une cohorte de 72 patients âgés de 7 à 35 ans²⁰⁴. Cette étude a permis de valider l'innocuité de la dose testée la plus faible. Les sujets recevant la dose de 20 mg/kg/jour ont montré une diminution importante de la cardiomyopathie corrélée à une diminution de l'infiltration de fer dans ce tissu²⁰⁴. En revanche, la dose de 60 mg/kg/jour a dû être interrompue prématurément en raison de l'aggravation de l'ataxie chez deux patients²⁰⁴.

Des thérapies combinées avec des antioxydants (idébénone et/ou riboflavine) ont également été testées. Les résultats de la bithérapie (déféripone/idébénone) restent relativement mitigés. Bien qu'une réduction de l'hypertrophie cardiaque et de la quantité de fer dans le cerveau aient été décrites, aucune amélioration notable de l'ataxie n'a été relevée. En revanche, la trithérapie a dû être arrêtée chez plusieurs patients en raison de la survenue d'effets secondaires importants. Actuellement, le déféripone est couramment administré aux patients et permet de contrôler l'évolution ainsi que de réduire des symptômes cardiaques. Cependant, aucune amélioration des signes neurologiques n'a été mise en évidence par son utilisation sur le long terme.

2. Les antioxydants et/ou stimulants de la biogenèse mitochondriale

Une seconde stratégie a été développée pour essayer de palier les anomalies de la fonction mitochondriale résultant d'un déficit en frataxine. Dans ce sens, plusieurs antioxydants ont été

testés lors d'essais thérapeutiques. Parmi eux, l'idébénone, un antioxydant dérivé du benzoquinone, est connu pour favoriser la production d'ATP et maintenir le métabolisme mitochondrial. Une étude a démontré l'intérêt de l'idébénone dans l'amélioration des signes cardiaques^{205,206}. Dans les faits, les résultats sur le long terme restent modérés. Il semblerait que ce traitement ait surtout un impact chez les sujets présentant une hypertrophie très prononcée. Bien qu'une réduction de l'épaisseur ventriculaire ait été notée, aucune amélioration notable de la fonction cardiaque n'a été rapportée chez les patients²⁰⁷. Par conséquent, les bénéfices de l'administration d'idébénone seule restent incertains.

Le coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀), un analogue structural de l'idébénone, est une petite molécule lipophile qui assure le transport d'électrons des complexes I et II de la chaîne respiratoire au complexe III. Le CoQ₁₀ a également des propriétés antioxydantes. Son utilisation couplée à de la vitamine E a permis d'augmenter la production d'ATP mitochondrial dans les muscles squelettiques de patients permettant d'améliorer la fonction énergétique dans ces tissus ainsi que dans le cœur²⁰⁸. Néanmoins, l'administration de CoQ₁₀ et de vitamine E ou d'idébénone n'a montré aucune amélioration significative de la fonction neurologique chez les patients^{209,210}. Bien que ces antioxydants n'aient pas d'effets notables majeurs, ils restent régulièrement pris par environ la moitié des patients grâce à leur facilité d'accès et leurs faibles effets secondaires.

Dans ce sens, les propriétés thérapeutiques d'un grand nombre d'autres antioxydants ont été testées chez les patients AF ; c'est le cas notamment de la molécule A0001, chimiquement très proche de l'idébénone et du CoQ₁₀, mais beaucoup plus puissante. L'EPI-743, très proche de l'A0001 d'un point de vue structural, est connu pour prévenir le stress oxydatif tout en favorisant les fonctions mitochondriales. Ces traitements semblent relativement bien tolérés²¹¹ et présentent des améliorations significatives pour quelques sous-groupes de patients²¹². Cependant, la baisse de la progression des signes neurologiques reste limitée à une minorité de sujets.

L'activité des antioxydants est souvent favorisée par l'administration de vitamines. Des associations antioxydant/vitamine ont ainsi été testées sans pour autant donner des résultats prometteurs. La vitamine B1 (thiamine) a également fait l'objet d'un essai clinique du fait de ses propriétés neuroprotectrice. Des doses de 100 mg de thiamine à raison d'une à deux fois par semaine permettent d'améliorer la fonction neurologique des patients, de retrouver des réflexes tendineux quasi-normaux, ainsi que de limiter le taux de morbidité²¹³.

La mitochondrie a un rôle majeur dans la β -oxydation et la synthèse des acides gras qui se retrouvent altérés dans plusieurs modèles AF. Diverses molécules impliquées dans ces voies de biogenèse ont été proposées pour avoir des effets potentiellement thérapeutiques dans l'AF. Le RT001, un acide gras synthétique doté de propriétés antioxydantes, ainsi que la L-carnitine et la créatine, impliquées dans le transport des acides gras dans la mitochondrie, ont été très bien tolérées chez les patients. Bien que les résultats finaux de l'étude de RT001 n'aient pas été publiés, les administrations de L-carnitine ou de créatine n'ont pas montré d'amélioration majeure des signes neurologiques²¹⁴.

3. La surexpression de la frataxine

Un troisième axe de recherche de molécule thérapeutique vise à cibler la cause principale à l'origine de la maladie, à savoir le déficit en frataxine. Dans ce contexte, des molécules permettant d'augmenter l'expression du transcrit et de la protéine ont été étudiées avec attention.

c. L'érythropoïétine (EPO)

L'EPO est une hormone endogène sécrétée par les reins qui stimule la production de globules rouges. Cette molécule a reçu une attention particulière en raison de ses propriétés cardio et neuroprotectrices. L'administration d'érythropoïétine recombinante humaine (rhuEPO) permet d'augmenter l'expression de la frataxine dans les cardiomyocytes et les cellules neuronales de modèle murin¹⁹¹ ainsi que dans les lymphocytes de patients²¹⁵. De plus, des éléments en faveur d'une réduction du stress oxydant ont été rapportés²¹⁵. Cependant, aucune amélioration significative neurologique n'a été détectée après huit semaines de traitement (2000 UI trois fois/semaine) alors que quelques effets secondaires au niveau de l'hématocrite se sont fait ressentir chez plusieurs sujets. Un second essai a mis en évidence une bonne tolérance du traitement (de 20 000 à 40 000 UI toutes les trois semaines) mais sans aucune différence notable sur le niveau de l'expression de frataxine²¹⁶. Par conséquent, les études sur l'effet de l'EPO semblent contradictoires d'autant plus que les effets secondaires sur le long terme ne sont pas anodins car ils peuvent engendrer de graves problèmes cardiovasculaires en raison de l'augmentation du nombre de globules rouges.

d. Les inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC)

L'expansion intronique de GAA dans le gène *FXN* promeut la méthylation de l'ADN au niveau du locus ainsi que la désacétylation des histones. Ce phénomène d'hétérochromatinisation

conduit à sa répression transcriptionnelle. Dans ce sens, des inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) pourraient avoir un effet bénéfique en rétablissant l'expression de *FXN*. Les HDAC et le RG2833, un inhibiteur synthétique de HDAC, ont tout d'abord été testés dans des modèles murins et ils se sont révélés prometteurs. En effet, une nette augmentation du taux de frataxine a été détectée dans le cœur et le système nerveux²¹⁷ associée à une amélioration de la locomotion des souris^{218,219}. A l'issue de ces essais favorables, une étude de phase I a été menée sur quatre cohortes différentes de patients recevant des doses s'étendant de 30 à 240 mg/jour de RG2833. Les premiers résultats de cette étude étaient très concluants avec une augmentation de taux de transcrite *FXN* et de l'acétylation des histones H3 dans les cellules sanguines de patients. En revanche, la dégradation du RG2833 en un métabolite intermédiaire conduit à un déséquilibre de la fonction ventriculaire cardiaque²¹⁸. Cet effet secondaire a donc fortement limité son utilisation.

e. L'interféron gamma

L'interféron γ est une petite cytokine qui joue un rôle primordial dans le système immunitaire. Pour des raisons encore inconnues, l'utilisation de cette molécule a permis d'augmenter le niveau d'expression de frataxine dans différents types de cultures cellulaires de patients AF²²⁰. Ce traitement a des effets positifs sur le niveau de frataxine dans les cellules du GRD de souris en promouvant son expression et ainsi en prévenant l'apparition de dysfonctionnements neurologiques²²⁰. Plusieurs essais de phases I, II et III chez des patients AF ont eu des effets modestes sur le niveau d'expression de *FXN*, sans révéler de bénéfice notable sur les symptômes neurologiques^{221,222}.

4. La thérapie génique et cellulaire

La thérapie cellulaire repose sur la transplantation de cellules saines dans le but de remplacer les cellules atteintes par la pathologie. En général, cette approche utilise des cellules souches hématopoïétiques (CSH) d'un donneur sain qui sont ensuite greffées à un malade HLA (pour *human leukocyte antigen*) compatible. Dans ce contexte, une transplantation de CSH murines a été réalisée sur des souris YG8R développant des signes moteurs de l'AF²²³. Une restauration partielle de la quantité de transcrits *FXN* a été décrite dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques en lien avec une augmentation d'autres protéines mitochondriales (Cox8) dans tous ces tissus²²³. D'un point de vue biologique, l'augmentation du niveau de frataxine résulte du transfert physique de mitochondries issues des macrophages sains vers les cellules de l'hôte

atteintes par l'AF, dont notamment les neurones et les myocytes, grâce à la création de nanotubes à effet tunnel (TNT)²²³. Cet apport de mitochondries fonctionnelles permet de limiter le déficit locomoteur, la neurodégénérescence des neurones, l'atrophie musculaire et de réduire les dépôts de fer dans le cœur²²³. La thérapie cellulaire pourrait constituer une alternative aux traitements actuels mais cette technique de transfert mitochondrial reste encore à tester sur des cellules humaines.

La thérapie génique est une approche qui vise à remplacer le gène *FXN* muté par le gène sain, offrant ainsi une opportunité de traitement curatif dans l'AF. Cette technique se base sur la capacité des adénovirus à introduire leur propre ADN dans les cellules de l'hôte. Dans ce sens, l'insertion d'une copie de la séquence de référence du gène *FXN* dans un vecteur d'un adénovirus (AAV) pourrait constituer une voie thérapeutique pour remplacer le gène déficient par sa copie fonctionnelle. Les premiers essais de thérapie génique ont vu le jour sur des modèles murins reproduisant les symptômes cardiaques ou neurologiques de l'AF^{224,225}. L'administration d'AAV par injection intraveineuse ou intracérébrale permet de rétablir le niveau d'expression de frataxine dans le tissu cardiaque et le cerveau^{224,225}. Ce traitement permet également de prévenir le développement d'une cardiomyopathie mais aussi de la corriger quand les AAV sont administrés après le début des premiers symptômes²²⁵. Sur le modèle neurologique murin, l'injection intraveineuse empêche totalement l'apparition d'une neuropathie sensitive²²⁴. Quand l'administration d'AAV combine les voies intraveineuse et intracérébrale, les troubles comportementaux des souris sont rapidement et entièrement abolis en quelques jours²²⁴. Ainsi la thérapie génique représente une approche de choix pour le traitement de l'AF. Néanmoins, les problèmes de délivrance du virus ainsi que son caractère d'immunogénicité soulèvent des problèmes de sécurité qui limite sérieusement son utilisation. Des études doivent encore être menées dans ce sens avant de pouvoir passer à des essais cliniques chez l'homme.

Projet de thèse

L'identification du gène *FXN* responsable de l'ataxie de Friedreich (AF) a permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et a ouvert la voie vers de nouveaux traitements thérapeutiques. Malgré le contrôle de la cardiomyopathie, les patients continuent à souffrir de symptômes neurologiques sévères. Dans ce contexte, il semble important de continuer nos efforts dans l'identification des processus clés régissant l'apparition des signes cliniques.

Un premier axe de recherche a été d'approfondir le rôle de l'homéostasie du fer dans un contexte de déficit en frataxine et en *pip5k1β*. Ce projet passe par une meilleure caractérisation de l'ensemble des protéines majeures impliquées dans cette voie métabolique, de leurs mécanismes de régulation ainsi que de leurs impacts respectifs dans la surcharge en fer en utilisant des cultures primaires de fibroblastes de cinq patients présentant une expansion biallélique de GAA dans *FXN*. Les rôles de la voie TBI et NTBI dans l'entrée du fer ont été étudiés afin d'appréhender leurs impacts respectifs dans l'accumulation de fer. Des approches cinétiques ont été mises en œuvre pour analyser les mécanismes d'endocytose et de recyclage du récepteur Tfr1 dans le but d'établir son impact dans le cycle d'assimilation du fer. Cette étude s'est également attachée à analyser la régulation post-transcriptionnelle de l'homéostasie du fer ainsi que la modification post-traductionnelle du Tfr1 par palmitoylation afin de mieux comprendre la fonction des mécanismes de contrôle dans la surcharge en fer intracellulaire.

Le second objectif de mes travaux de recherche a été d'essayer de distinguer le rôle respectif de la frataxine et de *pip5k1β* dans la surcharge en fer. En effet, l'expansion de triplets conduit à une extinction en *cis* du gène *PIP5K1B*, codant pour la protéine *pip5k1β*⁶¹. Cette kinase assure la synthèse de phosphatidylinositol ($PI_{4,5}P_2$) jouant un rôle prépondérant dans les processus d'endocytose et de recyclage de récepteur membranaire. Outre un déficit en frataxine, une diminution de *PIP5K1B* pourrait également contribuer à l'émergence des mécanismes physiopathologiques de la maladie. Dans ce sens, une extinction transitoire ou stable de *FXN* et/ou *PIP5K1B* par l'utilisation de petits ARN non codants (siRNA ou shRNA) a été menée. La validité de ces lignées cellulaires a tout d'abord été établie avant de les caractériser au niveau de l'homéostasie du fer sur la base des travaux réalisés sur les fibroblastes de patients AF.

Le troisième but de cette étude est d'essayer de cibler certains axes de dérégulation régissant la surcharge en fer dans les fibroblastes de patients dans le but d'établir de nouvelles pistes thérapeutiques. La première partie de ma thèse ayant mis en évidence un dysfonctionnement de l'import du fer et de certaines voies de régulation, la recherche de molécules ciblant ces éléments a été réalisée. Des travaux précédemment réalisés au sein du laboratoire couplé aux résultats de la caractérisation des fibroblastes de patients AF ont permis d'identifier trois molécules potentiellement thérapeutiques. Ces agents ont été testés avec succès dans des cellules en culture.

D'autre part, la frataxine ayant un rôle primordial dans la biogenèse des centres Fe-S au sein de la mitochondrie et de l'homéostasie du fer, une partie de mes travaux de recherche s'est attelée à mieux appréhender l'impact de différents déficits en protéines impliquées dans des étapes clés de la synthèse des ISC. Dans ce contexte, l'analyse de plusieurs composants de l'homéostasie du fer a été réalisée dans des fibroblastes de patients présentant des mutations dans les gènes codants pour des protéines d'assemblage des centres [2Fe-2S] (FDXR), des centres [4Fe-4S] (IBA57) ou de leurs insertions aux apoprotéines réceptrices (NFU1 et NUBPL).

Enfin, un projet transversal portant sur l'étude de nouveaux gènes et leurs conséquences physiopathologiques sur l'homéostasie du fer dans des neurodégénérescences avec accumulation de fer dans le cerveau (NBIA) a également été mené au sein de mon laboratoire d'accueil. Ma collaboration sur une partie de ce projet m'a permis d'étendre le spectre de mes connaissances les mécanismes impliqués dans une surcharge en fer cellulaire et leurs impacts physiologiques chez les patients.

Matériels et méthodes

Patients

Des biopsies cutanées de patients présentant des mutations dans des gènes impliqués dans la biogenèse des ISC (*FXN*, *FDXR*, *IBA57*, *NFU1* et *NUBPL*) ont été réalisées conformément aux mesures éthiques et après accord des intéressés. Les patients *FDXR* (*FDXR* 1-3) présentent une atrophie optique et auditive associées à des mutations dans la séquence du gène *FDXR*. Le patient *FDXR* 1 est hétérozygote composite avec la variation c916C>T (p.Arg306Cys) sur un allèle et la mutation c.1255C>T (p.Gln419*) sur le second, tandis que le patient *FDXR* 2 présente une mutation homozygote faux sens c.916C>T. En revanche, le patient *FDXR* 3 possède une mutation intronique à l'état hétérozygote c.600+1G>T. Le sujet *IBA57* possède deux mutations faux sens à l'état hétérozygote composite : c.335T>G (p.Leu112Trp) et c.437G>C (p.Arg146Pro). Le patient *NFU1* présente une variation homozygote faux sens c.179T>G (p.Phe60Cys) tandis que le sujet *NUBPL* est hétérozygote composite avec la variation c.205-206delGT, laissant apparaître un codon stop prématuré (p.Val69Tyrfs*80) sur un allèle, et la mutation c.815-27T>C créant un site d'épissage ainsi qu'un décalage du cadre de lecture (p.Asp273Glnfs*32).

Les patients AF présentent tous une expansion de triplets GAA dans le premier intron du gène *FXN* (**Tableau 2**). Les analyses réalisées durant cette étude se sont portées sur la caractérisation de cultures primaires de fibroblastes obtenues par biopsies cutanées des patients P1 à P5 ou sur les cellules sanguines circulantes (PBMC) (pour les patients de P6 à P16 ainsi que P1).

Tableau 2 : Listes des tailles d'expansion GAA des patients AF

Patient AF	Taille de l'expansion (kb)
P1	2,1 et 2,1 kb
P2	3,0 et 3,6 kb
P3	2,1 et 2,7 kb
P4	2,4 et 2,4 kb
P5	Non communiqué (CHU de Strasbourg)
P6	2,1 et 2,4 kb
P7	2,2 et 2,8 kb
P8	2,4 et 2,7 kb
P9	1,5 et 2,4 kb
P10	2,5 et 3,0 kb
P11	1,7 et 1,9 kb

P12	2,8 et 2,8 kb
P13	2,9 et 3,4 kb
P14	2,5 et 2,5 kb
P15	2,6 et 2,6 kb
P16	2,5 et 2,5 kb

Culture cellulaire

Les lignées primaires de fibroblastes de patients, les cellules humaines immortalisées de type HEK 293 FT (Human Embryonic Kidney 293 Fast Transfection) ou de cancer du col de l'utérus (HeLa) ainsi que les cellules sanguines mononuclées périphériques (PBMC) sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Minimal Eagle Medium, Life Technologies) contenant 4,5 g/L de D-glucose, 110 mg/L pyruvate de sodium, 10% de sérum de vœu foetal (FBS – Life Technologies), 200 U/mL de pénicilline et 200 U/mL streptomycine (Life Technologies). Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide sous 5% de CO₂ jusqu'à 80% de confluence.

Pour l'étude de l'homéostasie du fer, les boîtes de culture sont préalablement traitées au collagène (collagen I Rat Tail, Life Technologies) afin de maximiser l'adhésion des cellules HEK. Les cellules sont cultivées : *i*) dans un milieu standard (DMEM avec FBS et antibiotiques), ou *ii*) en milieu pauvre en fer (DMEM avec antibiotiques et sans FBS), ou *iii*) en milieu riche en fer (DMEM avec 13 mM d'holo-Tf ou 100 µM de citrate d'ammonium de fer (FAC) et des antibiotiques, mais sans FBS) durant 72 h en atmosphère contrôlée pour des lignées primaires ou 48 h pour des cellules immortalisées.

Extinction des gènes

FXN et/ou *PIP5K1B* ont été éteints par l'utilisation d'un ensemble de quatre petits siRNA non-spécifiques (On-Target plus Non-targetting pool, Dharmacon) ou spécifiquement dirigés contre *FXN* ou *PIP5K1B* (On-Target plus SMART pool siRNA Human *FXN* ou On-Target plus SMART pool siRNA Human *PIP5K1B*, Dharmacon). Les cellules HEK à 80% de confluence ont été transfectées avec 50 nM de pool de siRNA à l'aide de l'agent transfectant (Dharmafect transfection reagent 1, Dharmacon) dans un milieu DMEM dépourvu d'antibiotiques. L'efficacité de transfection est estimée selon le contrôle de transfection SIGLO (Dharmacon) au microscope 48 h post-transfection. Les cellules transfectées sont incubées 48 h en atmosphère contrôlée avant étude de l'homéostasie du fer.

Une extinction stable par des shRNA spécifiques (human shFXN TRCN0000006138 et/ou shPIP5K1B TRCN0000037861, Sigma) ou non (pLKO.1-Puro Non-Target control, Sigma) a été réalisée sur des cellules HeLa à 80% de confluence. L'établissement des lignées est passé par une sélection monoclonale de chacun des clones dans un milieu sélectif contenant 3 µg/mL de puromycine (LifeTechnologie) sur une durée de trois semaines.

Extraction d'ARN et qRT-PCR

Les ARN totaux sont extraits de culots cellulaires (10^7 cellules) grâce au kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) à l'aide de 600 µL de tampon de lyse (RPL buffer, Qiagen) et repris dans 25 µL d'eau. La concentration et la pureté des ARN sont estimées par dosage au spectrophotomètre (NanoDrop 8000, Thermo). Une étape de digestion de l'ADN résiduel est réalisée par un traitement à la DNase grâce au kit TURBO DNA-free (Qiagen). La réaction de transcription inverse (RT) est réalisée à partir de 200 à 400 ng d'ARN totaux grâce au kit High-Capacity RNA-to cDNA (Thermo) selon les recommandations du fournisseur. Les transcrits *FXN*, *PIP5K1B*, *TFRC* et *FTH* sont quantifiés par la technologie de digital droplet PCR (ddPCR, Bio-Rad) dans le supermix 1X (ddPCR Supermix for probes with no dUTP, Bio-Rad) contenant 900 nM de sonde FAM spécifique du transcrit étudié et 900 nM de sonde HEX de β -glucuronidase (GusB). La ddPCR passe par la génération de gouttelettes réalisées dans une cartouche (Bio-rad) à partir de 20 µL de mix de PCR et 70 µL d'huile de génération (Droplet generator oil, Bio-rad) grâce au générateur de gouttelettes QX200. L'amplification est réalisée sur plaque 96 puits dans le thermocycleur C100 Touch™ selon les recommandations du fournisseur. L'acquisition des données est permise grâce au lecteur QX200 (Bio-rad). L'analyse des données s'effectue à l'aide du logiciel Quantasoft™ conformément aux conseils du fabricant. La quantité d'ADN complémentaire (ADNc) et le seuil de détection de la PCR sont ajustés en fonction des transcrits étudiés. Les quantités d'ARNm sont normalisées par le taux de transcrits GusB dont l'expression est ubiquitaire.

Analyse de l'expression des protéines

Le tapis cellulaire est lavé deux fois avec une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4, Life) avant lyse des cellules dans du tampon de lyse 1X (100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 600 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 Substitute (Biochemiker), 20 mM MgCl₂, cocktail d'inhibiteur de protéase 1X sans EDTA (Sigma)). Les protéines totales sont extraites par centrifugation des produits de lyse et quantifiées par la méthode de Bradford (Sigma). Les extraits protéiques

(30µg) sont préparés dans du tampon de charge Laemmli (2% SDS, 10% glycérol, 5% β-mercaptoéthanol, 0,002% bleu de bromophénol et 0,062 M Tris-HCl pH 6,8). L'étude en condition dénaturante des protéines s'effectue par ajout de 0,05 M de dithiothreitol (DTT, Sigma) et un chauffage à 95°C pendant 5 min. Le TfR1 est toujours étudié en condition non réduite afin d'analyser la quantité d'homodimère présente à la membrane. L'IRP2 et SOD2 sont également étudiées en condition non réduite tandis que toutes les autres protéines sont analysées en condition dénaturante. Les extraits protéiques ont été déposés sur des gels Mini Protean TGX avec 12% de polyacrylamide ou Any KD (Bio-rad) et ont migré entre 0,02 et 0,04 mA dans du tampon TGS 1X (2,5 mM Tris-HCl (pH 8,3), 19,2 mM Glycine et 0,01 % de SDS). Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Bio-rad) en condition semi-sèche à 15V pendant 17 min. La membrane est bloquée pendant 1h à température ambiante sous agitation dans une solution de PBS-Tween 0,05% (PBS-T, Sigma) supplémentée avec 5% de lait demi-écrémé.

La concentration des anticorps primaires est optimisée pour permettre une meilleure détection des protéines cibles selon les ratios suivants : anti-Ferritine (1/5000), anti-IRP2 (1/1000), anti-Frataxine (1/1000), anti-SOD1 (1/2000), anti-SOD2 (1/5000), anti-TfR1 (1/1000), anti-Pip5k1β (1/1000), anti-ACO2 (1/1000), anti-GAPDH (1/10000). Les anticorps primaires sont incubés pendant une nuit à 4°C sous agitation. L'immunodétection est réalisée par un système de détection chimioluminescence (ECL, Sigma) avec des anticorps secondaires IgG anti-souris ou lapin couplés à la peroxydase (1/10000). L'acquisition des images hautes résolutions est réalisée grâce au lecteur Chemidoc équipé d'une caméra CDD (Bio-rad) à l'aide du logiciel Image Lab (Bio-Rad).

Détermination du contenu en fer intracellulaire

La teneur totale en fer cellulaire a été quantifiée dans des lysats de culture selon la méthode décrite par Riemer *et al.*²²⁶. Les cellules ont été lysées par 200 µL de NaOH 50 mM pendant 2h à 4°C. Des aliquotes de lysats ont été utilisées soit pour la quantification du fer (par la méthode de la ferrozine), soit pour la quantification des protéines (par la technique de Bradford). Pour la détermination du contenu en fer, une aliquote de 150 µL de lysat a été prétraitée avec une solution équi-volume de HCl 1,4 M et de KMnO₄ 4,5% pendant 2h à 60°C dans le but de relarguer le fer contenu dans les protéines et convertir l'ensemble du fer ferrique en fer ferreux. Ce dosage du fer à base de ferrozine mesure ainsi à la fois le fer ferreux libre, libéré de protéines

ou issu de la conversion du fer ferrique afin de le chélater avec le réactif de détection du fer (ferrozine 6,5 mM, néocuproïne 6,5 mM, acétate d'ammonium 2,5 M, acide ascorbique 1 M), donnant ainsi naissance à un produit coloré qui est détecté par spectrophotométrie à 560 nm (lecteur de miroirs Victor Nivo, PerkinElmer). La concentration en fer a été normalisée avec la concentration en protéines.

Détection du TfR1 à la membrane plasmique

Le récepteur de la transferrine lié à la membrane a été mesuré par AMNIS (Amnis Corp, Millipore Sigma) qui combine cytométrie de flux et imagerie cellulaire détaillée. Les cellules ont été incubées pendant 1h dans un milieu DMEM sans FBS à 37°C, puis traitées par une solution de PBS contenant 5 mM d'EDTA afin de les récolter tout en préservant l'intégrité du TfR1 situé à la surface membranaire. Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS froid avant d'être incubées avec un anticorps de souris anti-TfR1 (A24) pendant 1h sur de la glace pour éviter l'internalisation du TfR1. Les cellules ont été ensuite marquées par un anticorps secondaire Alexa fluor 488 (Invitrogen, A11029) pendant 30 min sur de la glace. Les cellules ont été lavées et colorées avec une solution Hoechst (1/1000, Invitrogen, H3570) pendant 5 min avant l'acquisition. La fluorescence du TfR1 et du Hoechst a été étudiée sur au moins 20 000 cellules à l'aide de l'instrument Imagestream^X Mk II (Amnis Corp, MilliporeSigma) à un grossissement de 40X. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel AMNIS IDEASTM (version 6.2 Amnis Corp). La compensation spectrale a été effectuée à l'aide d'échantillons monomarqués. Un masque spécifique a été conçu pour analyser la localisation TfR1 à la membrane plasmique. Ce masque en forme de beignet est le résultat de la sélection de l'ensemble des pixels d'une cellule établi en lumière blanche, moins 5 pixels d'érosion et 1 pixel de dilatation. Les résultats ont été exprimés en valeur moyenne de l'intensité de pixels, qui correspond à l'intensité de signal du TfR1 normalisée par la surface.

Internalisation et recyclage de la transferrine

La mesure du recyclage et de l'internalisation du Tf a été effectuée par imagerie en temps réel via un microscope à disque rotatif (Spinning disk, ZEISS Microscopy). Les fibroblastes ont été placés à 30% de confluence dans des microglissières à fond de verre (IBIDI) 24 heures avant l'expérience. Les cellules ont été incubées dans un milieu DMEM sans FBS pendant 1h.

L'internalisation et le recyclage de la Tf ont été étudiés après incubation avec de l'Alexa fluor 555 conjugué à de la transferrine (12,5 µg/mL) pendant 30 min à 37°C sur au moins 20 cellules en utilisant la microscopie à disque rotatif (Spinning disk, ZEISS Microscopy) à un objectif de 63X. Une vidéo de chaque cellule a été acquise pendant 40 min avec une image par minute et en utilisant le logiciel Zen (ZEISS Microscopy). La région nucléaire a été définie à l'aide du logiciel Icy v1.9 et agrandie deux fois pour générer la région périnucléaire d'intérêt. Ces masques ont ensuite été appliqués sur le canal de fluorescence de la transferrine par un plugin de détection pour obtenir l'intensité moyenne des particules de fluorescence. Seules les particules d'une taille d'au moins 8 pixels ont été prises en compte. La valeur moyenne de l'intensité a été normalisée par rapport à la surface. L'internalisation de la Tf correspond à la moyenne de la fluorescence de la Tf dans la région périnucléaire, après l'élimination du milieu marqué à l'Alexa fluor 555 (T0). En revanche, le recyclage de la Tf correspond à la perte de fluorescence rouge de chacune des cellules au cours du temps. Les données ont été exprimées en pourcentage de signal Tf initial.

Test de viabilité cellulaire

Le nombre de cellules viables est déterminé sur des cellules en suspension dans 1 mL de PBS et diluées au demi dans du bleu Trypan 0,04%. Après une incubation de 3 min à température ambiante, 10 µL de suspension sont placés dans une cellule de Malassez pour permettre le dénombrement des cellules viables (non marquées) et des cellules mortes (colorées au bleu Trypan).

Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm l'erreur standard autour de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques sont réalisées grâce au test de Student (Test d'homogénéité des moyennes - t-test) sur des échantillons non appariés pour une même condition (avec ou sans fer). La comparaison de données issues d'échantillons traités *versus* des échantillons non traités est étudiée par un test multiparamétrique de type ANOVA (analyse de variance). Le degré de signification des tests est exprimé par : * pour une p-value < 0.05, ** pour une p-value < 0.01 ou *** pour une p-value < 0.001. Ns = non significatif.

Résultats

Partie I : Étude de l'homéostasie du fer dans des fibroblastes de patients Friedreich et applications thérapeutiques

a. Dérégulation de l'homéostasie du fer cellulaire dans des fibroblastes de patients AF

Article 1 en cours de révision (Journal Blood) :

Defective palmitoylation of transferrin receptor triggers iron overload in Friedreich's ataxia fibroblasts

Floriane Petit¹, Anthony Drecourt¹, Michael Dussiot^{1,2}, Coralie Zangarelli¹, Olivier Hermine^{1,2}, Arnold Munnich^{1,3}, Agnès Rötig^{1*}

¹UMR1163, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France

²Laboratory of Excellence GR-Ex, Institut Imagine, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France

³Department of Genetics, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France

*Corresponding author. Agnès Rötig. ORCID: 0000-0003-0589-0703; Institut Imagine, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France; tel: +33 142 754 322; agnes.rotig@inserm.fr.

KEY POINTS

Abnormal post-translational palmitoylation of transferrin receptor results in iron overload in Friedreich's ataxia fibroblasts.

Artesunate, dichloroacetate and coenzyme A improved the transferrin receptor palmitoylation and reduced iron overload.

ABSTRACT

Friedreich's ataxia (FRDA) is a frequent autosomal recessive disease caused by a GAA repeat expansion in the *FXN* gene encoding frataxin, a mitochondrial protein involved in iron-sulfur cluster (ISC) biogenesis. Resulting frataxin deficiency affects ISC-containing proteins and causes iron to accumulate in the brain and heart of FRDA patients. Here we report on abnormal cellular iron homeostasis in FRDA fibroblasts inducing a massive iron overload in the cytosol and mitochondria. We observe membrane transferrin receptor 1 (TfR1) accumulation, increased TfR1 endocytosis, and delayed transferrin recycling, ascribing this to impaired TfR1 palmitoylation. Frataxin deficiency is shown to reduce coenzyme A (CoA) availability for TfR1 palmitoylation. Finally, we demonstrate that artesunate, CoA, and dichloroacetate improve TfR1 palmitoylation and decrease iron overload, paving the road for evidence-based therapeutic strategies at the actionable level of TfR1 palmitoylation in FRDA.

INTRODUCTION

Friedreich's ataxia (FRDA) is a frequent autosomal recessive degenerative disease (1 out of 50,000 live births) characterized by progressive spinocerebellar and sensory ataxia, lack of tendon reflexes in the legs, dysarthria, and pyramidal weakness of the inferior limbs, in association with hypertrophic cardiomyopathy and occasionally diabetes mellitus (Pandolfo, 2009). FRDA is primarily caused by GAA repeat expansions within the first intron of *FXN*, a gene encoding the 210-amino-acid mitochondrial protein frataxin. Such expansions account for 96% of *FXN* mutant alleles (Campuzano et al., 1996). They induce epigenetic silencing, abnormal DNA structures, and aberrant *FXN* RNA splicing, which together lower the steady-state frataxin level (Herman et al., 2006). Extensive studies in yeast have shown that YFH1, the yeast homolog of frataxin, is involved in the first step of mitochondrial assembly of iron-sulfur clusters (ISCs), which are subsequently inserted into mitochondrial or cytosolic proteins (Stehling et al., 2014). In YFH1-deleted yeast strains and the hearts of FRDA patients and mice, frataxin deficiency reportedly results in defective ISC-containing proteins—namely, cytosolic and mitochondrial aconitases involved in the citric acid cycle and respiratory chain complexes I to III (Puccio et al., 2001; Rotig et al., 1997).

Cellular models and pathophysiological studies of FRDA patients suggest a link between frataxin deficiency and altered cellular iron homeostasis. Granular iron deposits have been observed in the hearts (Lamarche et al., 1980) and brains of FRDA patients (Boddaert et al., 2007), as well as in cardiomyocytes of the conditional MCK mouse model reproducing the cardiac phenotype (Puccio et al., 2001). Frataxin deficiency has been shown to increase production of free reactive oxygen species (ROS) in the fibroblasts and plasma of FRDA patients (Schulz et al., 2000). Previous studies have demonstrated that iron accumulates in mitochondria and, to a lesser extent, in the cytosol of $\Delta Yfh1$ yeast and MCK mice (Babcock et al., 1997; Puccio et al., 2001). However, evidence that frataxin deficiency also causes cytosolic iron dysregulation is inconclusive. Indeed, studies have alternatively shown higher (Ramirez et al., 2012; Seznec et al., 2005) or lower (Huang et al., 2009; Martelli et al., 2015; Telot et al., 2018; Whitnall et al., 2012; Whitnall et al., 2008) ferritin levels in various frataxin deficiency models, and cytosolic and mitochondrial iron contents have not been consistently measured.

Here we report on major iron accumulation in both the cytosol and mitochondria of cultured skin fibroblasts from FRDA patients with biallelic *FXN* GAA expansions. We show that cultured cells were unable to limit iron uptake in our study. Moreover, intracellular

coenzyme A (CoA) availability and transferrin receptor 1 (TfR1) palmitoylation were reduced, suggesting that the latter could alter iron uptake and the metal pool in FRDA.

RESULTS

Dysregulation of iron homeostasis in FRDA fibroblasts grown under basal conditions

Our study investigated iron homeostasis in cultures of skin fibroblasts from five FRDA patients (with biallelic GAA repeat expansions), whose steady-state frataxin levels were significantly lower in comparison to controls (Fig. 1A, Supplemental Figure 1). We quantified ferrous and ferric labile iron, as well as the metal complexed with cellular proteins in fibroblasts grown in regular medium (10% fetal bovine serum, FBS), using a ferrozine-based iron assay (Riemer et al., 2004). Iron content was measured in mitochondrial and cytosolic compartments after cellular fractionation. Both mitochondrial and cytosolic iron content was significantly higher in FRDA fibroblasts than in controls (Fig. 1B), though the distribution of iron between these compartments was similar across FRDA and control cells (Fig. 1C). This contrasts with findings for *ΔYfh1* yeast strains, where iron accumulated in the mitochondria at the expense of cytosol (Babcock et al., 1997).

Homeostasis of cellular iron is regulated by a post-transcriptional mechanism involving iron regulatory proteins (IRPs) 1 and 2 (IRP1, IRP2) (Hentze and Kuhn, 1996). IRP2 is degraded when cytosolic iron concentration increases, causing TfR1 downregulation, which reduces iron uptake, and ferritin upregulation, which promotes iron storage. Western blot analyses of FRDA fibroblasts revealed an expected decrease of IRP2 and increase of ferritin, consistent with cytosolic iron accumulation (Fig. 1D, Supplemental Figure 1). Paradoxically, dimeric TfR1 steady-state levels actually increased in FRDA fibroblasts, mimicking iron starvation as previously reported upon disruption of the mitochondrial ISC machinery (Muhlenhoff et al., 2015), which is not consistent with lower IRP2 levels. Thus, we hypothesized that TfR1 can escape regulation by IRPs.

Moreover, levels of cytosolic and mitochondrial superoxide dismutases 1 and 2 (SOD1 and SOD2) rose (Fig. 1D, Supplemental Figure 1), suggesting oxidative stress that is triggered by iron overload. Flow cytometry using MitoSOX consistently revealed a 2.5-fold increase in mitochondrial reactive oxygen species within FRDA fibroblasts (Fig. 1E). Altogether these findings point to cellular iron dysregulation associated with cytosolic and mitochondrial iron accumulation in cultured FRDA fibroblasts.

FRDA fibroblasts fail to regulate iron uptake

Cells take up iron primarily as transferrin-bound iron (TBI) and secondarily as non-transferrin-bound iron (NTBI). To better understand the mechanism underlying iron overload, we tested both iron import pathways in FRDA fibroblasts by incubating cells with either 13 mM holo-transferrin (holo-Tf) or 100 μ M ferric ammonium citrate (FAC) for 72 h. FAC is a soluble form of Fe³⁺ iron which enters cells opportunistically via resident transporters or endocytic pathways (NTBI uptake). No FBS was added to deprive the growth medium of TBI. Compared with controls, FRDA fibroblasts not incubated with holo-Tf or FAC exhibited 2.4- to 3-fold higher iron content (Fig. 2A). However, after 3 days of incubation with 100 μ M FAC or 13 mM holo-Tf, there was massive iron accumulation in FRDA cells. This accumulation was much higher after supplementation with holo-Tf, versus FAC (Fig. 2A). Indeed, while iron content in control fibroblasts increased 2.3- to 3-fold and 4.1- to 5-fold in FAC and holo-Tf medium respectively (Dulbecco's modified Eagle's medium (Fig. 2A), FRDA fibroblasts displayed a 14-fold increase with FAC and a 28-fold increase with holo-Tf respectively (Fig. 2A). Analysis of the compartmentation of excess iron revealed higher proportions of mitochondrial iron in FRDA patients (Fig. 2B). Taken together, these results suggested that FRDA fibroblasts fail to regulate both TBI and NTBI uptake.

In mammals, IRP signaling governs iron homeostasis by altering TfR1 and ferritin expression through post-transcriptional modification. Iron deprivation triggers binding of IRPs to iron-responsive elements (IREs) of TfR1 mRNA 3' untranslated regions, protecting them from RNase degradation, and to ferritin mRNA 5' untranslated regions, preventing their translation. To investigate their regulation, we quantified TfR1 (*TFRC*) and H-ferritin (*FTH*) mRNAs using droplet digital PCR (ddPCR) with cultured fibroblasts grown in either low (-FAC) or high (+FAC) iron conditions for three days. *TFRC* mRNA levels were similar in control and FRDA fibroblasts grown in low iron condition (-FAC) and decreased in high iron condition (+FAC), suggesting downregulation of *TFRC* transcription by IRP activities in FRDA (Fig. 2C), while ferritin mRNA levels increased in control and FRDA fibroblasts grown under high-iron conditions (Fig. 2D). As IRPs only modify the ferritin translation, these results highlighted another regulation affecting mRNA levels, which may involve antioxidant-responsive elements.

At the protein level, iron supplementation in the culture medium (+FAC) increased steady-state ferritin levels in both control and FRDA cells (Fig 2E, Supplemental Figure 2) and decreased steady-state IRP2 levels, as demonstrated by western blotting (Fig. 2E, Supplemental Figure 2). However, steady-state ferritin levels were significantly higher in FRDA fibroblasts in FAC-treated condition (Fig. 2E, Supplemental Figure 2), consistent with their higher cytosolic iron content and levels of SOD1 and SOD2 (Fig. 2E, Supplemental Figure 2).

Under +FAC conditions, dimeric TfR1 levels were lower in controls, preventing iron accumulation, but unexpectedly higher in FRDA cells, despite normal post-transcriptional IRP regulation (Fig. 2E, Supplemental Figure S2). Increased TfR1 and ferritin levels in the context of iron overload is paradoxical because stored iron should downregulate TfR1 and metal import. Taken together, these results suggest TfR1 post-transcriptional regulation is normal in FRDA but co-occurs with other, dysregulated processes.

Increased amount of membrane TfR1 and delayed transferrin recycling in FRDA fibroblasts

We hypothesized that higher steady-state TfR1 levels could be related to an accumulation of homodimeric membrane TfR1 in FRDA cells, as previously observed in neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) (Drecourt et al., 2018). To understand receptor dysregulation, we assessed the functional localization of TfR1 and its ability to internalize and recycle transferrin (Tf) through receptor-mediated endocytosis. Firstly, TfR1 was quantified by immunofluorescence using the Amnis ImageStream^X Mark II, which combines flow cytometry with detailed cell imaging and functional analysis. More TfR1 was found on the surface of FRDA fibroblasts than on control cells grown in regular medium (Figs. 3A, B). Thus, in spite of iron overload and normal post-transcriptional downregulation, patient fibroblasts paradoxically accumulated membrane TfR1, preventing downregulation of iron uptake. Live imaging via spinning-disk microscopy was then used to assess Tf-TfR1 complex endocytosis through evaluation of perinuclear fluorescence intensity in FRDA and control. FRDA cells exhibited a significantly higher Tf signal compared to controls (Fig. 3C), suggesting greater Tf-TfR1 internalization. Tf-TfR1 recycling was then measured as the loss of cell-associated fluorescence over time. Control fibroblasts displayed rapid loss of Tf staining ascribed to Tf recycling (Fig. 3D, Supplemental Movie 1). By contrast, Tf recycling was significantly delayed in FRDA fibroblasts, as the specific perinuclear signal failed to weaken after 10 min of Alexa

555-Tf incubation, and was still delayed later (Fig. 3D, Supplemental Movie 2). The combination of greater Tf-TfR1 endocytosis and delayed recycling is expected to increase iron release from early endosomes and contribute to iron overload in frataxin-deficient cells.

Artesunate rescues TfR1 palmitoylation defect in FRDA fibroblasts

Despite normal post-transcriptional TfR1 regulation, cultured FRDA fibroblasts imported aberrant amounts of iron, leading us to consider whether TfR1 regulation could be altered at other cellular levels in FRDA. Indeed, TfR1 is known to undergo post-translational modification by covalent attachment of S-acyl radicals to the cysteine amino acids at positions 62 and 67 via thioester bonds, palmitate being the predominant fatty acid donor (Alvarez et al., 1990). Decreased palmitoylation has been previously shown to induce accumulation of dimeric TfR1 at cell membranes and to increase its endocytosis (Alvarez et al., 1990), as recently reported in NBIA fibroblasts, where iron homeostasis is also altered (Drecourt et al., 2018). Studying cultured FRDA cells through acyl-biotin exchange, we observed a dramatic fall in TfR1-biotin levels, reflecting defective TfR1 palmitoylation (only 16%–22% of control levels, Fig. 4A and Supplemental Figure 3A). This result suggests that frataxin deficiency severely alters TfR1 palmitoylation for reasons still unknown.

Artesunate, an antimalarial, is known to alter cellular iron homeostasis by increasing TfR1 palmitoylation and reducing membrane TfR1 (Ba et al., 2012). Addition of 25 μ M artesunate to the culture medium enhanced TfR1 palmitoylation and significantly decreased the steady-state level of TfR1 in FRDA fibroblasts (Fig. 4A, Supplemental Figures S3A, B). Furthermore, flow cytometry imaging showed that artesunate lowered membrane TfR1 levels by 15% to 30% in FRDA fibroblasts (Fig. 4B, Supplemental Figure 3C) but raised them 1.1- to 1.3-fold in control cells (Fig. 4B, Supplemental Figure 3C).

Finally, immunoblot analyses confirmed that artesunate lowered dimeric TfR1 levels 1.3- to 1.5-fold in FRDA cells (Fig. 4D, Supplemental Figure 3D), while IRP2 levels increased 1.3- to 1.7-fold, in parallel with decreased steady-state ferritin concentrations (Fig. 4D, Supplemental Figure 3D). This is to be expected with lower cellular iron content. Near return of SOD2 to control levels was consistently observed (Fig. 4D, Supplemental Figure 3D). In control cells, artesunate slightly increased dimeric TfR1, paralleling the increase in membrane TfR1 (Fig. 4B, Supplemental Figure 3C). However, it did not alter intracellular iron content

(Fig. 4C). These findings illustrate the impact of TfR1 palmitoylation on cellular iron content and suggest a possibly beneficial effect of artesunate on cellular iron pools in FRDA.

Impaired TfR1 palmitoylation is related to defective pyruvate dehydrogenase lipoylation in FRDA fibroblasts

Lipoic acid synthase (LIAS), a key enzyme of lipoic acid (LA) synthesis, is a [4Fe-4S] cluster-containing protein, severely impacted by deficient assembly of the ISC machinery (Stehling et al., 2018). LA is a cofactor of several mitochondrial proteins including dihydrolipoamide acetyltransferase (PDH-E2), one of the three pyruvate dehydrogenase (PDH) subunits. Biallelic mutations in various genes involved in ISC biogenesis (*NFU1*, *IBA57*, and *ISCA2*) alter lipoylation of PDH-E2 and cause a secondary decrease in PDH activity (Lebigot et al., 2017). Moreover, *FXN* depletion in mice and knock-down of *FXN* in HeLa cells have been shown to greatly disrupt PDH lipoylation (Martelli et al., 2015; Tong et al., 2018). We likewise observed altered lipoylation of PDH-E2 and a lower steady-state level of PDH-E2 in FRDA fibroblasts (Fig. 5A, Supplementary Material, Fig. S4A).

Acetyl-CoA, the product of the PDH reaction, is the sole donor of acetyl groups for palmitoyl transferases. We hypothesized that frataxin deficiency could limit the acetyl-CoA pool and secondarily affect TfR1 palmitoylation. We noted 1.6- to 2.1-fold lower total cellular CoA content in FRDA fibroblasts relative to control cells (Fig. 5B), confirming that *FXN* mutations limited the CoA/acetyl-CoA pool. Considering that mitochondrial acetyl-CoA is the major source of cytosolic acetyl-CoA in normal cells (Pietrocola et al., 2015), the decrease in total CoA/acetyl-CoA should reflect a reduction of both mitochondrial and cytosolic acetyl-CoA pools.

We therefore sought to investigate whether CoA supplementation might rescue impaired TfR1 palmitoylation in FRDA. Supplementing cultured cells with CoA (25 μ M for 72 h) resulted in increased TfR1 palmitoylation in FRDA fibroblasts (Fig. 5C and Supplemental Figure 4B). CoA supplementation also decreased steady-state dimeric TfR1 levels in patient cells (Fig. 5C, Supplemental Figure 4C). Furthermore, addition of dichloroacetate (5 mM DCA for 72 h), an inhibitor of PDH kinase (PDHK) known to augment pyruvate oxidation and the acetyl CoA pool, significantly raised FRDA fibroblast CoA content (Fig. 5B) and restored PDH lipoylation (Fig. 5A, Supplemental Figure 4A). DCA also significantly lowered steady-state levels of dimeric TfR1 in FRDA fibroblasts (Fig. 5C, Supplemental Figure 4C). These results

collectively suggest that frataxin deficiency leads to secondary reduction of the CoA/acetyl-CoA pool required for palmitoylation and endocytosis of TfR1.

Role of palmitoylation in TBI and NTBI uptake

Finally, we wanted to know if defective palmitoylation of other proteins might also contribute to iron uptake dysregulation in FRDA. Cells were grown in FAC medium supplemented with 2-bromopalmitate (100 μ M 2BP), a well-known inhibitor of protein S-palmitoylation, for 16 h. Remarkably, 2BP substantially increased iron overload in both FRDA fibroblasts and control cells (Fig. 6A), suggesting a role for protein palmitoylation in NTBI uptake.

To investigate the part played by TBI and NTBI uptake in iron overload, we quantified the effects of holo-Tf and FAC on iron content in cells supplemented with CoA, DCA, or artesunate. Reduced iron overload was seen under all conditions in FRDA cells, but not controls (except for artesunate with FAC; Figs. 6 B–E). In light of these observations, iron overload in FRDA would seem to be triggered by both TBI and NTBI uptake, and limited by expansion of the CoA/acetyl-CoA pool.

Artesunate reduces iron overload in peripheral blood mononuclear cells of FRDA patients

We finally assessed whether other cell types might exhibit iron import dysregulation in FRDA. Total cellular iron content was quantified for FRDA and control peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) grown in FAC medium for 40 h. After 24 h, iron content was much higher in FRDA PBMCs, and iron overload was more pronounced after 40 h (Fig. 7A), pointing to the inability of PBMCs to regulate iron uptake under high-iron conditions. PBMC iron content in three heterozygote carriers was similar to that in controls, even after 40 h of incubation. Adding 25 μ M artesunate to the PBMC culture medium resulted in a comparable decrease in iron content for both FRDA and control cells (Fig. 7B). In summary, we found that regulation of iron import was impaired in FRDA PBMCs, and this characteristic could be useful for monitoring future FRDA-related clinical trials.

DISCUSSION

Here, we report dramatic alteration of iron homeostasis due to impaired regulation of TBI import in cultured fibroblasts derived from five FRDA patients with biallelic *FXN* GAA expansions. NTBI uptake, an important alternative source of cellular iron, was also altered in

some diseases, further contributing to iron overload. Both cytosolic and mitochondrial compartments accumulated abnormally large amounts of iron, a finding consistent with overproduction of mitochondrial ROS and increased ferritin, SOD1 and SOD2 steady-state levels in FRDA fibroblasts. Previous studies have reported on mitochondrial iron overload at the expense of cytosolic iron in both $\Delta Yfh1$ yeast and frataxin-depleted MCK mouse mutants (Babcock et al., 1997; Puccio et al., 2001). Though few studies have evaluated cytosolic iron content, observation of increased ferritin levels in the hearts of FRDA patients (Ramirez et al., 2012) and livers of MCK conditional frataxin knockout mice (Whitnall et al., 2012) suggests cytosolic iron accumulation in several tissues.

Studying TfR1 trafficking, we noted accumulation and greater endocytosis of membrane TfR1. This prevents FRDA fibroblasts from limiting iron uptake, fostering iron overload. Cellular iron homeostasis is known to be primarily regulated by a post-transcriptional mechanism that allows TfR1 mRNA to decrease and thereby limits iron uptake under high-iron conditions (Hentze and Kuhn, 1996). *TFRC* transcripts were downregulated, as expected under such conditions, suggested that post-transcriptional regulation by IRPs is normal in FRDA fibroblasts. The paradoxical increase in membrane TfR1 in FRDA fibroblasts thus points to another level of regulation-possibly post-translational TfR1 regulation.

TfR1 palmitoylation is known to play a role in the control of cellular iron uptake. TfR1 is post-translationally modified by S-acylation, specifically palmitoylation, with palmitate (C16:0) being the major lipid donor to S-acylated proteins. Indeed, mutations of Cys⁶² and Cys⁶⁷, the major sites of TfR1 palmitoylation, have been shown to increase TfR1 internalization and iron overload (Alvarez et al., 1990). Here we show that TfR1 palmitoylation was defective in FRDA fibroblasts, resulting in an accumulation of membrane TfR1. Artesunate supplementation significantly increased TfR1 palmitoylation, reduced membrane TfR1 and iron content, and eventually restored the ability of FRDA fibroblasts to regulate iron uptake. In line with these findings, the potent anticancer properties of artesunate are reportedly ascribed to iron depletion, which is toxic for cancer cells (Lai et al., 2013).

Palmitoylation increases hydrophobicity of proteins and regulates their trafficking, stability, and subcellular distribution (Chamberlain and Shipston, 2015). Since several endosome recycling proteins are palmitoylated, it is possible that impaired palmitoylation of still other endosomal proteins yet to be identified may alter TfR1 internalization and contribute to TBI overload. It is also conceivable that impaired palmitoylation affects NTBI uptake and promotes iron overload, as 2BP exacerbated iron accumulation in both FRDA and control fibroblasts.

Because CoA is the sole donor of acyl for palmitic acid, via palmitoyl transferases, and both *FXN* depletion in mice and *FXN* knock-down in HeLa cells reportedly alter PDH lipoylation (Lebigot et al., 2017; Martelli et al., 2015; Stehling et al., 2018; Tong et al., 2018; Whitnall et al., 2012), we hypothesized that frataxin deficiency could secondarily limit the acetyl-CoA pool. Acetyl-CoA required for TfR1 palmitoylation is mainly generated by PDH decarboxylation of pyruvate in mitochondria (Pietrocola et al., 2015). We noted a decrease in lipoylated PDH-E2 and CoA content, confirming that *FXN* mutations limited the CoA/acetyl-CoA pool in FRDA fibroblasts. Conversely, CoA or DCA supplementation of cultured cells increased TfR1 palmitoylation, reduced membrane TfR1, and rescued iron overload. Interestingly, we also observed that these compounds, in addition to artesunate, limited TBI and NTBI uptake. Hence, by impairing ISC biogenesis, frataxin deficiency led to a secondary reduction of the CoA/acetyl-CoA pool required for normal palmitoylation and endocytosis of TfR1. Together these results suggest that acetyl-CoA, already recognized as a central metabolic intermediate and a signal transducer (Pietrocola et al., 2015), also plays an important role in the regulation of cellular iron homeostasis by controlling the extent of TfR1 palmitoylation.

In conclusion, our study not only sheds new light on the disease mechanism in FRDA, but also paves the road for evidenced-based therapeutic trials at the actionable level of TfR1 palmitoylation using existing drugs-namely artesunate and DCA. Artesunate is used to treat malaria caused by *Plasmodium falciparum* (Efferth and Kaina, 2010). Although its safety profile and pharmacokinetics have not been assessed in neurodegenerative diseases, several millions of subjects have received artemisinin with very few side effects. On the other hand, DCA is generally well tolerated when administered to PDH-deficient patients. DCA enters the circulation rapidly, crosses the blood-brain barrier, and significantly lowers blood and cerebrospinal fluid lactate concentrations (Stacpoole et al., 2008). Our data suggest these compounds and other drugs enhancing PDH activity, acetyl-CoA synthesis, or TfR1 palmitoylation might be therapeutic agents in FRDA, especially since iron-mediated toxicity has been shown to promote neurodegeneration in a *Drosophila* model of FRDA (Chen et al., 2016). Finally, because FRDA PBMCs are unable to regulate iron uptake under high-iron conditions, as seen with FRDA-iPSC cardiomyocytes (Lee et al., 2014), we believe iron content and membrane TfR1 levels in patient PBMCs, are potential biomarkers for future clinical trials concerned with FRDA.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatments

Skin fibroblasts from five FRDA patients (with biallelic GAA repeat expansions) and three controls were grown in 5% CO₂ at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco) supplemented with 4.5 g/L of D-glucose, 110 mg/L of sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), and 200 U/mL of penicillin-streptomycin (Gibco). For treatment with FAC (Sigma-Aldrich) or holo-transferrin (holo-Tf, Sigma-Aldrich), 80% confluent cells were incubated for 72 h with or without either 100 μM FAC or 13 mM holo-Tf in serum-free (i.e., Tf-free) DMEM. For drug treatment, 80% confluent cells were supplemented with 25 μM artesunate (Sigma-Aldrich) for 48 h in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich), 25 μM CoA (Sigma-Aldrich) for 72 h, 5 mM DCA for 72 h, 100 μM 2BP for 16 h (Sigma-Aldrich). PBMCs were isolated from blood samples by density centrifugation using Ficoll (GE Healthcare) and grown in regular DMEM for 2 h before treatment with serum-free DMEM and 100 μM FAC for different durations. Informed consent for diagnostic and research studies were obtained from FRDA patients prior to their inclusion in the study, per Declaration of Helsinki guidelines, and approved by the local institutional review boards (Paris, France).

Protein extraction and immunoblotting

Cultured skin fibroblasts were lysed on ice by scraping with cell lysis buffer (100 nM Tris-HCl, pH 8.3, 600 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 Substitute, 20 mM MgCl₂, protease inhibitor cocktail [1X]) and centrifuged at 14,000 rpm for 30 min. The protein concentration in the resulting supernatant was measured using the Bradford assay (Bio-Rad). Western blotting was performed on 20 μg of whole-cell protein extracts in 12% acrylamide gel (Bio-Rad) or mitochondrial-enriched fractions in 4% to 15% gel gradient (Bio-Rad) under reducing (2 μM dithiothreitol (DTT); denaturation at 95 °C over 5 min; for frataxin, ferritin, SOD1, PDH-E2, and lipoic acid) or nonreducing (no DTT or heat denaturation; for TfR1, SOD2, and IRP2) conditions in Laemmli sample buffer. Membranes were incubated with the following primary antibodies diluted in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.05% TWEEN 20 (Sigma-Aldrich) and 1% milk: rabbit anti-SOD1 (ab16831, Abcam), rabbit anti-SOD2 (ab13533, Abcam), mouse anti-TfR1 (13-6800, Invitrogen), rabbit anti-ferritin (ab75973, Abcam), rabbit anti-IRP2 (ab181153, Abcam), rabbit anti-frataxin (14147-1-AP, Proteintech), rabbit anti-PDH-E2 (ab172617, Abcam), rabbit anti-lipoic acid (LA, ab58724, Abcam), mouse anti-VDAC1/Porin (ab14734, Abcam), and mouse anti-GAPDH antibodies (ab8245, Abcam). Immunoblots were incubated

with fluorescent IRDye 800CW goat anti-rabbit IgG (926-68071, LI-COR) or IRDye 680LT goat anti-mouse IgG (926-32210, LI-COR) secondary antibodies, and signals were captured with the Odyssey Infrared Imaging System using Image Studio Lite v5.2 (LI-COR).

Detection of mitochondrial reactive oxygen species

Mitochondrial superoxides were detected by MitoSOX-based flow cytometry. Fibroblasts were supplemented with 10 μ M MitoSOX Red (ThermoFisher Scientific) for 20 min, washed three times in cold PBS, and maintained in cold PBS with 5% FBS on ice and in the dark. MitoSOX Red was excited at 488 nm, and emission was collected at 580 nm. Fluorescence was recorded for at least 20,000 cells using a Gallios flow cytometer and Kaluza software (Beckman Coulter). Cell debris was gated out for analysis. Data were expressed as percentages of MitoSOX fluorescence intensity normalized to control values.

Subcellular fractionation and isolation of mitochondria

For iron quantification, cytosolic and mitochondrial fractions were obtained using a cell fractionation kit (ab109719, Abcam). For immunoblotting, mitochondria were isolated as previously described (Frezza et al., 2007).

Determination of intracellular iron content

Total cellular or subcellular iron content was quantified in culture lysates using a ferrozine-based assay modified from (Riemer et al., 2004). This assay measures both free ferric and ferrous forms of iron available for chelation as well as iron complexed to cellular proteins. We lysed $3 \cdot 10^5$ cells with 200 μ L of 50 mM NaOH for 2 h at 4 °C. Aliquots (150 μ L) were pretreated with 150 μ L of a fresh 1.4 M HCl and 4.5% KMnO_4 solution for 2 h at 60 °C to convert ferric iron to ferrous iron. Iron was quantified using iron-detection reagent (6.5 mM ferrozine, 6.5 mM neocuproine, 2.5 M ammonium acetate, 1 M ascorbic acid), measuring absorbance at 560 nm (VICTOR Nivo microplate reader, PerkinElmer). Iron content was normalized to either protein concentration or number of cells.

RNA extraction and droplet digital PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) and DNase processed with the RNase-Free DNase Set (QIAGEN) in accordance with the manufacturer's protocol. Total RNA concentration and purity was assessed using the NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). The mRNAs were reverse-transcribed using the High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) per manufacturer's instructions. Droplet digital PCR (ddPCR) was performed using the QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad) and

specific fluorescent probes for *TFRC* (qHsaCIP0033292, Bio-Rad), *FTH* (dHsaCPE5031151, Bio-Rad), and *GUSB* cDNA detection (qHsaCIP0028142, Bio-Rad). Data were analyzed on the QX200 Droplet Reader using QuantaSoft analysis software (Bio-Rad) and normalized to *GUSB* expression, and plotted (mean \pm standard error).

Detection of TfR1 on plasma membrane

Membrane-bound TfR1 was measured by Amnis imaging flow cytometry (Amnis Corporation, MilliporeSigma) which combines flow cytometry with detailed cell imaging. Fibroblasts were starved for 1 h in FBS-free DMEM, treated with 5 mM EDTA to harvest them without disrupting TfR1 at the cell surface, washed 3 times with cold PBS, and then labelled with mouse anti-TfR1 antibody (A24) for 1 h on ice to prevent TfR1 internalization. Secondary staining was performed using Alexa Fluor 488 goat anti-mouse antibody (A11029, Invitrogen) for 30 min on ice. Cells were washed and stained with Hoechst solution (1/1,000, H3570, Invitrogen) for 5 min before acquisition. Fluorescence measurements for at least 20,000 cells were acquired with the ImageStream^X Mark II (Amnis Corporation, MilliporeSigma) at 40 \times magnification. Data were analyzed using IDEAS software (version 6.2, Amnis Corporation). Spectral compensation was performed using singly stained samples. A specific, doughnut-like mask-full Brightfield with Erode 5 pixels and Dilate 1 pixel was designed for analysis of membrane TfR1 localization. Results were expressed as mean pixel intensities (normalized to surface area).

Tf internalization and recycling

Live cell imaging was used to evaluate Tf recycling and internalization. Fibroblasts were spread at 30% confluence onto glass-bottom micro-slides (Ibidi), 24 h before the experiment. Cells were starved in FBS-free DMEM media for 1 h. Tf internalization was measured, following incubation with Alexa 555-conjugated transferrin (Alexa 555-Tf, 12.5 μ g/mL) for 5 min at 37 $^{\circ}$ C, as mean Tf fluorescence in the perinuclear region after removal of the Alexa 555-Tf medium. After incubation with Tf for 30 min at 37 $^{\circ}$ C, Tf recycling was evaluated as lost fluorescence for at least 20 cells, using spinning disk microscopy (ZEISS Microscopy) with a 63 \times oil immersion objective. A 40 min video (1 picture per minute) of each cell was produced using ZEN software (ZEISS Microscopy). The nuclear region was defined using Icy software (version 1.9) and enlarged twice to define the perinuclear region of interest. Masks for this region were then applied on the Alexa 555-Tf channel with the Spot Detector plugin, to obtain mean particle fluorescence intensity. Only particles 8 pixels or bigger were considered. The

mean intensity value was normalized to surface area. Data were expressed as percent of initial Tf signal.

Palmitoylation assay

Cultured skin fibroblasts were lysed on ice in DTT-free cell lysis buffer, and endogenous TfR1 was immunoprecipitated overnight with mouse anti-TfR1 antibody (136890, Life Technologies) using protein G magnetic beads (Bio-Rad). After washing with PBS, beads were incubated at room temperature for 2 h with 50 mM N-ethylmaleimide (NEM, Sigma-Aldrich), then 1 M hydroxylamine, and finally 50 mM HPDP-biotin (Thermo Fisher Scientific), in the dark. Biotin-labeled TfR1 content was determined by immunoblotting under nonreducing conditions on 12% acrylamide gel (Bio-Rad) using rabbit anti-TfR1 (ab108985, Abcam) and goat anti-biotin (31852, Thermo Fisher Scientific) primary antibodies. Membranes were incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP): goat anti-rabbit IgG HRP (ab6721, Abcam) or donkey anti-goat IgG HRP (sc-2020, Santa Cruz). The reaction was carried out using an enhanced chemiluminescence substrate (SuperSignal West Dura, Thermo Fisher Scientific), and immunoblot bands were acquired using a ChemiDoc system coupled with a CCD camera (Bio-Rad). Data were analyzed using Image Lab software (version 3.0, Bio-Rad).

CoA assay

Cells were collected by scraping with cell lysis buffer on ice, supernatants were obtained after centrifugation at 14,000 rpm for 30 min, and CoA was quantified using the Coenzyme A Assay Kit (ab138889, Abcam) per manufacturer's instructions. CoA concentration was normalized to protein content.

Statistics

Student's *t*-tests and two-way ANOVAs using the Holm-Sidak method were performed with GraphPad Prism (version 6.01) software. Data presented are based on 3 independent experiments (mean \pm standard error).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Ottolenghi, MD, PhD, and F. Côté, PhD, for helpful scientific discussions, as well as FRDA patients and their parents for their participation. We are also grateful for technical assistance (live microscopy and flow cytometry) from Meriem Garfa-Traoré, Nicolas Goudin, and Olivier Pellé. Imaging and Amnis studies were performed at the Imagine Institute and funded by the Imagine Foundation, Fondation ARC, and GR-Ex LabEx. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche through the Investissements d’Avenir program ANR-10-IAHU-01, the E-Rare project GENOMIT (01GM1207), and the Association Française de l’Ataxie de Friedreich (AFAF).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FP designed and contributed to most of the experiments and data analyses, under the supervision of AR and AM. CZ carried out data acquisition and analysis of iron quantification in PBMCs. MD helped design and interpret the Amnis experiments. AD and OH made contributions to the discussion of results and performed critical reviews of the manuscript. FP, AM, and AR conceived this study and wrote the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Alvarez, E., Girones, N., and Davis, R.J. (1990). Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid. *J Biol Chem* 265, 16644-16655.
- Ba, Q., Zhou, N., Duan, J., Chen, T., Hao, M., Yang, X., Li, J., Yin, J., Chu, R., and Wang, H. (2012). Dihydroartemisinin exerts its anticancer activity through depleting cellular iron via transferrin receptor-1. *PLoS One* 7, e42703.
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276, 1709-1712.
- Boddaert, N., Le Quan Sang, K.H., Rotig, A., Leroy-Willig, A., Gallet, S., Brunelle, F., Sidi, D., Thalabard, J.C., Munnich, A., and Cabantchik, Z.I. (2007). Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood* 110, 401-408.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423-1427.
- Chamberlain, L.H., and Shipston, M.J. (2015). The physiology of protein S-acylation. *Physiol Rev* 95, 341-376.
- Chen, K., Lin, G., Haelterman, N.A., Ho, T.S., Li, T., Li, Z., Duraine, L., Graham, B.H., Jaiswal, M., Yamamoto, S., et al. (2016). Loss of Frataxin induces iron toxicity, sphingolipid synthesis, and Pdk1/Mef2 activation, leading to neurodegeneration. *Elife* 5.
- Drecourt, A., Babdor, J., Dussiot, M., Petit, F., Goudin, N., Garfa-Traore, M., Habarou, F., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., Ottolenghi, C., et al. (2018). Impaired Transferrin Receptor Palmitoylation and Recycling in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation. *Am J Hum Genet* 102, 266-277.
- Efferth, T., and Kaina, B. (2010). Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *Crit Rev Toxicol* 40, 405-421.
- Frezza, C., Cipolat, S., and Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature protocols* 2, 287-295.
- Hentze, M.W., and Kuhn, L.C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8175-8182.
- Herman, D., Jenssen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S.L., and Gottesfeld, J.M. (2006). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol* 2, 551-558.
- Huang, M.L., Becker, E.M., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Ponka, P., and Richardson, D.R. (2009). Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16381-16386.
- Lai, H.C., Singh, N.P., and Sasaki, T. (2013). Development of artemisinin compounds for cancer treatment. *Invest New Drugs* 31, 230-246.
- Lamarche, J.B., Cote, M., and Lemieux, B. (1980). The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can J Neurol Sci* 7, 389-396.

Lebigot, E., Gaignard, P., Dorboz, I., Slama, A., Rio, M., de Lonlay, P., Heron, B., Sabourdy, F., Boespflug-Tanguy, O., Cardoso, A., et al. (2017). Impact of mutations within the [Fe-S] cluster or the lipoic acid biosynthesis pathways on mitochondrial protein expression profiles in fibroblasts from patients. *Mol Genet Metab* *122*, 85-94.

Lee, Y.K., Ho, P.W., Schick, R., Lau, Y.M., Lai, W.H., Zhou, T., Li, Y., Ng, K.M., Ho, S.L., Esteban, M.A., et al. (2014). Modeling of Friedreich ataxia-related iron overloading cardiomyopathy using patient-specific-induced pluripotent stem cells. *Pflugers Arch* *466*, 1831-1844.

Martelli, A., Schmucker, S., Reutenauer, L., Mathieu, J.R., Peyssonnaud, C., Karim, Z., Puy, H., Galy, B., Hentze, M.W., and Puccio, H. (2015). Iron regulatory protein 1 sustains mitochondrial iron loading and function in frataxin deficiency. *Cell Metab* *21*, 311-322.

Muhlenhoff, U., Hoffmann, B., Richter, N., Rietzschel, N., Spantgar, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., and Lill, R. (2015). Compartmentalization of iron between mitochondria and the cytosol and its regulation. *Eur J Cell Biol* *94*, 292-308.

Pandolfo, M. (2009). Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol* *256 Suppl 1*, 3-8.

Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Madeo, F., and Kroemer, G. (2015). Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab* *21*, 805-821.

Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* *27*, 181-186.

Ramirez, R.L., Qian, J., Santambrogio, P., Levi, S., and Koeppen, A.H. (2012). Relation of cytosolic iron excess to cardiomyopathy of Friedreich's ataxia. *Am J Cardiol* *110*, 1820-1827.

Riemer, J., Hoepken, H.H., Czerwinska, H., Robinson, S.R., and Dringen, R. (2004). Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem* *331*, 370-375.

Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* *17*, 215-217.

Schulz, J.B., Dehmer, T., Schols, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., Burk, K., Matson, W., Dichgans, J., Beal, M.F., et al. (2000). Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* *55*, 1719-1721.

Sez nec, H., Simon, D., Bouton, C., Reutenauer, L., Hertzog, A., Golik, P., Procaccio, V., Patel, M., Drapier, J.C., Koenig, M., et al. (2005). Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum Mol Genet* *14*, 463-474.

Srinivasan, B., Baratashvili, M., van der Zwaag, M., Kanon, B., Colombelli, C., Lambrechts, R.A., Schaap, O., Nollen, E.A., Podgorsek, A., Kosec, G., et al. (2015). Extracellular 4'-phosphopantetheine is a source for intracellular coenzyme A synthesis. *Nat Chem Biol* *11*, 784-792.

Stacpoole, P.W., Kurtz, T.L., Han, Z., and Langae, T. (2008). Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Adv Drug Deliv Rev* *60*, 1478-1487.

Stehling, O., Paul, V.D., Bergmann, J., Basu, S., and Lill, R. (2018). Biochemical Analyses of Human Iron-Sulfur Protein Biogenesis and of Related Diseases. *Methods Enzymol* *599*, 227-263.

Stehling, O., Wilbrecht, C., and Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* *100*, 61-77.

Telot, L., Rousseau, E., Lesuisse, E., Garcia, C., Morlet, B., Leger, T., Camadro, J.M., and Serre, V. (2018). Quantitative proteomics in Friedreich's ataxia B-lymphocytes: A valuable approach to decipher the biochemical events responsible for pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1864, 997-1009.

Tong, W.H., Maio, N., Zhang, D.L., Palmieri, E.M., Ollivierre, H., Ghosh, M.C., McVicar, D.W., and Rouault, T.A. (2018). TLR-activated repression of Fe-S cluster biogenesis drives a metabolic shift and alters histone and tubulin acetylation. *Blood Adv* 2, 1146-1156.

Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Huang, M.L., Saletta, F., Lok, H.C., Gutierrez, L., Lazaro, F.J., Fleming, A.J., St Pierre, T.G., Mikhael, M.R., et al. (2012). Identification of nonferritin mitochondrial iron deposits in a mouse model of Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20590-20595.

Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Sutak, R., Xu, X., Becker, E.M., Mikhael, M.R., Ponka, P., and Richardson, D.R. (2008). The MCK mouse heart model of Friedreich's ataxia: Alterations in iron-regulated proteins and cardiac hypertrophy are limited by iron chelation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9757-9762.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Iron dysregulation in Friedreich's ataxia fibroblasts.

A. Immunoblot of frataxin in fibroblasts of five Friedreich's ataxia patients (P1–P5) and three controls (C1–C3) grown in regular medium. GAPDH was used as a loading control. **B.** Iron quantification using the ferrozine-based colorimetric assay in subcellular fractions of control (C* = mean of three controls) and FRDA (P1–P5) cells grown in regular medium. **C.** Relative cytosolic and mitochondrial iron content in controls (C*) and FRDA cells (P1–P5). **D.** Immunoblot of several proteins involved in iron homeostasis and defense in control (C1–C3) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in regular medium. GAPDH was used as a loading control. **E.** Quantification of mitochondrial reactive oxygen species using MitoSOX Red and flow cytometry for control (C*) and FRDA (P1–P5) fibroblasts in regular medium. Data expressed as percentages of MitoSOX-positive cells relative to control value. All bar plots show mean \pm standard error, $n = 3$. Student's t -tests were used to compare patients' values to the control mean. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ns = nonsignificant. Immunoblotting quantifications are presented in Supplemental Figure 1.

Fig. 2. Iron accumulation caused by impairment of iron uptake

A. Iron quantification for whole cellular extracts of control (C1–C3) and Friedreich's ataxia (P1–P5) fibroblasts grown in FBS-free DMEM medium under low-iron (untreated) or high-iron (100 μ M ferric ammonium citrate or 13 mM holo-Tf) conditions for 72 h. **B.** Relative cytosolic and mitochondrial iron content in control (C*) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in FBS-free DMEM with 100 μ M FAC for 72 h. **C, D.** Post-transcriptional regulation of iron homeostasis in control (C1–C3) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in FBS-free DMEM under low-iron (–FAC) or high-iron (+FAC) conditions. TfR1 (**C**: *TFRC*) and ferritin (**D**: *FTH*) mRNAs were quantified by droplet digital PCR and expressed as ratios to *GUSB* mRNA. **E.** Immunoblots of proteins involved in iron homeostasis and ROS defense in control (C1–C3) and FRDA (P1–P5) cells. GAPDH was used as a loading control. Immunoblotting quantifications are presented in Supplemental Figure 2. All bar plots show mean \pm standard error, $n = 3$. Multiple t -tests (**A, B**) and two-way ANOVAs (**C, D**) were used to compare untreated to treated values. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ns: nonsignificant.

Fig. 3. Friedreich's ataxia fibroblasts accumulate TfR1 at plasma membrane and exhibit increased transferrin endocytosis

A. Examples of TfR1 labeling in fibroblasts of control (C1–C3) and Friedreich's ataxia (FRDA) (P1–P5) fibroblasts. Cell analysis was based on Hoechst-positive signals. Scale bar: 10 μ m. **B.** Quantification of membrane-bound TfR1 signal in control (C*) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in regular medium, using IDEAS software (Amnis Corporation). **C.** Basal fluorescence intensity of Alexa Fluor 555-conjugated transferrin (Alexa 555- Tf) signal in control (C*) and FRDA (P1–P5) fibroblasts after 5 min of Alexa 555- Tf incubation. **D.** Relative mean fluorescence intensity of Alexa 555- Tf signal over 40 min, after 30 min of incubation, for control (C*) and FRDA (P1–P5) fibroblasts. Number of cells acquired is >15 cells/experiment. All bar plots show mean \pm standard error, $n = 3$. ANOVA and t -tests were used to compare patients' values to the control mean. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ns: nonsignificant.

Fig. 4. Artesunate attenuates cellular iron dysregulation in Friedreich's ataxia fibroblasts

A. Biotin immunoblots correlating with extent of TfR1 palmitoylation, in control (C1–C3) and Friedreich's ataxia (P1–P5) fibroblasts grown in regular medium (–artesanate) or supplemented with 25 μ M artesunate (+artesanate) for 48 h. For each condition, the topmost panel shows the palmitoylated TfR1 level (IP: biotin) and the panel below shows the immunoprecipitated amount of TfR1 (IP: TfR1). Immunoprecipitated TfR1 is used as a loading control for each condition. Immunoblotting quantifications of palmitoylated and steady-state TfR1 levels are given in Supplemental Figures 3A, B. **B.** Quantification of membrane-bound TfR1 signal for control (C1–C3) and FRDA (P1–P5) fibroblasts, grown for 48 h with or without 25 μ M artesunate supplementation, using IDEAS software (Amnis Corporation). Examples of TfR1 labeling in control and FRDA fibroblasts are given in Supplemental Figure 3C. **C.** Iron quantification using ferrozine-based colorimetric assay in control (C1–C3) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in regular medium, with or without 25 μ M artesunate for 48 h. **D.** Immunoblot analysis of proteins involved in iron homeostasis and ROS defense in control (C1–C3) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in regular DMEM medium, with or without 25 μ M artesunate, for 48 h. GAPDH was used as a loading control. Immunoblotting quantifications are given in Supplemental Figure 3D. All bar plots show mean \pm standard error, $n = 3$. Two-way ANOVA tests were used to compare untreated to treated values. IP: immunoprecipitate, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ns: nonsignificant.

Fig. 5. Friedreich's ataxia fibroblasts display coenzyme A and PDH lipoylation defects

A. Immunoblots of PDH-E2 and lipoylated PDH-E2 (PDH-E2-LA) in mitochondria-enriched extracts from control (C1–C3) and Friedreich's ataxia (FRDA) (P1–P5) grown in regular medium for 72 h, with or without 5 mM dichloroacetate (DCA). Porin was used as a loading control. Immunoblotting quantifications are given in Supplemental Figure 4A. **B.** Total CoA content in FRDA (P1–P5) and control (C1–C3) cells grown in untreated regular medium, with 25 μ M CoA, or with 5 mM DCA, for 72 h. Plots show mean \pm standard error, $n = 3$. Two-way ANOVA was used to compare untreated to treated values. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, ns: nonsignificant. **C.** Biotin immunoblots correlating with extent of TfR1 palmitoylation in control (C1–C3) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in untreated regular medium or supplemented with either 25 μ M CoA or 5 mM DCA for 72 h. For each condition, the topmost panel shows palmitoylated TfR1 levels (IP: biotin), the panel below shows the immunoprecipitated amount of TfR1 (IP: TfR1), and immunoprecipitated TfR1 is used as a loading control. Immunoblotting quantifications of palmitoylated and steady-state levels of TfR1 are given in Supplemental Figures 4 B, C. IP: immunoprecipitate.

Fig. 6. Enhancement of TBI and NTBI uptake in Friedreich's ataxia fibroblasts

A. Iron quantification using the ferrozine-based colorimetric assay for control (C1–C3) and Friedreich's ataxia (FRDA) (P1–P5) fibroblasts grown under high-iron conditions (100 μ M FAC), with or without 100 μ M 2BP, for 16 h. **B–E.** Iron quantification for fibroblasts grown under high-iron (13 mM holo-Tf [B, C] or + 100 μ M FAC [D, E]) conditions: for 72 h, with or without 25 μ M CoA or 5 mM DCA supplementation (B, D); or for 48 h, with or without 25 μ M artesunate supplementation (C, E). Plots show mean \pm standard error, $n = 3$. Two-way ANOVA was used to compare untreated and treated values. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, ns: nonsignificant.

Fig. 7. Iron overload in Friedreich's ataxia peripheral blood mononuclear cells limited by artesunate supplementation

A. Iron content (at 8 h intervals), determined by ferrozine-based colorimetric assay, of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)-from healthy donors (C4–C7), heterozygous carriers of *FXN* GAA expansions (Carriers 1–3), and Friedreich's ataxia patients (P1, P6–P14)—grown in high-iron medium (100 μ M FAC) for 40 h. $n = 1$. **B.** Iron content of PBMCs—from control subjects (C8, C9), heterozygous carriers of *FXN* GAA expansions (Carriers 4 and

5), and FRDA patients with compound heterozygous *FXN* GAA expansions (P15, P16)-grown for 40 h in high-iron medium (100 μ M FAC), with or without 25 μ M artesunate. $n = 1$.

SUPPLEMENTARY FIGURE AND MOVIE CAPTIONS

Supplemental Figure 1.

Quantification of steady-state protein levels, relative to GAPDH values, for immunoblots in Fig. 1A, D. Data expressed as mean \pm standard error, $n = 3$. Student's *t*-tests were used to compare patients' values to control means. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Supplemental Figure 2.

Quantification of steady-state protein levels, relative to GAPDH values, for immunoblots in Fig. 2E. All bar plots show mean \pm standard error. $n = 3$. Two-way ANOVA was used to compare untreated to treated values. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ns: nonsignificant.

Supplemental Figure 3.

A, B. Quantification of steady-state (A) biotin (reflecting palmitoylated TfR1 levels) and (B) TfR1 levels in control (C* = mean of three controls) and Friedreich's ataxia (P1–P5) fibroblasts, grown in medium with or without artesunate supplementation, for immunoblots in Figure 4A. **C.** Examples of TfR1 labeling in control (C1–C3) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in medium with or without 25 μ M artesunate supplementation for 48 h. Cell analysis based on Hoechst-positive signal in Figure 4B. Scale bar: 10 μ m. **D.** Protein expression levels, relative to GAPDH values, for immunoblots in Fig. 4D. All bar plots show mean \pm standard error, $n = 3$. Two-way ANOVA was used to compare untreated to treated values. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ns: nonsignificant.

Supplemental Figure 4.

A. Quantification of steady-state protein levels, relative to porin values, for immunoblots in Figure 5A. **B, C.** Quantification of steady-state (B) biotin (reflecting palmitoylated TfR1 levels) or (C) TfR1 levels in control (C* = mean of 3 controls) and FRDA (P1–P5) fibroblasts grown in medium with or without CoA or DCA supplementation, for immunoblots in Figure 5C. All bar plots show mean \pm standard error, $n = 3$. Student *t*-tests and two-way ANOVA were used to compare Friedreich's ataxia cell values to control means or untreated and treated values, respectively. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ns: nonsignificant.

Movie 1. Transferrin recycling in fibroblasts of Control 1

Movie 2. Transferrin recycling in fibroblasts of Patient 1

ABBREVIATIONS

2BP	2-bromopalmitate
Alexa 555-Tf	Alexa fluor 555-conjugated transferrin
CoA	coenzyme A
DCA	dichloroacetate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FAC	ferric ammonium citrate
FBS	fetal bovine serum
FRDA	Friedreich's ataxia
IRE	Iron Responsive Elements
holo-Tf	holo-transferrin
IP	immunoprecipitate
IRP	iron-regulatory protein
ISC	iron-sulfur cluster
LA	lipoic acid
LIAS	lipoic acid synthetase
NBIA	neurodegeneration with brain iron accumulation
NTBI	non-Tf-bound iron
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate-buffered saline
PDH	pyruvate dehydrogenase
SOD	superoxide dismutase
TBI	Tf-bound iron
Tf	transferrin
TfR1	transferrin receptor 1

Figure 1

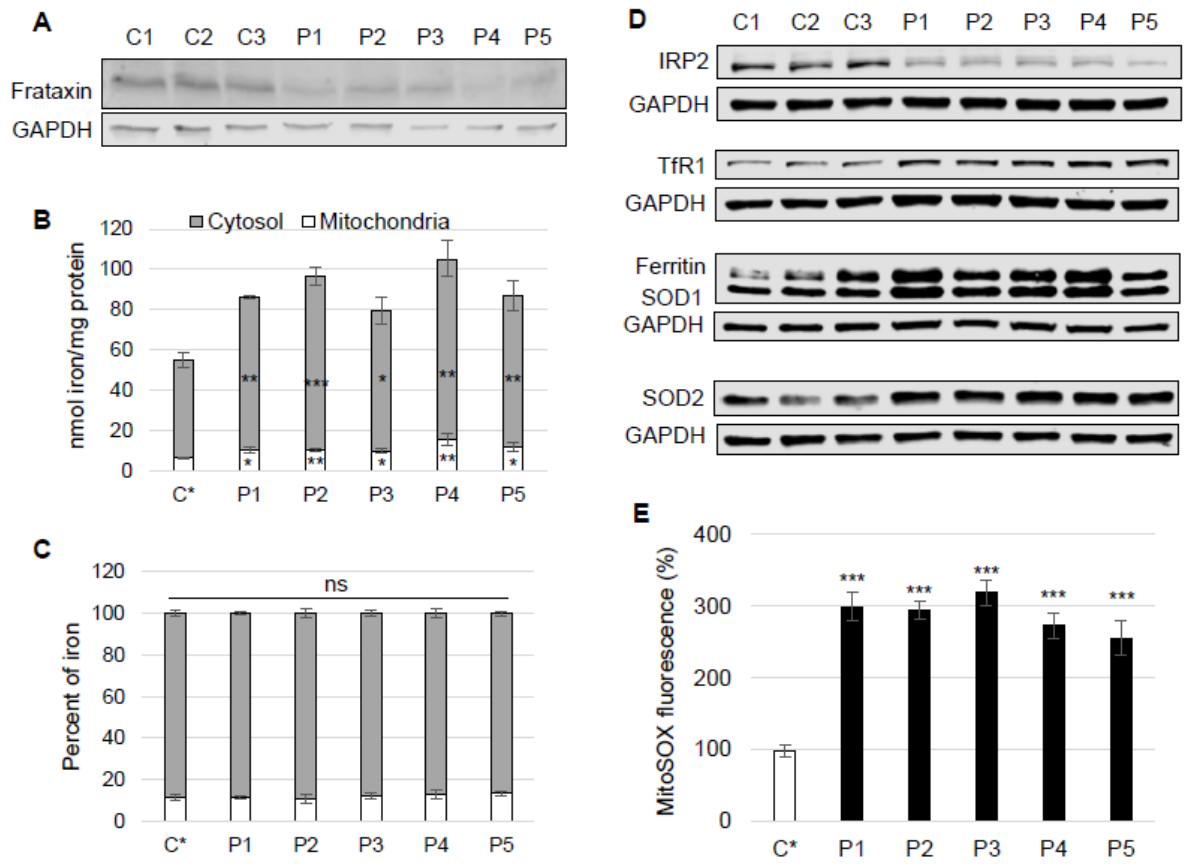


Figure 2

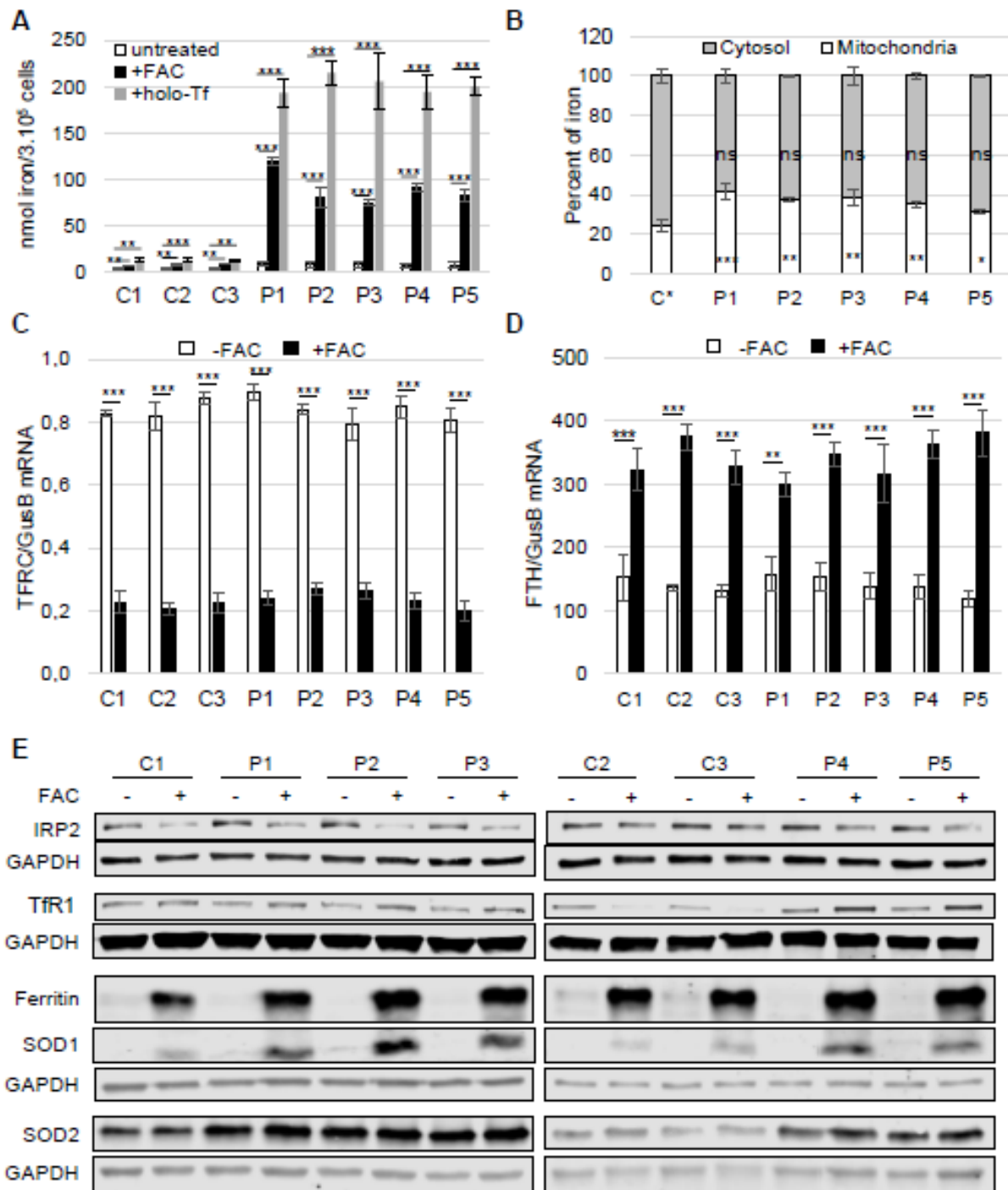


Figure 3

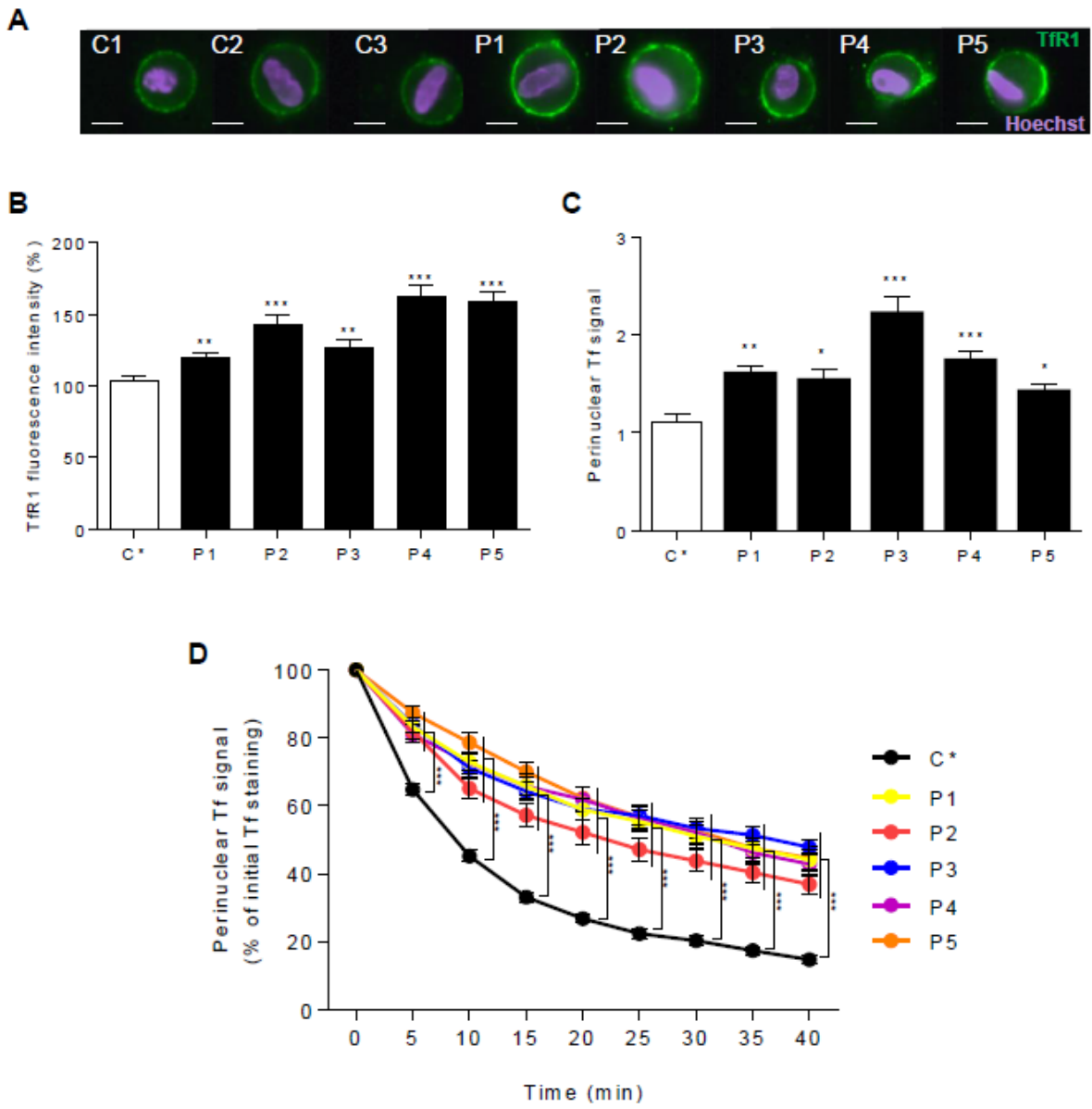


Figure 4

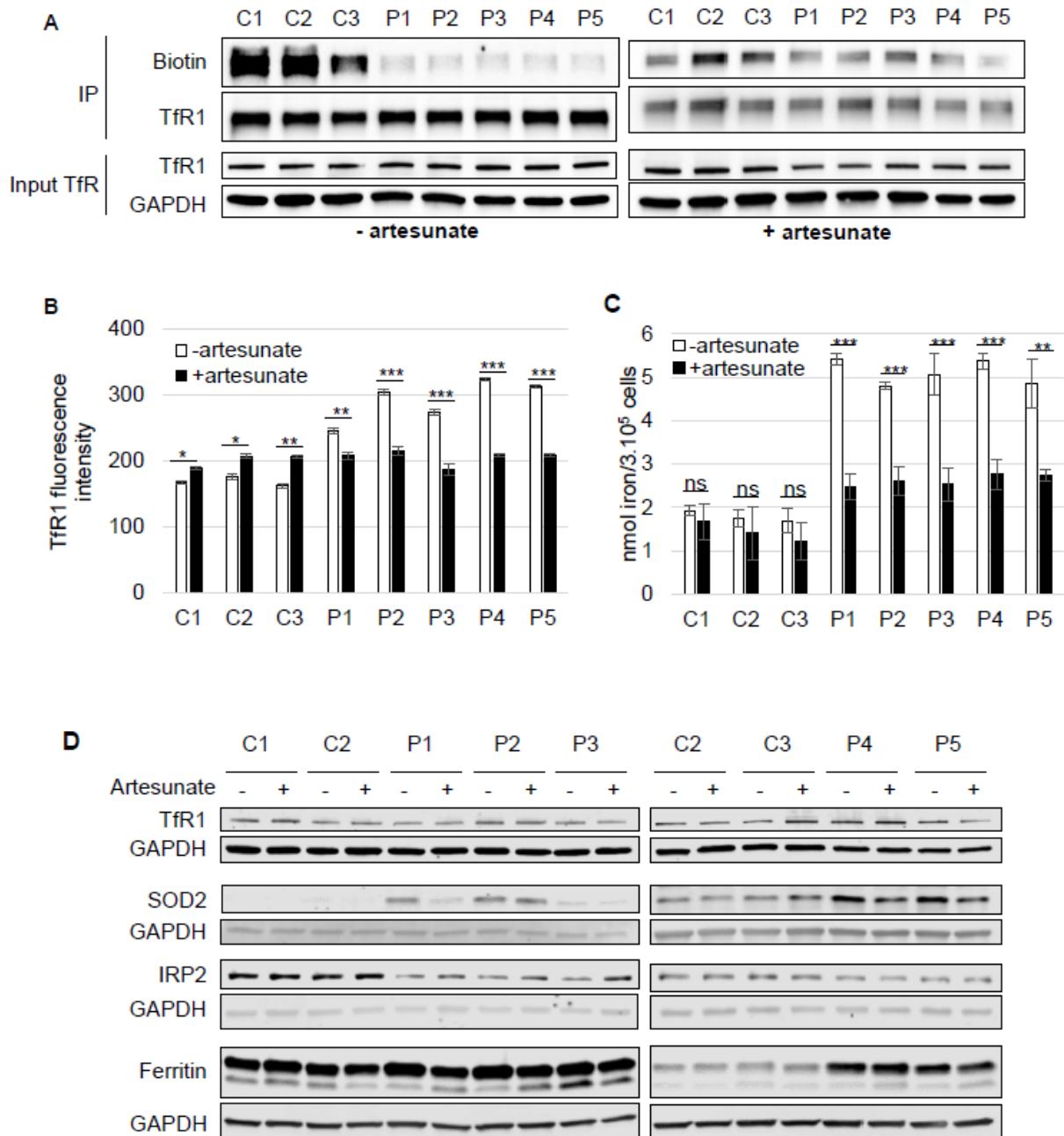


Figure 5

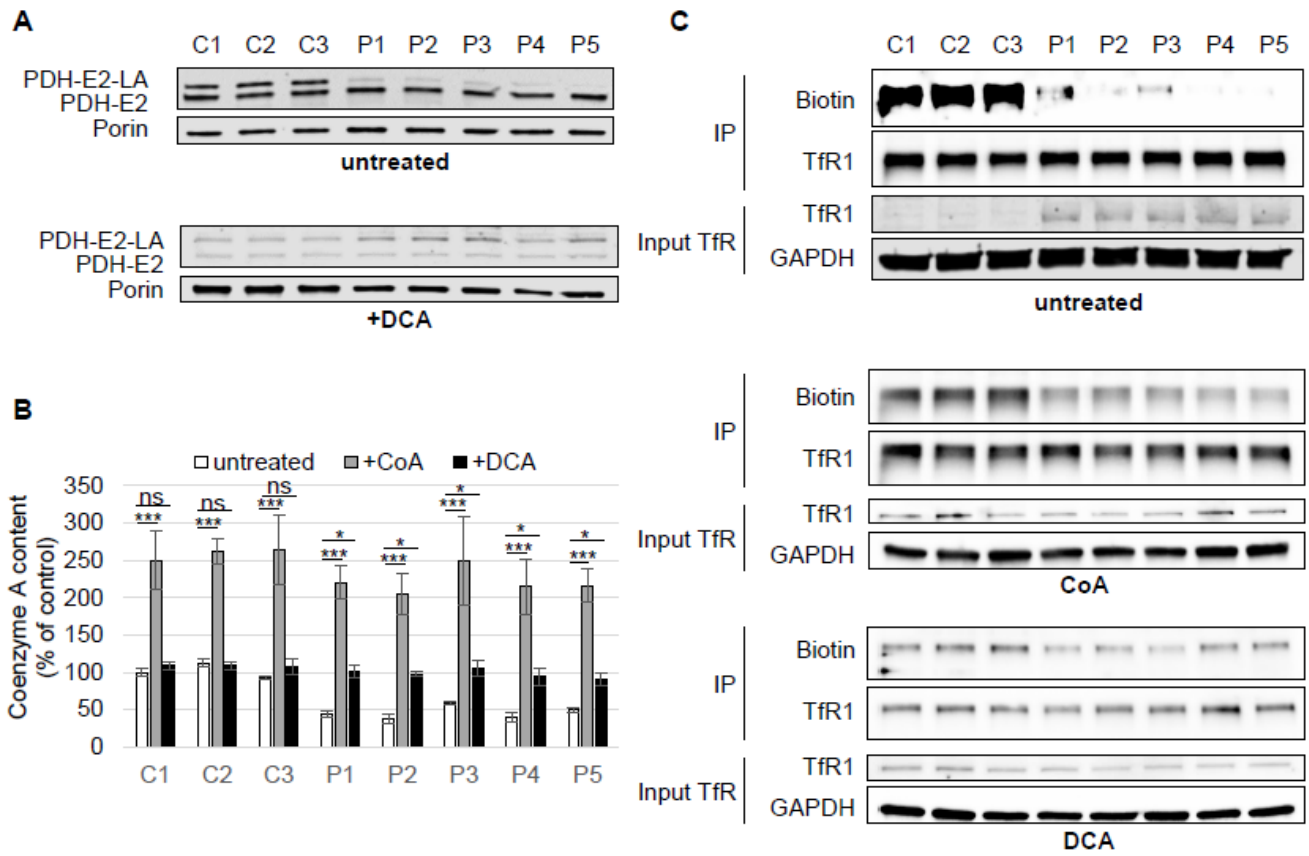


Figure 6

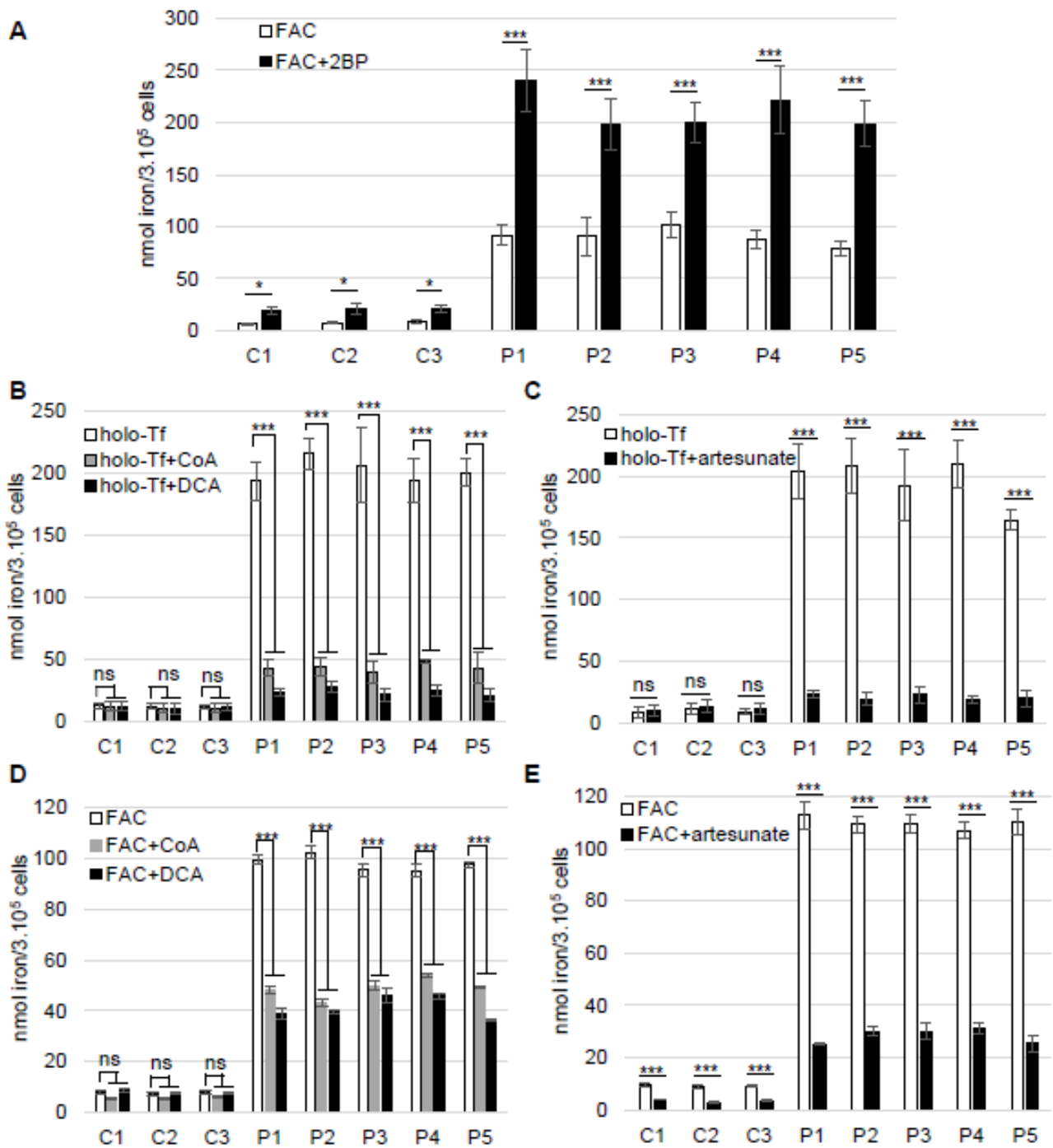
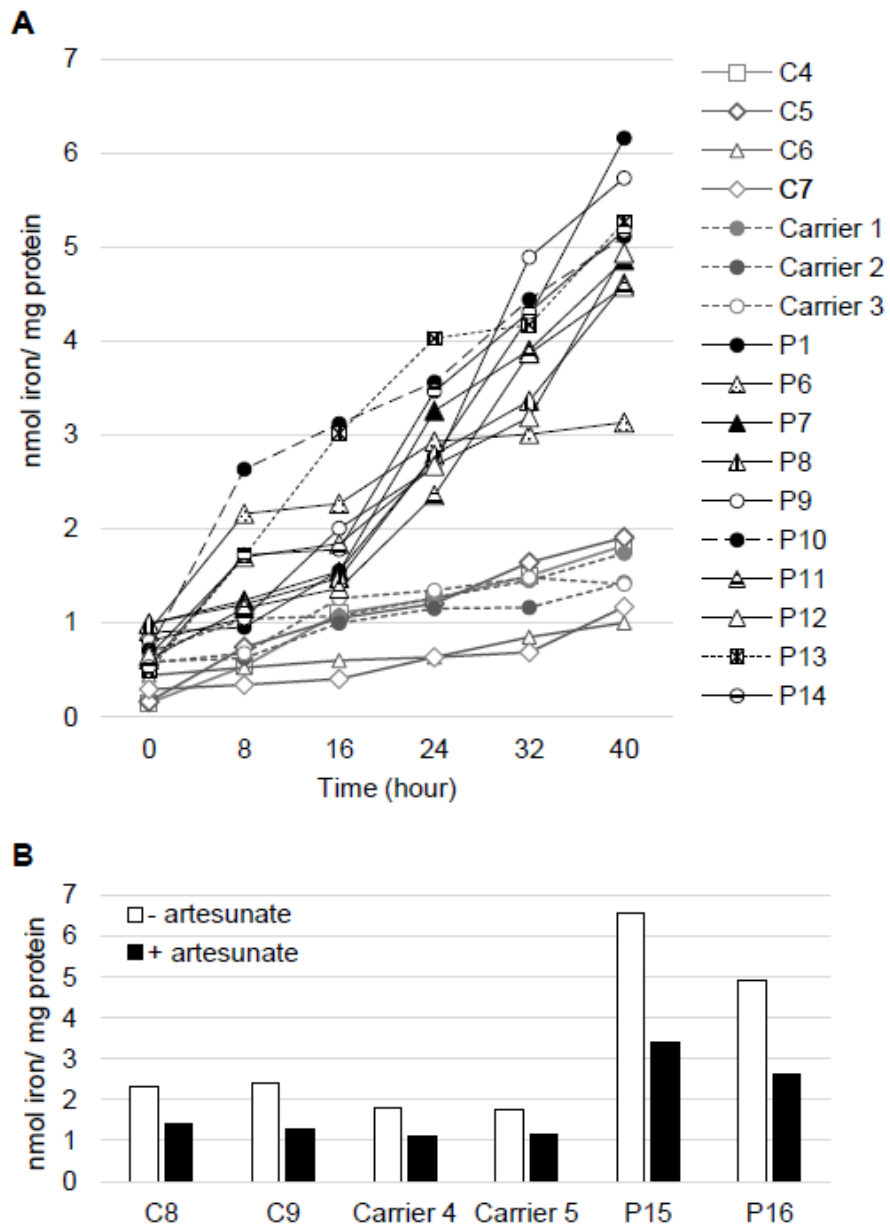
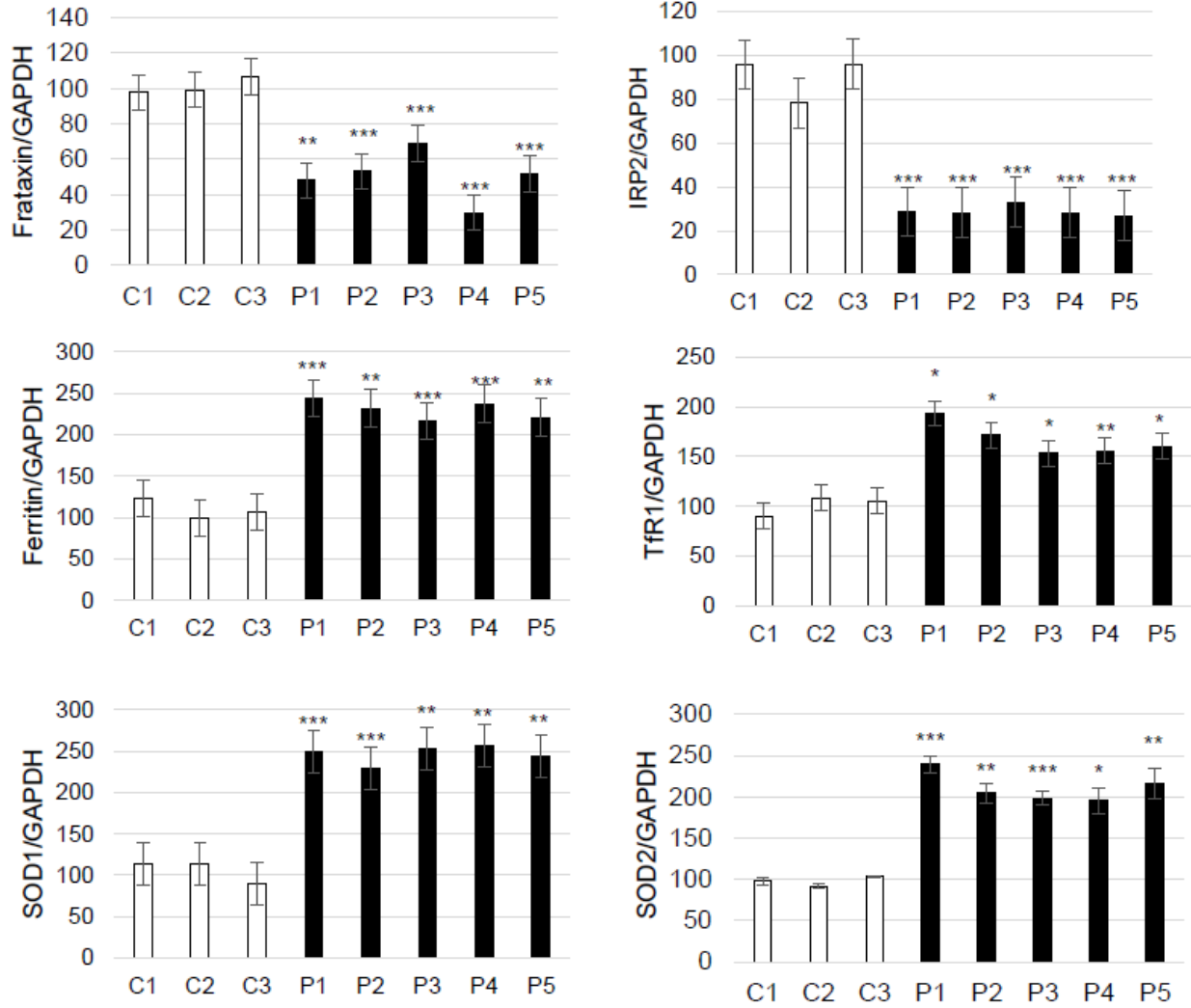


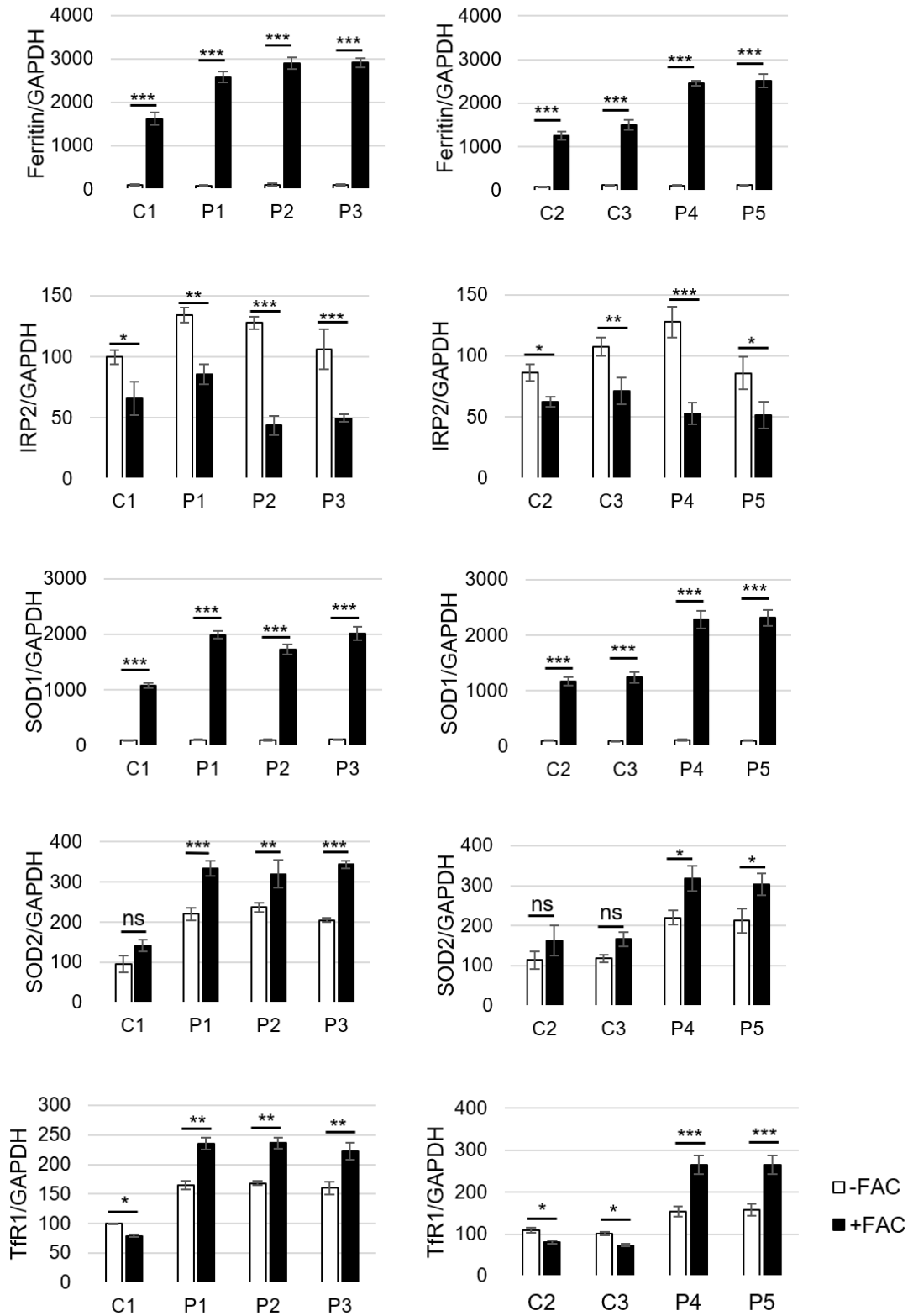
Figure 7



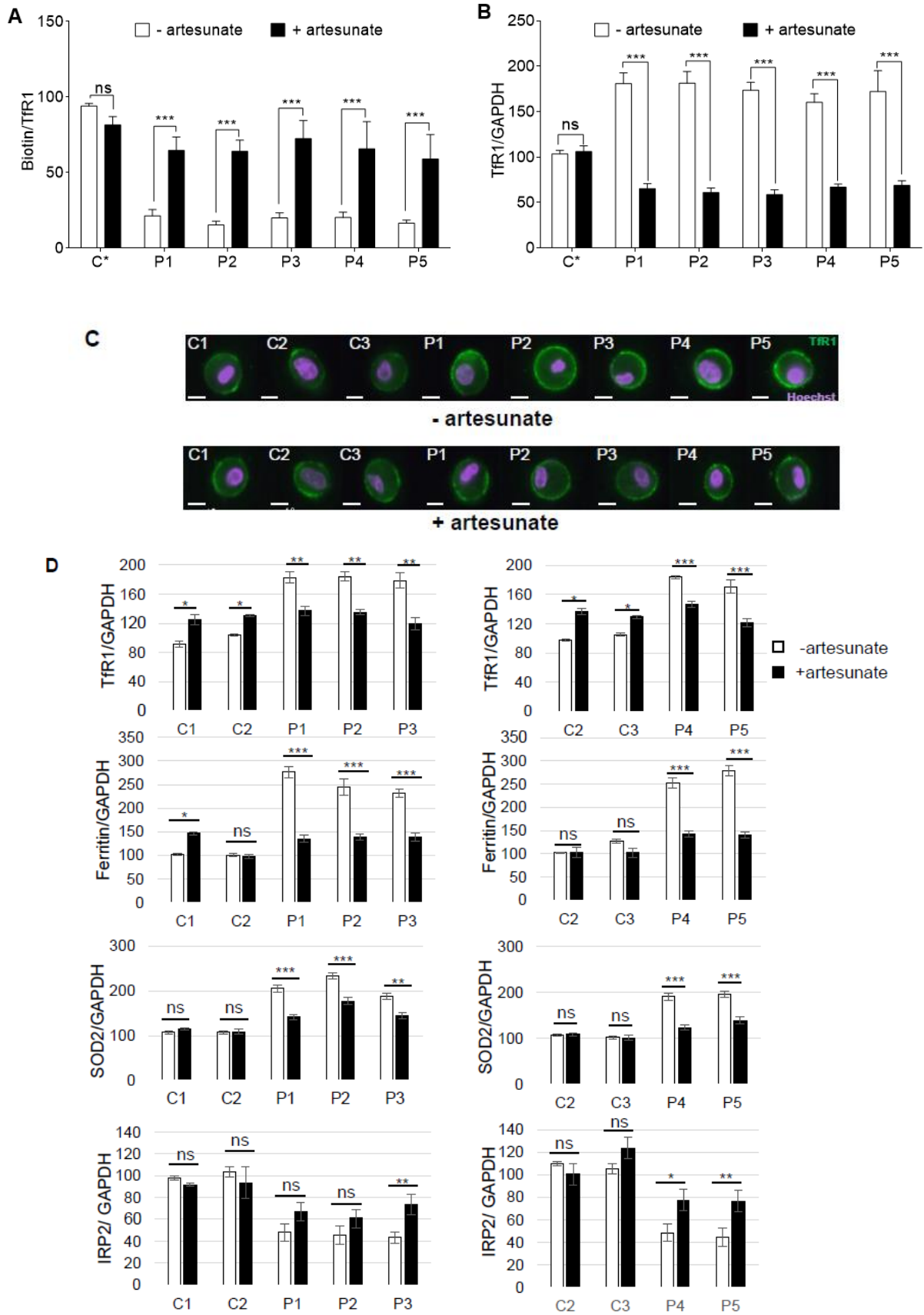
Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2

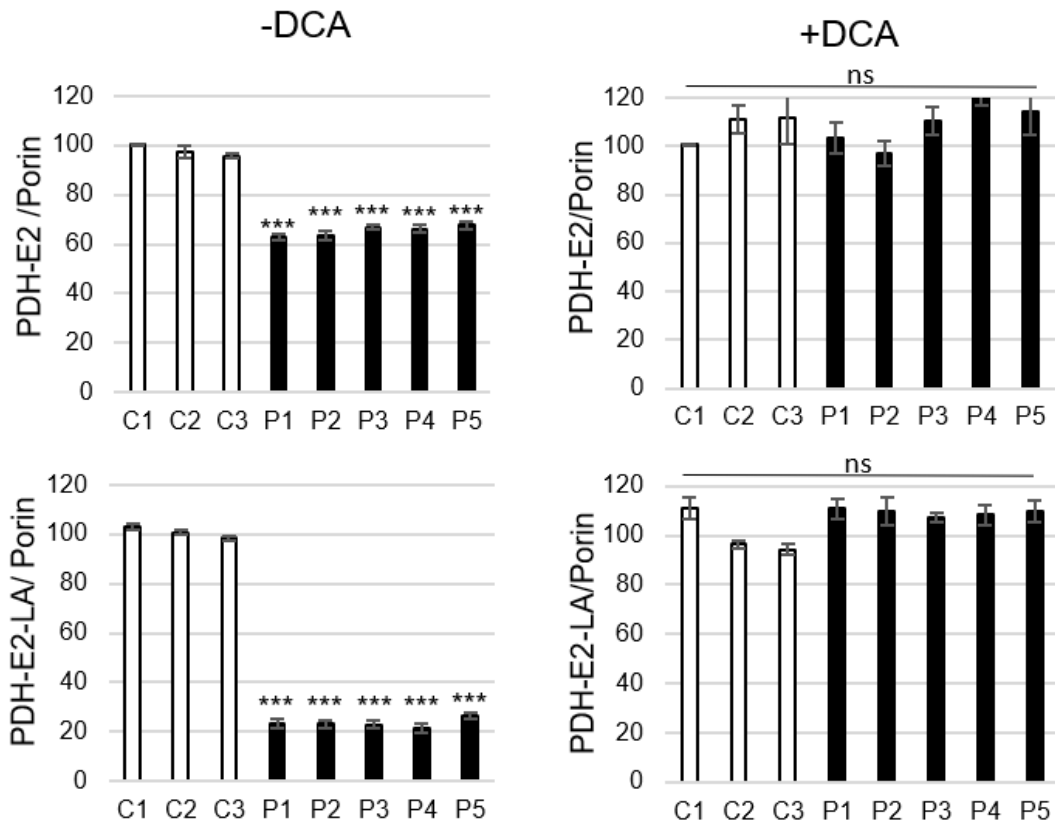


Supplemental Figure 3

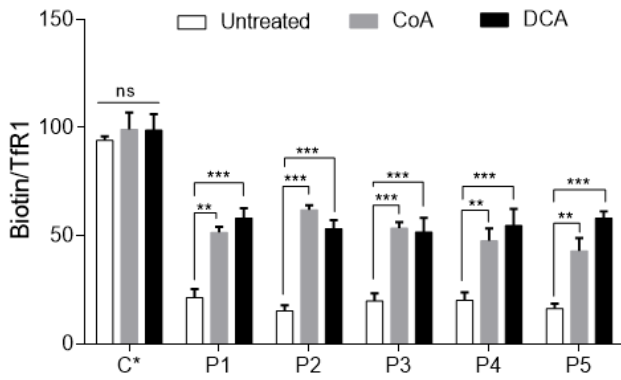


Supplemental Figure 4

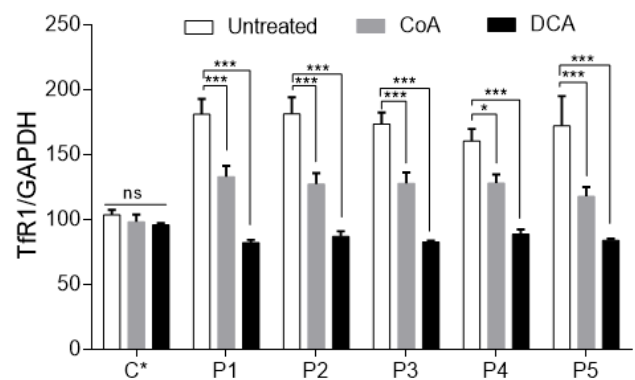
A



B



C



b. Étude de l'effet combiné de l'artésunate et du dichloroacétate sur la surcharge en fer cellulaire dans des fibroblastes de patients

La caractérisation de fibroblastes de patients AF a permis de mettre en évidence un mécanisme d'accumulation du fer fondé sur un défaut de palmitoylation du TfR1 qui est partiellement restauré par le dichloroacétate (DCA) ou l'artésunate (Figures 4A et 5C, Supplemental Figures 3A et 4B de l'article 1). Nous avons voulu tester si leur administration conjointe pouvait avoir un effet synergique qui limiterait d'autant plus la surcharge en fer dans les fibroblastes de patients AF. Cependant, une supplémentation en artésunate et en DCA a un effet comparable à l'utilisation seule de chacune de ces molécules sur la réduction du contenu en fer (**Figure 19**), démontrant l'absence d'interaction synergique ou antagoniste entre ces deux facteurs. Par conséquent, leur usage simultané ne présente aucun bénéfice dans le cadre d'un essai clinique ultérieur.

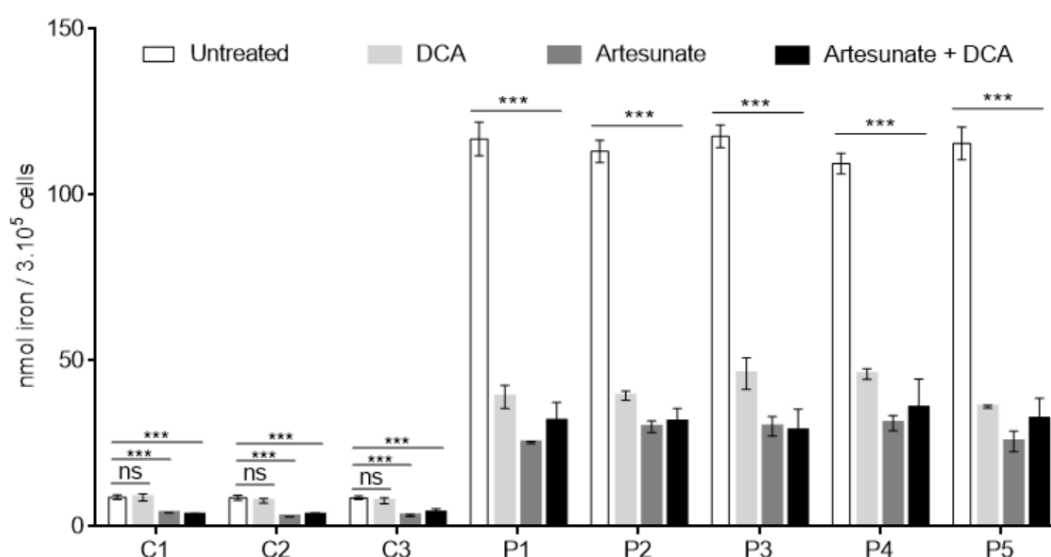


Figure 19 : Détermination du contenu en fer cellulaire par une méthode colorimétrique à base de ferrozine dans des fibroblastes contrôles (C1-C3) et de patients AF (P1-P5) cultivés dans un milieu riche en fer (FAC 100 μ M) supplémenté par 5 mM de dichloroacétate (DCA) et/ou 25 μ M d'artésunate pendant 48 h. Les données représentent la moyenne \pm SEM. Des tests ANOVA ont été utilisés pour comparer la valeur issue d'un traitement à la valeur de référence obtenue sans traitement. *** correspond à une p-value < 0,001, ns : non significatif.

Un traitement en artésunate seul ou conjoint provoque également une diminution significative de la teneur en fer intracellulaire dans les cellules contrôles (**Figure 19**), pouvant refléter un potentiel effet toxique de cette molécule. Des doses inférieures ainsi que des tests de viabilité cellulaire doivent ainsi être réalisés afin de vérifier l'innocuité de l'artésunate tout en préservant son impact fonctionnel sur l'homéostasie du fer.

c. *Étude des effets indépendants de l'artésunate et de dichloroacétate sur la surcharge en fer cellulaire dans des PBMC de patients*

Dans l'objectif d'un essai clinique, un biomarqueur thérapeutique facilement traçable doit nous permettre de suivre l'évolution de la pathologie chez l'homme ainsi que les conséquences physiologiques du traitement administré. L'étude de cellules sanguines mononuclées périphériques (PBMC) de patients AF ($P^{+/+}$) a révélé une dérégulation de l'importation du fer se traduisant par une augmentation progressive de la teneur en fer intracellulaire au cours du temps (**Figure 20**). Il est intéressant de constater que les parents des patients AF présentant une expansion de triplets GAA à l'état hétérozygote ($C^{-/+}$) ont un niveau basal de fer intracellulaire (à T0) supérieur à celui des contrôles sains ($C^{-/-}$) (**Figure 20**). L'incubation de ces cellules pendant 40 h dans un milieu riche en fer (FAC 100 μ M) n'a aucun impact sur la teneur en fer, attestant que les sujets hétérozygotes ($C^{-/+}$) régulent correctement l'entrée du fer dans la cellule. Par conséquent, la dérégulation de l'homéostasie du fer cellulaire constatée dans les cellules de patients peut être utilisée pour le suivi de futurs essais cliniques dans l'AF.

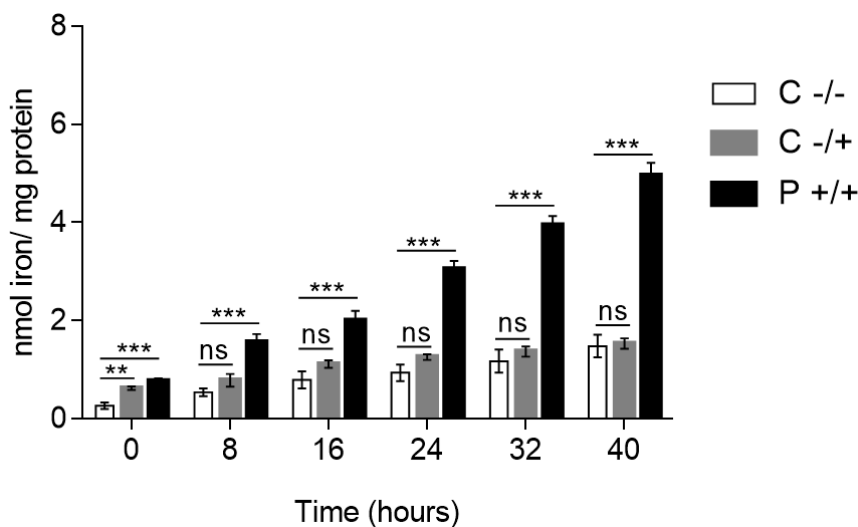


Figure 20 : Cinétique d'accumulation de fer dans les cellules sanguines de patients AF. Détermination du contenu en fer par intervalle de 8 h par la méthode colorimétrique à base de ferrozine sur des PBMC issus de donneurs sains ($C^{-/-}$; n = 4), de parents hétérozygotes ($C^{-/+}$; n = 3) ou de patients AF ($P^{+/+}$; n = 10) cultivés dans un milieu supplémenté par 100 μ M de FAC. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm SEM. Des tests multiples de Student ont été utilisés pour comparer la valeur des hétérozygotes ou des patients à la moyenne des contrôles pour chaque intervalle de temps. **, *** correspondent à des valeurs de p-value < 0,01 et < 0,001, ns : non significatif.

Parmi l'ensemble des molécules testées *in vitro* sur les fibroblastes AF, deux d'entre-elles sont déjà commercialisées, le DCA et l'artésunate. Le CoA est un métabolite très instable en raison de sa dégradation digestive et sanguine très rapide tandis que l'administration de L-carnitine, un précurseur stable de CoA, n'a montré aucun bénéfice évident dans les

mitochondriopathies²²⁷. Par conséquent, seuls les effets pharmacologiques de l'artésunate et du DCA ont été étudiés sur des PBMC incubées en présence de fer (FAC 100 μ M) avec des doses croissantes de molécules dans le but d'appréhender la concentration optimale dépourvue d'effet toxique. Son efficacité et sa sécurité ont été évaluées respectivement par mesure de la teneur en fer intracellulaire (**Figure 21**) et du taux de survie cellulaire (**Figure 22**) à l'issue d'une période d'incubation des cellules de 40 h à une concentration déterminée de drogue.

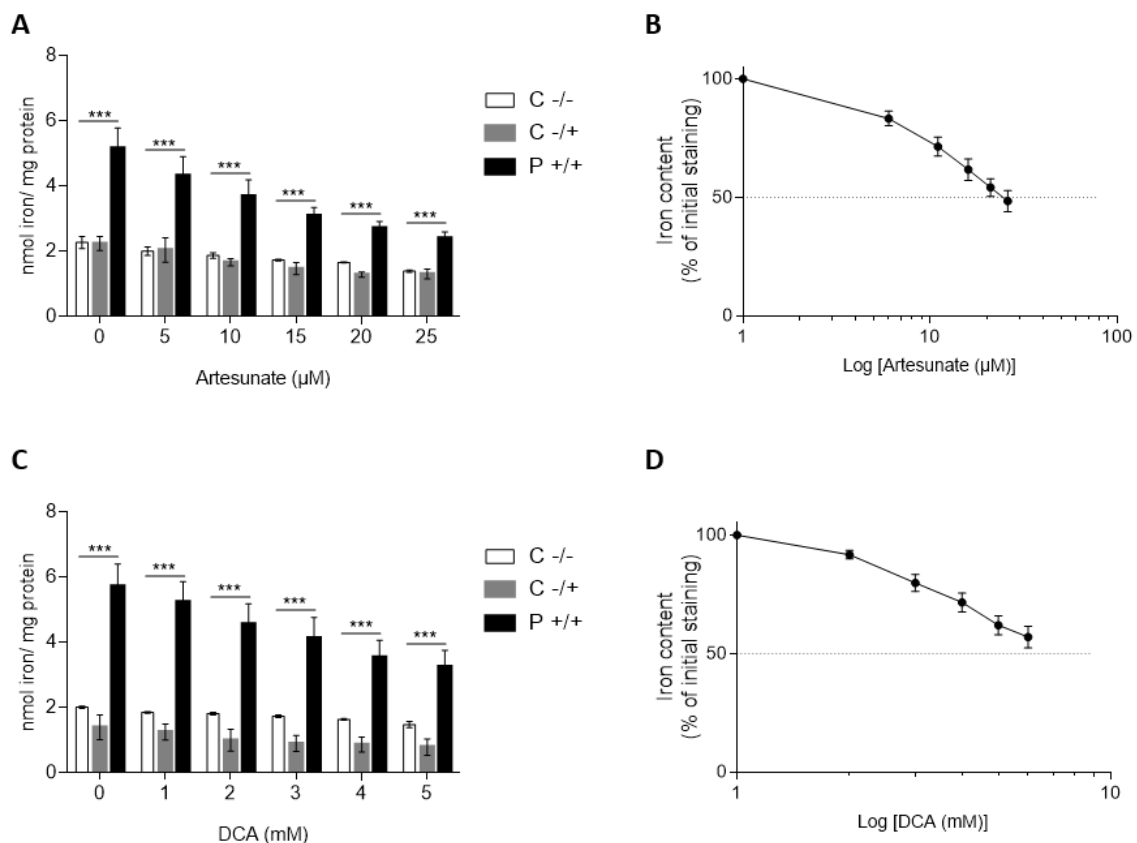


Figure 21 : Relation effet-dose de l'artésunate et du dichloroacétate (DCA) sur le contenu en fer de PBMC. **A et C.** Détermination du contenu en fer intracellulaire par la méthode colorimétrique à base de ferrozine sur des PBMC issus de donneurs sains (C^{-/-} ; n = 3), de parents hétérozygotes (C^{-/+} ; n = 2) ou de patients AF (P^{+/+} ; n = 7) cultivés dans un milieu supplémenté par 100 μ M de FAC avec des doses croissantes d'artésunate (**A**) ou de DCA (**C**) pendant 40 h. **B et D.** Courbes dose-réponse des effets de différentes doses d'artésunate (**B**) et de DCA (**D**) testées (exprimées en log de la dose) sur la quantité de fer cellulaire. Les données représentent la moyenne \pm SEM. Des tests multiples de Student ont été utilisés pour comparer la valeur des patients à la valeur contrôle pour chaque intervalle de temps. *** correspond à une valeur de p-value < 0,001.

Une supplémentation en artésunate ou en DCA permet aux cellules de patients AF de réduire le contenu en fer en limitant son absorption d'autant plus que la dose de drogue administrée est importante (**Figure 21A-C**). Une diminution de la teneur en fer intracellulaire est également observée dans les cellules hétérozygotes (C^{-/+}) suite à l'administration de DCA (**Figure 21A**), suggérant que son effet pourrait être médié par une toxicité cellulaire. De plus, la concentration

permettant de diminuer de moitié la surcharge en fer dans les cellules de patients (IC_{50}) est atteinte avec une dose de 25 μM d'artésunate alors que cette valeur n'est pas obtenue pour le DCA (**Figure 21B-D**). L'artésunate a ainsi une concentration-effet nettement inférieure à celle du DCA se traduisant par un effet pharmacologique plus puissant *in vitro* sur des PBMC de patients AF pour une dose moindre. Cependant, l'efficacité maximale n'a pas pu être atteinte pour chacune de ces molécules en raison d'une gamme de concentration testée trop étroite. Une étude plus large devra donc être menée pour établir l'effet plafond (meilleure réponse réalisable pour chaque molécule) ainsi que la concentration de molécules nécessaire pour induire un effet égal à 50% de son effet maximal possible (EC_{50}).

Avant d'étendre notre étude, les effets cytotoxiques du DCA et de l'artésunate ont été mesurés via la détermination du pourcentage de cellules vivantes à l'issue du traitement. L'action de l'artésunate induit une mort cellulaire importante avec une mortalité d'environ 50% des cellules aux concentrations les plus fortes (**Figure 22A-B**), tandis qu'un traitement en DCA provoque une faible mortalité cellulaire, inférieure à 20% (**Figure 22C-D**). Par conséquent, cette cytotoxicité nettement plus limitée du DCA nous permet d'envisager une gamme de doses plus importantes. En revanche, il n'est pas concevable de mettre en place un tel protocole d'expérimentation pour l'artésunate en raison de sa toxicité avérée.

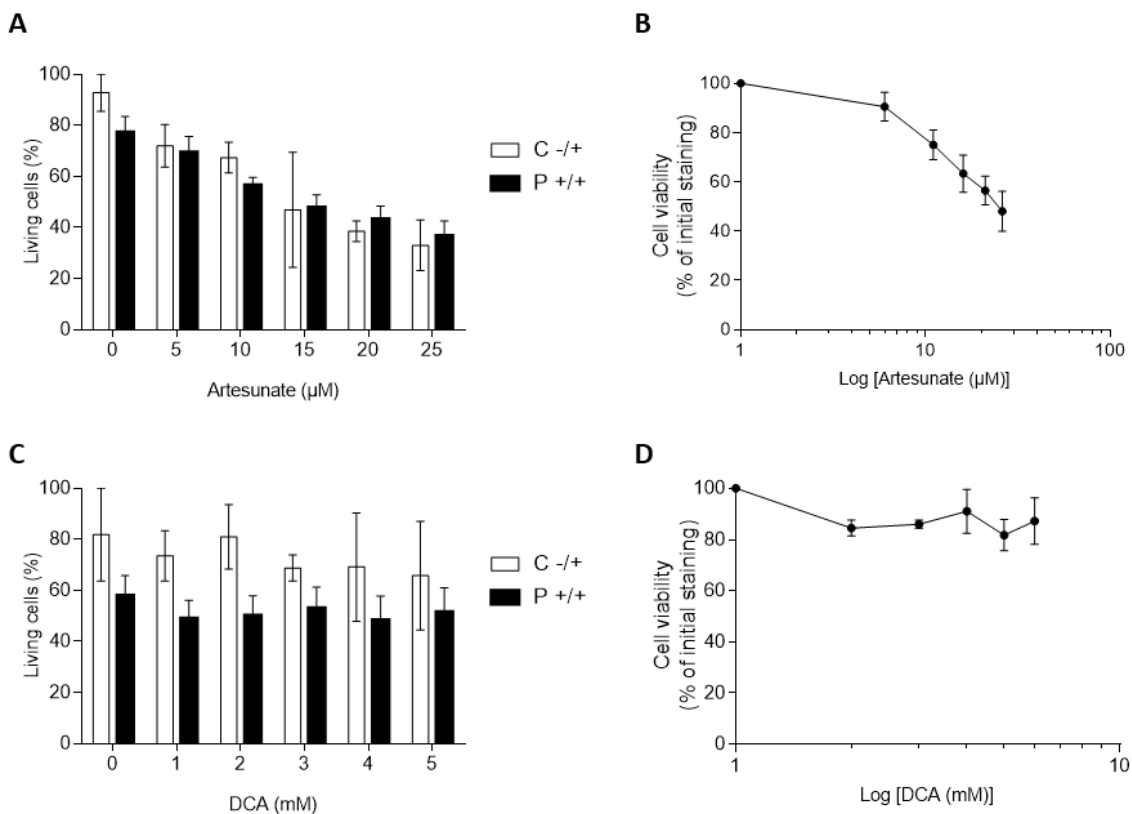


Figure 22 : Relation effet-dose de l'artésunate et du dichloroacétate (DCA) sur la viabilité cellulaire de PBMC. **A et C.** Détermination de la viabilité cellulaire par coloration au bleu Trypan sur des PBMC issus de parents hétérozygotes (C^{-/-}; n = 2) ou de patients AF (P^{+/+}; n = 5) cultivés dans un milieu supplémenté par 100 µM de FAC avec des doses croissantes d'artésunate (**A**) ou de DCA (**C**) pendant 40 h. **B et D.** Courbes doses-réponses des effets de différentes doses d'artésunate (**B**) et de DCA (**D**) testées (exprimées en log de la dose) sur la quantité de fer cellulaire. Les données représentent la moyenne ± SEM.

L'artésunate est un agent anti-malarien administré dans des formes sévères de paludisme lors d'une brève incubation grâce à son effet prolongé se poursuivant plusieurs heures après l'exposition. Notre première intention a donc été de réduire le temps d'incubation des PBMC en présence d'artésunate à une durée de 16 h dans un milieu riche en fer dans le but d'essayer de diminuer ces effets cytotoxiques (Condition 2, **Figure 25A**). Cette courte incubation a permis de réduire de moitié la quantité de fer intracellulaire dans les cellules du patient AF pour une dose de 25 µM d'artésunate (**Figure 23A**) avec seulement 20% de mort cellulaire (**Figure 23B**).

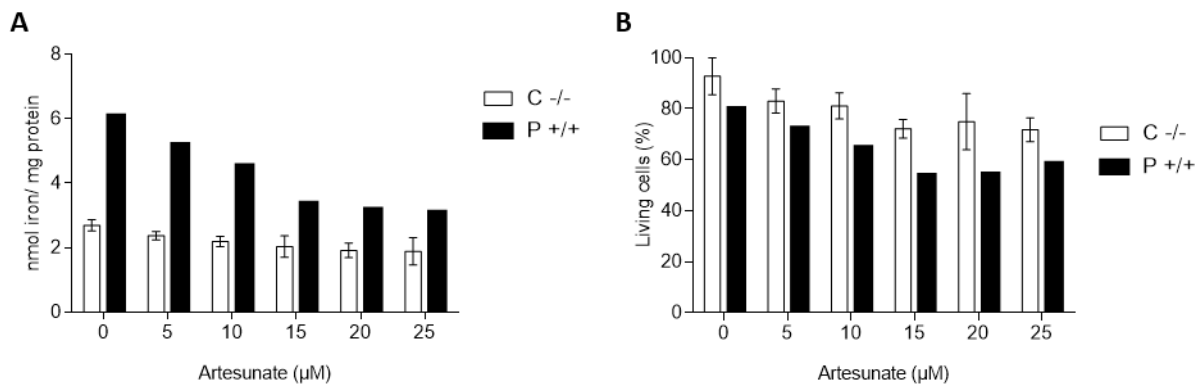


Figure 23 : Étude de l'effet différentiel de l'artésunate au cours du temps sur des PBMC après 16 h d'incubation en présence de fer. Le contenu en fer est déterminé par la méthode colorimétrique à base de ferrozine (**A**) et le pourcentage de cellules vivantes est déterminé par coloration au bleu Trypan (**B**) sur des PBMC issus de donneurs sains (C^{-/-}; n = 2), ou de patient AF (P^{+/+}; n = 1) cultivés dans un milieu supplémenté par 100 µM de FAC avec des doses croissantes d'artésunate pendant 16 h suivi d'une incubation dans un milieu riche en fer (100 µM FAC) pendant 24 h. Au total, les PBMC ont été incubées dans des conditions riches en fer pendant 40 h. Les données représentent la moyenne ± SEM seulement pour les contrôles.

Dans un deuxième temps, une période d'exposition en artésunate encore plus restreinte a été testée. Cependant, une période de préincubation en présence de fer (FAC 100 µM) pendant 16 h a précédé l'administration d'artésunate sur une durée de 4 h (Condition 3, **Figure 25A**) de manière à reproduire *in vitro* un contexte de surcharge en fer comme rencontré dans les tissus affectés par l'AF. La mesure du contenu en fer n'a montré qu'une faible diminution de la teneur de ce métal pour les doses croissantes d'artésunate testées dans les cellules de patients (**Figure 24A**), se traduisant par une absence d'effet cytotoxique (**Figure 24B**). De ce fait, une surcharge

en fer préexistante limite fortement les effets pharmacologiques d'une courte exposition en artésunate.

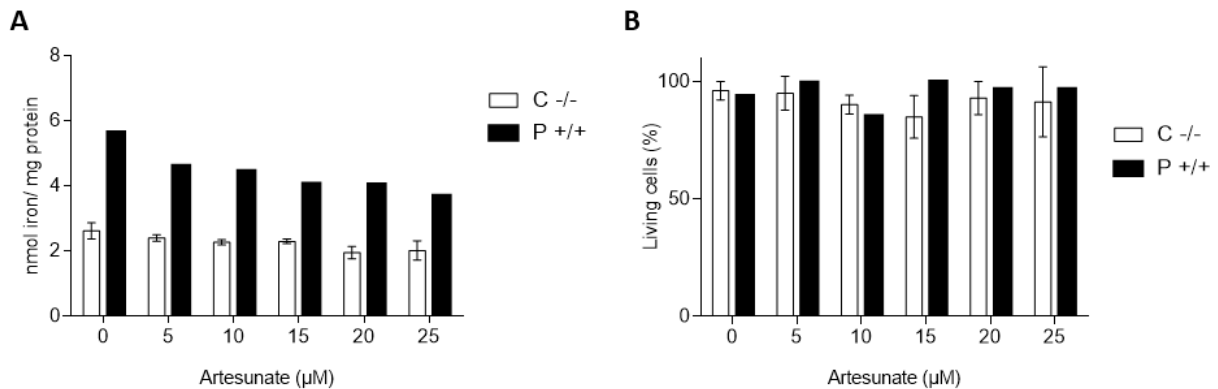


Figure 24 : Étude d'une courte exposition d'artésunate sur des PBMC cultivés en présence de fer. Le contenu en fer est déterminé par la méthode colorimétrique à base de ferrozine (A) et le pourcentage de cellules vivantes est déterminé par coloration au bleu Trypan (B) sur des PBMC issus de donneurs sains (C^{-/-}; n = 2), ou de patient AF (P^{+/+}; n = 1) pré-incubés dans un milieu riche en fer (100 μM FAC) sur la nuit (16 h) suivi d'une courte incubation en présence d'artésunate (concentration entre 0 et 25 μM pendant 4 h) puis cultivés dans un milieu supplémenté par 100 μM de FAC pendant 20 h. Au total, les PBMC ont été incubées dans des conditions riches en fer pendant 40 h. Les données représentent la moyenne \pm SEM seulement pour les contrôles.

L'analyse comparative de la variation d'amplitude des effets de l'artésunate en fonction du temps a été établie par l'établissement des relations doses-réponses pour chaque période temporelle étudiée. Pour des doses identiques d'artésunate, des expositions de 16 h et de 40 h ont montré une efficacité comparable sur la surcharge en fer dans des PBMC de patients (Figure 25B). L'incubation restreinte de 16 h a permis d'atteindre une toxicité maximale cellulaire plafonnée à 60% de viabilité dès 15 μM d'artésunate (Figure 25C). En revanche, une exposition très brève de 4 h, associée d'une surcharge en fer préalablement établie, a conduit à une efficacité modérée de l'artésunate sans provoquer d'effet cytotoxique (Figure 25B-C). En conclusion, l'effet prolongé de l'artésunate sur la surcharge en fer au-delà de son temps d'incubation permet d'envisager des périodes brèves d'administration interrompues par des temps d'arrêt du traitement. Il est fortement probable que le nombre de cycles d'incubations et d'interruptions soit d'autant plus important que la surcharge en fer est élevée. Néanmoins, ces résultats restent à confirmer en raison du nombre limité d'échantillons sanguins testés lors de ces expériences.

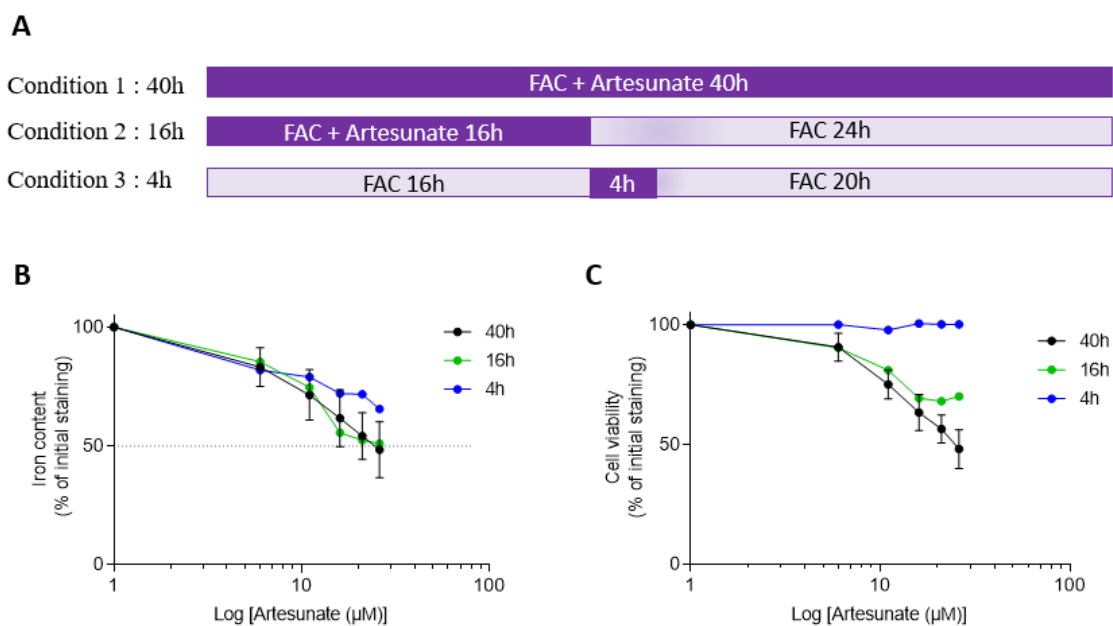


Figure 25 : Tests doses-réponses des effets d'artésunate sur des PBMC en fonction du temps. **A.** Schéma des différents temps d'incubation d'artésunate testés en présence de fer (100 μ M FAC). **B-C.** Courbes doses-réponses des effets de différentes concentrations d'artésunate (exprimées en log de la dose) sur la quantité de fer intracellulaire (**B**) et la viabilité (**C**) des PBMC de patients AF ($P^{+/+}$) incubés dans un milieu riche en fer supplémenté en artésunate pendant 40 h ($n = 7$), 16 h ($n = 1$) ou 4 h ($n = 1$) selon les protocoles définis dans les figures 22, 23 et 24. Les données représentent la moyenne \pm SEM seulement pour une incubation en artésunate de 40 h.

d. Étude de dérivés de l'artésunate sur la surcharge en fer cellulaire dans des fibroblastes de patients

L'artésunate a une biodisponibilité faible et une demi-vie très restreinte, de l'ordre de 20 à 30 min dans l'organisme. En revanche, certains de ces dérivés comme la dihydroartémisinine (DHA), le métabolite actif de l'artésunate, ou les ozonides, des dérivés structuraux, ont des temps d'action nettement plus élevés avec des demi-vies avoisinant les 40-60 min ou 60 à 120 min respectivement. Les effets de ces molécules ont été testés sur des fibroblastes de patients AF. La DHA, l'ozonide MMV000019 et l'artésunate ont des effets relativement comparables sur le contenu en fer pour les deux plus faibles concentrations testées, 5 et 10 μ M (**Figure 26**). En revanche, une dose de 20 μ M de MMV690941, de MMV018052 ou d'artésunate conduit à une réduction de plus de la moitié de la surcharge en fer des cellules de patients (**Figure 26**). De manière intéressante, cet effet pharmacologique est obtenu dès 10 μ M de MMV690941. Ainsi, cet ozonide pourrait constituer une alternative thérapeutique à l'utilisation de

l'artésunate. Néanmoins, ces résultats n'ont pu être répliqués faute de molécules en quantité suffisante pour renouveler cette expérience et doivent être confirmés.

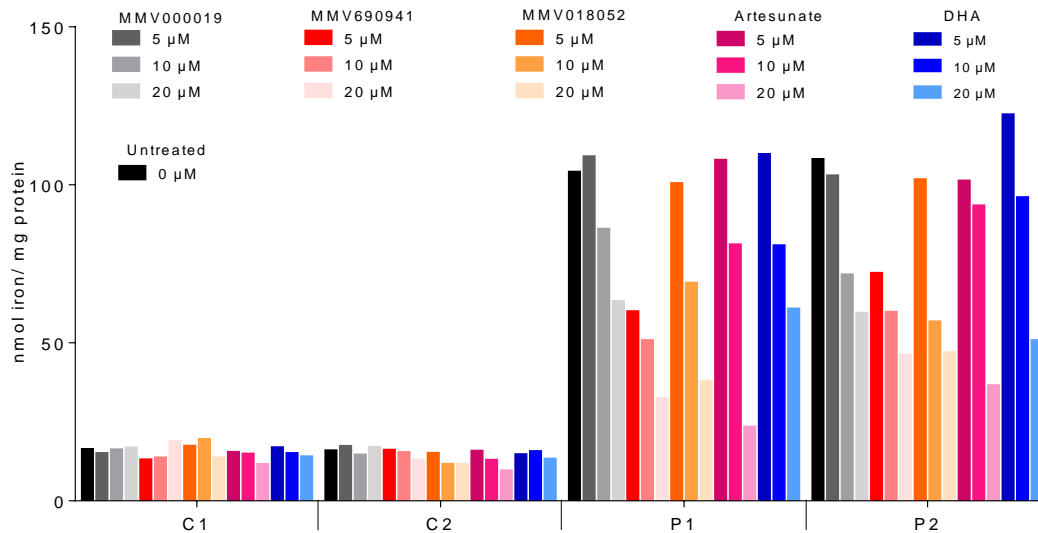


Figure 26 : Étude d'ozonides sur des fibroblastes cultivés en présence de fer. Contenu en fer déterminé par la méthode colorimétrique à base de ferrozine sur des fibroblastes contrôles (C1 – C2) et de patients AF (P1 – P2) cultivés dans un milieu riche en fer (100 µM FAC) supplémenté par des doses croissantes d'ozonides (MMV000019, MMV690941 et MMV018052), d'artésunate et de DHA pendant 48 h. n = 1.

e. Discussion

L'AF se caractérise par une surcharge en fer dans le cœur et le cerveau des patients provoquant des symptômes neurologiques et cardiaques importants. Cette propriété est présente dans l'ensemble des modèles cellulaires et animaux de l'AF. Cette étude a démontré que les fibroblastes ainsi que les PBMC de patients AF sont incapables de limiter l'entrée du fer provoquant une accumulation de ce métal dans les cellules. L'identification d'un mécanisme possible de dérégulation de l'homéostasie du fer ouvre la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur le défaut de palmitoylation du TfR1 et/ou le déficit en CoA.

Le dichloroacétate (DCA) stimule l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) responsable de la synthèse de CoA en inhibant la pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK). Une supplémentation en DCA a permis de limiter l'accumulation de fer dans les cellules de patients grâce à la restauration du contenu en CoA et la réduction du défaut de palmitoylation du TfR1, sans occasionner de toxicité cellulaire. Le DCA est couramment utilisé dans l'acidose

lactique^{228,229}, le diabète²³⁰ ou dans certains cancers²³¹ où il est souvent coadministré avec d'autres molécules de chimiothérapie conventionnelle afin d'améliorer sa biodisponibilité et son efficacité grâce à leur action synergique²³¹. Dans ce sens, une addition conjointe de DCA et d'artésunate, un agent anti-malaria, a été étudiée mais n'a révélé aucun effet supérieur à la somme de leurs effets indépendants sur la surcharge en fer. Le DCA en monothérapie pourrait ainsi être envisagé dans un contexte d'essai clinique dans l'AF. Cependant, l'apparition de neuropathie périphérique chez des patients avec un syndrome MELAS (associant myopathie mitochondriale, encéphalopathie, acidose lactique et des pseudo-épisodes vasculaires cérébraux)²³² ainsi qu'une suspicion de cancérogénicité ont conduit à l'interruption prématurée des essais cliniques dans le cancer du sein et du poumon²³³, limitant ainsi grandement son utilisation.

A cette fin, nous avons concentré nos efforts à analyser les effets de l'artésunate sur la palmitoylation du TfR1 et le contenu en fer. Cette molécule a permis de réduire considérablement le contenu en fer intracellulaire des cellules de patients AF avec une IC50 de 25 μM . Néanmoins, l'IC50 de l'artésunate *in vitro* sur *Plasmodium falciparum*, l'agent pathogène de la malaria, est de l'ordre de 1 à 3 nM²³⁴ tandis que sa concentration plasmatique ne dépasse pas 700 nM lors d'un traitement d'artésunate en monothérapie (à 2 mg/kg/jour)²³⁴. De plus, l'artésunate diminue la teneur en fer de fibroblastes contrôles et induit une cytotoxicité importante sur des PBMC. Cette mortalité cellulaire est d'autant plus importante que la dose administrée est forte. Ces éléments nous ont donc amené à rechercher des alternatives de manière à optimiser ces paramètres pharmacologiques.

Les ozonides sont des dérivés structuraux de l'artésunate ayant un profil pharmacodynamique comparable et des paramètres pharmacocinétiques plus favorables permettant leur utilisation en dose unique (demi-vie prolongée et concentrations d'administration plus élevées de l'ordre de 750-1200 mg)²³⁵. Leur étude a permis de mettre en évidence une efficacité comparable du MMV000019 (OZ439) et du MMV018052 qui diffèrent par leur chaîne radicalaire (**Figure 27**). En revanche, une supplémentation de 5 μM de MMV690941 induit une diminution de fer aussi prononcée qu'une dose de 10 μM d'artésunate, de DHA ou d'autres ozonides. Ce MMV690941 étant dépourvu d'un groupe peroxyde (R-O-O-R') (**Figure 27**), il semble assez surprenant d'obtenir une réponse aussi marquée sur l'accumulation de fer à faible concentration. Bien que les mécanismes d'actions de l'artésunate et de l'ensemble des dérivés de l'artémisinine restent encore flous et discutables, l'effet pharmacologique proposé de ces molécules sur *P. falciparum*

implique le clivage de la liaison peroxyde par la réaction de Fenton sous l'action d'une source de fer réduite, produisant des radicaux libres. La génération d'espèces réactives de l'oxygène provoque des dommages sur des macromolécules telles que les protéines et les lipides entraînant la mort du parasite intra-érythrocytaire. Par conséquent, il est fortement probable que l'artésunate ou les ozonides agissent sur différents mécanismes impliquant la palmitoylation du TfR1 ou leur pont peroxyde dans le but de limiter l'entrée du fer et sa surcharge intracellulaire. Cependant, notre étude a analysé les effets des ozonides lors d'une incubation en FAC, une source de fer de la voie NTBI. Ainsi, le phénomène de réduction du niveau de palmitoylation du TfR1 ne joue aucun rôle dans la limitation du contenu en fer. De plus, l'absence de pont peroxyde du MMV690941 laisse penser que cette liaison n'est également pas impliquée dans la restauration de l'homéostasie du fer. Par conséquent, il semble que d'autres mécanismes encore méconnus des ozonides et de l'artésunate affectent la régulation du fer cellulaire, comme par exemple une action plus large sur la palmitoylation de nombreuses protéines cellulaires dont des acteurs de la voie NTBI.

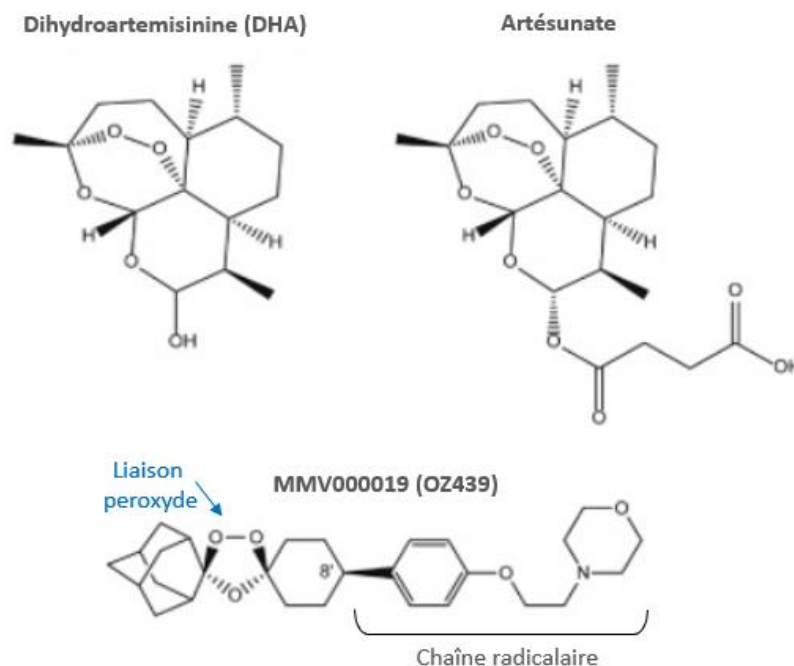


Figure 27 : Structure chimique du DHA, de l'artésunate et du MMV000019 (adaptée de Giannangelo *et al.*²³⁵). Tous les dérivés de l'artémisinine possèdent une liaison peroxyde leur permettant d'exercer leurs actions sur *P. Falciparum* à l'exception du MMV690941. La chaîne radicalaire est variable d'un ozonide à un autre.

Grâce à son action comparable à plus faible concentration que l'artésunate et le DHA, l'ozonide MMV690941 pourrait constituer une alternative thérapeutique. Néanmoins, les données actuelles chez l'homme ne sont pas suffisantes pour démarrer un quelconque essai clinique chez des patients AF.

La seconde stratégie a été d'étudier l'action prolongée de l'artésunate après une période d'administration restreinte. Une incubation très brève de 4 h a permis de diminuer de la surcharge en fer présente dans les PBMC de patients de plus de 30% sans occasionner de toxicité cellulaire. A l'inverse, une exposition de 16 h a un effet comparable à une incubation de 40 h sur la diminution du contenu en fer avec une réduction de moitié de sa surcharge intracellulaire tout en réduisant ces effets toxiques. Cette baisse de cytotoxicité nous permet d'établir un protocole de détermination de la dose optimale thérapeutique basé sur des cycles répétés d'administration et d'arrêt du traitement dans la première phase des essais cliniques chez les patients AF. Une telle approche permettrait ainsi de limiter des phénomènes d'exposition chronique toxique de cette molécule.

Pour conclure, l'artésunate semble être la solution thérapeutique la plus prometteuse présentant un bon profil de sécurité pouvant être testée dans l'AF. Cependant, l'apparition croissante de phénomènes de résistance de l'agent du paludisme dans plusieurs zones géographiques du globe (Cambodge et Inde) ont conduit les instances sanitaires internationales à décréter en Octobre 2017 l'arrêt mondial de l'utilisation de l'artémisinine ou ses dérivés en monothérapie orale (source OMS). De futurs essais cliniques potentiels devront ainsi tenir compte de ces conséquences et amènent des préoccupations supplémentaires sur l'approvisionnement en artésunate.

Partie II : Étude de l'homéostasie du fer dans des modèles déficitaires en *FXN* et/ou *PIP5K1B*

Contexte :

En 1996, la découverte d'altérations dans le gène codant pour la frataxine chez des patients a permis d'établir les bases génétiques de l'AF avec la mise en évidence d'une expansion intronique de triplets dans *FXN*²⁰. Cependant, quelques mois plus tard, une étude a révélé que les causes génétiques de l'AF s'étendaient au-delà du locus *FXN* en affectant un gène avoisinant, *PIP5K1B*, pouvant être responsable de certaines atteintes neurologiques²³⁶.

Par conséquent, le but de la présente étude vise à déterminer la part du défaut en frataxine et en pip5k1 β dans la dérégulation de l'homéostasie du fer associée à l'AF. Des analyses quantitatives des transcrits et des protéines majeures impliquées dans l'homéostasie du fer ont été réalisées en parallèle dans des modèles cellulaires déficitaires en *FXN* et/ou *PIP5K1B*.

*a) Extinction des gènes *FXN* et *PIP5K1B* dans des cellules HEK*

Une extinction indépendante ou simultanée de *FXN* et *PIP5K1B* a été réalisée dans des cellules HEK293FT grâce à un ensemble de quatre siRNA dirigés contre les transcrits *FXN* (*siFXN*) ou *PIP5K1B* (*siPIP5K1B*) ou simultanément (*siFXN/PIP5K1B*) dans des conditions de culture standard (DMEM supplémenté par FBS 10%). Dans la suite du manuscrit, les termes *siFXN*, *siPIP5K1B* et *siFXN/PIP5K1B* désigneront les cellules dans lesquelles *FXN* et/ou *PIP5K1B* ont été éteints par siRNA. L'efficacité d'extinction a été évaluée par quantification des taux de transcrits et de protéines respectivement par qRT-PCR et western blot. Les données de qRT-PCR ont montré que l'utilisation de siRNA contre *FXN* induit une réduction de 60% et 69% de la quantité de transcrits après une simple (*siFXN*) ou une double extinction (*siFXN/PIP5K1B*) (**Figure 28A**). Cette extinction s'accompagne également d'une réduction de la quantité de protéine frataxine d'environ 65% dans les deux conditions (**Figure 28C-D**). Similairement, l'utilisation de siRNA ciblant l'ARNm *PIP5K1B* réduit le taux de transcrits d'environ 60% et 66% après une simple (*siPIP5K1B*) et une double extinction (*siFXN/PIP5K1B*) respectivement (**Figure 28B**) ainsi que le niveau de protéine pip5k1 β (58% en simple extinction et 68% en double extinction) (**Figure 28C-D**).

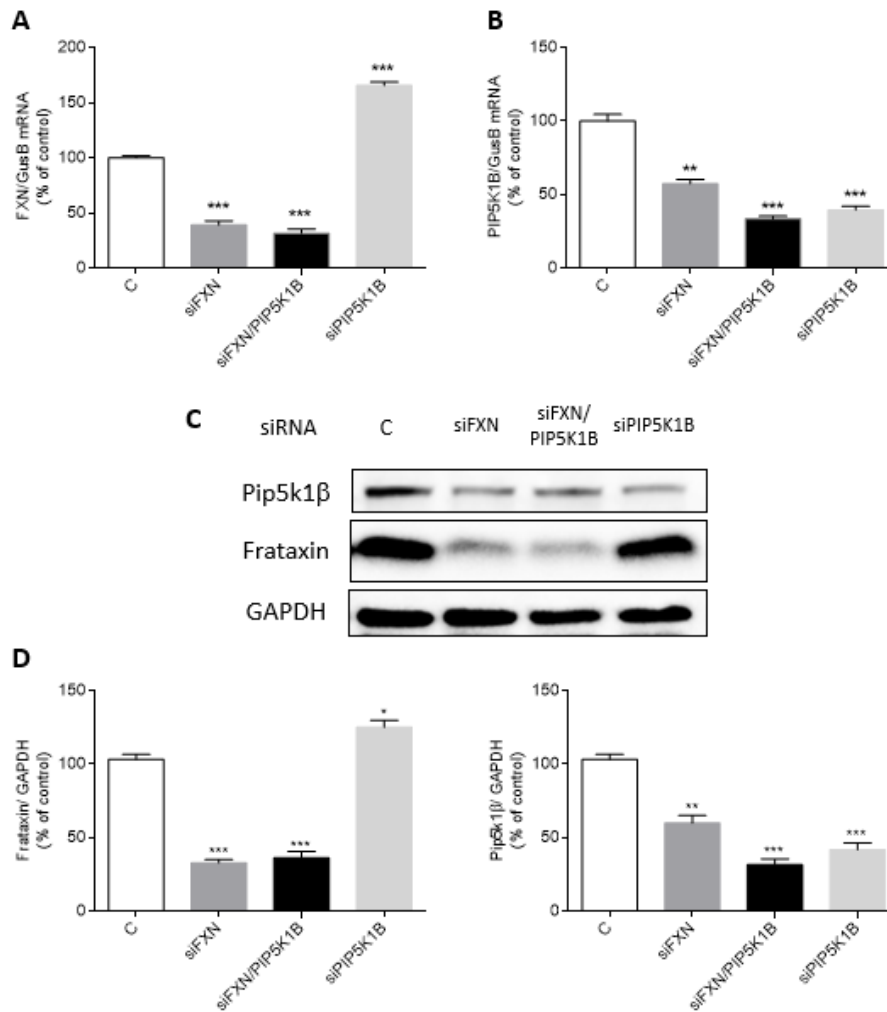


Figure 28 : Extinction des gènes *FXN* (A, C) et *PIP5K1B* (B, C) dans des cellules HEK transfectées par siRNA (*siFXN*, *siPIP5K1B* ou *siFXN/PIP5K1B*) 48h post-transfection. A-B. Expression des transcrits *FXN* (A) et *PIP5K1B* (B) quantifiés par ddPCR et normalisés par un contrôle interne, GusB. **C.** Immunoblots de la frataxine et pip5k1β dans les modèles HEK déficitaires en *FXN* et/ou *PIP5K1B*. **D.** Quantification des immunoblots. Le taux de protéines est rapporté à la GAPDH. Les données sont exprimées selon la moyenne ± SEM. n = 3. Un test de Student a été réalisé pour comparer la valeur de chaque échantillon par rapport à la valeur contrôle. *, ** et *** correspondent à une p-value <0,05, < 0,01 et < 0,001, respectivement.

L'extinction de *FXN* seul réduit significativement le taux de transcrit *PIP5K1B* (57% d'ARNm résiduelle) ainsi que de protéine pip5k1β (60% de protéine résiduelle) (**Figure 28B-C**) comme décrit dans les fibroblastes de patients AF⁶¹. De manière surprenante, l'extinction de *PIP5K1B* (*siPIP5K1B*) augmente de manière significative la quantité de transcrit *FXN* et de protéine frataxine (**Figure 28A-C**), démontrant que l'expression de *PIP5K1B* peut, à son tour, affecter celle de *FXN*.

La transfection dans des cellules HEK par des siRNA dirigés à la fois contre *FXN* et *PIP5K1B* conduit à des extinctions partielles de ces deux gènes dans des proportions comparables à l'utilisation seule des *siFXN* ou *siPIP5K1B*. Une mutation à expansion de triplets dans les

fibroblastes de patients conduit à une diminution d'environ 75-80% du taux de transcrits *FXN* (**Figure 29A**) et de 30 à 70% de protéine frataxine selon les patients (**Figure 29C-D**). Cette réduction s'accompagne d'une extinction de *PIP5K1B* provoquant une baisse de sa quantité de transcrits (**Figure 29B**) et de protéines d'environ 60-80% (**Figure 29B-C**) selon le nombre de GAA, comme précédemment décrit dans la littérature⁶¹. Par conséquent, le modèle *siFXN/PIP5K1B* permet de reproduire des conditions d'extinction proches de celles retrouvées dans les fibroblastes de patients AF. Le déficit en protéine frataxine est plus prononcé dans le modèle *siFXN/PIP5K1B* que dans les cellules de patients en raison de la spécificité de l'anticorps utilisé et du niveau d'expression de la frataxine beaucoup plus faible dans des fibroblastes contrôles que dans des cellules immortalisées.

Ces modèles ont été créés pour mieux comprendre les rôles respectifs d'un défaut en *FXN* et *PIP5K1B* dans la dérégulation de l'homéostasie du fer dans l'ataxie de Friedreich. Cependant, le fait que l'extinction d'un des deux gènes impacte l'expression du second gène va compliquer cette étude.

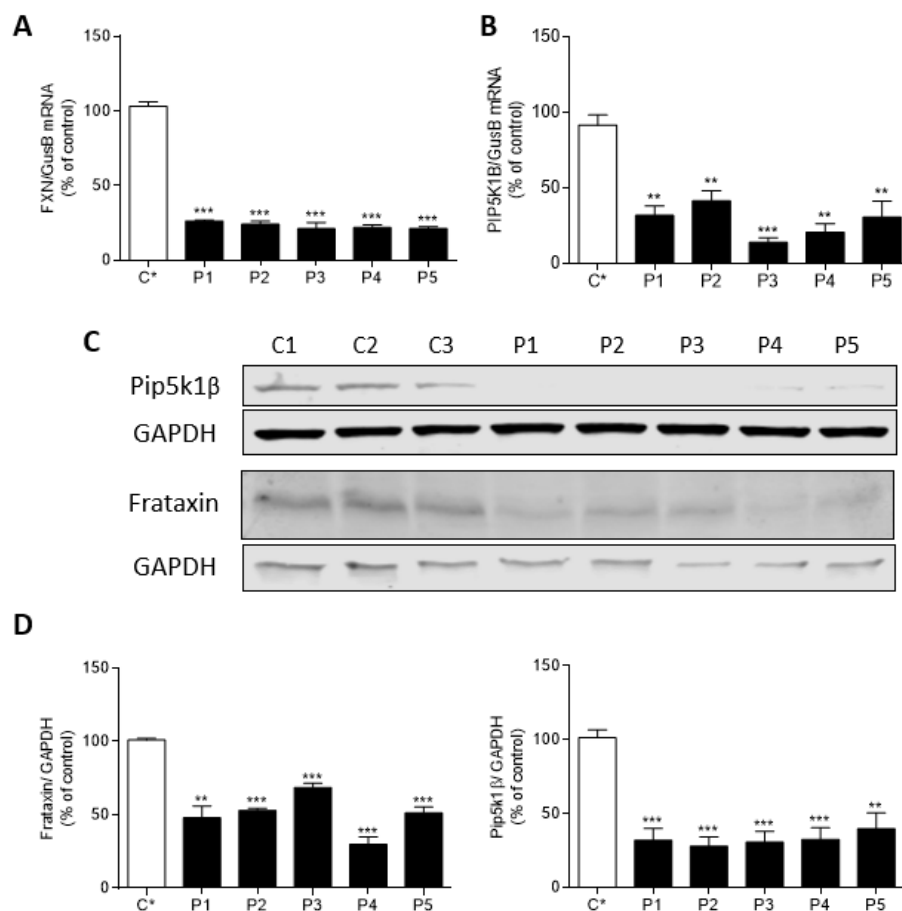


Figure 29 : Déficit quantitatif en frataxine et pip5k1 β dans les fibroblastes de patients AF. A-B. Expression des transcrits *FXN* (A) et *PIP5K1B* (B) quantifiés par ddPCR et normalisés par un contrôle interne, GusB. **C.** Immunoblots de la frataxine et pip5k1 β dans des fibroblastes contrôles (C1-C3) et de patients AF (P1-P5). **D.** Quantification des immunoblots. C* : moyenne des trois contrôles. Le taux de protéines est rapporté à la GAPDH. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm SEM. n = 3. Un test de Student sur des échantillons non appariés est réalisé pour comparer la valeur de chaque échantillon par rapport à la valeur contrôle. ** et *** correspondent à une p-value < 0.01 ou < 0,001 respectivement.

b) Les acteurs de l'homéostasie du fer dans des modèles déficients en frataxine et/ou pip5k1 β

L'homéostasie du fer a été étudiée par quantification protéique de plusieurs acteurs majeurs impliqués dans son import et son stockage dans des modèles cellulaires de siRNA cultivés dans un milieu standard, 48 h après transfection.

Les cellules *siFXN/PIP5K1B* ont une augmentation significative de protéines du TfR1 et de la ferritine (**Figure 30**) associée à une baisse d'IRP2, comme dans les fibroblastes AF (voir article 1, Figure 1D). Cependant, la hausse de ces deux protéines est moins prononcée que dans les fibroblastes de patients. La quantité des superoxyde dismutases SOD1 et SOD2 est également plus élevée par rapport aux cellules contrôles suggérant l'existence d'un stress oxydant cytosolique et mitochondrial. De plus, les cellules *siFXN/PIP5K1B* présentent une baisse de l'aconitase mitochondriale (ACO2), une protéine à centre Fe-S.

Les cellules *siFXN* présentent également une hausse du TfR1, de la ferritine et des superoxydes dismutases (SOD1 et SOD2) avec une diminution d'IRP2 ainsi que d'ACO2 (**Figure 30**) légèrement moins prononcées que dans les cellules *siFXN/PIP5K1B*. Ainsi, l'extinction de *FXN* contribue à une dérégulation de l'homéostasie du fer.

De façon surprenante, l'extinction seule de *PIP5K1B* provoque une baisse significative de la ferritine et de SOD2 sans affecter les niveaux d'expression d'IRP2 et de SOD1 (**Figure 30**), reflétant une absence de stress oxydant, pouvant être liée à l'augmentation de frataxine dans ce contexte. Ces résultats suggèrent qu'une surexpression de frataxine consécutive à un défaut quantitatif en pip5k1 β n'affecte pas le contenu en fer.

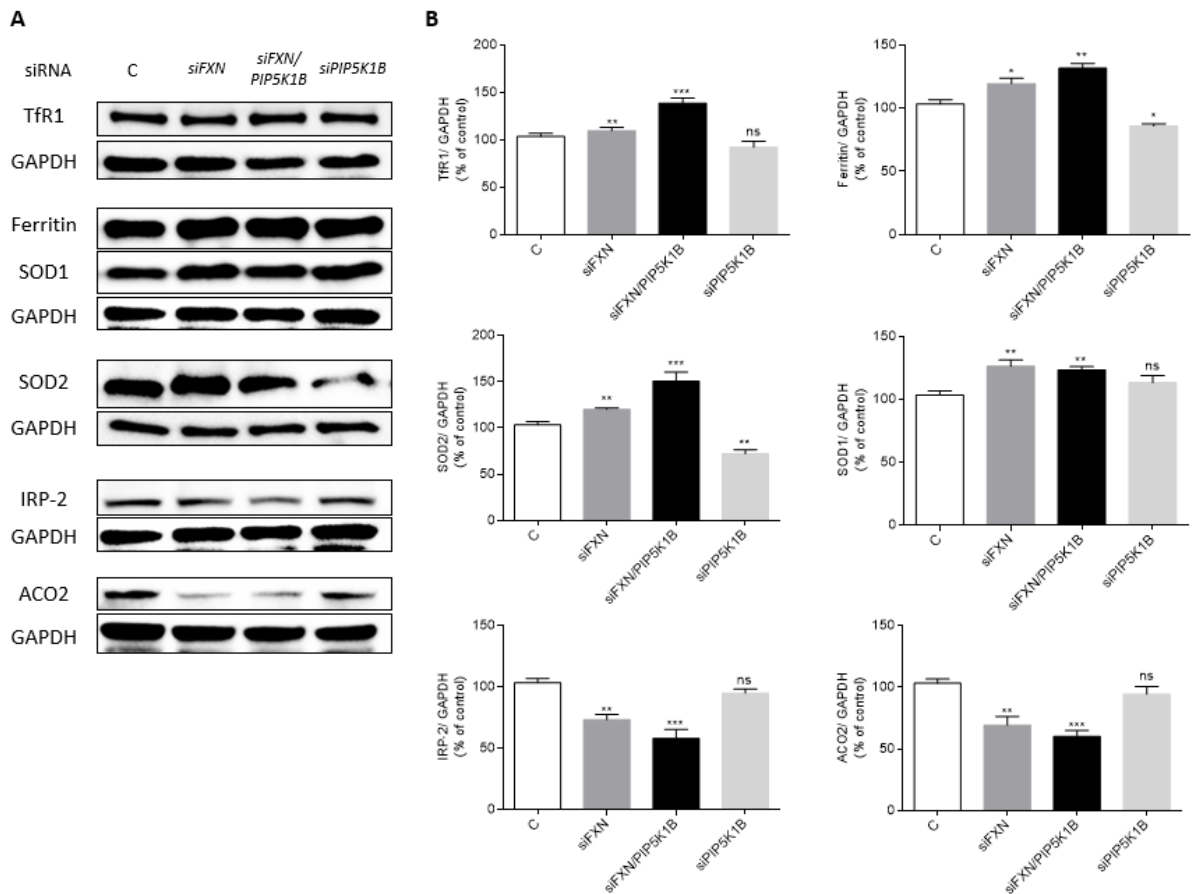


Figure 30 : Dérégulation de l'homéostasie du fer dans les modèles cellulaires HEK déficitaires en *FXN* et/ou *PIP5K1B*. **A.** Immunoblots de plusieurs protéines impliquées dans l'homéostasie du fer ou dans la défense contre les ROS dans des cellules HEK contrôle (C) ou transfectées par siRNA (*siFXN*, *siPIP5K1B* ou *siFXN/PIP5K1B*). Tfr1, SOD2, et IRP-2 sont étudiées en condition non réduite tandis que la ferritine, SOD1 et ACO2 sont analysées en condition dénaturante. **B.** Quantifications des immunoblots. Chaque protéine est normalisée par la GAPDH. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM. n = 3. Un test de Student sur des échantillons non appariés est réalisé pour comparer la valeur de chaque échantillon par rapport à la valeur contrôle. *, ** et *** correspondent à une p-value < 0,05, < 0.01 et < 0.001 respectivement, ns : non significatif.

c) Régulation de l'homéostasie du fer dans des modèles déficitaires en frataxine et/ou *pip5k1 β*

La régulation de l'homéostasie du fer cellulaire est étudiée en cultivant les cellules dans des conditions pauvres (- FAC) ou riches en fer (+ 100 μ M FAC). Nous avons dans un premier temps voulu savoir si une incubation en fer pouvait affecter l'efficacité des siRNA. La variation du niveau d'extinction de *FXN* et/ou *PIP5K1B* a été étudiée en quantifiant le taux de transcrits et de protéines frataxine et *pip5k1 β* respectivement dans chacune des lignées cellulaires. Les données de qRT-PCR (**Figure 31A-B**) et de western blot (**Figure 31C-E**) ont montré des niveaux d'extinction comparables en présence et en absence de fer. Par conséquent, la présence

de FAC n'affecte en aucun cas l'action des siRNA. En revanche, la quantité d'ARNm FXN augmente légèrement dans les cellules contrôles ainsi que dans les cellules *siPIP5K1B* (**Figure 31B**) cultivées en condition riche en fer (+FAC), sans que le niveau de protéine ne soit significativement affecté (**Figure 31C-D**). Or, la demi-vie de la forme mature de la frataxine est d'environ 50 h dans des cellules HEK⁶⁷. Il n'est donc pas surprenant de n'observer aucune variation d'expression de la frataxine après une incubation en fer de 48 h.

De plus, le niveau de transcrits *PIP5K1B* et de protéines pip5k1 β diminue significativement dans les cellules contrôles lors d'une supplémentation en fer (**Figure 31B-E**), suggérant que sa baisse pourrait être un mécanisme de limitation de l'entrée du fer.

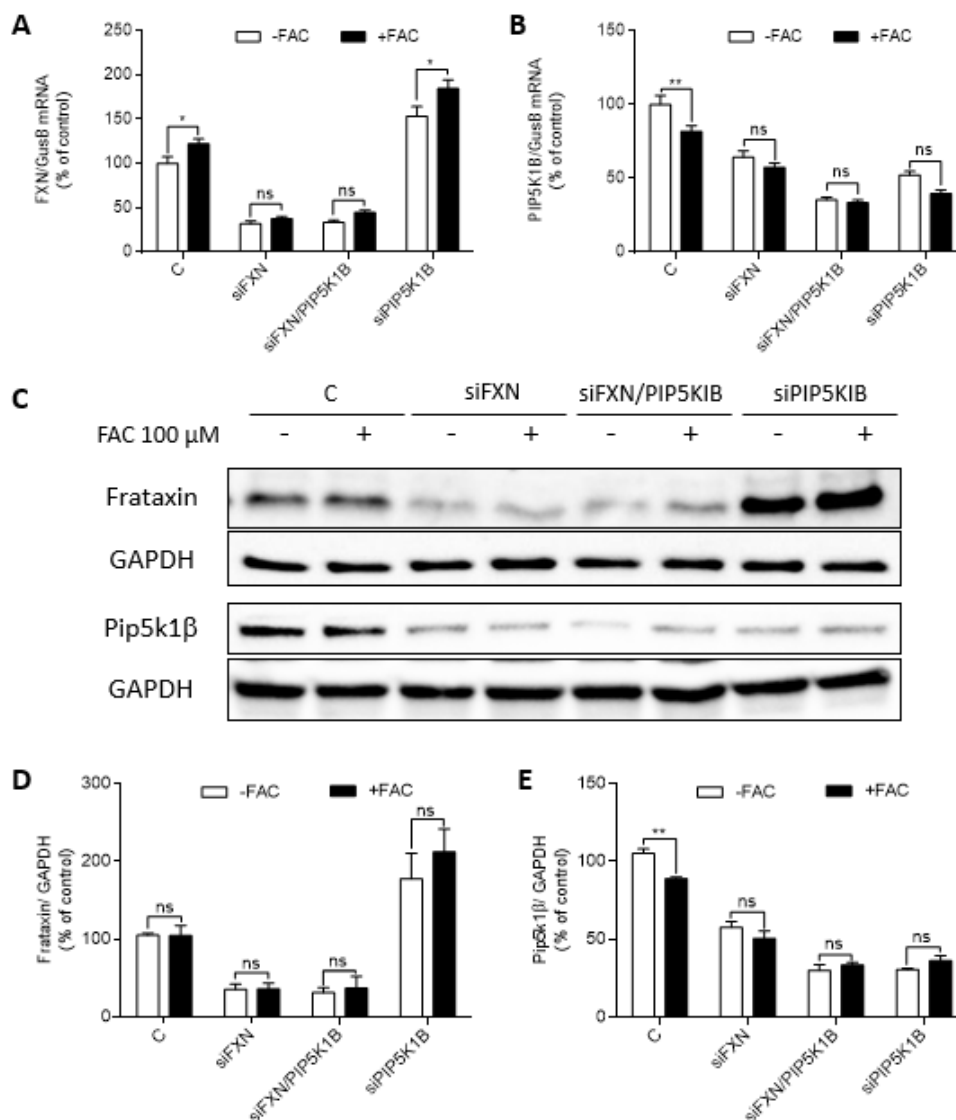


Figure 31 : Extinction transcriptionnelle (A, B) et protéique (C, D, E) dans les cellules HEK contrôle (C) ou transfectées (*siFXN*, *siPIP5K1B* et *siFXN/PIP5K1B*) cultivées en milieu pauvre (-FAC) ou riche (+FAC 100 μ M) en fer pendant 48 h. A-B. Quantification par ddPCR des ARNm *FXN* (A) et *PIP5K1B* (B) en présence ou non de fer. C. Immunoblots de la frataxine et de pip5k1 β dans les cellules en présence ou en l'absence de FAC.

D-E. Quantification des immunoblots de la frataxine (D) et de pip5k1 β (E) après normalisation par rapport à la GAPDH. Les données représentent la moyenne \pm SEM. n = 3. Des tests multiparamétriques de type ANOVA ont été utilisés pour comparer la valeur sans traitement en fer par rapport à la valeur issue d'un traitement en fer. ** et *** correspondent à des valeurs de p < 0,01 et < 0,001 respectivement.

Dans le but d'essayer de comprendre l'augmentation conjointe du TfR1 et de la ferritine dans un contexte de déficit en frataxine, la régulation de l'homéostasie du fer a été analysée par quantification des transcrits *TFRC* et *FTH* par qRT-PCR sur les cellules *siFXN*, *siPIP5K1B* et *siFXN/PIP5K1B* en présence ou non de FAC. Les taux d'ARNm TfR1 et ferritine sont diminués ou augmentés respectivement en condition riche en fer pour l'ensemble des conditions testées (**Figure 32A-B**), suggérant une régulation post-transcriptionnelle correcte de ces deux transcrits.

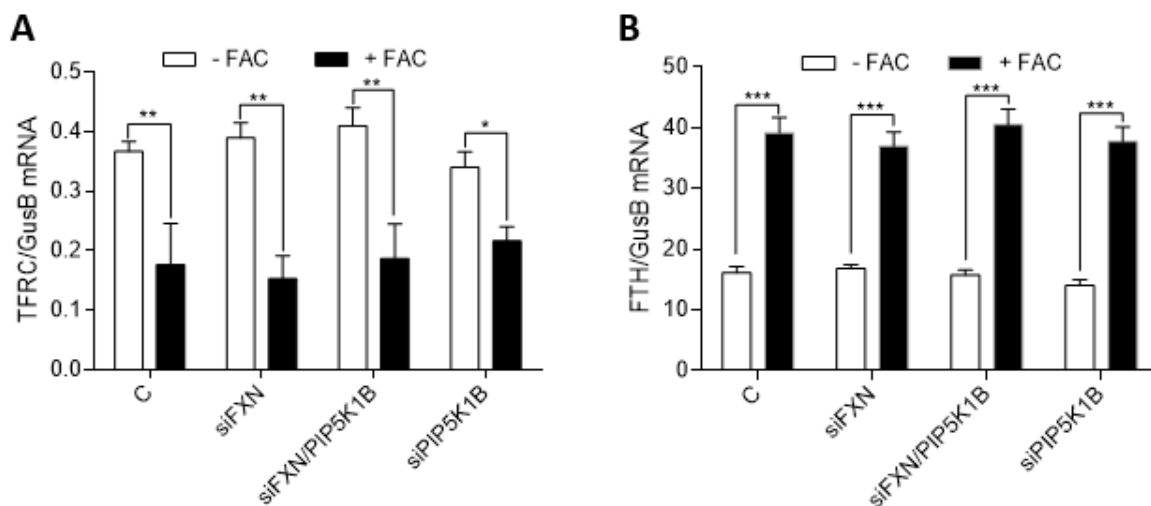


Figure 32 : Régulation post-transcriptionnelle du TfR1 et de la ferritine dans les cellules HEK contrôle (C) ou transfectées (*siFXN*, *siPIP5K1B* et *siFXN/PIP5K1B*). Quantification par ddPCR des ARNm TfR1 (*TFRC*) (A) et ferritine (*FTH*) (B) en milieu pauvre (-FAC) ou riche (+FAC 100 μ M) en fer pendant 48 h. Les taux de transcrits sont normalisés par le taux d'ARNm GusB. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm SEM. n = 3. Des tests multiparamétriques de type ANOVA ont été utilisés pour comparer la valeur sans traitement FAC par rapport à la valeur issue d'un traitement en FAC. *, ** et *** correspondent à des valeurs de p < 0,05, < 0,01 et < 0,001 respectivement. Aucune différence significative n'est observée entre les cellules transfectées et non transfectées par siRNA pour une même condition (-FAC ou +FAC).

La quantité de protéines de l'homéostasie du fer a ensuite été évaluée par western blot dans des cellules contrôles ou déficientes en *FXN* et/ou *PIP5K1B* et cultivées en milieu pauvre ou riche en fer. Les analyses par western blot montrent que les cellules contrôles ont une modulation de l'expression de TfR1 et de ferritine différente de celles observées dans les fibroblastes (article 1, Figure 2E) avec un TfR1 peu diminué et une ferritine très augmentée dans les cellules HEK

contrôles cultivées en présence de fer (**Figure 33A-B**). Le niveau de régulation semble donc être différent entre ces deux types cellulaires.

Dans les cellules *siFXN* et *siFXN/PIP5K1B*, le TfR1 n'est pas diminué en condition riche en fer mais augmente paradoxalement tandis que le niveau de ferritine est deux fois plus important que dans les cellules contrôles (**Figure 33A-B**), suggérant la présence d'une entrée massive du fer comme précédemment décrit dans les fibroblastes de patients AF. De plus, les SOD (SOD1 et SOD2) sont en quantités supérieures dans les deux conditions de culture des cellules transfectées par rapport aux cellules contrôles (**Figure 33A-B**), évoquant la présence de stress oxydant cytosolique et mitochondrial. Par conséquent, un déficit en frataxine et en pip5k1 β provoque une dérégulation de l'homéostasie du fer se traduisant pas un défaut de régulation du TfR1, comme préalablement observée dans les fibroblastes AF.

A l'inverse, les cellules *siPIP5K1B* présentent une régulation correcte du TfR1, de la ferritine et des SOD en présence de fer (**Figure 33A-B**). Ces résultats démontrent ainsi qu'un défaut quantitatif en pip5k1 β associé à une surexpression de frataxine n'a aucun impact sur la régulation de l'homéostasie du fer.

Etant donné qu'un déficit de *PIP5K1B* est présent dans l'ensemble des modèles cellulaires avec extinction par siRNA, il est probable que les variations de l'homéostasie du fer observées résultent seulement du niveau d'expression de la frataxine. Cependant, seul un modèle dans lequel *FXN* est éteint indépendamment de *PIP5K1B* pourrait nous permettre de valider ces résultats et de conclure sur l'importance d'un défaut en frataxine dans l'homéostasie du fer.

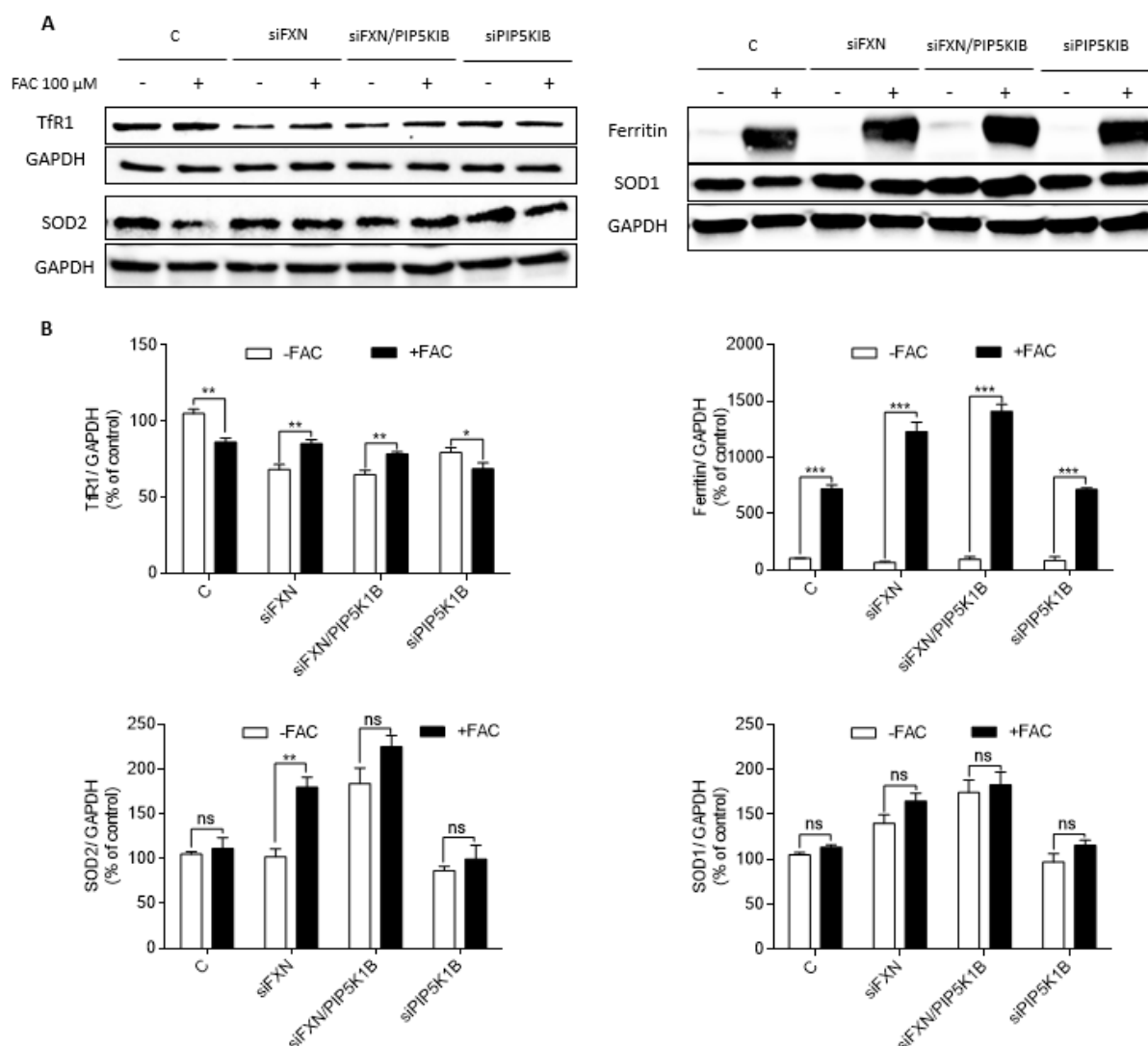


Figure 33 : Régulation de l'homéostasie du fer dans les modèles déficients en *FXN* et/ou *PIP5K1B*. **A.** Immunoblots TfR1 et SOD2 sont étudiés en condition non réduite tandis que les autres protéines sont étudiées en condition dénaturante sur des cellules incubées en milieu pauvre (-) ou riche (+) en fer (FAC 100 μ M). **B.** Quantification des immunoblots. Chaque protéine est normalisée par la GAPDH. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm SEM. $n = 3$. Des tests multiparamétriques de type ANOVA ont été utilisés pour comparer les conditions avec et sans fer. *, ** et *** correspondent respectivement à une p-value $< 0,05$, $< 0,01$ et $< 0,001$. ns : non significatif.

Il est important de préciser qu'au cours de ce projet le taux de transfection par siRNA n'a pas été strictement identique d'une expérience à une autre, conduisant à des extinctions variables selon les expériences. Les efficacités d'extinction de la frataxine et de pip5k1 β ont été quantifiées systématiquement avant la réalisation d'autres analyses. L'ensemble des résultats développés jusqu'ici ne prend en compte que des transfactions ayant abouti à un taux d'extinction de *FXN* d'environ 65% de transcrits et de protéines pour une simple (*siFXN*) ou double extinction (*siFXN/PIP5K1B*) avec une variabilité de 5%. Pour l'extinction de *PIP5K1B*,

seuls les modèles avec un déficit d'environ de $60\% \pm 5\%$ d'ARNm et de protéine pour une simple extinction (*siPIP5K1B*) ont été étudiés contre quasiment $65\% \pm 5\%$ pour une extinction conjointe (*siFXN/PIP5K1B*).

La réalisation d'immunoblots en première intention pour valider les déficits en *FXN* et/ou *PIP5K1B* a permis de souligner l'importance du niveau d'extinction de chacun des acteurs dans l'établissement d'un phénotype dans l'homéostasie du fer. En effet, l'étude de quatre expériences indépendantes (notées de 1 à 4) de co-transfection par les deux siRNA en simultanément (*siFXN/PIP5K1B*) montrent que les taux de protéines sont réduits en quantités variables provoquant des régulations différentes du TfR1 en conditions pauvres ou riches en fer (**Figure 34**). Il apparaît ainsi que le TfR1 est augmenté lors d'une supplémentation en FAC au-delà de 40% d'extinction de frataxine. Cette dérégulation est d'autant plus importante que le taux résiduel de frataxine est bas et que celui de pip5k1β est élevé. Ainsi, un déficit en frataxine semble avoir un effet négatif dans l'homéostasie du fer en favorisant son assimilation.

De plus, une réduction majeure de pip5k1β avoisinant les 80% ne module pas le TfR1 dans la mesure où la frataxine est en quantité importante (70%) (**Figure 34**), insinuant qu'un déficit en pip5k1β n'aurait pas d'effet délétère sur la dérégulation du TfR1.

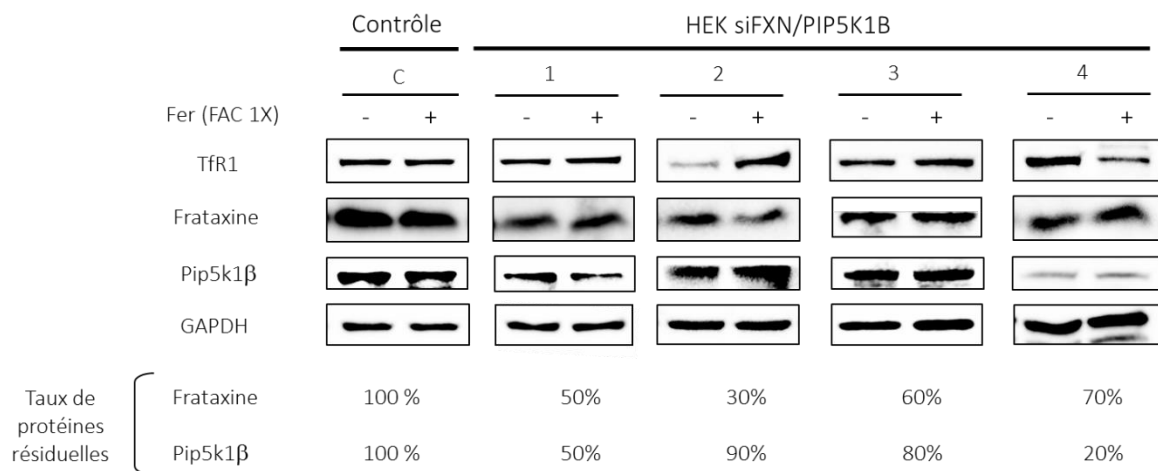


Figure 34 : Régulation du récepteur de la transferrine 1 (TfR1) dans des cellules HEK déficientes en *FXN* et/ou *PIP5K1B* cultivées dans un milieu pauvre (-FAC) ou riche (+FAC 100 μM) en fer. Les taux en protéines résiduelles ont été arrondis au dixième près dans quatre expériences d'extinction par siRNA (notées de 1 à 4). La quantité en protéines frataxine et pip5k1β est arbitrairement fixée à 100% dans des cellules contrôles (C).

d) Régulation de l'homéostasie du fer dans des modèles déficitaires en frataxine et/ou pip5k1 β de manière permanente

Pour pallier ce problème de variabilité d'extinction, des modèles stables déficitaires en *FXN* et/ou *PIP5K1B* ont été créés à l'aide de shRNA dans des cellules HeLa. Le changement de lignée cellulaire s'est basé sur leur paramètre morphologique. Les cellules HEK présentent un rapport noyau/cytoplasme (NC) très élevé (d'environ 0,5) comparativement à des cellules HeLa et des lignées primaires de fibroblastes (rapport NC de 0,3 et 0,1 respectivement), compliquant ainsi les études microscopiques. Afin de réaliser une étude comparable à celle effectuée précédemment sur les fibroblastes de patients, nous avons préféré établir de nouvelles lignées d'extinction sur des cellules HeLa afin de faciliter la quantification du taux de TfR1 membranaire ainsi que de ses fonctions d'endocytose et de recyclage. Les termes *shFXN*, *shPIP5K1B* et *shFXN/PIP5K1B* désigneront les cellules HeLa dans lesquelles *FXN* et/ou *PIP5K1B* ont été éteints par shRNA.

L'étude de l'homéostasie du fer a reposé sur l'analyse de trois clones différents pour chacune des conditions (*shFXN*, *shFXN/PIP5K1B*, *shPIP5K1B*) après une sélection monoclonale de trois semaines. Chaque clone d'une même condition a reçu un plasmide identique contenant un shRNA dirigé soit contre *FXN*, soit contre *PIP5K1B*. Les clones *shFXN* possèdent une extinction comprise entre 80-90% du transcrite *FXN* et d'environ 60 à 75% de la quantité de protéine frataxine (*shFXN 1-3*, **Figure 35A et C**). De manière semblable, l'expression de *shPIP5K1B* a permis de diminuer approximativement de 65-70% le taux d'ARNm *PIP5K1B* et de 55-60% le niveau d'expression de pip5k1 β (*shPIP5K1B 1-3*, **Figure 35B et D**).

Les cellules *shFXN/PIP5K1B* ont été transfectées par les deux plasmides à quelques jours d'intervalle ce qui a conduit à une baisse de l'expression des transcrits *FXN* et *PIP5K1B* ainsi que des protéines frataxine et pip5k1 β comparables à celles obtenues dans les clones mono-éteints. Similairement aux observations réalisées sur les modèles siRNA, une extinction en *FXN* (*shFXN 1-3*) provoque également une diminution de moitié de l'expression de pip5k1 β (**Figure 35D**) tandis qu'un déficit seul en *PIP5K1B* (*shPIP5K1B 1-3*) conduit à une hausse du taux de frataxine (**Figure 35C**).

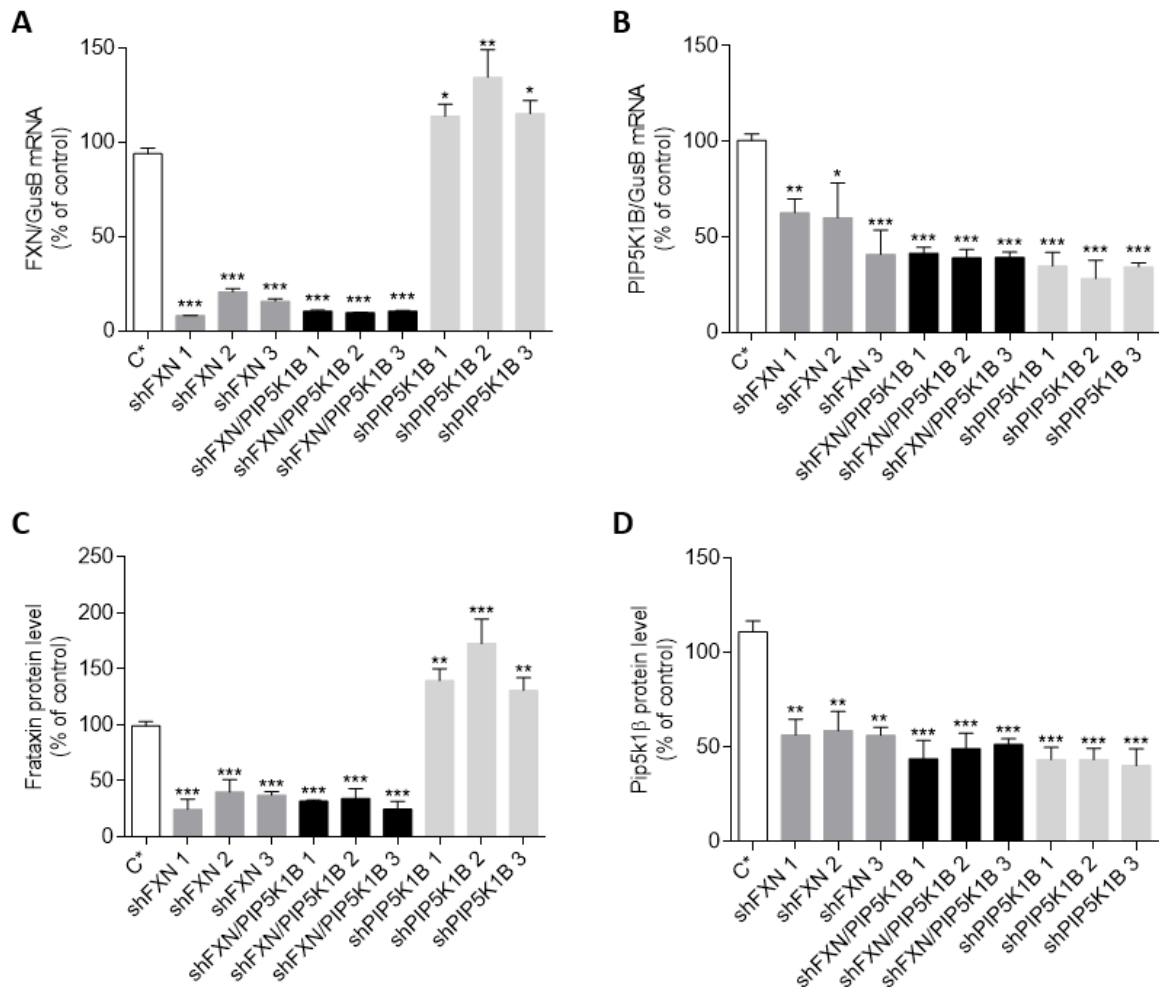


Figure 35 : Extinction de FXN et PIP5K1B dans chaque clone HeLa transfecté par shRNA (*shFXN*, *shPIP5K1B* ou *shFXN/PIP5K1B*) cultivé en condition standard (10% FBS). A-B. qRT-PCR des transcrits *FXN* (A) et *PIP5K1B* (B) dans des cellules contrôles (C* : moyenne de trois contrôles *shNT*) et les modèles shRNA. Les taux de transcrits sont normalisés par un contrôle interne, GusB. C-D. Quantification des immunoblots de la frataxine (C) et de pip5k1β (D) après normalisation par la GAPDH. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm SEM. n = 3. Un test de Student a été réalisé pour comparer la valeur de chaque échantillon par rapport à la valeur contrôle. *, ** et *** correspondent à une p-value < 0,05 ; < 0,01 et < 0,001, respectivement.

L'étude de l'homéostasie du fer dans les cellules *shFXN* et *shFXN/PIP5K1B* a mis en évidence une hausse du TfR1 et de la ferritine tandis que les cellules *shPIP5K1B* présentent une baisse de ces deux protéines (Figure 36A-B). Ces résultats sont analogues à ceux obtenus sur les cellules siRNA.

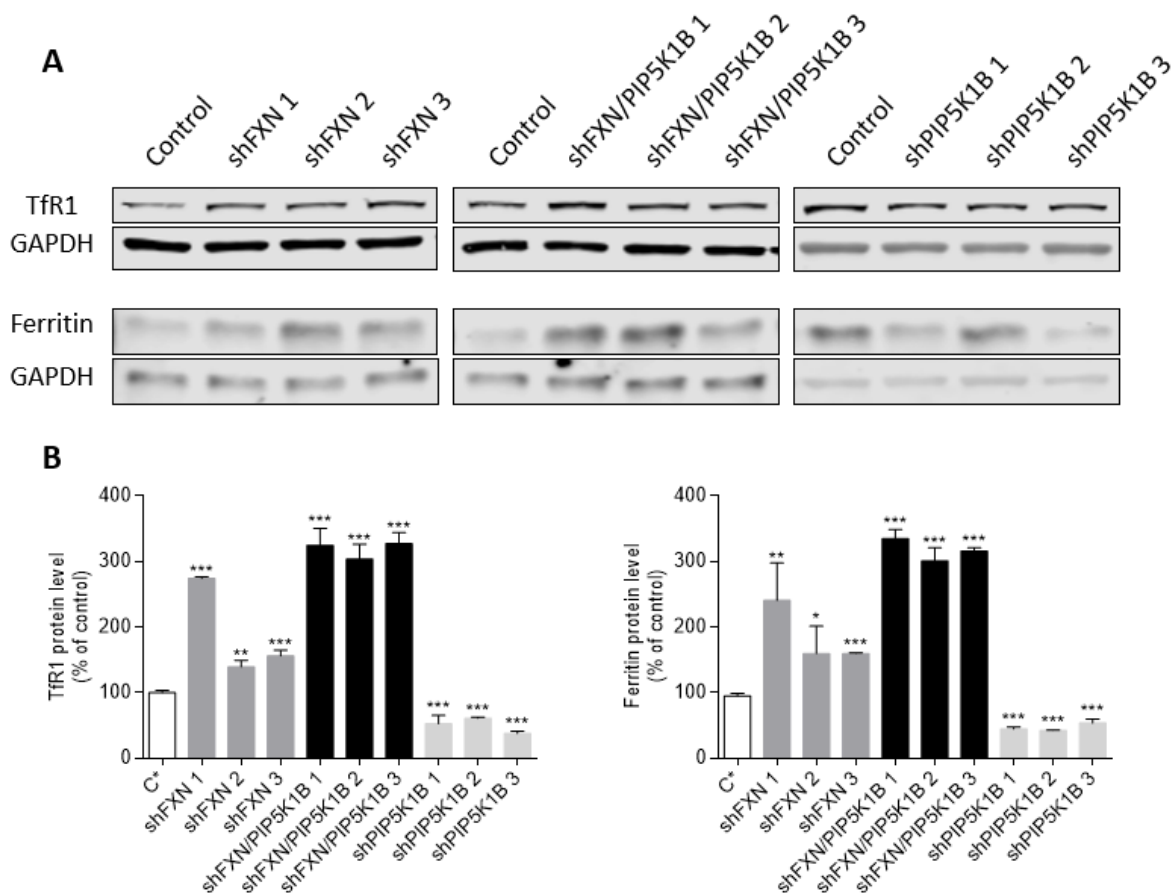


Figure 36 : Dérégulation de l'homéostasie du fer dans les clones *shFXN*, *shFXN/PIP5K1B* et *shPIP5K1B* cultivés en milieu standard. **A.** Immunoblots du TfR1 et de la ferritine dans des cellules contrôles et les différents modèles shRNA. **B.** Quantification des immunoblots. Le taux d'expression de chacune des protéines est normalisé par rapport à la GAPDH. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm SEM. n = 3. Un test de Student a été réalisé pour comparer la valeur de chaque échantillon par rapport à la valeur contrôle. *, ** et *** correspondent à une p-value < 0,05 ; < 0,01 et < 0,001, respectivement.

L'analyse de la quantité de TfR1 membranaire par AMNIS, un cytomètre en flux combiné à un microscope, est entièrement en concordance avec les données d'immunoblots. En effet, une élévation massive du taux de récepteurs de la transferrine localisés à la surface cellulaire est observée uniquement pour une extinction de *FXN* seule (*shFXN*) ou combinée (*shFXN/PIP5K1B*) (**Figure 37A**). En contrepartie, le TfR1 membranaire est abaissé dans les modèles *shPIP5K1B* (**Figure 37A**), probablement en raison du rôle de pip5k1 β dans l'endocytose de récepteur membranaire.

La capacité d'entrée du fer dans la cellule a été explorée en incubant les cellules en présence de FAC. Après 48 h de traitement, le contenu en fer augmente massivement dans les cellules *shFXN/PIP5K1B* et dans une moindre mesure dans les lignées *shFXN* (**Figure 37B**), démontrant que ces cellules n'arrivent pas à limiter l'entrée du fer. En revanche, deux clones

shPIP5K1B ont une diminution de la teneur totale en fer (**Figure 37B**). Par conséquent, l’extinction de *PIP5K1B* suite à un défaut en frataxine pourrait constituer un mécanisme de compensation qui permettrait de modérer la surcharge en fer.

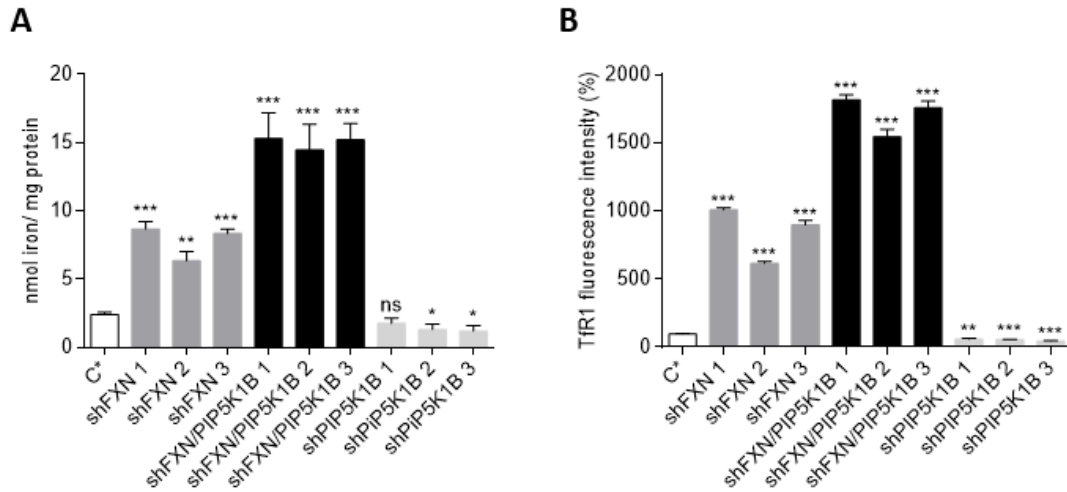


Figure 37 : Accumulation de fer et du TfR1 membranaire dans les modèles déficients en frataxine. A. Détermination du contenu en fer cellulaire dans des cellules contrôles (C*) et les clones shRNA (*shFXN*, *shFXN/PIP5K1B* et *shPIP5K1B*) cultivés dans un milieu riche en fer (100 μ M FAC) pendant 48 h. **B.** Quantification du signal TfR1 lié à la membrane par AMNIS chez des témoins (C*) et les modèles cellulaires shRNA (*shFXN*, *shFXN/PIP5K1B* et *shPIP5K1B*) cultivés dans un milieu standard. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm SEM. n = 3. Un test de Student a été réalisé pour comparer la valeur de chaque échantillon par rapport à la valeur contrôlée. *, ** et *** correspondent à une p-value < 0,05 ; < 0,01 et < 0,001, respectivement. Ns = non significatif.

e) Discussion

Afin de déterminer les rôles respectifs de *FXN* et *PIP5K1B* dans l’homéostasie du fer, des modèles cellulaires déficitaires en frataxine et/ou pip5k1 β ont été développés grâce à l’utilisation de petits ARN non codants (siRNA et shRNA). Ces lignées présentent une diminution des quantités résiduelles des transcrits ainsi que des protéines frataxine et pip5k1 β démontrant une extinction partielle de ces acteurs. Cependant, la quantité de pip5k1 β diminue presque de moitié quand *FXN* est éteint, comme dans les fibroblastes AF où l’expansion de triplets GAA dans *FXN* induit une extinction en *cis* de *PIP5K1B*⁶¹. Cette répression transcriptionnelle est néanmoins moins prononcée que celle de *FXN* dans les lignées cellulaires siRNA et shRNA ainsi que dans les fibroblastes de patients AF.

La diminution de l’expression de *PIP5K1B* est positivement corrélée à la taille de l’expansion de triplets GAA dans *FXN* à l’exception des fibroblastes du patient (P2) où la baisse de frataxine

est plus faible que ce que l'on pouvait attendre compte tenu de la taille de l'expansion. Ainsi un cinquième des patients possède une suppression de frataxine moins prononcée que prévue, conformément aux observations décrites par Bayot *et al.*²³⁷.

Dans un contexte d'expansion de GAA, une réorganisation de la chromatine peut expliquer une expression réduite du gène adjacent, *PIP5K1B*. Cependant, dans un environnement d'extinction transitoire ou permanente de *FXN* par siRNA ou shRNA, il est difficile d'imaginer que ce mécanisme peut occasionner une déplétion partielle en pip5k1β. De façon surprenante, l'extinction de *PIP5K1B* induit une augmentation de la frataxine, démontrant que la transcription de ces deux gènes semble étroitement liée. Leurs régions promotrices respectives partagent cinq facteurs de transcription ainsi que trois facteurs ciblant leurs régions enhancer (source : Ensembl). Il paraît largement imaginable que de tels éléments ou des facteurs épigénétiques comme des ARN non codants puissent jouer un rôle dans la coïncidence de l'expression de *FXN* et *PIP5K1B*.

De plus, les souris KIKI et KIKO présentant une expansion GAA dans *FXN*, localisée approximativement à 14 kb de *PIP5K1B*, n'ont aucun phénotype¹⁷⁷. En revanche, l'insertion du locus *FXN* humain comprenant certains gènes avoisinants dont une partie de la séquence de *PIP5K1B*, conduit à des manifestations cardiaques et neurologiques typiques de l'AF⁵⁰. Ces faits démontrent qu'un déficit en frataxine n'est pas le seul acteur orchestrant l'établissement de mécanismes physiopathologiques dans l'AF. De plus, les éléments modulateurs de l'expression de *PIP5K1B* semblent spécifiques du génome humain. L'intrication de la transcription de *FXN* et *PIP5K1B* va ainsi considérablement compliquer notre étude sur l'impact respectif de chacun des deux acteurs dans l'homéostasie du fer.

Les cellules déficitaires en frataxine présentent une surcharge en fer en raison de leur incapacité à limiter l'entrée du fer par la voie TBI et NTBI. La dérégulation du TfR1 est d'autant plus importante que le taux de frataxine résiduel est bas et que celui de pip5k1β est élevé. En revanche, un défaut en *PIP5K1B* associé à une augmentation de la frataxine réduit le contenu en fer cellulaire grâce à une baisse de la quantité de TfR1 membranaire. Une surexpression *in vitro* de *FXN* dans des cellules HeLa conduit à une hausse du fer labile ainsi qu'une sensibilité accrue au stress oxydatif²³⁸. Ainsi l'augmentation de l'expression de la frataxine n'aurait aucun impact dans ce phénotype de limitation du contenu en fer, qui semble être gouverné seulement par l'extinction de *PIP5K1B*. Un déficit en pip5k1β conduit à une baisse de PI(4,5)P₂⁶¹ provoquant une inhibition importante de l'endocytose de la transferrine²³⁹ limitant l'entrée de

fer dans la cellule. Par conséquent la répression de *PIP5K1B* permettrait de compenser les effets d'une réduction d'expression en *FXN*. Les patients présentant deux répétitions de triplets à l'état hétérozygote composite ont des phénotypes moins sévères que les patients porteurs d'une mutation ponctuelle *FXN* sur un allèle et d'une expansion GAA sur l'autre. L'effet de l'extinction en *cis* étant régi par les répétitions GAA, la gravité des cas présentant au moins une mutation ponctuelle est sûrement induite par une extinction moins importante de *PIP5K1B*, permettant de pallier les effets délétères d'un déficit en frataxine.

Les cellules *siFXN/PIP5K1B* présentent un déficit légèrement plus important en pip5k1 β que les lignées *siPIP5K1B*. Un défaut plus sévère de synthèse de PI(4,5)P₂ devrait donc conduire à une faible absorption de fer. Or, la dérégulation de l'homéostasie du fer s'est révélée davantage prononcée dans les cellules *siFXN/PIP5K1B* que *siFXN*. Le PI(4,5)P₂ est un phospholipide produit par trois isoenzymes (pip5k1 α , pip5k1 β et pip5k1 γ). Les pip5k1 peuvent fonctionner de manière coordonnée et redondante en s'associant afin de compenser un déficit de l'une d'entre-elles²⁴⁰. Malgré leur spécificité tissulaire, elles sont toutes exprimées dans le cerveau probablement en raison du rôle prépondérant des phosphatidylinositols (PI) dans le remodelage synaptique²⁴¹. Une déplétion en *PIP5K1B* prononcée pourrait ainsi induire l'expression des autres isoenzymes pip5k1 afin d'assurer la survie cellulaire. Dans ce contexte, la compensation du défaut en pip5k1 β via pip5k1 α et/ou pip5k1 γ pourrait bien se mêler aux conséquences d'une carence en frataxine. Cette hypothèse permettrait ainsi d'expliquer la sévérité et la précocité des symptômes chez les patients présentant un grand nombre de répétitions GAA.

Toutefois, il serait prématuré de spéculer sur le rôle potentiel d'un défaut en *PIP5K1B* dans l'AF. Même si pip5k1 β est fortement exprimé dans le cœur, le cerveau et les os²⁴², sa déplétion n'a pas encore été démontrée dans les tissus affectés. Nous avons toutes les raisons de croire que, l'impact de la déplétion en frataxine est déterminant dans la maladie. Cette étude devra donc se compléter par la création de lignées cellulaires CRISPR/Cas9 présentant un déficit indépendant en *FXN* ou *PIP5K1B*. Si le déficit en *PIP5K1B* s'avère être un facteur essentiel, il pourrait fournir des cibles supplémentaires dans l'espoir de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Partie III : Étude de l'homéostasie du fer dans d'autres déficits de la biogenèse des centres Fe-S

Contexte :

La frataxine joue un rôle primordial dans la biogenèse des centres Fe-S au sein de la mitochondrie. Comme la plupart des autres protéines des étapes précoces des ISC, son déficit conduit à une dérégulation de l'homéostasie du fer cellulaire. Néanmoins, ce dysfonctionnement est loin d'être une caractéristique clinique propre aux patients présentant des défauts d'assemblage des ISC.

Cette étude a ainsi essayé d'appréhender l'impact sur l'homéostasie du fer de différents déficits en protéines impliquées dans les diverses étapes de la synthèse des ISC. Dans ce contexte, des fibroblastes de patients présentant des mutations dans les gènes codants pour des protéines d'assemblage des centres [2Fe-2S] (FDXR), des centres [4Fe-4S] (IBA57) ou de leurs insertions à des apoprotéines réceptrices (NFU1 et NUBPL) ont été utilisés pour étudier leur contenu en fer et la régulation de plusieurs protéines majeures de l'homéostasie du fer.

a. Découverte et étude de mutations FDXR sur l'homéostasie du fer cellulaire (article 2)

REPORT

FDXR Mutations Cause Sensorial Neuropathies and Expand the Spectrum of Mitochondrial Fe-S-Synthesis Diseases

Antoine Paul,¹ Anthony Drecourt,¹ Floriane Petit,¹ Delphine Dupin Deguine,² Christelle Vasnier,³ Myriam Oufadem,¹ Cécile Masson,¹ Crystel Bonnet,⁴ Saber Masmoudi,⁵ Isabelle Mosnier,⁶ Laurence Mahieu,⁷ Didier Bouccara,⁶ Josseline Kaplan,¹ Georges Challe,⁸ Christelle Domange,⁹ Fanny Mochel,¹⁰ Olivier Sterkers,⁶ Sylvie Gerber,¹ Patrick Nitschke,¹ Christine Bole-Feysot,¹ Laurence Jonard,¹¹ Souad Gherbi,¹² Oriane Mercati,¹² Ines Ben Aissa,¹² Stanislas Lyonnet,^{1,13} Agnès Rötig,¹ Agnès Delahodde,^{3,14} and Sandrine Marlin^{1,12,13,14,*}

Hearing loss and visual impairment in childhood have mostly genetic origins, some of them being related to sensorial neuronal defects. Here, we report on eight subjects from four independent families affected by auditory neuropathy and optic atrophy. Whole-exome sequencing revealed biallelic mutations in *FDXR* in affected subjects of each family. *FDXR* encodes the mitochondrial ferredoxin reductase, the sole human ferredoxin reductase implicated in the biosynthesis of iron-sulfur clusters (ISCs) and in heme formation. ISC proteins are involved in enzymatic catalysis, gene expression, and DNA replication and repair. We observed deregulated iron homeostasis in *FDXR* mutant fibroblasts and indirect evidence of mitochondrial iron overload. Functional complementation in a yeast strain in which *ARH1*, the human *FDXR* ortholog, was deleted established the pathogenicity of these mutations. These data highlight the wide clinical heterogeneity of mitochondrial disorders related to ISC synthesis.

Hearing loss and visual defects have mostly genetic origins. Several syndromes, including Usher (OMIM: 276903) and Wolfram syndromes (OMIM: 606201), are associated with hearing and visual impairments. Sensorial neuropathies are less frequent than cochlear and retinal defects. Auditory neuropathies (ANs) represent about 8% of congenital deafness,^{1,2} and the prevalence of optic atrophy (OA) is 1/40,000.³ The association between ANs and OA can be part of a multiorgan syndrome, usually implicating other neurologic systems. Examples include Friedreich ataxia (OMIM: 606829), Charcot-Marie-Tooth disease (OMIM: 159440), Brown-Vialetto-Van-Laere syndrome (OMIM: 614707), and Mohr-Tranebjaerg syndrome (OMIM: 304700). The AN-OA association is due to specific rare *OPA1* (OMIM: 605290) and *TMEM126A* (OMIM: 612988) mutations.^{4,5} Interestingly, several of the implicated genes encode mitochondrial proteins.

Here, we report on eight subjects, two boys and six girls, from four different families (F1–F4) affected by AN and OA. The first clinical signs were observed during childhood or adolescence. The four families are from different origins (F1—Tunisia; F2—Algeria; F3—France; and F4—Azerbaijan and Russia). All parents were healthy, and there were no cases of sensorial defect in any relatives. Recurrence of

the AN-OA was observed in two families, F1 and F4, with 2/5 and 2/4 of the children being affected, respectively (Figure 1, Table 1, and Supplemental Note). Consanguinity was noted only in family 1. All subjects were born at term, after normal pregnancy and delivery, with normal parameters. They all had normal psychomotor development except that subject 7 had a slight language delay; she spoke her first words at 2 years of age (Table 1 and Supplemental Note). For all subjects the diagnosis of AN was made on the basis of severe impaired auditory brainstem responses (ABRs), discrepancies between tonal and vocal audiometry, and the presence of otoacoustic emissions on both ears (Figure S1A). All subjects underwent ophthalmological fundus, electroretinogram (ERG), visual evoked potential (VEP) tests, and optic coherence tomography (OCT) and showed a bilateral defect of the optic nerves (Figure S1B). Magnetic resonance imaging (MRI) of cerebral and temporal bones did not reveal any abnormalities in supra-tentorial regions, posterior fossa, or inner ears (data not shown) in any index cases. Subjects 1–5 and 7–8 had isolated sensorial neurologic defects. Bilateral retinitis pigmentosa was diagnosed in subject 6 at 2 years of age because of low vision and nystagmus. ERG waves were indiscernible, and the fundus was altered. At the age of 20, his neurologic

¹UMR 1163, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut IMAGINE, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France; ²Service de Génétique Médicale, Hôpital Purpan, 40031 Toulouse, France; ³Institute for Integrative Biology of the Cell, Commissariat à l’Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette Cedex, France; ⁴UMRS 1120, Institut de la Vision, 75012 Paris, France; ⁵Laboratory of Molecular and Cellular Screening Processes, Center of Biotechnology of Sfax, 1177 Sfax, Tunisia; ⁶Service d’Oto-Rhino-Laryngologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75013 Paris, France; ⁷Service d’Ophtalmologie, Hôpital Rangueil, 40031 Toulouse, France; ⁸Service d’Ophtalmologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75013 Paris, France; ⁹Service d’Oto-Rhino-Laryngologie, Hôpital Lariboisière, 75475 Paris, France; ¹⁰Département de Génétique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75013 Paris, France; ¹¹Service de Génétique, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France; ¹²Centre de Référence des Surdités Génétiques, Service de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France; ¹³Service de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France

¹⁴These authors have equally contributed to this research

*Correspondence: sandrine.marlin@aphp.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.09.007>

© 2017 American Society of Human Genetics.

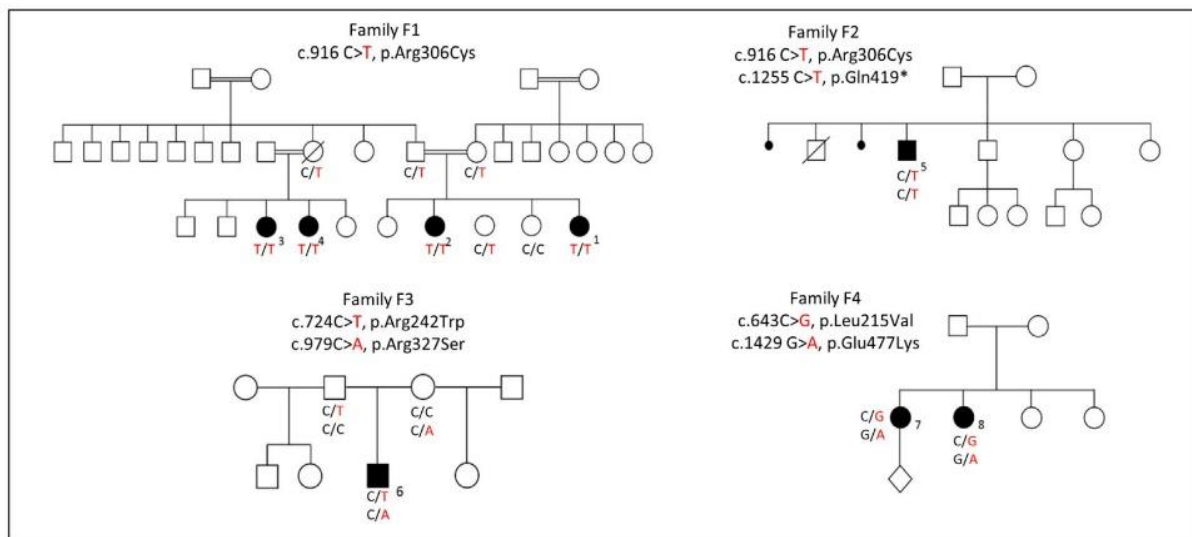


Figure 1. Pedigree of the Investigated Families
FDXR variants are reported according to GenBank: NM_024417.4.

examination showed only hypopallesthesia of the lower limbs. His cerebral MRI spectroscopy study and electromyogram were normal at this age.

None of the index cases (subjects 1 and 5–7) harbored mutations in *OPA1*, *TMEM126A*, or mitochondrial DNA. Molecular analysis of 35 different genes involved in severe congenital retinitis pigmentosa did not identify any causative variation. Because of a high degree of consanguinity in family 1 and the absence of disease in any parent, autosomal-recessive inheritance was hypothesized, and whole-exome-sequencing (WES) for subjects 1 and 3 was performed. Informed consent for diagnostic and research studies was obtained for all subjects in accordance with the Declaration of Helsinki protocols, and the local institutional review boards in Paris (Comité de Protection des Personnes, Ile de France II) approved the study.

DNA was extracted from leucocytes. Exome capture was performed with the Sure Select Human All Exon kit (Agilent Technologies). Agilent Sure Select Human All Exon (58 Mb, V6) libraries were prepared from 3 μ g of genomic DNA sheared with an Ultrasonicator (Covaris) as recommended by the manufacturer. Barcoded exome libraries were pooled and sequenced with a HiSeq2500 system (Illumina), generating paired-end reads. After demultiplexing, sequences were mapped on the human genome reference (NCBI build 37, hg19 version) with BWA. Variant calling was carried out with the Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, and Picard tools. Single-nucleotide variants were called with GATK Unified Genotyper, whereas indel calls were made with the GATK IndelGenotyper_v2. All variants with a read coverage $\leq 2\times$ and a Phred-scaled quality ≤ 20 were filtered out. All the variants were annotated and filtered with PolyWeb, an in-house-developed annotation software. For subject 1's library, a $86\times$ mean depth of coverage was obtained, and 86% of the targeted exonic bases were covered by at least 15 independent sequencing reads (86% at $15\times$). The mean depth of

coverage obtained for the exome library of subject 3 was $106\times$, and $>97\%$ of the targeted exonic bases were covered by at least 15 independent sequencing reads ($>97\%$ at $15\times$). Variant-filtering strategies and familial segregation led to the identification of only one homozygous variant shared by subjects 1 and 3 in *FDXR* (NM_024417.4): c.916C>T (p.Arg306Cys). This allele has been reported with a frequency of 8.85×10^{-6} , 1/112999 alleles (ExAc Browser Beta). We detected the *FDXR* c.916C>T homozygous variation in subjects 1–4 by Sanger sequencing (Figure S2). This variation co-segregated with the disease as expected for autosomal-recessive inheritance (Figure 1). We subsequently performed *FDXR* Sanger sequencing in subjects 5–8. Subject 5 was found to be compound heterozygous for the same c.916C>T *FDXR* variation and for c.1255C>T (p.Gln419*). Unfortunately, we did not have access to DNA of other members of this family. Subject 6 had two compound heterozygous missense variations: c.724C>T (p.Arg242Trp) and c.979C>A (p.Arg327Ser) (Figure 1 and Figure S2). Subjects 7 and 8 were found to be compound heterozygous for two other missense mutations, c.643C>G (p.Leu215Val) and c.1429G>A (p.Glu477Lys) (Figure 1 and Figure S2). DNA of other family members was not available. The pathogenicity clues for these *FDXR* variations are presented in Table 1. No *FDXR* mutation could be found in 12 independent subjects who demonstrated hearing loss due to a cochlear defect and optic atrophy, 12 subjects with isolated auditory neuropathy, 58 subjects with isolated optic atrophy, or four subjects with auditory neuropathy associated with peripheral neuropathy.

FDXR (OMIM 103270) encodes a mitochondrial NADPH: adrenodoxin oxidoreductase or ferredoxin reductase, the sole human ferredoxin reductase involved in the biosynthesis of iron-sulfur (Fe-S) clusters and heme formation.^{6–8} We built a structural-homology model of ferredoxin reductase on the basis of the crystal structure of

Table 1. Clinical Data of Affected Individuals and *FDXR* Genotypes

Families	F1				F2	F3	F4	
Familial origin	Tunisia				Algeria	France	Russia and Azerbaijan	
Individuals	1	2	3	4	5	6	7	8
Genders	F	F	F	F	M	M	G	G
Onset of hearing defect	13 yr	13 yr	15 yr	11 yr	teenage	20 yr	17y	5y
Hearing phenotype	BAN	BAN	BAN	BAN	BAN	BAN	BAN	BAN
Onset of visual defect	13 y	13y	36y	31y	31y	2 and 20y	Childhood	17y
Visual phenotype	BOA	BOA	infraclinal BOA	infraclinal BOA	infraclinal BOA	BRP and BOA	BOA	BOA
<i>FDXR</i> variations	c.916 C>T Ho	c.916 C>T Ho	c.916 C>T Ho	c.916 C>T Ho	c.916 C>T c.1255 C>T	c.724C>T, c.979C>A	c.643C>G, c.1429 G>A	c.643C>G, c.1429 G>A
Protein change	p.Arg306Cys	p.Arg306Cys	p.Arg306Cys	p.Arg306Cys	p.Arg306Cys, p.Gln419*	p.Arg242Trp, p.Arg327Ser	p.Leu215Val, p.Glu477Lys	p.Leu215Val, p.Glu477Lys
ExAC browser allele frequency	8.85×10^{-6}	8.85×10^{-6}	8.85×10^{-6}	8.85×10^{-6}	8.85×10^{-6} 0	0	0	0
Score prediction, SIFT	0.585	0.585	0.585	0.585	0.04 NA	0 0.3	0 0.03	0 0.03
Score prediction, Mutation Taster	1	1	1	1	1 NA	1 1	1 1	1 1

F1–4: families 1–4. M: male. F: female. BAN: bilateral auditory neuropathy. BOA: bilateral optic atrophy. BRP: bilateral retinitis pigmentosa. Ho: homozygous. NA: not available.

Bos taurus ferredoxin reductase (Figure 2A). This in silico modeling showed that the amino acids modified by the mutations are scattered in various parts of the protein but are not located in FAD or Fe-S binding sites. Three amino acid changes are predicted to create new H bonds: p.Leu215Val with Ala211 and Leu212, p.Arg242Trp with Leu279, and p.Arg327Ser with Gln313 (Figures 2B, 2C, and 2E). On the contrary, p.Arg306Cys is predicted to abolish the H bond with Glu349 (Figure 2D). These modifications are thus expected to destabilize ferredoxin reductase. Indeed, immunoblot analyses showed a major decrease of ferredoxin reductase in fibroblasts of subjects 1 and 5 (Figure 3A). To assess the consequences of *FDXR* mutations on ISC synthesis, we measured in-gel activity of mitochondrial and cytosolic aconitase, both containing ISC, that were found to be decreased (Figure 3B). Moreover, the amounts of heme oxygenase (HO-1) (Figure 3B) and SDHB, an iron-sulfur cluster (ISC)-containing subunit of respiratory chain complex II (Figure 3D), were severely decreased in subjects' fibroblasts. Finally, we also observed decreased activities of complexes I and III in these cells (Table 2). No fibroblasts were available for other affected subjects.

Several mitochondrial proteins are involved in ISC assembly; these include frataxin, encoded by *FXN* (MIM: 606829), the mutations of which result in Friedreich ataxia.¹¹ In yeast, Arh1 and Yfh1, the orthologs of human ferredoxin reductase and frataxin (*FXN*), respectively, are two factors involved in the first step of ISC assembly. Considering that (1) human *FXN* mutations induce

mitochondrial iron accumulation and decreased activity of ISC enzymes,^{8,12} (2) yeast Yfh1 defects result in mitochondrial iron overload,¹³ and (3) yeast Arh1 defects induce a cellular iron uptake and disturbed iron trafficking within the cell,¹⁴ we examined iron homeostasis in fibroblasts of subjects with *FDXR* mutations. Iron enters cells either via internalization of transferrin (Tf)-bound iron by transferrin receptor 1 (TfR1)-mediated endocytosis or by non-Tf-bound iron (NTBI) uptake.^{15,16} An increase of the TfR1 steady-state level was observed in the fibroblasts of subjects 1 and 5 compared to control (187% and 184% of the control amount, respectively), and highly elevated amounts of mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2) were also observed (Figure 3A and Figure S3). In keeping with this, increased mitochondrial superoxide production in S1 and S5 fibroblasts was detected by flow cytometry with MitoSOX (Figure 3C). These results suggest that mutations in the gene encoding ferredoxin reductase induce abnormal iron uptake by TfR1 and that they result in a major oxidative stress in mitochondria. Homeostasis of cellular iron is regulated by a post-transcriptional mechanism that involves iron-regulatory proteins (IRPs) and that modulates TfR1 levels, so that iron uptake does not take place in high-iron conditions. When grown for 3 days in low-iron conditions (fetal beef serum [FBS]-free DMEM, i.e., devoid of Tf-bound iron), a major increase in the ferritin steady-state level was observed in cultured fibroblasts of subject 1 and to a lesser extent those of subject 5 (Figure 3D and Figure S3), reflecting iron overload. Ferric ammonium citrate (FAC) is a soluble form of iron known to

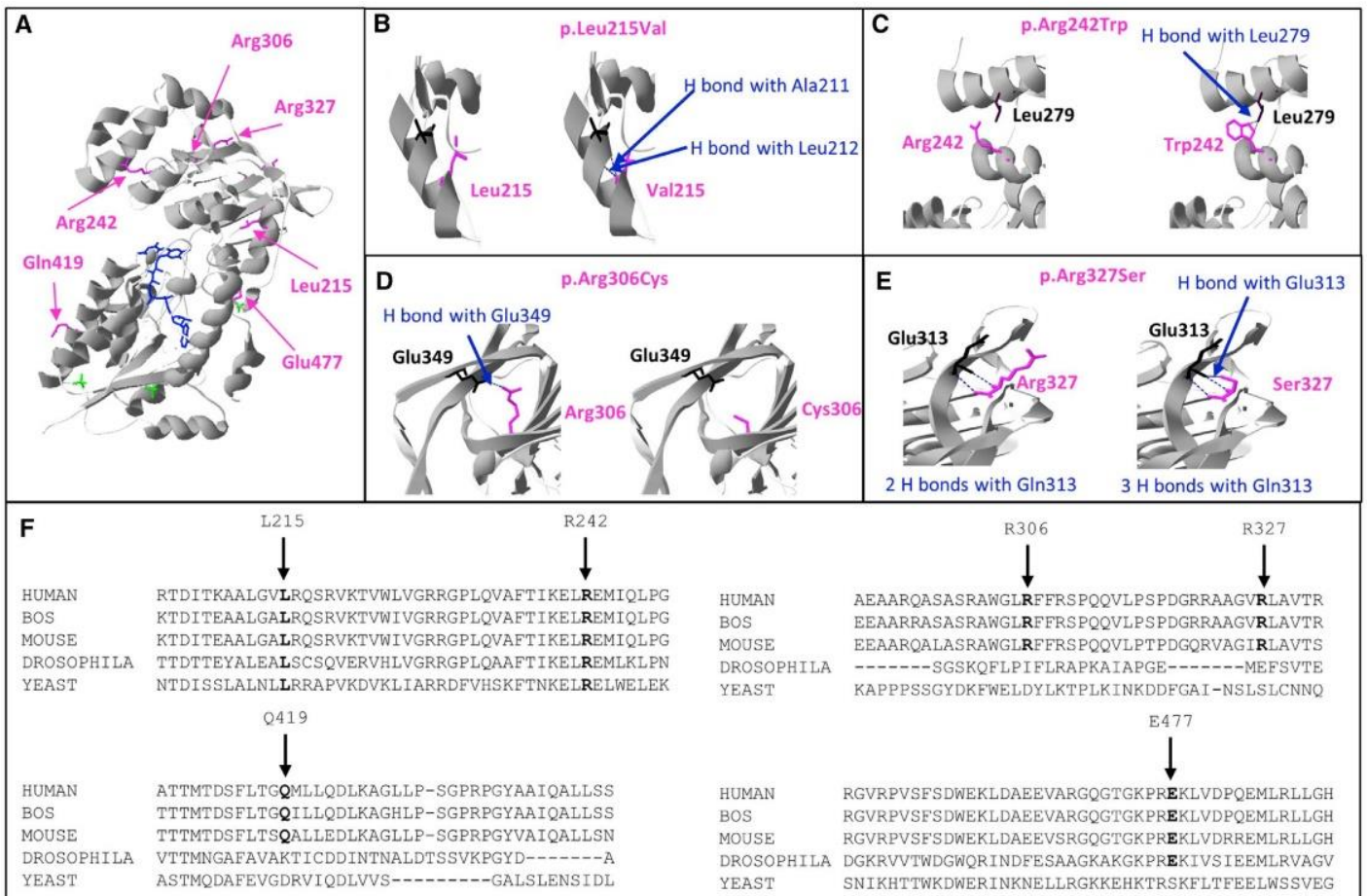


Figure 2. Ferredoxin Reductase Mutations

(A) Three-dimensional representation of the crystal structure of beef ferredoxin reductase (PDB: 1CJC). Blue and green sticks illustrate flavin adenine dinucleotide and sulfate ion, respectively. The mutated residues are highlighted in pink. (B–E) H-bond modification resulting from p.Leu215Val, p.Arg242Trp, p.Arg306Cys, and p.Arg327Ser changes. (F) Sequence alignment of ferredoxin proteins from various species. The arrows indicate the amino acid changes.

enhance NTBI uptake in fibroblasts¹⁷ by a poorly understood mechanism that might involve the endocytic pathway.¹⁶ After 3 days of incubation with FAC, control cells increased amounts of ferritin as expected, but S1 and S5 fibroblasts displayed a much higher ferritin steady-state level, showing that both fibroblast cultures abnormally increased their iron content (Figure 3D and Figure S3). As expected, in high-iron conditions, amounts of ACO1 (also called IRP1) decreased in control and subjects' fibroblasts, and amounts of TfR1 decreased in control cells. Cultured fibroblasts of subject 5 also had decreased amounts of TfR1 in high-iron conditions, but not only did TfR1 amounts fail to decrease in S1 fibroblasts, they actually increased, allowing abnormal iron uptake. We therefore quantified iron content in fibroblasts. When grown in low-iron conditions (no FAC and no FBS), control and affected individual fibroblasts showed a similar amount of iron. After a 3 day incubation with FAC, *FDXR* mutant fibroblasts exhibited a major increase in cellular iron content (a 50- and 100-fold change for S5 and S1, respectively), whereas control fibroblasts displayed a 2- to 3-fold upregulation (Figure 3E and Figure S3). Accordingly, SOD1 and SOD2 increased in high-iron conditions, reflecting the oxidative stress induced by iron

overload. Nevertheless, mitochondrial ROS production was not modified in high- versus low-iron conditions (Figure 3C), suggesting that SOD2 induction efficiently protects against ROS overproduction. The mitochondrial

Table 2. Respiratory-Chain Enzyme Activities in Cultured Skin Fibroblasts

	S1	S5	C
Absolute Activities (nmol/min/mg protein)			
CI	7	6	14 ± 3
CII	29	26	22 ± 2
CIII	82	125	190 ± 23
CIV	61	144	107 ± 14
CV	10	14	21 ± 3
Activity Ratios			
CI/CII	0,23	0,22	0,57 ± 0,11
CIII/CII	2,9	4,9	8,8 ± 0,8
CIV/CII	2,1	5,7	4,7 ± 0,5
CV/CII	0,34	0,56	0,87 ± 0,09

CI–V: complexes I–V. Abnormal values are shown in bold.

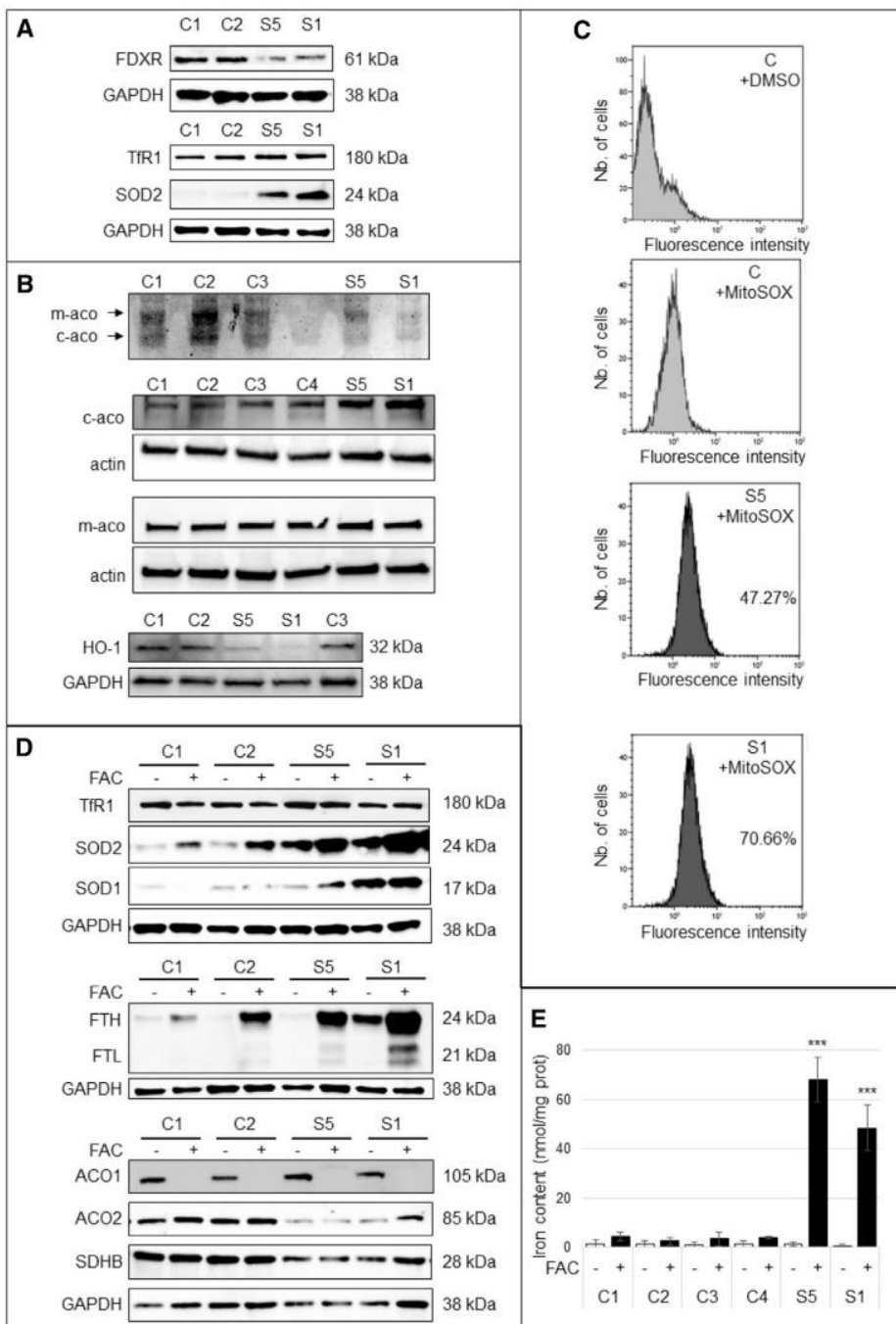


Figure 3. A Defect in Ferredoxin Reductase Results in Deregulation of Iron Homeostasis

(A) Decreased steady-state levels of ferredoxin reductase (upper panel) and increased steady-state levels of TfR1 and SOD2 (lower panel) in fibroblasts of subjects 1 and 5 (S1, S5). Controls (C1 and C2) are representative of three controls. Fibroblasts were grown in DMEM with 10% FBS. Ferredoxin reductase was studied in reducing conditions, and SOD2 and TfR1 were studied in non-reducing conditions so that TfR1 dimerization would be maintained. GAPDH was used as a loading control.

(B) Upper panel: in-gel aconitase assays revealed decreased mitochondrial (m-aco) and cytosolic (c-aco) aconitases in S1 and S5 fibroblasts compared to controls (C1–3).⁹ Lower panel: decreased HO-1 steady-state levels in S1 and S5 fibroblasts. C1–3: controls 1–3.

(C) Measurement of mitochondrial reactive oxygen species (ROS). Fibroblasts were grown in low- (-FAC) or high- (+FAC) iron conditions, and ROS amounts were similar in both conditions for control (C is representative of three controls) and subjects 1 and 5. The figure presents the ROS content in high-iron conditions. The numbers represent the percent of fluorescence intensity of subjects' fibroblasts compared to controls. ROS were measured as previously described.¹⁰

(D) Steady-state levels of proteins involved in iron homeostasis. TfR1, SOD1, and SOD2 were studied in non-reducing conditions, ferritin (FTH, FTL), ACO1, ACO2, and SDH were studied in reducing conditions in controls (C1–2), and FDXR fibroblasts grown in FBS-free DMEM medium were studied in low- (-FAC) and high- (+FAC) iron conditions. GAPDH was used as a loading control.

(E) Iron quantification using the ferrozine-based colorimetric assay in fibroblasts of controls (C1–C4) and FDXR subjects (S1, S5) grown in FBS-free DMEM medium and low- (-FAC) or high- (+FAC) iron conditions. The data are the means \pm SEM of

three independent experiments. A Student-Newman-Keuls ANOVA multifactorial test was used. *** $p < 0.001$.

We harvested cultured skin fibroblasts on ice by scraping cells in reducing (2 μ M DTT, denaturation at 95°C for 5 min) or non-reducing (no DTT, no heat denaturation) cell lysis buffer. SDS-PAGE was performed on whole-cell protein extracts in 10% or 7.5% acrylamide gel for reducing and non-reducing conditions, respectively. Immunodetections were performed in PBS with 5% milk and 0.05% Tween 20 (SIGMA) and the following antibodies: mouse anti-TfR1 (ab108985), rabbit anti-ferritin (ab75973), rabbit anti-FDXR (ab204310), rabbit anti-HO1 (Enzo Life Sciences, ADI-SPA-896), mouse anti-SOD1 (ab86454), mouse anti-SOD2 (ab125702), rabbit anti-GAPDH (ab62489), rabbit anti-ACO1 (ab126595), rabbit anti-ACO2 (ab129069). HRP-conjugated goat anti-mouse IgG H&L (ab6789), or goat anti-rabbit IgG (ab6721) were used as secondary antibodies before ECL-based detection (SuperSignal¹⁸ West Dura, Thermo Scientific). Images were visualized on a CCD camera (BioRad) and analyzed with ImageLab software (BioRad).

aconitase (ACO2) and SDHB amounts were decreased in subjects' fibroblasts in low- and high-iron conditions because of the ISC defect induced by FDXR mutations. Altogether, these results suggest that the defect in ferredoxin reductase induced a failure to repress iron uptake, as previously demonstrated in FDXR knock-down human cells¹⁸ and in ARH1-deficient yeast cells.¹⁴

To definitively demonstrate the pathogenic nature of the identified FDXR mutations, we studied their effect on the growth of a *Saccharomyces cerevisiae* strain in which ARH1 was deleted. Yeast mitochondrial Arh1 shares 35% identity with ferredoxin reductase (Figure 2F) and is essential for cell viability. Consistent with previous studies,¹⁹ the ARH1-null mutation (*arh1 Δ*) led to lethality that was rescued

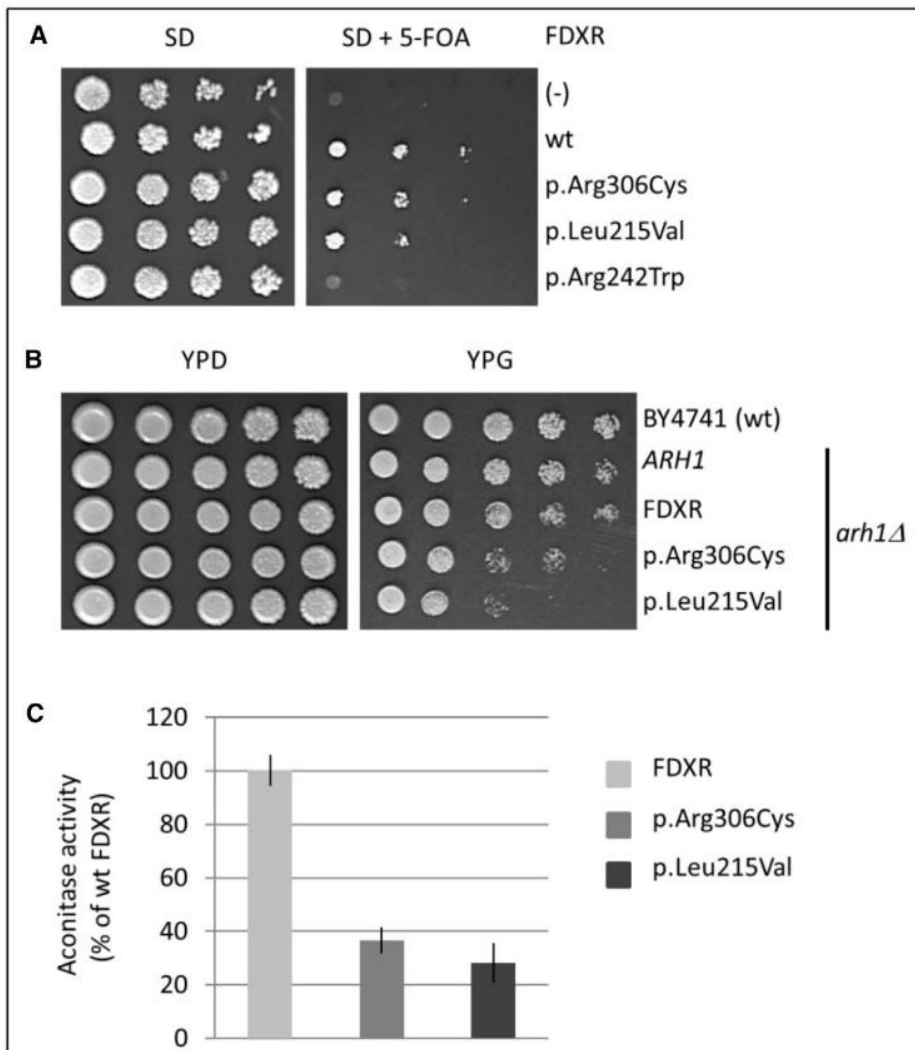


Figure 4. Functional Complementation Assay of the Yeast *arh1Δ* Mutant Strain Expressing Either the Wild-Type *FDXR* or the *FDXR* Mutants

(A) Growth on synthetic dextrose (SD) with or without 5-fluoroorotic acid (5-FOA) of *arh1Δ* and not D cells expressing the yeast wild-type *ARH1* and transformed with the wild-type *FDXR* (wt), the *FDXR* mutants, or the corresponding empty plasmid (-) under the control of the strong PGK promoter. 5-FOA treatment, as described by Boeke,²⁰ eliminates the plasmid encoding the yeast *ARH1* and allows one to evaluate growth capability of the *arh1Δ* cells expressing only *FDXR* or its mutated forms.

(B) Growth after 5-FOA treatment of wt cells (BY4741) and *arh1Δ* cells expressing wt*ARH1*, *FDXR*, or the *FDXR* mutants. Cells were spotted onto fermentable (YPD) or non-fermentable (YPG) plates. Drop dilution growth tests were performed at 1/10 dilution steps, and plates were incubated for 3 days at 28°C.

(C) *FDXR* mutations affect aconitase activity. Aconitase assays on crude yeast extracts from *arh1Δ* cells expressing the wild-type *FDXR* (wt) or the mutant forms Arg306Cys and Leu215Val are shown. Cells were grown to mid-logarithmic phase, and total crude extracts were prepared and analyzed for aconitase activity as previously described.²¹ Consumption of *cis*-aconitate was monitored spectrophotometrically at 240 nm at a molar absorption of 3,600 M⁻¹ × cm⁻¹. Activities shown are an average of two independent experiments. Error bars indicate SD.

by overexpression of *ARH1* (Figures 4A and 4B). Using a well-known plasmid-shuffling system,²⁰ we found, contrary to findings of the Manzella study,¹⁹ that overexpression of wild-type (wt) human *FDXR* cDNA was able to rescue *arh1Δ* lethality (Figures 4A and 4B), demonstrating that *FDXR* is the true functional ortholog of *ARH1*, as suggested by Weibert et al.,²² who used purified human ferredoxin reductase instead of Arh1 in an *in vitro* reconstitution of yeast Fe/S cluster synthesis on Isu1. Subsequently, we introduced amino acid changes into the ferredoxin reductase sequence for 3/5 missense mutations. p.Arg242Trp was completely unable to complement the *arh1Δ* growth defect (Figure 4A), indicating that this mutation disrupts the ferredoxin reductase function. p.Arg306Cys and p.Leu215Val changes did not modify cell growth in this condition but induced a growth defect on non-fermentable (respiratory) substrate (YPG, Figure 4B). Because *Arh1* is required for ISC assembly, we further measured the enzyme activity of mitochondrial aconitase, which contains an ISC. Spectrophotometric analyses revealed that aconitase activity in *arh1Δ* cells expressing p.Arg306Cys and p.Leu215Val was decreased in comparison to that in cells expressing WT *Fdxr* (Figure 4C), thus confirming the deleterious nature of the *FDXR* variants.

By using exome sequencing, we found mutations in the gene encoding the mitochondrial ferredoxin reductase in eight subjects from four independent families, and functional studies in yeast clearly established that the variations tested cause disease in these subjects. Mutations in several genes involved in ISC assembly have been reported in human diseases (Friedreich ataxia due to *FXN* mutations is the most frequent).¹¹ These mutations result in a wide panel of variably severe clinical presentations, ranging from fatal infantile leukodystrophy to mitochondrial myopathy.²³ Interestingly, whereas mutations in *FDX1L*, encoding ferredoxin-2 (*FDX2*), result in mitochondrial myopathy and myoglobinuria,²⁴ we showed here that mutations in the gene encoding its reductase (*FDXR*) result in sensorial neuropathies. Those points highlight the wide clinical heterogeneity of mitochondrial disorders even when the disease-causing mutations arise in a same pathway. Ferredoxin reductase is also able to reduce ferredoxin-1 (*FDX1*), which is not involved in ISC assembly but rather in steroid metabolism. Nevertheless, none of the subjects with *FDXR* mutations show any defect in steroid metabolism, suggesting that these specific mutations do not modify *FDX1* function or steroid metabolism. Why *FDXR* mutations result in sensorial neuropathies is

intriguing, and further studies will be needed to help us understand it. Nevertheless, several examples of isolated deafness or optic atrophy have been described in mitochondrial disorders and result from mitochondrial DNA mutations (m.1555A>G)²⁵ or nuclear gene mutations, such as *OPA1*²¹ and *PNPT1*.²⁶

Indirect evidence of mitochondrial iron overload in *arh1Δ* yeast cells expressing human mutant proteins is provided by increased SOD2 levels and defective mitochondrial aconitase activity. Moreover, we detected a major iron overload and increased mitochondrial ROS production in fibroblasts of affected individuals, which is in accordance with previous studies performed in human *FDXR*-knockdown cells¹⁸ as well as *FDX2*-knockdown cells.²⁷ We also observed increased TfR1 amounts that could be ascribed to the increased binding of IRP1 to the iron-responsive element; this increased binding activity was induced by an ISC defect, as previously demonstrated.^{18,27} Finally, we detected a considerable amount of iron in *FDXR* mutant cells when we grew these in high-iron conditions, suggesting that these cells are unable to regulate iron entry. Nevertheless, ferritin is not repressed in *FDXR* mutant fibroblasts, suggesting that an additional defect of iron homeostasis could occur in cultured skin fibroblasts.

In conclusion, we have shown that biallelic mutations in *FDXR* lead to sensorial neuropathies, confirming the critical role of the Fe-S biogenesis in the function of optic and auditory neurons.

Supplemental Data

Supplemental Data contain phenotype descriptions (Supplemental Note), clinical investigations, *FDXR* sequencing, and immunoblotting quantification data and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.09.007>.

Acknowledgments

We acknowledge the parents, the patients, and the physicians for their participation; Institut IMAGINE and the association S'entendre for their support; and Dr. Patrizia Amati Bonneau for *OPA1* and *TMEM126A* studies. This work was partially funded through the E-Rare project GENOMIT (01GM1207) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-IAHU-01). A.D. was supported by a fellowship from ApoPharma.

Received: February 10, 2017

Accepted: September 11, 2017

Published: September 28, 2017

Web Resources

UCSC genome browser, <https://genome.ucsc.edu/>

ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

Ensembl database, <http://www.ensembl.org/index.html>

Saccharomyces genome database, <http://www.yeastgenome.org/>

Basic local alignment search tool (Blast), <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Expression atlas, <http://www.ebi.ac.uk/gxa/>

References

1. Nikolopoulos, T.P. (2014). Auditory dyssynchrony or auditory neuropathy: understanding the pathophysiology and exploring methods of treatment. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **78**, 171–173.
2. Moser, T., and Starr, A. (2016). Auditory neuropathy—neural and synaptic mechanisms. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 135–149.
3. Bocquet, B., Lacroux, A., Surget, M.O., Baudoin, C., Marquette, V., Manes, G., Hebrard, M., Sénéchal, A., Delettre, C., Roux, A.F., et al. (2013). Relative frequencies of inherited retinal dystrophies and optic neuropathies in Southern France: assessment of 21-year data management. *Ophthalmic Epidemiol.* **20**, 13–25.
4. Namba, K., Mutai, H., Takiguchi, Y., Yagi, H., Okuyama, T., Oba, S., Yamagishi, R., Kaneko, H., Shintani, T., Kaga, K., and Matsunaga, T. (2016). Molecular impairment mechanisms of novel *OPA1* mutations predicted by molecular modeling in patients with autosomal dominant optic atrophy and auditory neuropathy spectrum disorder. *Otol. Neurotol.* **37**, 394–402.
5. Meyer, E., Michaelides, M., Tee, L.J., Robson, A.G., Rahman, F., Pasha, S., Luxon, L.M., Moore, A.T., and Maher, E.R. (2010). Nonsense mutation in *TMEM126A* causing autosomal recessive optic atrophy and auditory neuropathy. *Mol. Vis.* **16**, 650–664.
6. Ewen, K.M., Kleser, M., and Bernhardt, R. (2011). Adrenodoxin: the archetype of vertebrate-type [2Fe-2S] cluster ferredoxins. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 111–125.
7. Jung, Y.S., Gao-Sheridan, H.S., Christiansen, J., Dean, D.R., and Burgess, B.K. (1999). Purification and biophysical characterization of a new [2Fe-2S] ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*, a putative [Fe-S] cluster assembly/repair protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 32402–32410.
8. Stehling, O., Wilbrecht, C., and Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* **100**, 61–77.
9. Shi, Y., Ghosh, M.C., Tong, W.-H., and Rouault, T.A. (2009). Human *ISD11* is essential for both iron-sulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3014–3025.
10. Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B.J., Madesh, M., and Pacher, P. (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat. Protoc.* **2**, 2295–2301.
11. Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423–1427.
12. Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., and Puccio, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3521–3531.
13. Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W.G., Naylor, S., Benson, L.M., Gacy, A.M., and Isaya, G. (2000). Iron-dependent self-assembly

- of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 549–562.
14. Li, J., Saxena, S., Pain, D., and Dancis, A. (2001). Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 276, 1503–1509.
 15. Lane, D.J.R., Merlot, A.M., Huang, M.L., Bae, D.H., Jansson, P.J., Sahni, S., Kalinowski, D.S., and Richardson, D.R. (2015). Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1130–1144.
 16. Sohn, Y.-S., Ghoti, H., Breuer, W., Rachmilewitz, E., Attar, S., Weiss, G., and Cabantchik, Z.I. (2012). The role of endocytic pathways in cellular uptake of plasma non-transferrin iron. *Haematologica* 97, 670–678.
 17. Buys, S.S., Martin, C.B., Eldridge, M., Kushner, J.P., and Kaplan, J. (1991). Iron absorption in hypotransferrinemic mice. *Blood* 78, 3288–3290.
 18. Shi, Y., Ghosh, M., Kovtunovych, G., Crooks, D.R., and Rouault, T.A. (2012). Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 484–492.
 19. Manzella, L., Barros, M.H., and Nobrega, F.G. (1998). ARH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast* 14, 839–846.
 20. Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G.R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 154, 164–175.
 21. Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26, 207–210.
 22. Weibert, H., Freibert, S.A., Gallo, A., Heidenreich, T., Linne, U., Amlacher, S., Hurt, E., Mühlhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2014). Functional reconstitution of mitochondrial Fe/S cluster synthesis on Isu1 reveals the involvement of ferredoxin. *Nat. Commun.* 5, 5013.
 23. Beilschmidt, L.K., and Puccio, H.M. (2014). Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie* 100, 48–60.
 24. Spiegel, R., Saada, A., Halvardson, J., Soiferman, D., Shaag, A., Edvardson, S., Horovitz, Y., Khayat, M., Shalev, S.A., Feuk, L., and Elpeleg, O. (2014). Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* 22, 902–906.
 25. Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., and Wallace, D.C. (2007). An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 35, D823–D828.
 26. von Ameln, S., Wang, G., Boulouiz, R., Rutherford, M.A., Smith, G.M., Li, Y., Pogoda, H.M., Nürnberg, G., Stiller, B., Volk, A.E., et al. (2012). A mutation in PNPT1, encoding mitochondrial-RNA-import protein PNPase, causes hereditary hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 919–927.
 27. Sheftel, A.D., Stehling, O., Pierik, A.J., Elsässer, H.P., Mühlhoff, U., Weibert, H., Hobler, A., Hannemann, F., Bernhardt, R., and Lill, R. (2010). Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 11775–11780.

Supplemental Data

***FDXR* Mutations Cause Sensorial Neuropathies**

and Expand the Spectrum of Mitochondrial Fe-S-Synthesis Diseases

Antoine Paul, Anthony Drecourt, Floriane Petit, Delphine Dupin Deguine, Christelle Vasnier, Myriam Oufadem, Cécile Masson, Crystel Bonnet, Saber Masmoudi, Isabelle Mosnier, Laurence Mahieu, Didier Bouccara, Josseline Kaplan, Georges Challe, Christelle Domange, Fanny Mochel, Olivier Sterkers, Sylvie Gerber, Patrick Nitschke, Christine Bole-Feysot, Laurence Jonard, Souad Gherbi, Oriane Mercati, Ines Ben Aissa, Stanislas Lyonnet, Agnès Rötig, Agnès Delahodde, and Sandrine Marlin

Supplemental note: cases reports

Family 1

Patient 1 is the last child of consanguineous parents originating from Tunisia (Fig 1). She has 4 older sisters from whom one presents with the same association of auditory and visual defects, as two of her cousins.

She started to have poor voice understanding and visual impairment at the age of 13 years old. Ophthalmologic and audiological examinations were performed at 19 years when she arrived in France. A diagnosis of auditory neuropathy has been confirmed due to the association of a deep discrepancy between the hearing defect in tonal and speech audiograms (mild and severe defects respectively), bilateral conserved otoacoustic emissions and bilateral desynchronized Auditory Brainstem Responses (ABR) at all sound intensity (Fig1.b). Ophthalmologic fundus found a bilateral papilledema pallor. Optic coherence tomography (OCT) demonstrated a bilateral optic nerves atrophy. Cerebral, eyes and internal canals MRI showed small optic nerves predominating at the left side with heterogeneous signals; without any abnormalities in supra-tentorial regions, posterior fossa nor inner ears (data not shown). Her neurological examination stilled normal at 22 years old. Her visual acuity was very low (2/10 in the right side and 1/10 in the left). Glycaemia, echocardiography, cardiac holter, ECG and electromyogram were normal at the same age.

Her sister, patient 2, complained with visual problems and voice understanding problems also at 13 years. After the diagnosis of her sister, she had audiological and ophthalmologic examinations in Tunisia at 38 years. ABR showed a bilateral absence of responses at 105 dB. Her vocal audiogram confirmed a bilateral severe defect contrasting with a 30 dB defect at the tonal audiometry. Visual evoked potentials (VEP) were present but with a small amplitude and expanded latencies (P100=145ms). Her metabolic and neurological examinations were normal.

Their cousins were respectively 36 and 31 (Patient 3 and 4) years old at the time of examination. Patient 3 complained with hearing loss with very bad voice understanding at 15 years. At 36, her ophthalmologic fundus and visual acuity were normal but VEP showed bilateral delayed latencies (P100=133ms) with small amplitudes. ABR demonstrated desynchronised waves without identifiable potential. Patient 4 stopped school at 11 years old due to a progressive bilateral hearing loss with very poor speech understanding. At 31 years, an ophthalmologic fundus showed a bilateral papilledema pallor and no waves were obtained at both VEP and ABR. These two patients did complain with other features.

Family 2

Patient 5 is the first child of a non-consanguineous Algerian couple. Before his birth, a boy was stillborn. He has two younger sisters and one brother. There is no familial history of hearing, visual or neurological disease. At the time of examination, he is 31 years old. He started to have hearing problems during the teenage but the diagnosis of auditory neuropathy was very recent. There was a deep discrepancy between his hearing level in tonal audiometry (bilateral moderate hearing loss) and the results of the vocal audiometry (bilateral profound defect). ABR were totally desynchronised up to 100dB. A systematic ophthalmologic examination revealed a bilateral optic atrophy. He had a good

visual acuity (10/10 right eye, 8/10 left) but color vision tests revealed a dyschromatopsia (blue yellow axis). OCT documented a loss of the temporal fibers. His neurological examination was normal.

Family 3

Patient 6 is the unique child of a non-consanguineous French couple. He is got two half-sisters and one half-brother. There is no medical familial history. The pregnancy and the birth were unremarkable.

At 2 years of age, a bilateral retinitis pigmentosa has been diagnosed because of low vision and nystagmus. ERG waves were absent and fundus was altered.

At 20 years, he complained with hearing problems and an auditory neuropathy has been diagnosed due to of the association between normal tonal audiometry and no ABR potential at 105 dB. The ophthalmologic examination revealed a bilateral association of complete ophtalmoplegia with retinitis pigmentosa and optic atrophy. Metabolic check-up, electromyogram, brain MRI spectroscopy study were normal. His neurological examination showed only lower limbs hypoallegsthesia.

Family 4

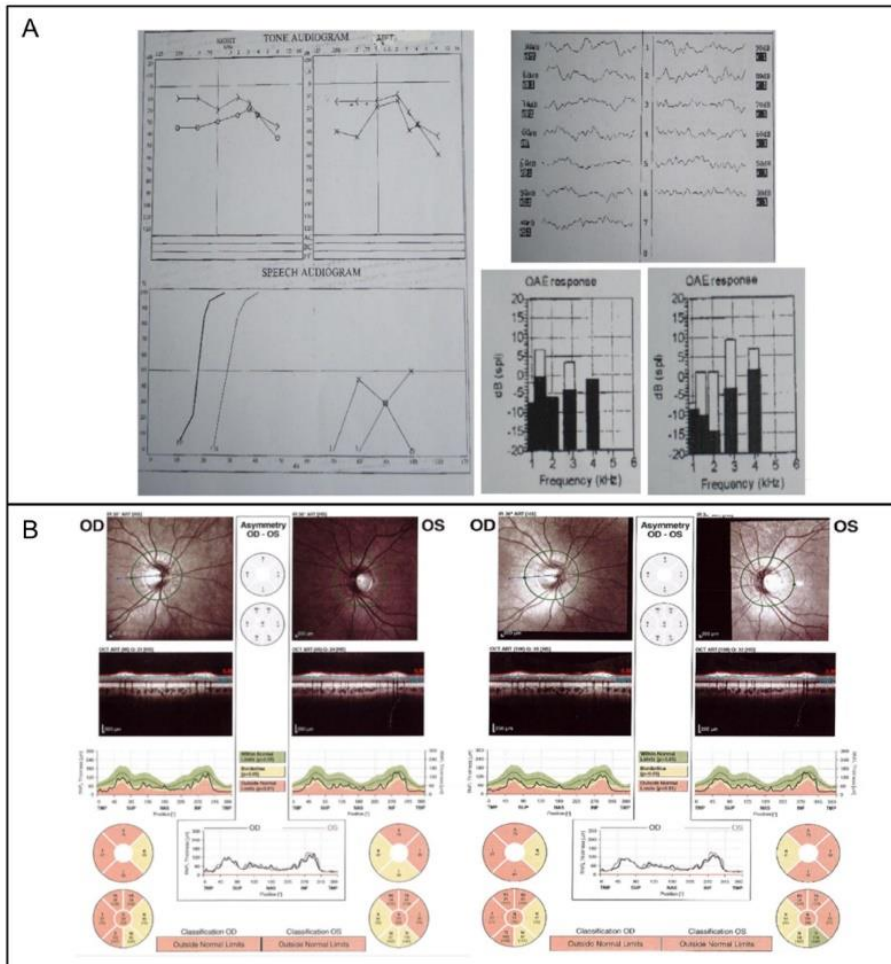
Patients 7 and 8 are two of the four sisters of a non-consanguineous couple originating from Azerbaijan and Russia (Fig 1a). There is no medical familial history. The two younger sisters have no sensorial feature.

Patient 7 was born in Russia. The parents noticed a slight language delay with her first words at 2 years old. The first symptoms were a slow bilateral decrease of the visual acuity which had started during childhood. When she arrived in France, at 17 years old, a bilateral optic atrophy was diagnosed. At this period, she started complaining with a moderate bilateral hearing loss. Electrophysiological exams diagnosed a bilateral auditory neuropathy. Brain MRI and temporal bones were normal.

Her younger sister, patient 8, arrived in France at 16. At 5 years old, a bilateral hearing defect has been diagnosed in Russia. Her school acquisitions were good but she had important problems to understand the language. Because of a bad adaptation to hearing aids, she used speech reading and sign language. The tonal audiometry showed a bilateral 35dB thresholds for all the frequencies. The otoacoustic emissions were present in both ears but ABR did not identified any responses at 120 dB. Optic atrophy has been diagnosed at 17 years. She presented with slight visual impairment (8/10). Ophthalmological examinations showed bilateral temporal pallor at the fundus, bilateral diminution of the amplitude of the EVP potentials and blind spot increasing and bilateral caeco-central scotoma at the kinetic visual field. The ERG was normal. At 23, a visual acquisition was: 6/10 P2 for the right side and 8/10 for the left one. Ophthalmologic fundus showed a bilateral temporal pupillary pallor. The OCT identified a bilateral stationary optic atrophy with a thickness of 57 μ m in the right eye and

59 μ m in the left eye (Fig1.c). Goldmann Visual field found a loss of the I-1 central isopters. Her brain MRI was normal.

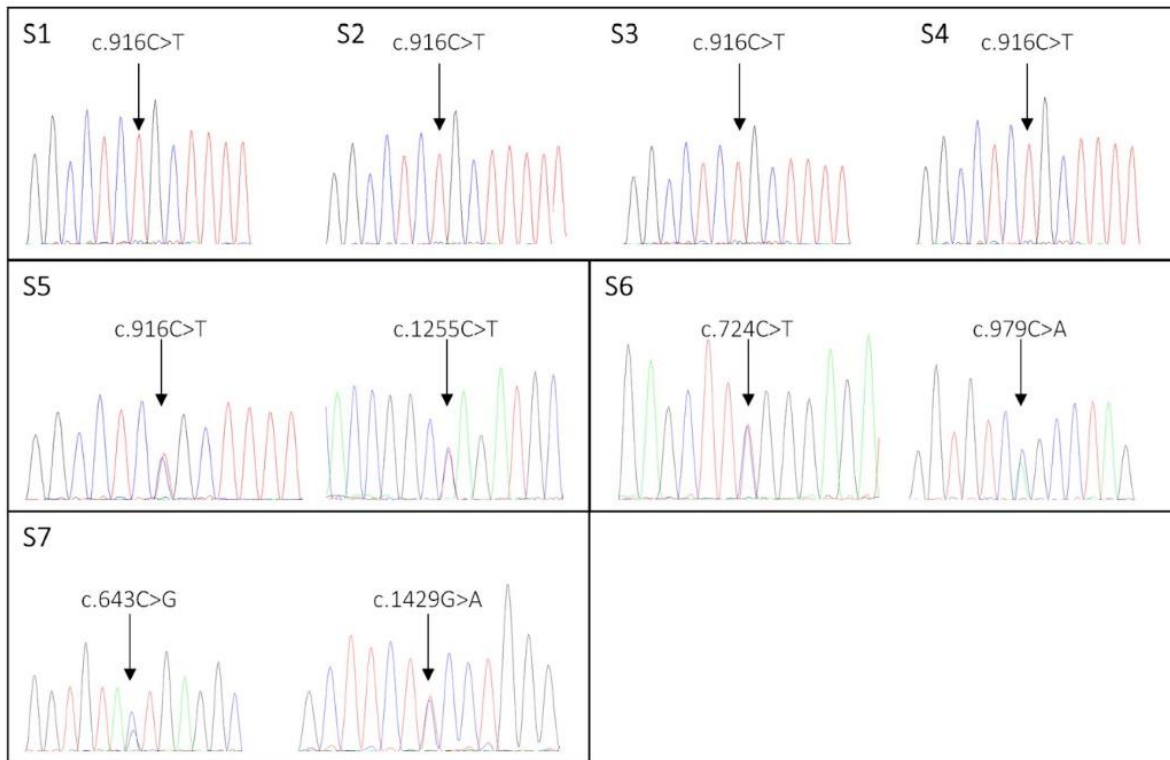
Figure S1 : Clinical investigations



A. Audiological investigations of subject 1: Discrepancy between the hearing defect in tonal and speech audiograms (mild and severe defects respectively)(left figure), bilateral conserved otoacoustic emissions (lower right figure) and bilateral impaired Auditory Brainstem Response (ABR, upper right figure) at all sound intensities.

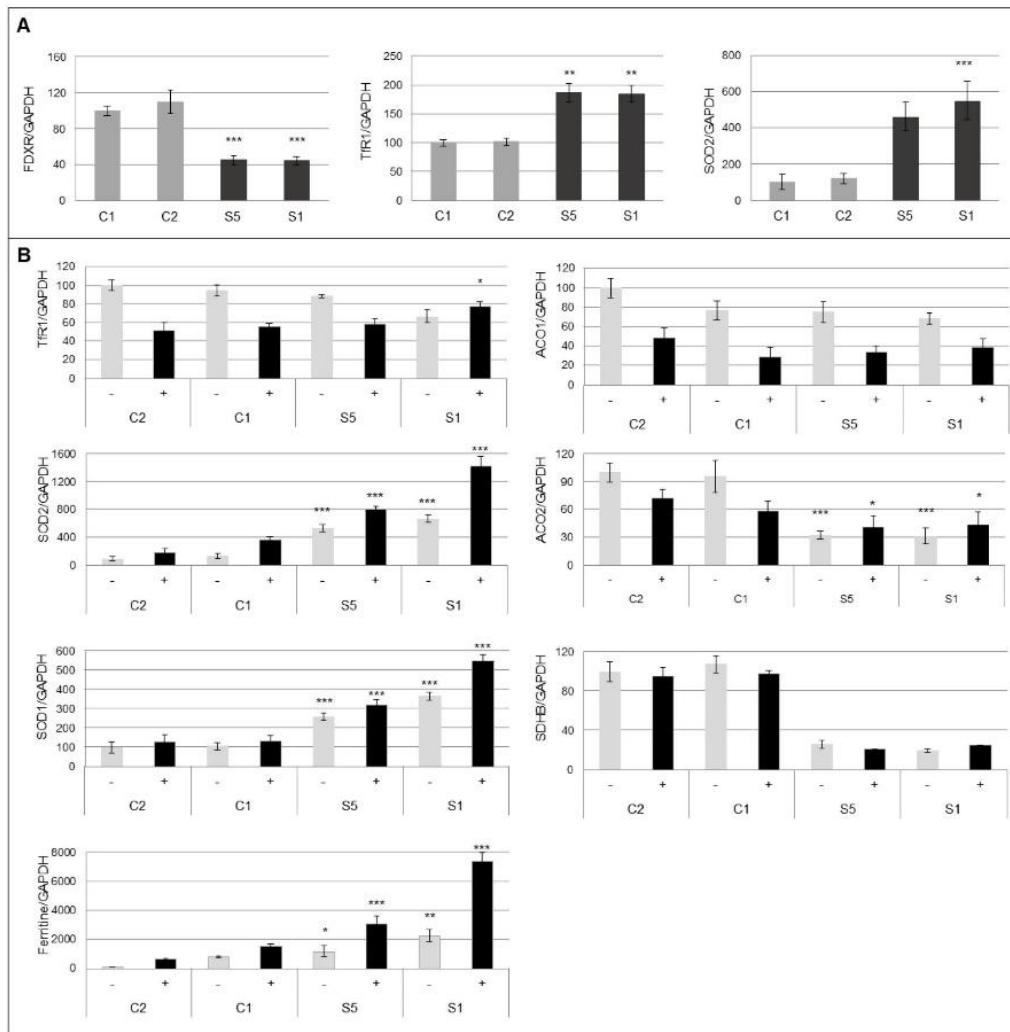
B. Ophthalmologic investigations of subject 8 at 17 (left figure) and 23 years: Ophthalmologic fundus showed a bilateral temporal pupillary pallor. The Optic Coherence Tomography identified a bilateral stationary optic atrophy with a thickness of 57 μ m in the right eye and 59 μ m in the left eye.

Figure S2: Sequence analysis of *FDXR* (NM_024417.4) in subjects 1-7 (S1-7).



The arrows indicate the mutations.

Figure S3: Immunoblotting quantification



A. Immunoblotting quantification of steady-state levels of FDXR, Tfr1 and SOD2 presented in Figure 3A. **B. Immunoblotting quantification of steady-state levels of proteins involved in iron homeostasis in low (-FAC) and high iron conditions (+FAC)** presented in Fig. 3D. Protein amounts are relative to GAPDH. The data are the means \pm SEM of three independent experiments. Student (t-test) was used. *, ** and *** correspond to P values <0.05 , <0.01 and <0.001 respectively.

b. Étude de l'impact de diverses mutations ISC dans la régulation de l'homéostasie du fer cellulaire

La régulation de l'homéostasie du fer s'est basée sur la caractérisation de fibroblastes issus de patients présentant différentes mutations dans les gènes *IBA57*, *NFU1* ou *NUBPL* ainsi que trois patients avec au moins une mutation dans le gène *FDXR*. Les cellules de deux patients *FDXR* ont été utilisées pour la première partie de l'étude (article 2, S5 et S1 correspondant respectivement aux patients *FDXR 1* et *FDXR 2*). Le troisième patient (*FDXR 3*) présente une mutation intronique hétérozygote touchant un site donneur d'épissage et une diminution importante de la ferrédoxine réductase (**Figure 38A-B**), suggérant la présence d'une seconde mutation encore non identifiée.

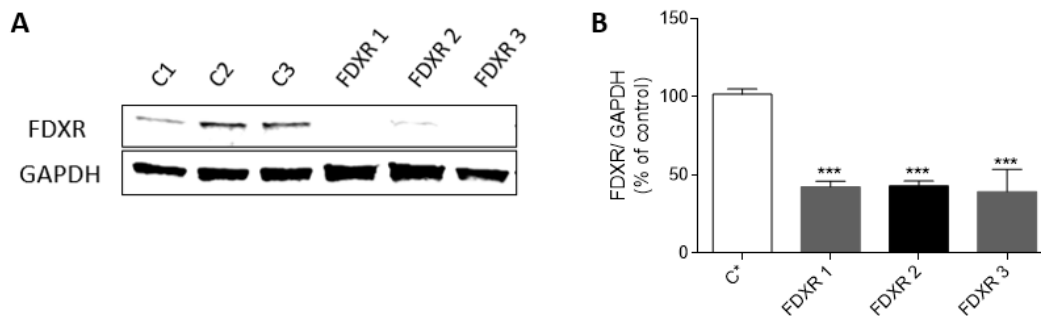


Figure 38 : Expression de la ferrédoxine réductase dans les fibroblastes FDXR. A. Immunoblot de FDXR dans des fibroblastes contrôles (C1-C3) et de patients présentant au moins une mutation dans le gène *FDXR* (FDXR 1-3), cultivés dans des conditions standard. B. Quantification de l'immunoblot. Le taux de protéines est rapporté à la GAPDH. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm SEM. $n = 3$. Un test de Student a été réalisé pour comparer la valeur de chaque échantillon par rapport à la valeur contrôle. *** correspond à une p -value $< 0,001$.

Sur la base des travaux menés sur les fibroblastes de patients AF, la régulation de l'entrée du fer a été analysée par quantification de la teneur en fer intracellulaire après un traitement de 72 h par holo-Tf ou par FAC. Une supplémentation en fer conduit à une surcharge en fer importante chez les patients *FXDR 1* et *2* (**Figure 39A-B**), évoquant une incapacité à limiter l'entrée du fer. Néanmoins, cette accumulation est très modérée lors d'une incubation en holo-Tf chez *FDXR1*. Une légère surcharge en fer est également observée dans les cellules *NUBPL* (**Figure 39B**), démontrant qu'un déficit tardif dans ISC ne provoque pas de défaut majeur de l'entrée du fer à l'inverse des déficits précoces. Ces données révèlent également que la nature des mutations *FDXR* peut avoir un impact variable sur l'homéostasie du fer.

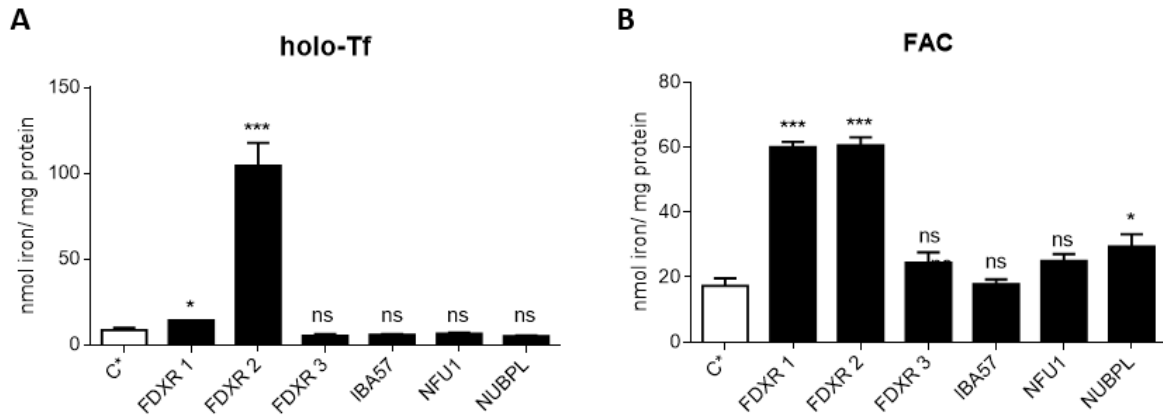


Figure 39 : Dosage en fer intracellulaire dans des fibroblastes contrôles (C* : moyenne de trois contrôles) et de patients traités par 13 mM d'holo-Tf (A) ou 100 μ M FAC (B) pendant 72 h. Les données représentent la moyenne \pm SEM. n = 3. Des tests de Student ont été utilisés pour comparer les valeurs de patients à la moyenne des contrôles. *, *** correspondent à des valeurs de p < 0,05 et < 0,001, ns : non significatif.

L'homéostasie du fer a ensuite été évaluée en quantifiant l'expression protéique du TfR1 et de la ferritine. Les western blots montrent que la quantité de ces deux protéines est plus importante pour deux patients FDXR (FDXR 1 et 2) comparée aux cellules témoins (**Figure 40A-B**), sans qu'elles soient affectées chez les autres patients. Par conséquent, les acteurs impliqués dans les stades précoces de la synthèse des centres Fe-S, tel que FDXR, semblent impacter davantage l'homéostasie du fer à la différence des acteurs tardifs de ce processus (IBA57, NFU1 et NUBPL), démontrant la divergence phénotypique provoquée par le type de protéine affectée dans la biogenèse des ISC.

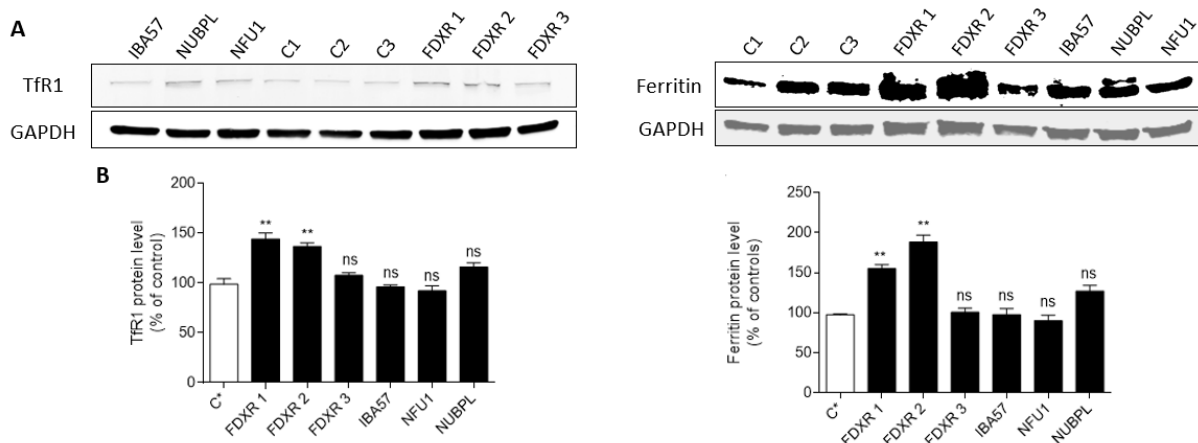


Figure 40 : Dérégulation de l'homéostasie du fer dans les fibroblastes de deux patients FDXR. A. Immunoblots du TfR1 et de la ferritine des fibroblastes contrôles (C1-C3) et de patients cultivés dans des conditions standard (10% FBS). **B.** Quantification des immunoblots. C* : moyenne de trois contrôles. Le taux de protéines est rapporté à la GAPDH. Les données représentent la moyenne \pm SEM. n = 3. Des tests de Student ont

été utilisés pour comparer les valeurs de patients à la moyenne des contrôles. ** correspond à une valeur de $p < 0,01$, ns : non significatif.

Comparativement aux observations réalisées sur les fibroblastes AF, nous supposons que l'augmentation de la quantité de TfR1 pourrait être liée à son accumulation à la surface cellulaire. Dans ce sens, le taux de TfR1 membranaire a été déterminé par AMNIS et s'est révélé augmenté dans les fibroblastes FDXR (FDXR 1-2) (**Figure 41A**).

Dans le but d'essayer de comprendre la dérégulation de ce récepteur, des analyses fonctionnelles de la capacité d'endocytose et de recyclage du TfR1 ont été mises en œuvre. Le taux d'internalisation du complexe Tf-TfR1 a été mesuré par quantification de l'intensité de fluorescence après l'incubation de Tf fluorescente. Les cellules de patients FDXR (FDXR 1 et 2) présentent un signal de Tf supérieur à celui des témoins (**Figure 41B**), suggérant une internalisation accrue du complexe Tf-TfR1 et donc probablement du fer. L'étude du recyclage du complexe Tf-TfR1 a montré une persistance de la fluorescence de la Tf au cours du temps évoquant un retard du recyclage dans les cellules de patients FDXR (FDXR 1-2) (**Figure 41C**). Par conséquent, l'augmentation combinée de l'internalisation et d'un retard de recyclage de la transferrine peut conduire à une augmentation de la libération du fer des endosomes vers le cytoplasme promouvant son accumulation.

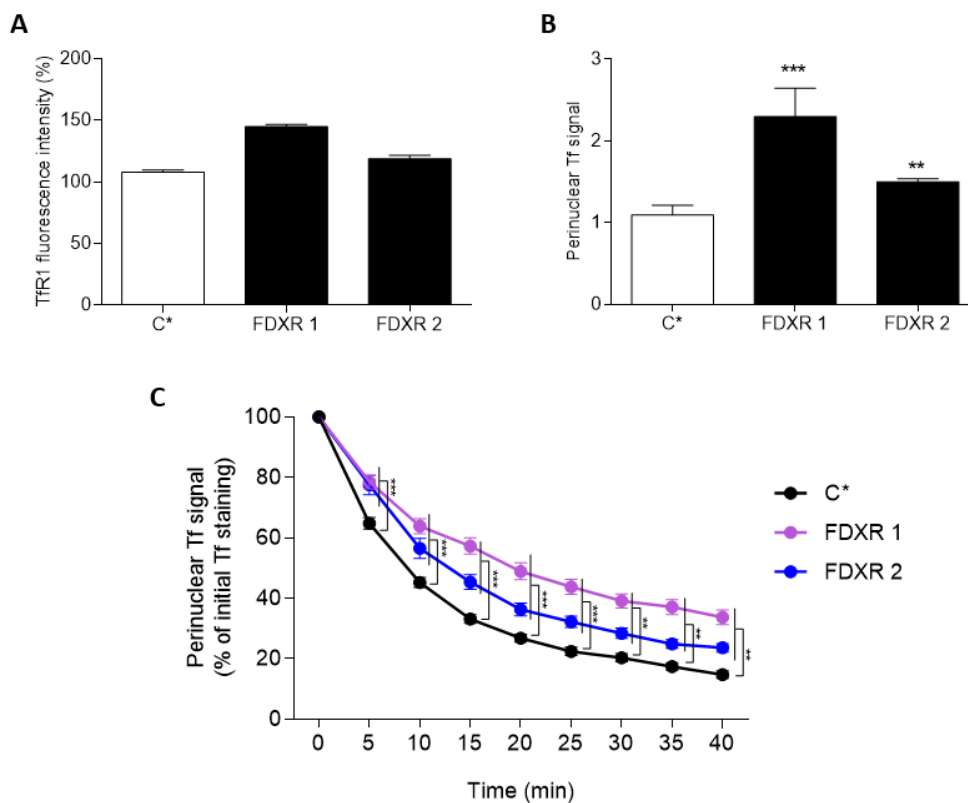


Figure 41 : Accumulation du TfR1 membranaire associée à une endocytose accrue et un retard de recyclage dans les fibroblastes FDXR. **A.** Quantification du TfR1 lié à la membrane dans les cellules contrôles (C*) et de patients FDXR (FDXR 1-2) cultivées dans des conditions standard, n = 2. **B.** Intensité de fluorescence basale de la Tf conjuguée à un Alexa fluor 555 après 30 min d'incubation pour des fibroblastes témoins (C*) et de patients (FDXR 1-2). n = 3. **C.** Représentation de l'intensité moyenne de fluorescence de la Tf suivie pendant 40 min après 30 min d'incubation de Tf conjuguée à un Alexa fluor 555 dans des fibroblastes contrôles (C*) et de patients FDXR (FDXR 1-2). Le nombre de cellules acquises est supérieur à 10 cellules par expérience. n = 3. Les données représentent la moyenne \pm SEM. Un test ANOVA a été utilisé pour comparer la valeur du patient à la moyenne de la valeur des témoins pour chaque temps. ** et *** correspondent à des valeurs de $p < 0,01$ et $< 0,001$ respectivement.

c. Discussion

La synthèse des ISC implique une vingtaine de protéines mitochondriales dont chacune exerce un rôle précis dans une des étapes de cette voie métabolique. Cette étude a visé à mieux comprendre l'importance et les conséquences fonctionnelles de déficits de certains membres de l'assemblage des ISC dont notamment FDXR, IBA57, NFU1 et NUBPL dans l'homéostasie du fer cellulaire.

La caractérisation de fibroblastes de trois patients FDXR a montré une surcharge en fer cellulaire associée à un stress oxydant chez deux d'entre eux. Cette dérégulation de l'homéostasie du fer est provoquée par une altération de l'import de ce métal par les voies TBI et NTBI. Des études antérieures ont fait état d'une accumulation en fer importante dans des embryons de souris en développement suite à une absence complète de *FDXR*, provoquant leur létalité embryonnaire²⁴³. Des analyses subcellulaires réalisées sur des modèles HeLa déficients pour *FDXR* par siRNA ont permis de localiser cette surcharge en fer dans le compartiment mitochondrial lors de l'incubation des cellules dans un milieu standard ou supplémenté en FAC²⁴⁴.

L'étude de l'entrée du fer a permis de mettre en évidence une accumulation de TfR1 membranaire associée à une augmentation de son internalisation et un retard de recyclage dans les fibroblastes FDXR 1-2, empêchant ainsi ces cellules de limiter l'absorption de ce métal. Une hausse du TfR1, de l'IRP2 ainsi que de la production de ROS ont été décrites dans l'ensemble des modèles cellulaires et murins déficitaires en FDXR²⁴³⁻²⁴⁵. Bien que FDXR joue un rôle clé dans la stéroïdogénèse mitochondriale et que son déficit affecte le métabolisme des lipides²⁴⁶, aucune anomalie de palmitoylation, de CoA, ou même de déficit en lipoylation, n'a été rapportée, contrairement aux fibroblastes AF.

De plus, l'analyse de la régulation du TfR1 en présence de fer a montré que seulement le patient FDXR 2 (S1 dans l'article 2) possède une dérégulation de ce récepteur semblable aux observations réalisées dans les cellules patients AF. En revanche, aucune différence de régulation du TfR1 n'a été observée chez le patient FDXR1 (S5 dans l'article 2), suggérant que ce récepteur n'est pas l'acteur majeur responsable de la dérégulation de l'homéostasie du fer. Il semblerait que les mécanismes orchestrant une accumulation en fer soient quelque peu différents de ceux de l'AF, en impliquant directement des acteurs connus de cette voie. En effet, l'absence complète d'IRP2 permet de supprimer totalement la surcharge en fer mitochondriale due à un déficit de FDXR²⁴³. De plus, l'expression de FDX2, un substrat de FDXR, permettrait de limiter l'action d'IRP2 et donc la surcharge en fer dans le cadre de cancers²⁴³. L'IRP2 pourrait ainsi être un modulateur du contenu en fer dans la mitochondrie lors d'un déficit en FDXR. Cependant, les mécanismes d'actions directes ou indirectes de FDXR sur l'IRP2 restent encore à définir.

L'absence de toute dérégulation de l'homéostasie du fer dans les cellules FDXR 3 suggère que la nature de la mutation a un impact majeur dans l'établissement de la surcharge en fer. Bien que la protéine ferrédoxine réductase soit diminuée dans les fibroblastes des trois patients FDXR, les défauts de l'activité de cette enzyme peuvent être différents. En effet, il a été rapporté que seul un déficit enzymatique de FDXR provoque une diminution de l'activité des complexes II et III due à un défaut de biogenèse des centres Fe-S mitochondriaux dans les fibroblastes de patients²⁴⁵. Il semble donc primordial de déterminer l'impact de ces différentes mutations sur l'activité enzymatique de la ferrédoxine réductase dans le but d'appréhender leurs influences dans un dysfonctionnement des ISC et leurs conséquences cellulaires.

L'étude de cellules de patients IBA57, NFU1 et NUBPL n'a révélé aucune altération du contenu en fer ainsi que de l'expression du TfR1 et de la ferritine démontrant que les acteurs impliqués dans les étapes finales des ISC n'affectent pas l'homéostasie du fer. De précédentes études ont montré qu'une diminution d'IBA57 était corrélée à une augmentation de l'activité des IRP²⁴⁷ ainsi que de la synthèse des ROS²⁴⁸ mitochondriaux et cellulaires sans affecter la quantité de TfR1 et de ferritine²⁴⁷. En absence d'IBA57, le fer a tendance à s'accumuler progressivement au niveau des protéines ISCA sans occasionner de surcharge ferrique²⁴⁷. Bien que les protéines NFU1 et NUBPL soient toutes les deux capables de se lier directement au fer, des études menées *in vivo* chez la levure ou sur des cellules de patients n'ont décrit aucune modification du contenu en fer^{249,250}.

Pour conclure, seules les mutations touchant des acteurs précoces de l'assemblage des ISC (*FDXR* et *FXN*) donnent lieu à une accumulation de fer, contrairement aux altérations géniques affectant des facteurs de maturation ou de transfert des ISC (*IBA57*, *NFUI* et *NUBPL*). Cette hétérogénéité phénotypique pourrait ainsi constituer un critère de classification dans les maladies à centres Fe-S afin de déterminer si la synthèse des centres Fe-S cytosoliques (CIA) peut être affectée ou non. Néanmoins, la base des mécanismes impliqués dans cette surcharge en fer mitochondrial reste encore à éclaircir.

Partie IV : Étude de l'homéostasie du fer dans les neurodégénérescences avec accumulation de fer dans le cerveau (NBIA)

Contexte :

Les NBIA représentent un groupe génétiquement hétérogène de patients présentant une surcharge en fer dans les noyaux gris du cerveau. La maladie se manifeste par un syndrome extrapyramidal, une dystonie et une choréo-athétose. L'évolution de cette maladie est souvent très rapide chez les jeunes enfants conduisant à des symptômes sévères. Les traitements administrés (chélateurs et antioxydants) n'ont que des effets partiels et une meilleure compréhension globale des mécanismes physiopathologiques des NBIA permettrait d'envisager de nouvelles pistes thérapeutiques.

Ainsi, l'enjeu de cette étude réalisée par un autre étudiant en thèse avec ma participation a été d'identifier en premier lieu de nouveaux gènes de NBIA, *REPS1* et *CRAT*, chez des patients présentant une accumulation de fer dans le cerveau. Dans un second temps, nous avons essayé de comprendre le mécanisme de la surcharge en fer dans cette maladie *via* la caractérisation de fibroblastes de patients porteurs de mutations dans les gènes *PANK2*, *PLA2G6*, *FA2H*, *C19ORF12*, *REPS1* et *CRAT*.

ARTICLE

Impaired Transferrin Receptor Palmitoylation and Recycling in Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation

Anthony Drecourt,^{1,2} Joël Babbior,^{1,2,7} Michael Dussiot,^{1,2,7} Floriane Petit,¹ Nicolas Goudin,^{1,3} Meriem Garfa-Traoré,^{1,3} Florence Habarou,^{1,4} Christine Bole-Feysot,¹ Patrick Nitschké,¹ Chris Ottolenghi,^{1,4} Metodi D. Metodiev,¹ Valérie Serre,⁵ Isabelle Desguerre,⁶ Nathalie Boddaert,^{1,6} Olivier Hermine,^{1,2} Arnold Munnich,^{1,6} and Agnès Rötig^{1,2,*}

Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) is a genetically heterogeneous condition characterized by progressive dystonia with iron accumulation in the basal ganglia. How NBIA-associated mutations trigger iron overload remains poorly understood. After studying fibroblast cell lines from subjects carrying both known and unreported biallelic mutations in *CRAT* and *REPS1*, we ascribe iron overload to the abnormal recycling of transferrin receptor (TfR1) and the reduction of TfR1 palmitoylation in NBIA. Moreover, we describe palmitoylation as a hitherto unreported level of post-translational TfR1 regulation. A widely used antimalarial agent, artesunate, rescued abnormal TfR1 palmitoylation in cultured fibroblasts of NBIA subjects. These observations suggest therapeutic strategies aimed at targeting impaired TfR1 recycling and palmitoylation in NBIA.

Introduction

Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA; NBIA1 [MIM: 234200], NBIA2A [MIM: 256600], NBIA3 [MIM: 606159], NBIA4 [MIM: 614298], NBIA5 [MIM: 300894], NBIA6 [MIM: 615643], SPG35 [MIM: 612319], KRS [MIM: 606693], Woodhouse-Sakati syndrome [MIM: 241080], and aceruloplasminemia [MIM: 604290]) is a genetically heterogeneous condition due to iron accumulation in the basal ganglia and manifests as a progressive extrapyramidal syndrome with dystonia, rigidity, and choreoathetosis. Mutations in 11 genes (*PANK2* [MIM: 606157], *PLA2G6* [MIM: 603604], *COASY* [MIM: 609855], *FA2H* [MIM: 611026], *ATP13A2* [MIM: 610513], *C2orf37* [MIM: 312515], *WDR45* [MIM: 300526], *C19ORF12* [MIM: 164297], *CP* [MIM: 117700], *FTL* [MIM: 134790], and *GTPBP2* [MIM: 607434]) have been hitherto identified.^{1,2} Mutations in *PLA2G6*, encoding a phospholipase A2, and *PANK2*, encoding the mitochondrial pantothenate kinase 2, are the most prevalent known cause of NBIA.

Only two genes, *FTL* (encoding the light subunit of ferritin) and *CP* (encoding ceruloplasmin, a metalloprotein binding plasma copper also involved in peroxidation of Fe(II) to Fe(III) transferrin (Tf)), are reportedly involved in iron metabolism. How the other NBIA proteins disturb iron metabolism remains poorly understood. On the other hand, iron has long been known to enter cells by

either internalization of Tf receptor 1 (TfR1)-mediated endocytosis or non-Tf bound iron uptake (NTBI).^{3,4} In living cells, newly imported iron is primarily used in the mitochondria and surpluses diverted to ferritin, a multimeric protein made up of two subunits, H-ferritin and L-ferritin. Homeostasis of cellular iron is post-transcriptionally regulated by iron-regulatory proteins (IRPs). When the level of cytosolic iron falls, cytosolic aconitase (ACO1) is converted into IRP (IRP1). IRP2, another IRP devoid of aconitase activity, is primarily regulated by iron-dependent degradation. IRPs bind the 3' UTR of TfR1 mRNA, preventing it from degradation and allowing cells to import more iron. IRPs also bind the 5' UTR of ferritin mRNAs, thereby inhibiting ferritin synthesis. In high-iron conditions, IRP1 is converted into aconitase and IRP2 is degraded, promoting iron storage and limiting iron entry. Up until now, this post-transcriptional regulation was the only mechanism reportedly known to maintain homeostatic levels of iron primarily via the control of TfR1 and ferritin amounts.⁵

After studying cultured skin fibroblasts of a series of subjects carrying mutations in both known and previously unreported genes, we report abnormal iron homeostasis and impaired palmitoylation and recycling of TfR1 as common features in NBIA, irrespective of the original defect. This observation paves the way for therapeutic strategies in this devastating group of diseases.

¹UMR 1163, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut IMAGINE, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France; ²Laboratory of Excellence GR-Ex, Institut IMAGINE, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France; ³Plateau Technique de Cytométrie et d'Imagerie Cellulaires, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US 24, Centre National de la Recherche Scientifique, UMS 3633, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France; ⁴Biochimie Métabolomique et Protéomique, Hôpital Necker – Enfants Malades, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France; ⁵UMR 7592, Université Paris Diderot and Institut Jacques Monod, Centre National de la Recherche Scientifique, 15 rue Hélène Brion, 75013 Paris, France; ⁶Departments of Pediatrics, Radiology, and Genetics, Hôpital Necker – Enfants Malades, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France

⁷These authors contributed equally to this work

*Correspondence: agnes.rotig@inserm.fr

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.01.003>

© 2018 American Society of Human Genetics.



Material and Methods

Informed consent for diagnostic and research studies was obtained for all subjects in accordance with the Declaration of Helsinki protocols and approved by local institutional review boards in Paris.

Exome Sequencing

Exome sequencing was performed on genomic DNA (1 µg) isolated from blood leukocytes. Exons were captured by the in-solution enrichment methodology (SureSelect Human All Exon Kit v.3, Agilent) with the company's biotinylated oligonucleotide probe library (Human All Exon v.3 50 Mb, Agilent). Each genomic DNA was then sequenced on a sequencer as 75 paired-end bases (Illumina HiSeq2000, Illumina). Image analyses and base calling were performed with Real Time Analysis Pipeline v.1.9 with default parameters (Illumina). Sequences were aligned to the human genome reference sequence (UCSC Genome Browser hg19 assembly). SNPs were called with the Consensus Assessment of Sequence and Variation (CASAVA) pipeline (v.1.8, Illumina) on the basis of the allele calls and read depth. Known SNPs reported in dbSNP, 1000 Genomes, the NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, and in-house SNP database—as well as intergenic, non-coding RNA, and UTR variants—were excluded.

Cell Culture

Skin fibroblasts were isolated from subjects 1 and 3 and from four NBIA subjects carrying biallelic *PANK2*, *PLA2G6*, *C19ORF12*, and *FA2H* mutations (Table S1). Fibroblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 2.5 mM pyruvate, 100 µg/mL streptomycin, and 100 U/mL penicillin at 37°C. For treatment with ferric ammonium citrate (FAC), 90% confluent cells were incubated for 72 hr with or without 100 µM FAC in serum-free DMEM (i.e., Tf free). HeLa cells were grown in the same medium.

Modeling of the Human CRAT Variant

The 1.6 Å coordinate set for human CRAT (PDB: 1NM8) was used for mapping the Arg321 residue. Swiss-PdbViewer 3.7 was used for analyzing the structural insight into the CRAT variant and visualizing the structures.

β-Oxidation of Palmitoyl-CoA

Cells seeded in 6-well plates were incubated when confluent with 250 µM ¹³C₁₆-labeled palmitate, fatty-acid-free bovine serum albumin (palmitate/albumin molar ratio: 4/1) and 0.4 mmol/L carnitine for 6 hr. Cells were removed by trypsinization and, after being washed with PBS, stored at –80°C until analysis. For acylcarnitine analysis, pellets were resuspended in 60 µL deionized water and briefly sonicated. Mixed internal standards (20 µL 20 µM ²H₉-L-carnitine, 4 µM ²H₃ octanoylcarnitine, and 1 µM ²H₃ octadecanoylcarnitine) were added to 45 µL cell homogenate. Proteins were precipitated by the addition of 400 µL ethanol, and the supernatant was extracted twice with 400 µL hexane. The aqueous layer was transferred in a vial, dried under nitrogen, and reconstituted with 100 µL acetonitrile/water (1:1 v/v, 0.025% formic acid). Acylcarnitines were analyzed on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems), which detected precursors of *m/z* 85 and quantified them by comparing deuterated internal standards. Proteins were measured by the Lowry method.

Immunoblotting

Cultured skin fibroblasts or HeLa cells were harvested on ice by being scraped in reducing (2 µM dithiothreitol [DTT] and denaturation at 95°C for 5 min) or non-reducing (no DTT and no heat denaturation) cell lysis buffer. SDS-PAGE was performed on whole-cell protein extracts in 10% acrylamide gel. Immunodetections were performed in PBS with 5% milk and 0.05% Tween20 (SIGMA) with the following antibodies: rabbit anti-CRAT (HPA022815, Sigma), mouse anti-REPS1 (ab69221), mouse anti-SOD1 (ab86454), mouse anti-TfR1 (136890, Zymed), rabbit anti-ferritin (ab75973), rabbit anti-IRP1 (ab126595), rabbit anti-IRP2 (ab80339), mouse anti-GRIM19 (ab110240), rabbit anti-catalase (ab16731), rabbit anti-FBXL5 (ab140175), rabbit anti-LC3B (ab51520), and mouse anti-actin antibodies (ab8226). HRP-conjugated goat anti-mouse IgG H&L (ab6789) and goat anti-mouse IgG H&L (ab6789) antibodies were used as secondary antibodies before electrochemiluminescence-based detection (SuperSignal West Dura, Thermo Fisher Scientific). Images were visualized and treated with a CCD camera (Bio-Rad) and ImageLab software (Bio-Rad). Quantification was performed with Bio-Rad imageLab 5.1 and Sigmaplot 13. Detection of carbonyl groups was performed with the OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (S7150, Chemicon) according to the manufacturer's recommendations.

Knockdown of CRAT

HeLa cells were plated at 80% confluence in 6-well plates on the day before transfection. Cells were transfected with Dharmafect 1 (Dharmacon) and 50 nM siRNA per target in 10% FBS antibiotic-free OPTIMEM, as recommended by the manufacturer. Palmitoyl-CoA β-oxidation and immunoblotting were performed 2 days after transfection. Small interfering RNAs (siRNAs) purchased from Dharmacon were as follows: human carnitine O-acetyltransferase (*CRAT* [MIM: 600184]) siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool L-009524-00-0005) and human non-targeting pool siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool).

Overexpression of CRAT and REPS1

The full-length *CRAT* and *REPS1* (RALBP1-associated Eps-domain-containing 1 [MIM: 614825]) cDNAs were cloned in the pLenti7.3 expression vector. For virus production, HEK293FT cells were plated 3 days before transfection in DMEM supplemented with 10% of heat-inactivated FBS (10270106, Invitrogen) at 80% confluence. HEK293FT cells were co-transfected with 30 µL JetPRIME PolyPLUS reagents with the three packaging plasmids REV, VSVG, and PAX2 and the pLenti7.3 expression vector containing either *CRAT* or *REPS1* cDNAs with a 1:3:6:10 DNA ratio. The supernatant containing the viral particles was collected every 12 hr during 3 days, centrifuged at 5,000 rpm for 5 min, filtered through a 0.8 µm filter, and centrifuged for 2 hr at 19,000 rpm at 4°C. Pellets were collected and resuspended in 200 µL DMEM. The fibroblasts were then transduced at 60%–70% confluence with a multiplicity of infection of 5.

Quantification of *TFRC* Transcripts

Total RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) and DNase treated by the RNase-free DNase Set (QIAGEN) according to manufacturer's protocol. The concentration and purity of total RNA were assessed with the NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) before being stored at –80°C. Then, mRNAs were reverse transcribed from 2 µg total RNA with the

High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) and random priming according to the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed with digital droplet PCR (ddPCR) with the QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad). Transferrin receptor (*TFRC* [MIM: 190010]) cDNAs were amplified with specific primers. β -glucuronidase (*GUSB* [GenBank: NM_000181.3]) was used for normalization. Primers are shown in Table S2. Data from triplicates were analyzed on a droplet flow cytometer (QX200 Droplet Reader) with QuantaSoft analysis software (Bio-Rad). *TFRC* expression levels were normalized to the mean copy numbers of the housekeeping gene *GUSB*.

Iron Content and Imaging Flow Cytometry (Imagestream)

Total iron contents were measured with a ferrozine-based iron assay modified from Barbeito et al.⁶ For imaging flow cytometry, fibroblasts (1×10^6 to 2×10^6) were starved for 1 hr in FBS-free DMEM, treated with 5 mM EDTA for harvesting them without disrupting TfR1 located at the cell surface (as trypsin does), washed three times with cold PBS, and then labeled with anti-TfR1 antibodies (A24)⁷ for 1 hr on ice to avoid TfR1 internalization. In this condition, only membrane-bound TfR1 was quantified. Secondary staining was performed with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse antibody for 30 min on ice. Cells were washed and stained with Hoechst for 5 min in a total volume of 50 μ L, and acquisitions were directly performed. Cell analysis was based on Hoechst-positive signal, allowing selection of living cells. Samples were run on an Imagestream ISX mkII (Amnis) that combines flow cytometry with detailed cell-imaging and functional studies, and a 40 \times magnification was used for all acquisitions. Data were acquired with INSPIRE software (Amnis) and analyzed with IDEAS software (v.6.2, Amnis). At least 20,000 events were collected in all experiments. Single-stain controls were run for each fluorochrome used, and spectral compensation was performed. Cells were gated for a single cell with the area and aspect ratio of the bright-field image and gated for focused cells with the gradient RMS feature. A specific mask was designed for analysis of the membrane localization of TfR1. Results were expressed as a mean pixel intensity value, which is the intensity normalized to surface area. Data analyses were performed with IDEAS software (Amnis). Data were compensated with a compensation matrix generated with singly stained samples. Gated data were used for generating histograms measuring fluorescence intensity (sum of all pixels in an image) at the plasma membrane with a specific mask. This mask was the result of a full bright-field mask minus a 10 pixel erode bright mask, resulting in a doughnut-like mask. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism (v.5.0; GraphPad Software).

Confocal Microscopy

For Tf recycling, fibroblasts were spread at 40% confluence onto 12-well plates containing glass slides 48 hr before experiments. Cells were then starved in FBS-free DMEM for 1 hr at 37°C. Tf-RED (25 μ g/mL) was then added for 30 min. Cells were washed three times with PBS and then incubated for 0, 5, 10, or 30 min in FBS-free DMEM. Finally, cells were washed in PBS and fixed in 4% cold paraformaldehyde (PFA). Slides were mounted in DAPI containing Diamond Prolong mounting media (Thermo Fisher Scientific). Slides were examined with a confocal laser microscope (Leica TCS SP8 SMD). Image analysis was performed with ImageJ software. For each independent experiment, at least 30 cells were collected per slide. Each field was selected from DAPI-positive

staining, which was used for defining the nuclear region (NR). Each NR was enlarged by 10 pixels for the generation of the perinuclear region of interest (PNROI). The image calculator then applied PNROI masks on the RED channel to obtain quantitative mean fluorescence particle intensity. Only particles of at least 8 pixels were considered. Red fluorescence intensity thresholds were determined according to non-incubated Tf-RED cells.

For Tf and TfR1 trafficking, fibroblasts were spread at 40% confluence onto 12-well plates containing glass-slides 48 hr before experiments. Cells were then starved in FBS-free DMEM for 1 hr at 37°C. Tf-RED (25 μ g/mL) was then added for 30 min. Cells were washed three times with PBS and then incubated for 10 min in FBS-free DMEM. Finally, cells were washed in PBS and fixed in 4% cold PFA. Confocal microscopy was performed as previously described⁸ with rabbit anti-Rab11A (71-5300, Zymed), mouse anti-LAMP2 (ab25631), Alexa-Fluor-488-conjugated goat anti-mouse IgG (A-11001, Thermo Fisher Scientific), Alexa-Fluor-594-conjugated goat anti-rabbit IgG (A-11012, Thermo Fisher Scientific) and ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (P36962, Thermo Fisher Scientific).

Palmitoylation Assay

TfR1 palmitoylation in cultured skin fibroblasts was modified from Ba et al.⁹ In brief, cells were lysed on ice in a DTT-free cell lysis buffer, and endogenous TfR1 was immunoprecipitated with mouse anti-TfR1 antibody (Zymed) with protein G magnetic beads (Bio-Rad). After being washed with PBS, beads were incubated overnight with 50 mM N-ethylmaleimide at 4°C, washed three times with PBS, and then incubated with 1 M hydroxylamine at room temperature for 2 hr. After three washes, the beads were incubated with 50 mM HPDP-Biotin (Thermo Fisher Scientific) in the dark for 2 hr. Samples were run in 7.5% acrylamide gel, and the biotin-labeled TfR1 level was determined by immunoblotting in non-reducing conditions with a goat anti-biotin antibody (Thermo Fisher Scientific), whereas immunoblotting with rabbit anti-TfR1 antibody (Abcam) was used as a loading control.

Statistics

All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software) or SigmaPlot 11 (SYSTAT Software) with a two-tailed, unpaired t test or one-way ANOVA for multiple comparisons by the Holm-Sidak method (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$).

Results

Abnormal Iron Content and Homeostasis in Cultured Fibroblasts of NBIA Subjects

Iron content was quantified in cultured fibroblasts of NBIA subjects (Table S1) with a ferrozine-based colorimetric assay in either low-iron (–FAC; no FBS, i.e., devoid of Tf-bound iron) or high-iron (+FAC) conditions. FAC is a soluble NTBI form that permeates into cells opportunistically via resident transporters or endocytic pathways.⁴ In low-iron conditions (no FAC or FBS), relatively similar iron content was observed in fibroblasts of control and NBIA subjects (Figure 1A). After a 3 day incubation with FAC, all fibroblasts from NBIA subjects tested exhibited a major cellular iron increase (10- to 30-fold change), whereas control fibroblasts displayed an 8-fold increase

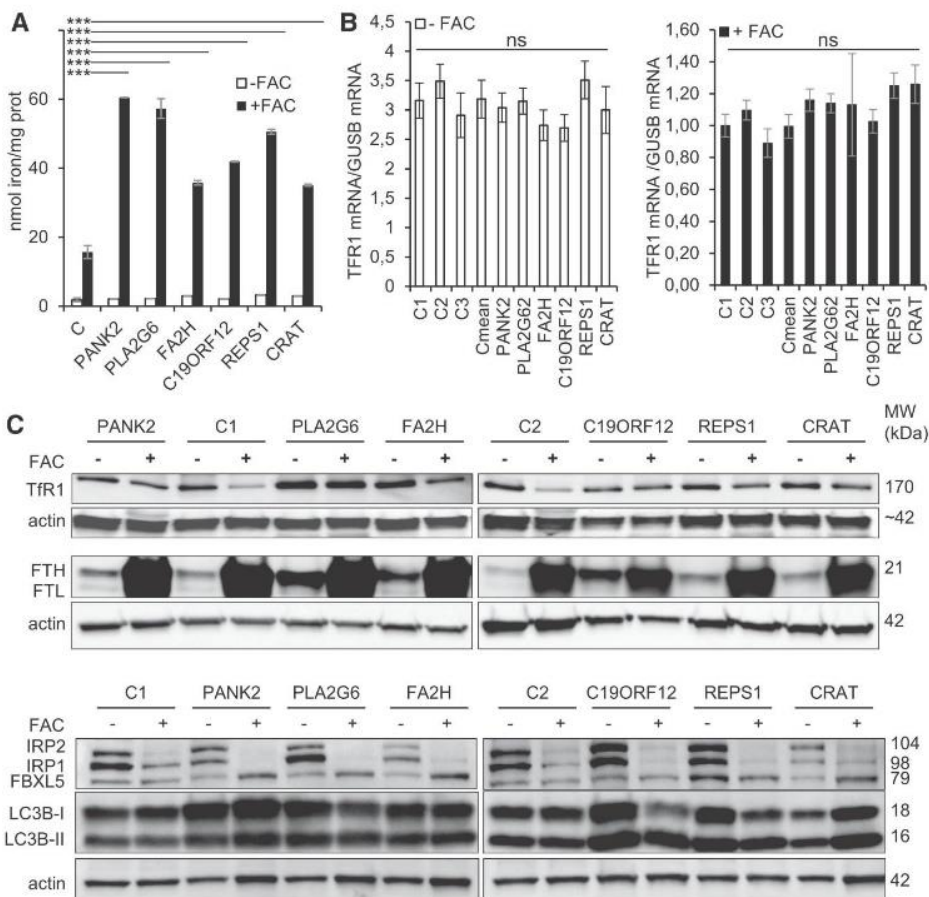


Figure 1. Iron Content and Regulation of Iron Homeostasis in Fibroblasts of NBIA Subjects

(A) Iron quantification using the ferrozine-based colorimetric assay in control (C; mean of 3 controls) and NBIA subject fibroblasts grown in FBS-free DMEM and low-iron (–FAC) or high-iron (+FAC) conditions. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. A Student-Newman-Keuls ANOVA multifactorial test was used (** $p < 0.001$ [considered significant]; ns, non-significant).

(B) Post-transcriptional regulation of iron homeostasis in control and NBIA subject fibroblasts grown in FBS-free DMEM in –FAC or +FAC conditions. *TFRC* mRNAs were quantified by ddPCR and expressed as a ratio to *GUSB* mRNA. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. The significance of variations among samples and controls was estimated by the one-way Holm-Sidak method.

(C) Steady-state levels of proteins involved in iron homeostasis. Tfr1, IRP1, IRP2, FBXL5, and LC3B were studied in non-reducing conditions (7.5% acrylamide, no DTT, and no heat denaturation), and ferritin was studied in reducing conditions in control (C1 and C2) and NBIA subject fibroblasts grown in FBS-free DMEM in –FAC or +FAC conditions. Actin was used as a loading control. Immunoblotting quantification is presented in Figure S1.

($p < 0.001$; Figure 1A). These data suggest abnormal iron homeostasis and a possible dysregulation of iron uptake in NBIA.

Conversely, quantification by ddPCR of *TFRC* mRNAs failed to detect differences between control and subject cells grown in either –FAC or +FAC conditions, suggesting a normal downregulation of *TFRC* RNA transcripts in NBIA in +FAC conditions (Figure 1B). Immunoblot analyses of cultured fibroblasts of NBIA and control subjects grown in –FAC conditions detected similar levels of IRP2 and of a reduced form of IRP1, both of which represent reliable indicators of cell iron status. Moreover, a consistent increase in H- and L-ferritin reflected cellular iron overload in fibroblasts from NBIA subjects (Figure 1C and Figure S1). In control cells, exposure to high amounts of iron (+FAC) resulted in reduced expression of IRPs and consequently in reduced iron uptake concomitant with an increase in ferritins (H and L).

Most interestingly, in fibroblasts of NBIA subjects exposed to high amounts of iron (+FAC), Tfr1 levels failed to decrease, whereas those of IRPs and ferritin responded similarly to those of control subjects. The same was observed with FBXL5, an iron-sensor protein reflecting the size of the labile iron pool (Figure 1C and Figure S1). Downregulation of Tfr1 normally results from the combined decrease in *TFRC* transcripts⁵ and degradation of Tfr1 in the lysosome.¹⁰ Considering that pre-translational regulation of Tfr1 was unaffected in cells from NBIA

subject, our results suggest non-canonical, post-translational regulation of Tfr1 and its alteration in NBIA. Given that we consistently observed increased amounts of LC3B-II in fibroblasts from NBIA subjects exposed to high amounts of iron (Figure 1C and Figure S1), these data suggest deficient targeting of Tfr1 to lysosomes and a reduced degradation of Tfr1 in NBIA. Similar abnormal iron overload and Tfr1 deregulation were also observed in fibroblasts of another subject (PLA2G6-2) with *PLA2G6* mutations (c.[109C>T];[386T>C], p.[Arg37*];[Leu129Pro]; Figures S3A–S3C).

Mutations in *REPS1* and *CRAT* Are Associated with Abnormal Iron Homeostasis

Exome sequencing in two sisters (subjects 1 and 2; see Supplemental Note) detected compound heterozygosity for *REPS1* missense variations c.232G>C (p.Val78Leu) and c.338C>A (p.Ala113Glu) (dbSNP: rs201191394; ExAC Browser: A = 0.011%; Figure 2A), which are predicted to be deleterious by *in silico* analyses (Table S1). The variations co-segregated with the disease in the family and were absent from 110 NBIA subjects and 200 control chromosomes (data not shown). Immunoblot analysis detected low amounts of REPS1 in cultured fibroblasts of subject 1 (Figure 2B).

RalBP1 proteins, including REPS1, are involved in endocytosis and vesicle transport. REPS1, an endocytic adaptor localized in clathrin-coated pits, interacts with endocytic

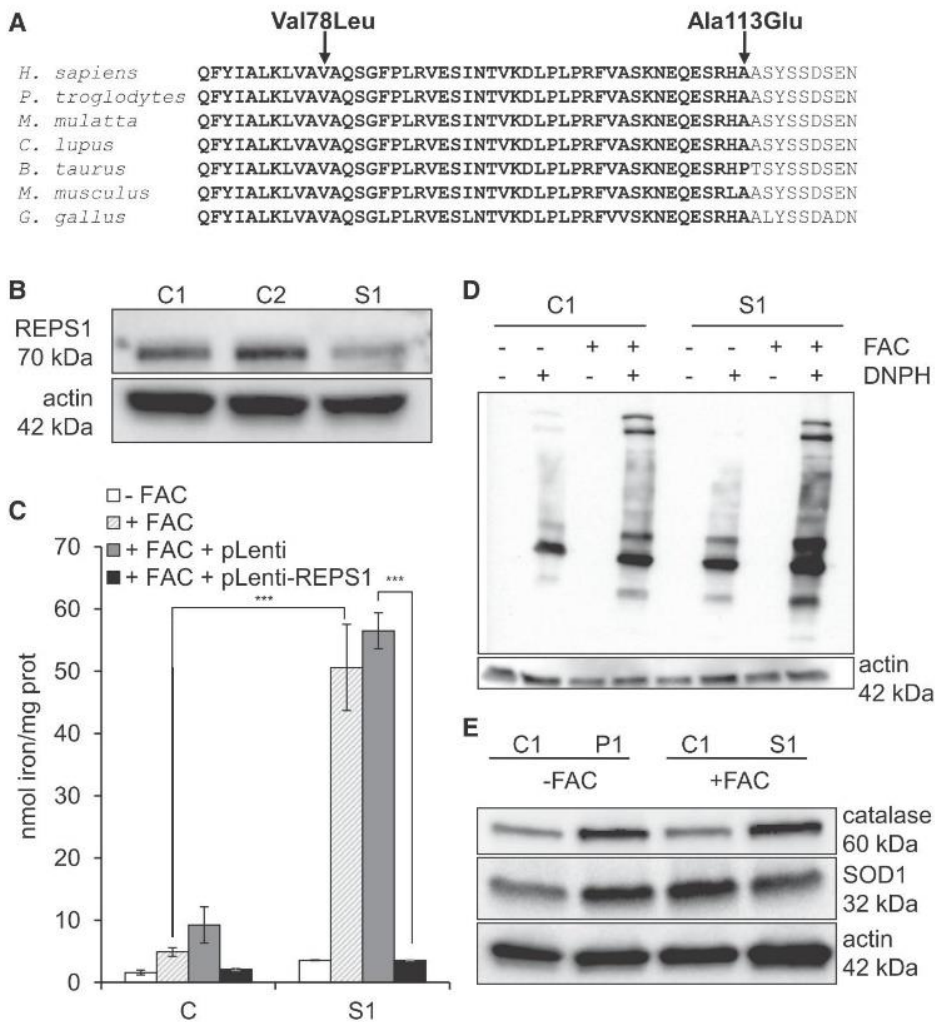


Figure 2. REPS1 Variants

(A) Sequence alignment of REPS1 proteins from various species. The arrows indicate the amino acid changes. Bold letters indicate the first epsin 15 homology (EH1) domain.

(B) Immunoblot analysis of REPS1 in subject 1 (S1) and two control fibroblasts (C1 and C2). Actin was used as a loading control. Data represent three independent experiments.

(C) Iron quantification in control (C; mean of three control values) and S1 fibroblasts alone or transduced with pLenti7.3 with or without WT REPS1 cDNA by ferrozine-based colorimetric assay and after incubation with or without FAC (+FAC or -FAC, respectively) for 3 days. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. Two-tailed Student's paired or unpaired t tests were used as appropriate (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

(D) Protein oxidation status in -FAC or +FAC conditions in control and S1 fibroblasts. Proteins were treated with or without 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), a derivatization solution. Data represent three independent experiments.

(E) Immunoblot analysis of catalase and SOD1 in S1 and control (C1) fibroblasts in -FAC or +FAC conditions. Actin was used as a loading control. Data represent three independent experiments.

scaffold intersectin 1 (ITSN1), a key protein in clathrin-mediated endocytosis.¹¹ REPS1 belongs to the Numb endocytic complex and helps recruit RalBP1 to this complex.¹² It is ubiquitously present and conserved across species and contains two Epsin 15 homology domains (EH1 and EH2) involved in protein-protein interactions.^{13,14} Both variants are located in the EH1 domain, a conserved region interacting with RalBP1 (Figure 2A). REPS1 also interacts with Rab11-FIP2, located at the membrane of early endosomes.¹⁵ Binding of REPS1 to Rab11-FIP2 induces the fusion of uncoated vesicles with the early endosome, forming the endosome recycling compartment.¹⁶

When incubated with FAC, fibroblasts with REPS1 mutations displayed a 10-fold increase in iron content similar to that of other NBIA strains (Figures 1A and 2C), and transduction of wild-type (WT) REPS1 cDNA returned iron content to control values in subject fibroblasts (Figure 2C). Labile iron is known to induce oxidative stress by the Fenton reaction. Oxyblot of subject 1 cultured fibroblasts detected slightly increased protein oxidation in -FAC conditions. By contrast, a major increase was observed in +FAC conditions (Figure 2D). Accordingly, steady-state levels of catalase and superoxide dismutase 1 (SOD1) were higher in subject 1 fibroblasts than in control cells in low-iron conditions (Figure 2E). Adding FAC to the culture medium increased protection against free-radical

injury in control but not in subject 1 fibroblasts, suggesting that the maximum level of protection was already achieved in basal conditions. We conclude that biallelic REPS1 mutations cause NBIA by a mechanism that impairs endosome recycling.

SNP genotyping and exome sequencing in subject 3 (see Supplemental Note) identified the homozygous CRAT variant c.962G>A (dbSNP: rs138665095; ExAC Browser: A = 0.0042%), which alters a highly conserved amino acid residue (p.Arg321His; Figure 3A). The variant was absent from 110 NBIA subject and 200 control chromosomes (data not shown). CRAT belongs to the carnitine acyltransferase family, which catalyzes the reversible transfer of acyl groups from carnitine to coenzyme A (CoA) and regulates the acyl-CoA/CoA ratio. CRAT also plays a crucial role in the transport of fatty acids for β -oxidation.¹⁷ Immunoblot analysis failed to detect CRAT in subject 3 fibroblasts (Figure 3B), and on the basis of the crystal structure, the p.Arg321His substitution was expected to destabilize the protein (Figure 3C), given that Arg321, the first residue of an α helix, is involved in the formation of hydrogen bonds with the surrounding amino acids.

Studying β -oxidation of U-¹³C₁₆ palmitate in cultured fibroblasts of subject 3 detected lower C₂ levels than in control cells (Figure 3D), and knocking down CRAT

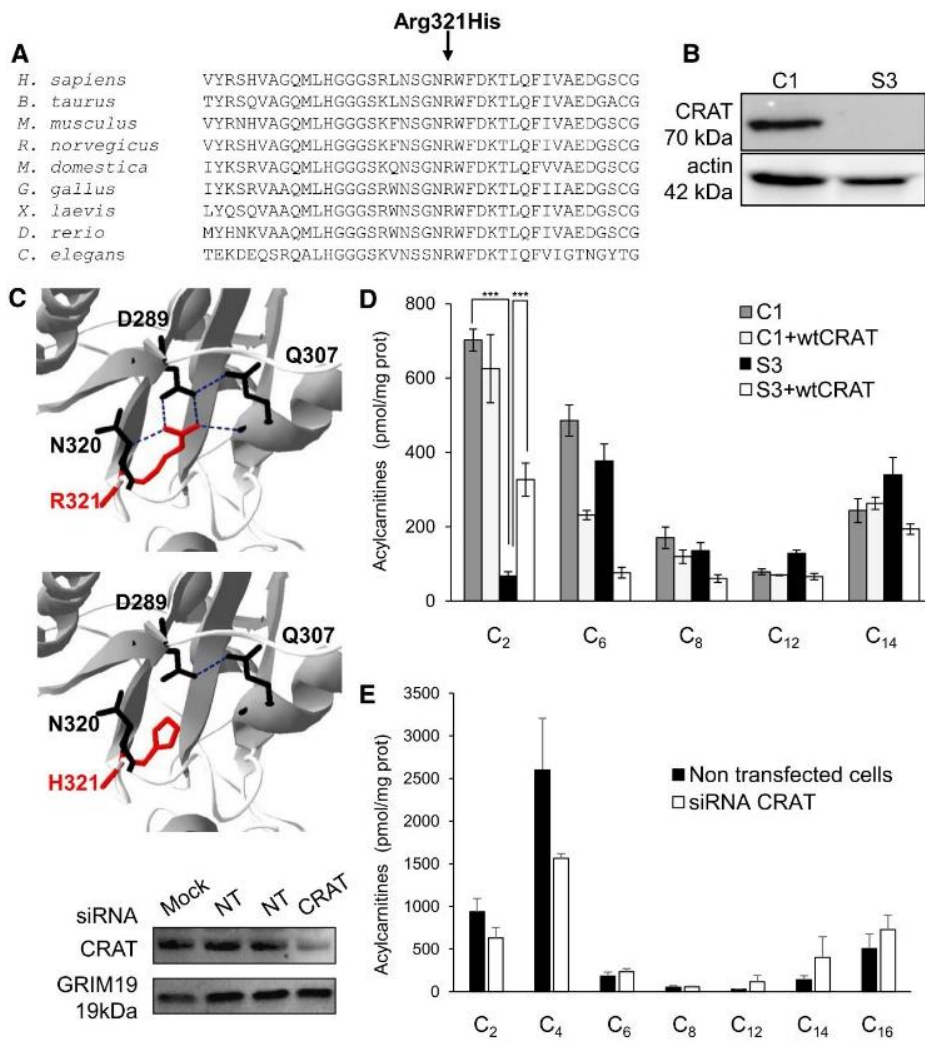


Figure 3. CRAT Variant

(A) Sequence alignment of CRAT proteins from various species. The arrow indicates the amino acid change.

(B) Immunoblot analysis of CRAT in control (C1) and subject 3 (S3) fibroblasts. Actin was used as a loading control.

(C) Localization of the p.Arg321>His (in red) substitutions in a crystallized model of human CRAT. The hydrogen (H) bonds (in blue) between Arg321 and Asp289, Gln307, and Asn320 are shown in the normal protein. The p.Arg321His change modified the H bonds with these three residues.

(D) Palmitoyl-CoA β -oxidation measured by U-¹³C₁₆-labeled palmitate tracer experiments and mass spectrometry in control (C1) and S3 fibroblasts alone or transduced with pLenti7.3 WT CRAT cDNA.

(E) Knockdown of CRAT in HeLa cells by siRNAs. Left: immunoblot analysis showing the efficiency of knockdown (NT, non-targeted siRNA; GRIM19 was used as a loading control). Right: palmitoyl-CoA β -oxidation measured by U-¹³C₁₆-labeled palmitate tracer experiments and mass spectrometry in HeLa cells knocked down or not for CRAT.

Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. Two-tailed Student's paired or unpaired t tests were used as appropriate (**p* < 0.05, ****p* < 0.001). Immunoblots in (B) and (E) represent three independent experiments.

expression by siRNA markedly reduced β -oxidation of labeled palmitoyl-CoA in HeLa cells and C₂-C₄ acylcarnitine derivatives in comparison with control levels (Figure 3E), a pattern similar to that observed in cultured fibroblasts of subject 3. Conclusive evidence for the disease-causing nature of the CRAT variation was provided by the lentiviral transduction of WT human CRAT cDNA into fibroblasts of subject 3, followed by a shift of palmitoyl-CoA β -oxidation toward control values (Figure 3D). Finally, when incubated with FAC, fibroblasts with CRAT mutations displayed a 10-fold increase in iron content similar to that of other NBIA strains (Figure 1A). We conclude that biallelic CRAT mutations cause NBIA by another mechanism in this family.

Impaired Tf Trafficking and TfR1 Recycling in Fibroblasts of NBIA Subjects

Next-generation imaging flow cytometry revealed increased amounts of TfR1 at the cell surface of NBIA subjects' fibroblasts (Figure 4A), and quantification using IDEAS software confirmed increased TfR1 signal in affected individuals' fibroblasts (Figure 4B). This result suggests that, despite iron overload, NBIA compromises the downregulation of iron uptake by TfR1 in cultured fibroblasts. Confocal microscopy using Tf-RED gave

further support to this view. Indeed, perinuclear fluorescence after a 30 min Tf-RED pulse and chase showed a rapid decrease in Tf staining, ascribed to normal Tf recycling in control fibroblasts (Figures 5A and 5B). By contrast, Tf recycling was significantly delayed in NBIA subjects' fibroblasts given that Tf signal failed to decline after the Tf-RED pulse. Moreover, Tf signal accumulated in the vicinity of the nucleus and persisted after 10 min and longer (Figure 5A). These results are consistent with an impairment of receptor-mediated endocytosis and endosome recycling in NBIA.

Tf and TfR1 staining colocalized and were evenly distributed in control cells (Figure 6A). Tf-TfR1 staining partly colocalized with RAB11A, a marker of the recycling compartment, or was located in lysosomes, given that Tf also colocalized with a lysosomal marker (LAMP2; Figure 6B). Moreover, Tf and TfR1 signals were more intense in NBIA subjects' fibroblasts. They clustered in the perinuclear region and were associated with enhanced staining of RAB11A, suggesting an impairment of endosome recycling (Figure 6A). Of note, all NBIA subjects' fibroblasts showed abnormally shaped, enlarged lysosomes with decreased Tf/LAMP2⁺ structures (Figure 6B), consistent with the increased LC3B-II signal detected by immunoblotting (Figure 1C) and suggestive of

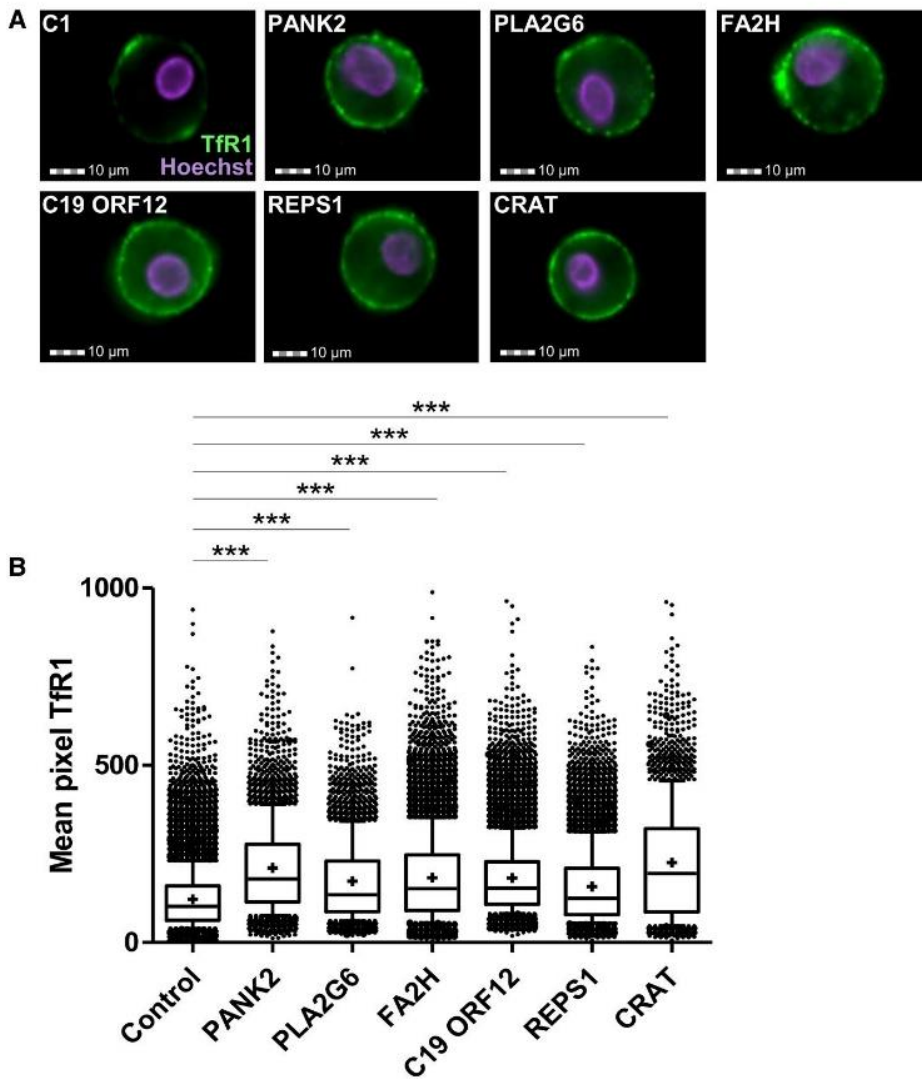


Figure 4. Quantification of TfR1 Amounts at the Cell Surface of Control and NBIA Subject Fibroblasts

(A) Examples of TfR1 labeling in fibroblasts of control (C1) and NBIA subjects. Cell analysis was based on Hoechst-positive signal. Scale bar, 10 μm.

(B) Quantification of membrane-bound TfR1 signal on at least 20,000 fibroblasts was performed with IDEAS software (Amnis). The control value is the mean of three different control fibroblasts. Data represent the means ± SEM of three independent experiments (+ indicates the mean). The boxplots correspond to the first, median, and third quartiles. Two-tailed Student's unpaired t tests or Mann-Whitney U tests were used as appropriate (**p < 0.01 [considered significant]).

impaired TfR1 degradation. These results were also observed in another PLA2G6 subject's fibroblast cell line (data not shown).

TfR1 Palmitoylation in Fibroblasts of NBIA Subjects

TfR1 is post-translationally modified by the covalent attachment of S-acyl via thioester bonds to Cys62 and Cys67,¹⁹ where palmitate is the predominant fatty acid. Considering that palmitoylation decreases cell-surface density and endocytosis of TfR1⁹ and that acetyl-CoA is the sole donor of acetyl groups for acetyl transferases, we hypothesized that CoA deficiency related to PANK2 and CRAT mutations might reduce TfR1 palmitoylation. By studying TfR1 palmitoylation in PANK2- and CRAT-deficient fibroblasts by fatty acyl exchange chemistry, we showed a reduced palmitoylation of TfR1 in subject cells, suggesting that impaired CoA biosynthesis directly alters TfR1 palmitoylation (Figure 7A and Figure S2). Interestingly, this observation was not specific to PANK2 and CRAT strains, given that a major palmitoylation defect was also observed in other NBIA cell lines (particularly in C19ORF12 and PLA2G6 mutant fibroblasts; Figure 7A and Figure S2). Supplementation of fibroblasts with PANK2

and CRAT mutations with 25 μM CoA for 72 hr resulted in increased TfR1 palmitoylation (Figure S3D), suggesting that CoA depletion related to PANK2 and CRAT defects is directly related to TfR1 palmitoylation.

Artesunate is known to inhibit liver and ovarian cancer growth by disrupting cellular iron homeostasis via the induction of TfR1 palmitoylation and the reduction of cell-surface TfR1.⁹ Artesunate (25 μM) enhanced TfR1 palmitoylation in fibroblasts from control and NBIA subjects (Figure 7A and Figure S2) and lowered steady-state levels of ferritin, reflecting a decrease in total iron content (Figure 7B and Figure S2).

Discussion

Transferrin-bound iron is known to be delivered to cells by TfR1 after internalization via clathrin-mediated endocytosis. Subsequent endosomal trafficking allows for its recycling to the plasma membrane. Iron stored in uncoated vesicles is normally released into the cytoplasm after vesicle acidification that occurs before this vesicle is fused with endosomes, the latter of which is mediated by the binding of REPS1 to RalBP1.

After studying cultured fibroblasts of NBIA subjects with known disease-causing biallelic mutations, we report increased cellular iron and abnormal TfR1 recycling as common features in NBIA. Increased cellular iron, with paradoxically enhanced steady-state TfR1 levels and delayed Tf or TfR1 recycling, was observed in all cell types tested, suggesting that this is a generic feature of NBIA. Hence, irrespective of the diversity of mutated genes and affected functions, it appears that iron overload in NBIA results from a single disease mechanism, i.e., abnormal TfR1

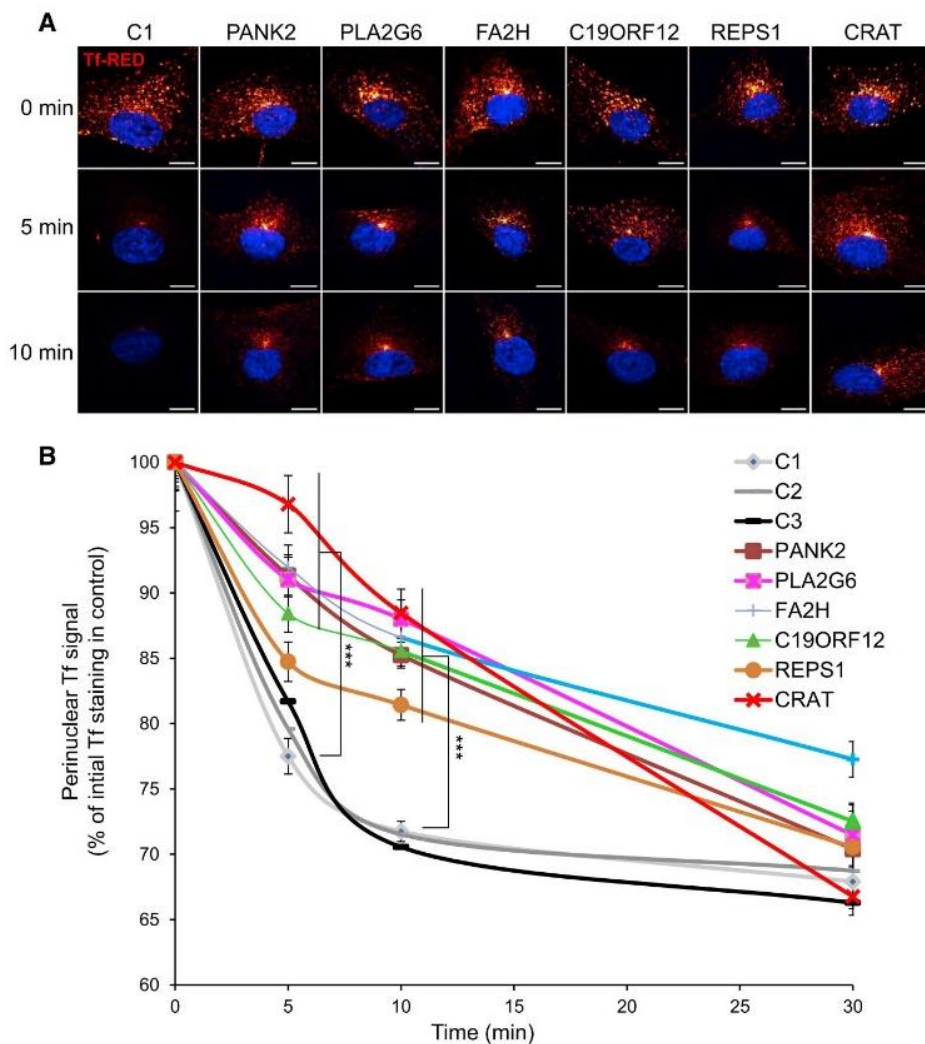


Figure 5. Defective Tf Recycling in Fibroblasts of NBIA Subjects

(A) Tf-RED signal 0, 5, and 10 min after incubation of control (C1) and NBIA subject fibroblasts with Tf-RED in FBS-free medium for 30 min at 37°C. The figure was produced with the ImageJ plugin FigureJ.¹⁸ Scale bar, 10 μ m.

(B) Relative mean fluorescence intensity of Tf-RED signal followed for 30 min in control (C1–C3) and NBIA subject fibroblasts as a percentage of Tf-RED initial staining in control cells. The apparently normal Tf signal at 30 min is due to the fact that the defined threshold for Tf detection in the perinuclear region at 0 min was higher than the Tf signal at the end of the experiment. The number of cells analyzed was higher than 30 in three independent experiments. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. An ANOVA multifactorial test by the Holm-Sidak method was used (***p* < 0.001 [considered significant]).

recycling. Of note, abnormal TfR1 recycling has been previously reported in phospholipase-A2-deficient models, where phospholipase A2 antagonists inhibited its recycling at the level of early sorting and late recycling endosomes.^{20,21} Together, these results suggest that defective endosome recycling is a common disease mechanism in NBIA and that NBIA should be regarded as a trafficking disease, whatever the original defect.

An increased amount of TfR1 in the context of iron overload is paradoxical, because stored iron should normally downregulate TfR1. In keeping with this, increases in TfR1, albeit to a lesser extent, have been previously reported after *PANK2* silencing in HeLa cells,²² whereas fibroblasts carrying *PANK2* mutations failed to reduce TfR1.²³ Different growth medium could explain these discrepancies. Here, post-transcriptional regulation of TfR1 by IRPs functioned normally, given that *TFRC* transcripts were efficiently downregulated in +FAC conditions. High amounts of TfR1 in NBIA are suggestive of post-translational dysfunction possibly related to impaired palmitoylation of the receptor. Several findings support defective palmitoylation in NBIA: (1) two genes, *CRAT* and *PANK2*, are involved in the CoA production required for palmitoylation, defective palmitate β -oxidation was found in *CRAT*-deficient fibroblasts, and CoA supplementation of

(2) previous metabolic profiling experiments have shown decreased amounts of palmitic acid and reduced lipid biosynthesis in *PANK2*-deficient fibroblasts;²⁴ (3) *COASY*-deficient fibroblasts displayed low amounts of acetyl and total CoA, which are expected to decrease palmitic acid;²⁵ (4) phospholipase-A2-deficient mice displayed reduced palmitate β -oxidation;²⁶ and finally (5), impaired CoA synthesis related to *PANK2* mutations reportedly induced alterations in histone and tubulin acetylation.²⁷ Another NBIA gene, *FA2H*, encodes a fatty acid hydroxylase, but no metabolic studies have been reported in *FA2H* subjects. Together, these data support the view that impaired palmitoylation of TfR1 is a common feature of NBIA. Therefore, we hypothesize that iron overload in NBIA results from (1) increased cell-surface amounts of TfR1 caused by impaired TfR1 palmitoylation and/or (2) the abnormal release of cytosolic iron stored in uncoated vesicles caused by defective endosome recycling.

TfR1 is known to be post-translationally modified by S-acylation, particularly palmitoylation, given that palmitate (C16:0) is the major lipid donor to S-acylated proteins. The amount of TfR1 palmitoylation controls cellular iron, given that substitutions at Cys62 and Cys67, the major sites of TfR1 palmitoylation, cause increased TfR1 internalization and iron overload.¹⁹ Conversely, dihydroartemisinin, an artemisinin derivative widely used as an anti-malarial drug and known to increase palmitoylation, has been shown to reduce membrane-associated TfR1 and decrease iron content.⁹ Although a number of endosome recycling proteins are palmitoylated, it is also possible that

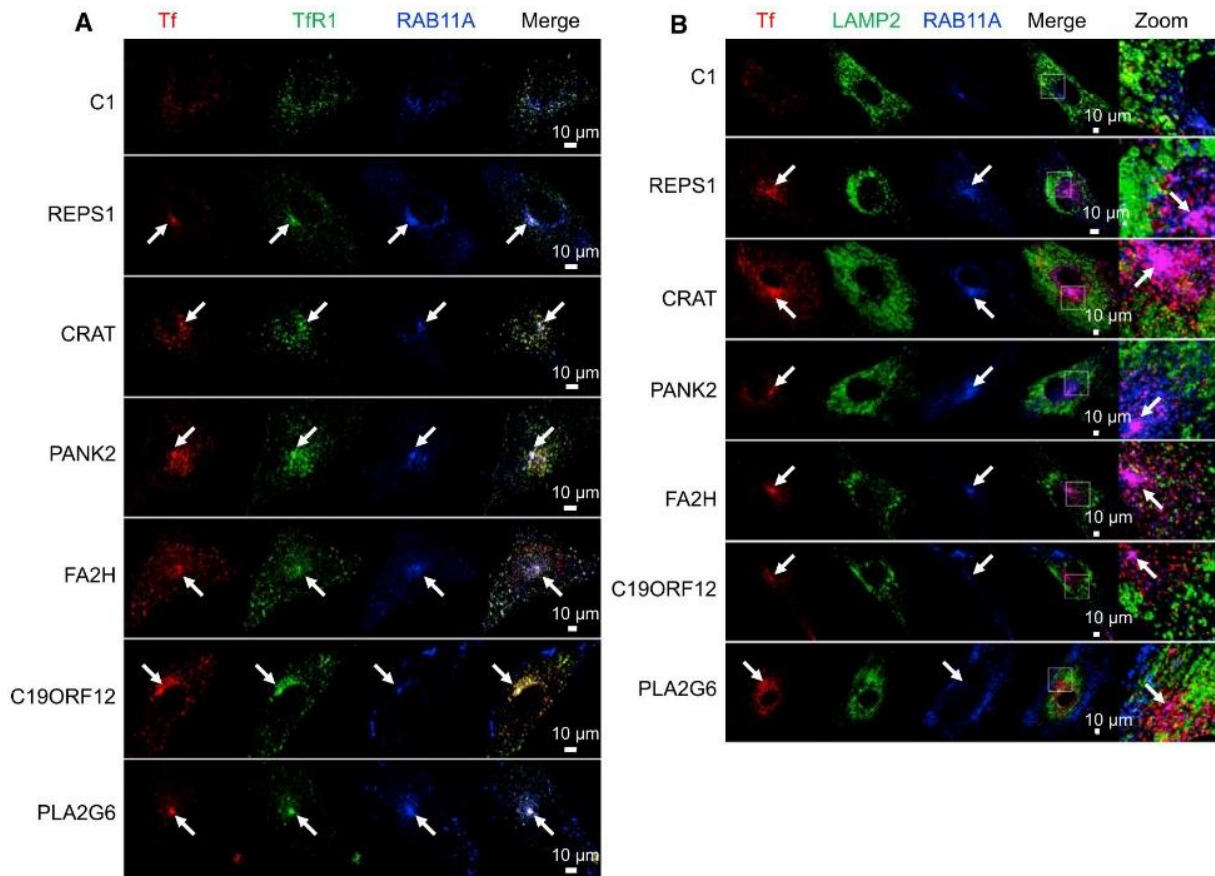


Figure 6. Tf and Tfr1 Trafficking in Fibroblasts of NBIA Subjects

(A) Tf, Tfr1, and RAB11A localization in fibroblasts of control (C1) and NBIA subjects by confocal microscopy after 30 min of Tf-RED pulse followed by a 10 min chase. Scale bar, 10 μ m. Arrows indicate the perinuclear colocalization of Tf, Tfr1, and RAB11A. (B) Tf, LAMP2, and RAB11A localization in fibroblasts of control (C1) and NBIA subjects after 30 min of Tf-RED pulse followed by a 10 min chase. Scale bar, 10 μ m. Arrows indicate the perinuclear colocalization of Tf and RAB11A independently of LAMP2. These pictures represent seven experiments and three control fibroblasts.

altered palmitoylation of other, as yet undetermined endosomal proteins could also alter Tfr1 recycling, especially given that fibroblasts of NBIA subjects displayed enlarged lysosomes with decreased Tf/LAMP2⁺ structures. In keeping with this, phospholipase A2 is reportedly involved at early stages of membrane tubule formation in the *trans*-Golgi network²⁸ and is known to regulate morphology and intra-organellar trafficking in the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment.²⁹ Finally, abnormal recycling caused by *REPS1* mutations could also slow down Tfr1 trafficking and reduce palmitoylation, given that S-acyl transferases are exclusively located at the membrane surface and mainly localized to the ER and Golgi membranes.³⁰

Palmitoylation is a rapid post-translational regulatory mechanism.³¹ Tfr1 recycles over 100 times and undergoes several acylation-deacylation cycles.³² Because post-transcriptional downregulation of Tfr1 in +FAC conditions requires several hours,³³ given that the half-life of Tfr1 is greater than 24 hr,³⁴ post-translational Tfr1 regulation by palmitoylation might represent an alternative means of rapidly modulating cellular iron content, a regulatory system that could be impaired in NBIA.

Abnormal palmitoylation has been occasionally reported to alter acylation enzymes in genetic diseases.

Most of them result in neurological or psychiatric disorders (e.g., Huntington disease, Alzheimer disease, schizophrenia, bipolar disorder, X-linked intellectual disability, and ceroid lipofuscinosis),³⁵ and models of Parkinson disease highlight the role of palmitoylation for normal neuronal function.³⁶ Why mutations in NBIA genes, which are ubiquitously expressed, result in neurologically restricted phenotypes remains unanswered. At least 23 palmitoyl transferase genes are expressed in the brain, where they display various patterns of expression, and not all of their substrates have been hitherto identified. We hypothesize that the brain-restricted involvement of NBIA could result from hitherto unknown Tfr1-specific palmitoyl transferases, the identification of which could help elucidate the disease mechanisms.

Finally, we have shown that artesunate improved Tfr1 palmitoylation and decreased steady-state ferritin levels in fibroblasts of NBIA subjects. Artesunate has potent anticancer properties because it induces iron depletion, which is toxic for cancer cells.³⁷ It is also used to treat malaria caused by *Plasmodium falciparum*. Although its safety profile and pharmacokinetics have not been assessed in neurodegenerative diseases, several millions of subjects have received artemisinin with very few side effects.³⁸

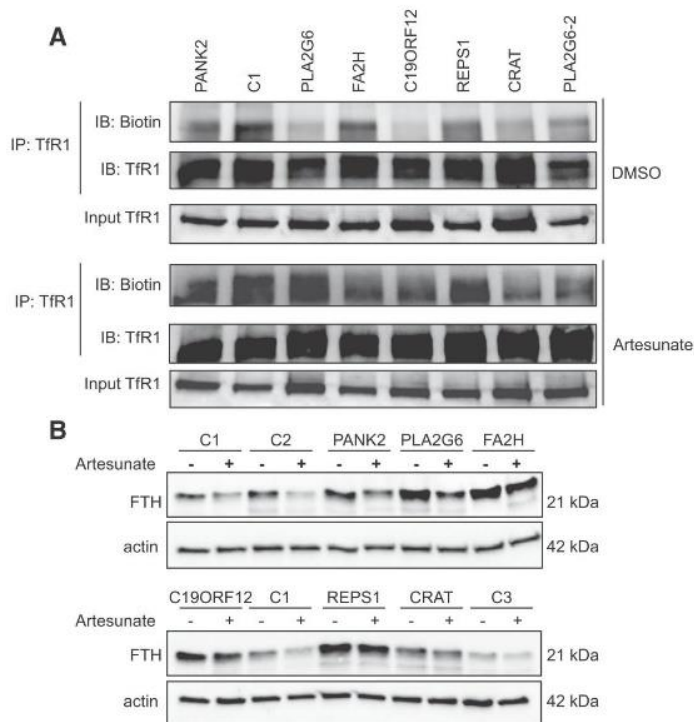


Figure 7. A. TFR1 Palmitoylation in Fibroblasts of NBIA Subjects Fibroblasts were treated with DMSO either alone or with 25 μ M artesunate for 48 hr, and TFR1 was immunoprecipitated with mouse anti-TFR1 antibody for the palmitoylation assay. In each condition, the upper panel shows the palmitoylated amount of TFR1 (IB: biotin) and the immunoprecipitated amount of TFR1 (IB: TFR1). Input TFR1 was used as a loading control for each condition. IP: immunoprecipitation, IB: immunoblotting. Only one from three controls is presented here. (B) Immunoblot analysis of ferritin (FTH) in control and NBIA subject fibroblasts treated or not with 25 μ M artesunate. Immunoblotting quantification is presented in Figure S2.

Our data suggest that consideration should be given to this compound, as well as other drugs that increase TFR1 palmitoylation, as possible therapeutic approaches in the treatment of NBIA. This strategy might also have relevance to other, more common neurodegenerative disorders, including Parkinson disease, where brain iron accumulation is also reported.

Accession Numbers

The *REPS1* and *CRAT* mutations reported in this paper have been submitted to ClinVar under SUB3461990 and SUB3466483, respectively. Please contact the corresponding author for the final accession numbers.

Supplemental Data

Supplemental Data include a Supplemental Note, four figures, and two tables and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.01.003>.

Acknowledgments

This work was partially funded through the E-Rare project GENOMIT (01GM1207) and the Agence Nationale de la Recherche

(ANR-10-IAHU-01). Whole-exome sequencing was funded by the GIS-Institut des Maladies Rares. Imaging and Amnis studies were performed at the Cell Imaging Platform and Cell Sorting Facility of the Imagine Institute and funded by the Imagine Foundation, ARC foundation, and GR-Ex LabEx. A.D. was supported by a fellowship from ApoPharma. We thank Olivier Pellé (Flow Cytometry Facility at INSERM UMR 1163) for assisting with cell sorting; Martial Saumier (BioRAD) for digital droplet PCR technical advice and support; Geneviève Courtois (Imagine Institute) for L3 maintenance, virus production, teaching, and advice; Sylvain Hanein (Imagine Institute) for assisting with confocal microscopy; Leona Enke for *REPS1* Sanger sequencing; and Yanick Crow for helping with editing the manuscript. We acknowledge the use of bioresources of the Necker Imagine DNA biobank (BB-033-00065).

Received: August 25, 2017

Accepted: January 5, 2018

Published: February 1, 2018

Web Resources

Alamut Interpretation Software 2.0, <http://alamut.interactivebiosoftware.com>

ClinVar, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>

Oligo Primer Analysis Software v.7, <http://www.oligo.net>

OMIM, <http://www.omim.org>

Primer-BLAST software, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/tools/primer-blast>

RSCB Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Swiss-PdbViewer 3.7, <http://www.expasy.org/spdbv>

References

- Meyer, E., Kurian, M.A., and Hayflick, S.J. (2015). Neurodegeneration with brain iron accumulation: Genetic diversity and pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 16, 257–279.
- Jaberi, E., Rohani, M., Shahidi, G.A., Nafissi, S., Arefian, E., Soleimani, M., Rasooli, P., Ahmadi, H., Daftarian, N., KarimiNejadRanjbar, M., et al. (2016). Identification of mutation in *GTPBP2* in patients of a family with neurodegeneration accompanied by iron deposition in the brain. *Neurobiol. Aging* 38, 216.e11–216.e18.
- Lane, D.J., Merlot, A.M., Huang, M.L., Bae, D.H., Jansson, P.J., Sahni, S., Kalinowski, D.S., and Richardson, D.R. (2015). Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1130–1144.
- Sohn, Y.S., Ghoti, H., Breuer, W., Rachmilewitz, E., Attar, S., Weiss, G., and Cabantchik, Z.I. (2012). The role of endocytic pathways in cellular uptake of plasma non-transferrin iron. *Haematologica* 97, 670–678.
- Hentze, M.W., and Kühn, L.C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8175–8182.
- Barbeito, A.G., Levade, T., Delisle, M.B., Ghetti, B., and Vidal, R. (2010). Abnormal iron metabolism in fibroblasts from a

- patient with the neurodegenerative disease hereditary ferritinopathy. *Mol. Neurodegener.* 5, 50.
7. Moura, I.C., Lepelletier, Y., Arnulf, B., England, P., Baude, C., Beaumont, C., Bazarbachi, A., Benhamou, M., Monteiro, R.C., and Hermine, O. (2004). A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* 103, 1838–1845.
 8. Hanein, S., Garcia, M., Fares-Taie, L., Serre, V., De Keyzer, Y., Delaveau, T., Perrault, I., Delphin, N., Gerber, S., Schmitt, A., et al. (2013). TMEM126A is a mitochondrial located mRNA (MLR) protein of the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3719–3733.
 9. Ba, Q., Zhou, N., Duan, J., Chen, T., Hao, M., Yang, X., Li, J., Yin, J., Chu, R., and Wang, H. (2012). Dihydroartemisinin exerts its anticancer activity through depleting cellular iron via transferrin receptor-1. *PLoS ONE* 7, e42703.
 10. Byrne, S.L., Buckett, P.D., Kim, J., Luo, F., Sanford, J., Chen, J., Enns, C., and Wessling-Resnick, M. (2013). Ferristatin II promotes degradation of transferrin receptor-1 in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 8, e70199.
 11. Dergai, O., Novokhatska, O., Dergai, M., Skrypkina, I., Tsyba, L., Moreau, J., and Rynditch, A. (2010). Intersectin 1 forms complexes with SGIP1 and Reps1 in clathrin-coated pits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 408–413.
 12. Krieger, J.R., Taylor, P., Gajadhar, A.S., Guha, A., Moran, M.F., and McGlade, C.J. (2013). Identification and selected reaction monitoring (SRM) quantification of endocytosis factors associated with Numb. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 499–514.
 13. Xu, J., Zhou, Z., Zeng, L., Huang, Y., Zhao, W., Cheng, C., Xu, M., Xie, Y., and Mao, Y. (2001). Cloning, expression and characterization of a novel human REPS1 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1522, 118–121.
 14. Yamaguchi, A., Urano, T., Goi, T., and Feig, L.A. (1997). An Eps homology (EH) domain protein that binds to the Ral-GTPase target, RalBP1. *J. Biol. Chem.* 272, 31230–31234.
 15. Cullis, D.N., Philip, B., Baleja, J.D., and Feig, L.A. (2002). Rab11-FIP2, an adaptor protein connecting cellular components involved in internalization and recycling of epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 49158–49166.
 16. Boissel, L., Fillatre, J., and Moreau, J. (2012). Identification and characterization of the RLIP/RALBP1 interacting protein Xreps1 in *Xenopus laevis* early development. *PLoS ONE* 7, e33193.
 17. Jogl, G., Hsiao, Y.S., and Tong, L. (2004). Structure and function of carnitine acyltransferases. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1033, 17–29.
 18. Mutterer, J., and Zinck, E. (2013). Quick-and-clean article figures with FigureJ. *J. Microsc.* 252, 89–91.
 19. Alvarez, E., Gironès, N., and Davis, R.J. (1990). Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid. *J. Biol. Chem.* 265, 16644–16655.
 20. de Figueiredo, P., Doody, A., Polizotto, R.S., Drecktrah, D., Wood, S., Banta, M., Strang, M.S., and Brown, W.J. (2001). Inhibition of transferrin recycling and endosome tubulation by phospholipase A2 antagonists. *J. Biol. Chem.* 276, 47361–47370.
 21. Doody, A.M., Antosh, A.L., and Brown, W.J. (2009). Cytoplasmic phospholipase A2 antagonists inhibit multiple endocytic membrane trafficking pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 695–699.
 22. Poli, M., Derosas, M., Lusciati, S., Cavadini, P., Campanella, A., Verardi, R., Finazzi, D., and Arosio, P. (2010). Pantothenate kinase-2 (Pank2) silencing causes cell growth reduction, cell-specific ferroportin upregulation and iron deregulation. *Neurobiol. Dis.* 39, 204–210.
 23. Campanella, A., Privitera, D., Guaraldo, M., Rovelli, E., Barzagli, C., Garavaglia, B., Santambrogio, P., Cozzi, A., and Levi, S. (2012). Skin fibroblasts from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients show altered cellular oxidative status and have defective iron-handling properties. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4049–4059.
 24. Leoni, V., Strittmatter, L., Zorzi, G., Zibordi, F., Dusi, S., Garavaglia, B., Venco, P., Caccia, C., Souza, A.L., Deik, A., et al. (2012). Metabolic consequences of mitochondrial coenzyme A deficiency in patients with PANK2 mutations. *Mol. Genet. Metab.* 105, 463–471.
 25. Dusi, S., Valletta, L., Haack, T.B., Tsuchiya, Y., Venco, P., Pasqualato, S., Goffrini, P., Tigano, M., Demchenko, N., Wieland, T., et al. (2014). Exome sequence reveals mutations in CoA synthase as a cause of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Am. J. Hum. Genet.* 94, 11–22.
 26. Song, H., Wohltmann, M., Bao, S., Ladenson, J.H., Semenkovich, C.F., and Turk, J. (2010). Mice deficient in group VIB phospholipase A2 (iPLA2gamma) exhibit relative resistance to obesity and metabolic abnormalities induced by a Western diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E1097–E1114.
 27. Siudeja, K., Srinivasan, B., Xu, L., Rana, A., de Jong, J., Nollen, E.A., Jackowski, S., Sanford, L., Hayflick, S., and Sibon, O.C. (2011). Impaired Coenzyme A metabolism affects histone and tubulin acetylation in *Drosophila* and human cell models of pantothenate kinase associated neurodegeneration. *EMBO Mol. Med.* 3, 755–766.
 28. Schmidt, J.A., Kalkofen, D.N., Donovan, K.W., and Brown, W.J. (2010). A role for phospholipase A2 activity in membrane tubule formation and TGN trafficking. *Traffic* 11, 1530–1536.
 29. Ben-Tekaya, H., Kahn, R.A., and Hauri, H.P. (2010). ADP ribosylation factors 1 and 4 and group VIA phospholipase A₂ regulate morphology and intraorganellar traffic in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Mol. Biol. Cell* 21, 4130–4140.
 30. Chamberlain, L.H., and Shipston, M.J. (2015). The physiology of protein S-acylation. *Physiol. Rev.* 95, 341–376.
 31. Magee, A.I., Gutierrez, L., McKay, I.A., Marshall, C.J., and Hall, A. (1987). Dynamic fatty acylation of p21N-ras. *EMBO J.* 6, 3353–3357.
 32. Zaliauskiene, L., Kang, S., Brouillette, C.G., Lebowitz, J., Arani, R.B., and Collawn, J.F. (2000). Down-regulation of cell surface receptors is modulated by polar residues within the transmembrane domain. *Mol. Biol. Cell* 11, 2643–2655.
 33. Müllner, E.W., and Kühn, L.C. (1988). A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 53, 815–825.
 34. Zaliauskiene, L., Fazio, R.L., Kang, S., Sparks, K., Weaver, C.T., Zinn, K.R., and Collawn, J.F. (2002). Inhibition of T cell

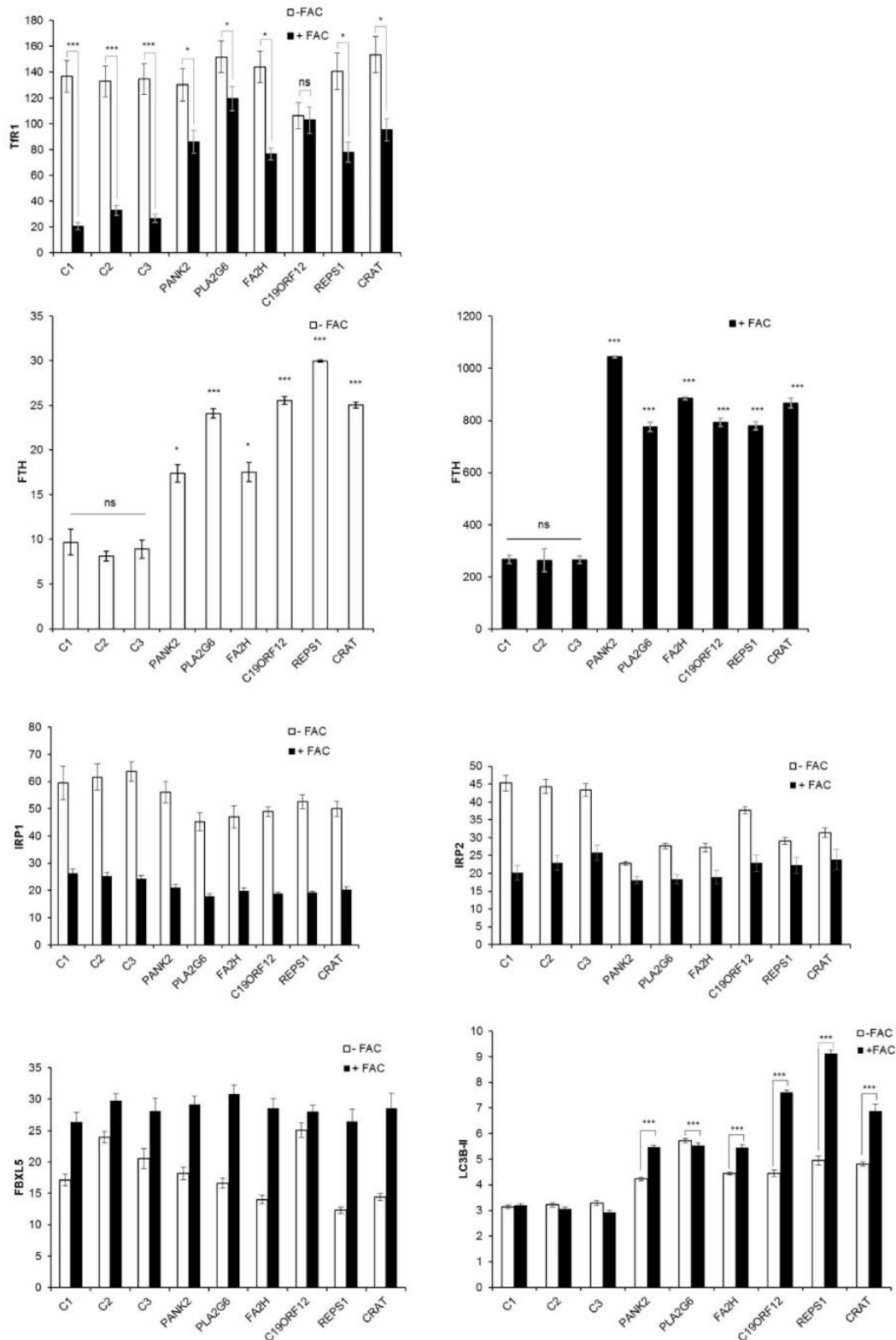
- responses by transferrin-coupled competitor peptides. *Immunol. Res.* *26*, 77–85.
35. Chavda, B., Arnott, J.A., and Planey, S.L. (2014). Targeting protein palmitoylation: selective inhibitors and implications in disease. *Expert Opin. Drug Discov.* *9*, 1005–1019.
36. Senyilmaz, D., Virtue, S., Xu, X., Tan, C.Y., Griffin, J.L., Miller, A.K., Vidal-Puig, A., and Teleanu, A.A. (2015). Regulation of mitochondrial morphology and function by stearoylation of TFR1. *Nature* *525*, 124–128.
37. Lai, H.C., Singh, N.P., and Sasaki, T. (2013). Development of artemisinin compounds for cancer treatment. *Invest. New Drugs* *31*, 230–246.
38. Efferth, T., and Kaina, B. (2010). Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives. *Crit. Rev. Toxicol.* *40*, 405–421.

Supplemental Data

**Impaired Transferrin Receptor Palmitoylation
and Recycling in Neurodegeneration
with Brain Iron Accumulation**

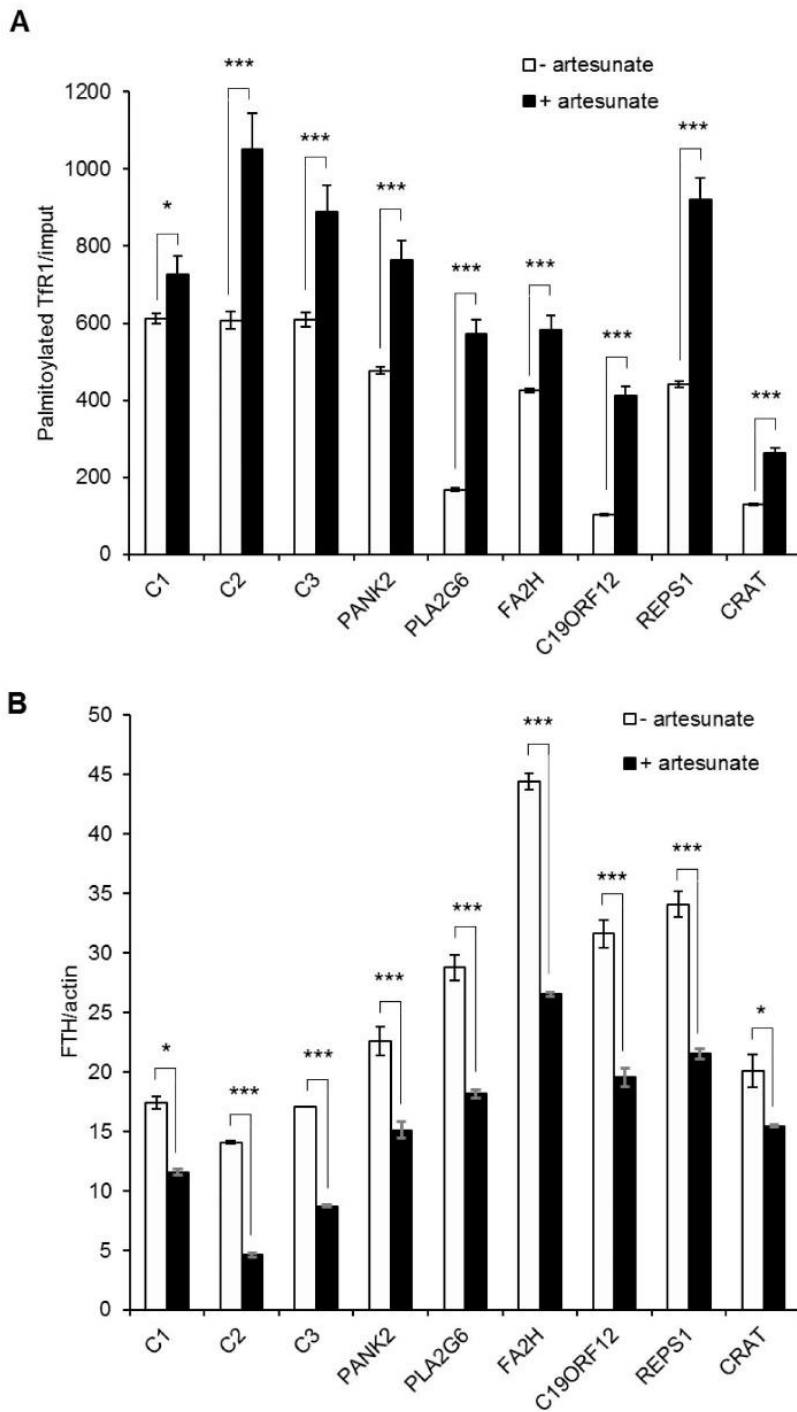
Anthony Drecourt, Joël Babdor, Michael Dussiot, Floriane Petit, Nicolas Goudin, Meriem Garfa-Traoré, Florence Habarou, Christine Bole-Feysot, Patrick Nitschké, Chris Ottolenghi, Metodi D. Metodiev, Valérie Serre, Isabelle Desguerre, Nathalie Boddaert, Olivier Hermine, Arnold Munnich, and Agnès Rötig

Figure S1. Quantification of steady-state levels of proteins involved in iron homeostasis.



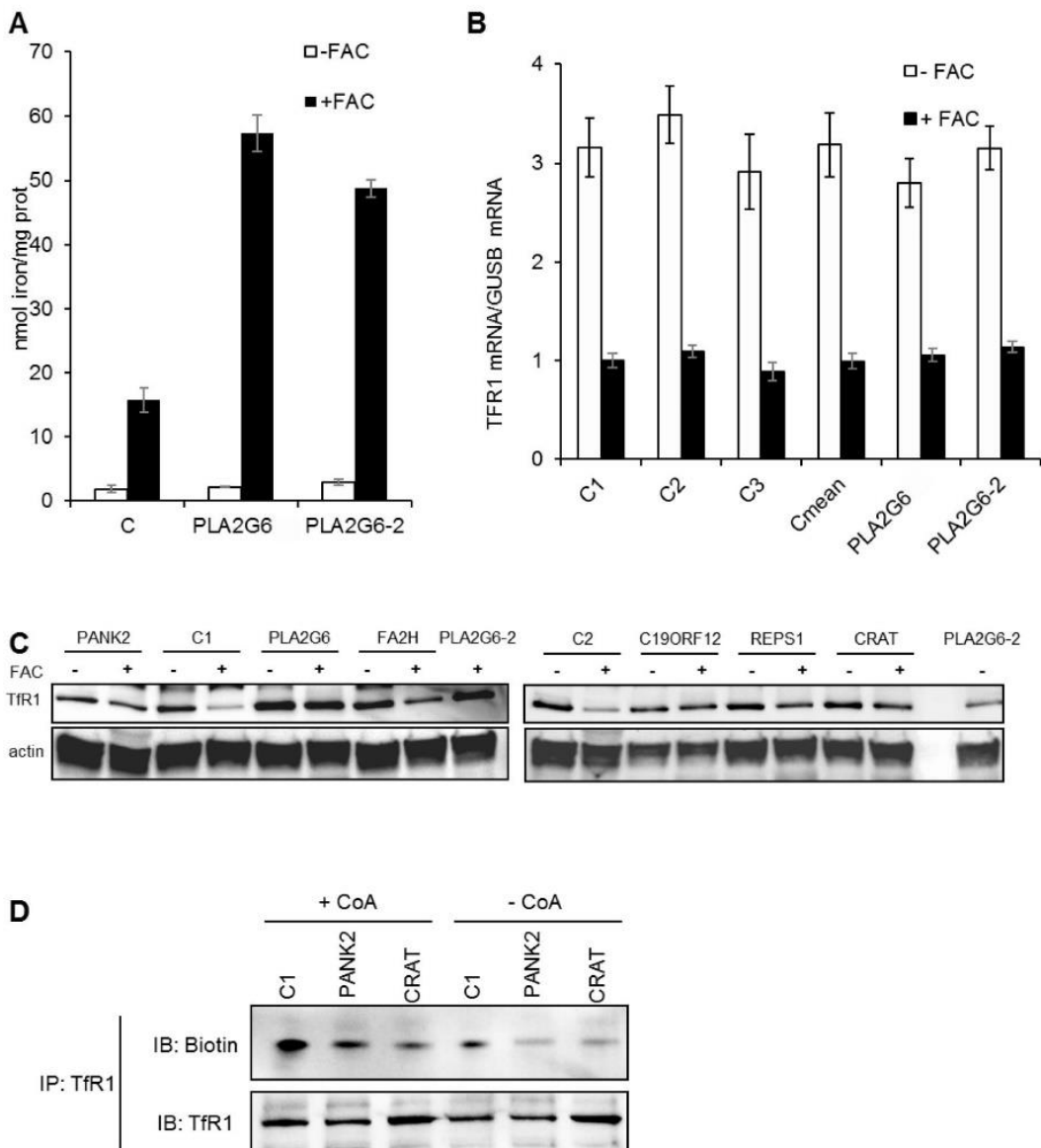
Immunoblotting quantification of steady-state levels of proteins involved in iron homeostasis in low (-FAC) and high iron conditions (+FAC) presented in Figure 3. Tfr1, FTH, IRP1, IRP2, FBXL5 and LC3B amounts are relative to actin. The data are the means \pm SEM of three independent experiments. C1-3: control fibroblasts. Tfr1 Paired sample t-test (Tfr1) or One Way Analysis Holm-Sidak method (ferritin) were used. * and *** correspond to P values < 0.05 and < 0.001 respectively, ns: non-significant.

Figure S2. Quantification of steady state levels of proteins presented in Figure 7.



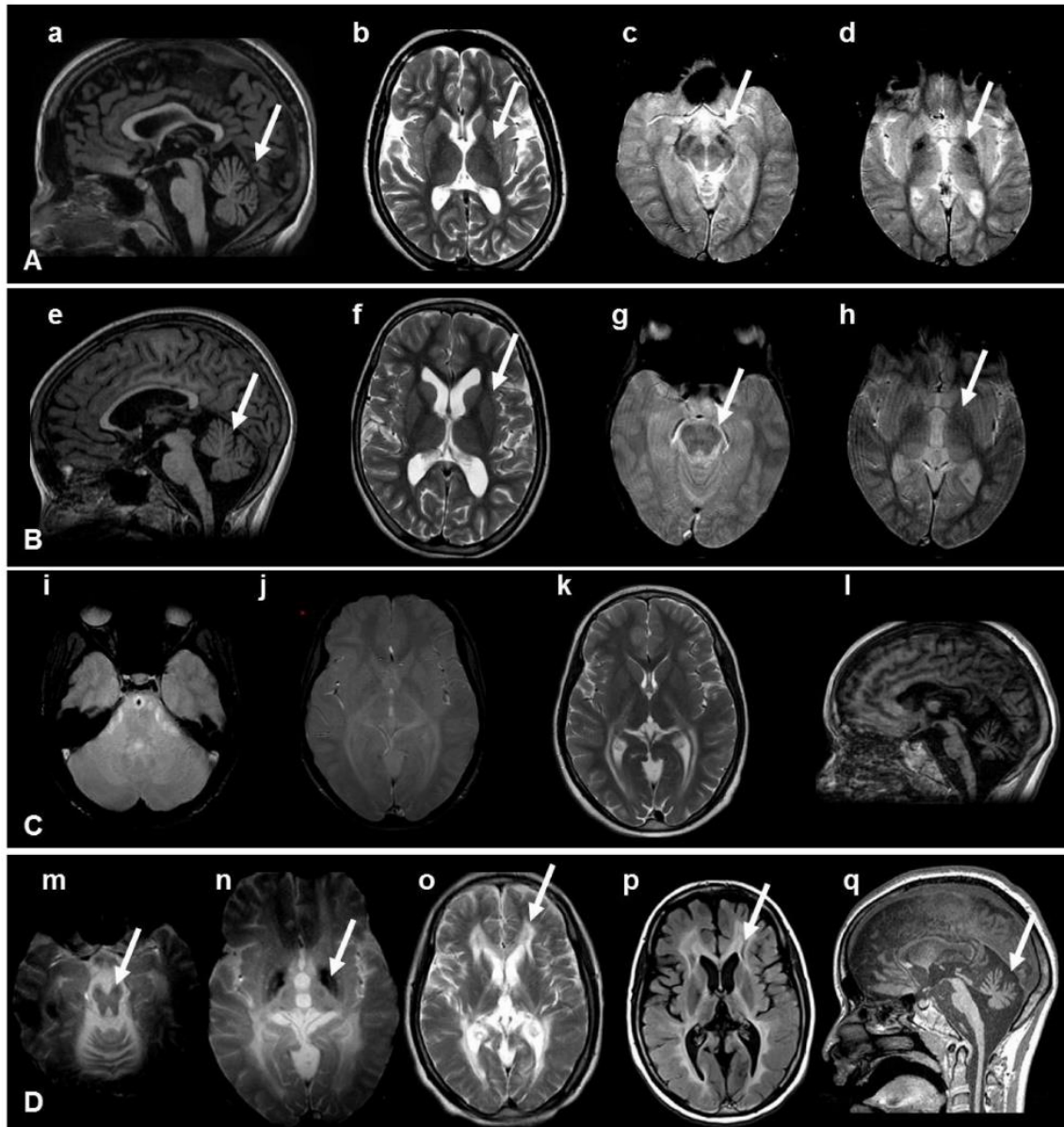
A. Quantification of Tfr1 palmitoylation in fibroblasts of controls and NBIA subjects. **B.** Quantification of ferritin in fibroblasts treated or not with 25 μ M artesunate. The data are the means \pm SEM of three independent experiments. C1-3: control fibroblasts. Paired sample t-test (Tfr1) or One Way Analysis Holm-Sidak method (ferritin) were used. * and *** correspond to P values <0.05 and <0.001 respectively, ns: non-significant.

Figure S3. Iron content and regulation of iron homeostasis in fibroblasts of NBIA subjects.



A. Iron quantification using the ferrozine-based colorimetric assay in fibroblasts of controls (C, mean of 3 controls) and two PLA2G6 subjects (PLA2G6, already presented in other figures, and PLA2G6-2) grown in FBS-free DMEM medium and low (-FAC) or high iron conditions (+FAC). The data are the means \pm SEM of three independent experiments. Student-Newman-Keuls ANOVA multifactorial test was used. **B.** Post-transcriptional regulation of iron homeostasis in fibroblasts of controls and two PLA2G6 subjects grown in FBS-free DMEM medium in low (-FAC) or high iron conditions (+FAC). *TFR1* mRNAs were quantified by ddPCR and expressed as a ratio to *GUSB* mRNA. The data are the means \pm SEM of three independent experiments. The significance of variations among samples and controls was estimated using One Way Analysis Holm-Sidak method. **C.** Steady-state levels of Tfr1 studied in non-reducing conditions (7.5% acrylamide, no dithiothreitol (DTT), no heat denaturation) in fibroblasts of controls (C1-2) and NBIA subjects grown in FBS-free DMEM medium in low (-FAC) and high iron conditions (+FAC). Actin was used as loading control. **D.** Effect of CoA supplementation on Tfr1 palmitoylation in PANK2 and CRAT-deficient fibroblasts. Fibroblasts were treated with or without CoA 25 μ M for 72 h, and Tfr1 protein was immunoprecipitated with mouse anti-Tfr1 antibody to perform the palmitoylation assay. In each condition, the upper panel shows the palmitoylated Tfr1 level (IB: Biotin) and the immunoprecipitated amount of Tfr1 (IB: Tfr1).

Figure S4. Brain MRI of subjects 1-3.



A. Brain MRI of subject 1 at 15 yr of age. Moderate cerebellar atrophy and thinning of the corpus callosum is seen on sagittal T1 (a). Putamen and caudate nuclei hyperintensity is seen on the T2 weighted image (b; arrow). Hypointensity of the substantia nigra (c) and globus pallidus (d) consistent with iron deposition, is seen on axial T2* (arrows). **B.** Brain MRI of subject 2 at 10 yr of age. Moderate cerebellar atrophy and thinning of the corpus callosum is seen on sagittal T1 (e, arrow). Neither basal ganglia anomalies on T2 weighted images (f; arrow) nor hypointensity of the substantia nigra (g) or globus pallidus (h) are seen on axial T2* (arrows). **C.** Brain MRI of subject 3 at 10.8 yr of age. No hypointensity of the substantia nigra (i) and globus pallidus (j) was seen on axial T2*. White matter hyperintensity is only seen in the posterior arm of the internal capsule on the T2 weighted image (k). Profound cerebellar atrophy and thinning of the corpus callosum is visible on sagittal T1 (l). **D.** Brain MRI of subject 3 at 15.5 yr of age. Hypointensity of the substantia nigra (m) and globus pallidus (n) consistent with iron deposition is seen on axial T2* (arrow heads). White matter hyperintensity is shown as well (o and p; arrows), with features of a necrotizing leukoencephalopathy evident on axial Flair weighted images (p). Profound cerebellar atrophy and thinning of the corpus callosum is also evident on sagittal T1 (q).

Table S2. Sequences of primers used for ddPCR

Primer	Sequence
TFCR	5'-gctgcagggttcttctgtgtggca-3'
TFCR reverse	5'-cgagccaggctgaaccgggta-3'
GUSB forward	5'-gcggtcgtgatgtggtctgt-3'
GUSB reverse	5'-gtgagcgatcaccatcttcaagt-3'

Primers were designed using the Oligo Primer Analysis Software v.7 available at <http://www.oligo.net>. The specificity of primer pairs to PCR template sequences was checked against the NCBI database using the Primer-BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/tools/primer-blast>).

Supplemental Note: Case reports

Subjects

Subject 1, the third child of unrelated healthy parents of French origin (birth weight: 2.6 Kg, height: 46.5 cm, OFC: 33.5 cm) had speech and motor delay. She did well during the first few months and walked alone aged 18 mths but her speech was delayed and she developed trunk hypotonia, progressive cerebellar ataxia, pyramidal syndrome for unknown reasons and lost the ability to walk at age 9 yrs. At this same age, nystagmus, dysarthria, dysmetry, spasticity of the lower limbs and *pes cavus* were noted. Skeletal muscle biopsy revealed negative SDH and COX staining in numerous fibers, but plasma lactate, pyruvate, amino acids and very long chain fatty acids were unremarkable and mitochondrial respiratory chain enzyme activities were normal. Brain MRI showed progressive cerebellar and cerebral atrophy and T2* evidence of brain iron accumulation in the *globus pallidi* and peduncles (Supplementary Figure 4). She gradually lost the ability to walk and stand unaided then to hold her head at 14 yrs. Swallowing difficulties, stiffness of the limbs, severe dystonia and nystagmus appeared. She died aged 20 yrs after a 10-yr gradual worsening of her condition.

Subject 2, the sister of subject 1, had a similar, albeit slightly milder clinical course. Aged 14 yrs, she can still walk with aids, hold a pencil and practice indoor bike and swimming. Interestingly, the parents mentioned some fluctuations in their neurological conditions and a significant worsening following monthly menstruations in subjects 1-2.

Subject 3, a girl born to first cousin Turkish parents after a term pregnancy and normal delivery (birth weight: 3.5 Kg, height: 51 cm, OFC: 35 cm) walked at age 14 mths but exhibited a speech delay first ascribed to a mild hearing loss. Unbalanced gait and slowly progressive cerebellar ataxia were noted at 3 yrs. She gradually lost the ability to stand, walk and write. Tremor, dysmetry, hypotonia, brisk deep tendon reflexes and sensory neuropathy were suggestive of slowly progressive spinocerebellar degeneration. Extensive metabolic workup showed normal plasma lactate, pyruvate and amino acids. Interestingly, absolute concentrations of very long chain fatty acids in plasma and their molar ratios were elevated, compared to controls (C22:48.6 $\mu\text{mol/L}$, normal: 21-46; C24: 63.7 $\mu\text{mol/L}$, normal: 22-49; C24/C22: 1.3, normal \pm 1SD: 0.86 ± 0.07). Normal respiratory chain activities were observed in muscle, liver and fibroblasts. Brain MRI showed evidence of cerebellar atrophy and posterior leukodystrophy. Hyperintensity of basal ganglia and hypointensity of *globus pallidi* and *substantia nigra* on T2* sequences were suggestive of major iron accumulation (Supplementary Figure 4).

Table S1. Gene mutations and pathogenicity.

Subjects	Gene	Nucleotide variation	AA change	SIFT	MutationTaster	Polyphen	dbSNP	ExAc	ESP frequencies
	PANK2 NM_153638.2	c.1411A>G	p.(S471G)	Deleterious (score: 0, median: 3.94)	disease causing (p-value: 1)	Probably damaging with a score of 0.996 (sensitivity: 0.36; specificity: 0.97)	none	none	
	PLA2G6 NM_001349864.1	c.351C>G	p.(His117Gln)	Tolerated (score: 0.09, median: 2.94)	disease causing (p-value: 1)	Probably damaging with a score of 0.968 (sensitivity: 0.61; specificity: 0.93)	rs149653983	T=0.039%	
		c.956C>T	p.(Thr319M)	Tolerated (score: 0.11, median: 2.94)	disease causing (p-value: 1)	Possibly damaging with a score of 0.879 (sensitivity: 0.71; specificity: 0.89)	none	none	MAF A < 0.01/1
	PLA2G6 NM_001349864.1	c.109C>T	p.(Arg37*)				rs200075782	T= 0.0037%	
		c.386T>C	p.(Leu129Pro)	Deleterious (score: 0.04)	disease causing (p-value: 1)	Probably damaging with a score of 0.909 (sensitivity: 0.69; specificity: 0.90)	rs374746113	C=0.0041%	
	C19ORF12 NM_001031726.2	c.244A>T	p.(Lys82*)				none	none	
		c.424A>G	p.(Lys142Glu)	Tolerated (score: 0.12)	disease causing (p-value: 0.973)	Benign with a score of 0.053 (sensitivity: 0.93; specificity: 0.64)	rs146170087	G=0.24%	MAF C < 0.01/11
	FA2H NM_024306.4	c.510_511del	p.(Y170fs*)				none	none	
Subjects 1-2	REPS1 NM_001286611.1	c.232G>C	p.(Val78Leu)	Deleterious (score: 0, median: 4.32)	disease causing (p-value: 0.988)	Benign with a score of 0.001 (sensitivity: 0.99; specificity: 0.09)	none	none	none
		c.338C>A	p.(Ala113Glu)	Deleterious (score: 0.04, median: 4.32)	disease causing (p-value: 0.991)	Benign with a score of 0.031 (sensitivity: 0.94; specificity: 0.59)	rs201191394	A=0.011%	MAF T = 0.0001
Subject 3	CRAT NM_000755.4	c.962G>A	p.(Arg321His)	Deleterious (score: 0.03, median: 3.40)	disease causing (p-value: 1)	Probably damaging with a score of 0.999 (sensitivity: 0.09; specificity: 0.99)	rs138665095	A=0.0042%	MAF T = 0.0001

Discussion générale

I. Dérégulation de l'homéostasie du fer dans les défauts précoces de la biogenèse des ISC et les NBIA

1. Surcharge en fer et stress oxydant

La présence d'une accumulation de fer dans le cerveau des patients AF et NBIA nous a conduit à étudier l'homéostasie du fer afin d'essayer d'appréhender les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Les fibroblastes de patients présentent une hausse du contenu en fer légèrement plus prononcée dans les cellules AF que dans les NBIA, s'accompagnant d'un stress cytosolique et mitochondrial. Plusieurs études sur des modèles cellulaires et animaux déficitaires en frataxine ont montré une augmentation des ROS associée à des dépôts de fer dans les mitochondries^{90,102,169}. Les souris KO *PANK2* présentent également une élévation de la teneur en fer dans le compartiment cytosolique et mitochondrial²⁵¹. Des signes de stress oxydatif ont été détectés dans des cellules de patients *PANK2* dont leur production a fortement augmenté à la suite d'une exposition en fer²⁵².

Au niveau physiologique, la voie d'absorption du fer privilégiée par les cellules est la voie TBI. Cependant, la voie NTBI peut représenter une part importante de l'entrée du fer dans des conditions pathologiques. Nous avons ainsi essayé d'évaluer l'importance respective de chacune de ces deux voies dans la dérégulation de l'homéostasie du fer. Une incubation avec une source de NTBI, dix fois plus importante que les conditions physiologiques, a augmenté entre 8 à 10 fois le contenu en fer dans les fibroblastes AF contre une hausse 3 fois supérieures dans les cellules contrôles. En revanche, une supplémentation en holo-Tf, correspondant à la concentration plasmatique physiologique, conduit à une accumulation de fer encore plus massive avec des teneurs 20 fois supérieures à la normale dans des cellules déficitaires en frataxine, suggérant que la voie TBI serait majoritairement impliquée dans la surcharge en fer dans les fibroblastes de patients AF. De plus, la saturation de la transferrine est normale, voire légèrement diminuée dans les analyses sanguines des patients AF (source : service génétique de Necker). Ces données cliniques nous laissent penser que l'holo-Tf serait la principale source de fer plasmatique au détriment de la forme NTBI dans un contexte pathologique de l'AF.

La dérégulation de l'homéostasie du fer dans les cellules de patients AF nous a amené à déterminer le contenu en fer dans d'autres défauts de biosynthèse des centres Fe-S. Cette étude a mis en évidence une surcharge en fer avec une hausse des enzymes antioxydantes SOD1 et SOD2 dans les cellules de deux patients *FDXR*. Des études précédentes ont montré que la perte

de l'activité ferrédoxine réductase entraînait une accumulation de fer mitochondrial avec une augmentation significative de la production de ROS^{244,245}. Cette incapacité à limiter l'entrée du fer n'est pas systématiquement rencontrée lors d'un déficit en FDXR. Il paraît donc primordial de déterminer les pertes fonctionnelles de cette protéine dans le but de comprendre si une décroissance d'activité est systématiquement corrélée à une dérégulation de l'homéostasie du fer. Une autre alternative serait de définir l'importance du déficit en protéines à centres Fe-S chez les trois patients FDXR afin de comprendre les différences phénotypiques observées.

2. Régulation de l'homéostasie du fer cellulaire

Le contenu en fer intracellulaire est régulé au niveau post-transcriptionnel par le système IRP/IRE dont l'action ne semble pas être altérée dans les fibroblastes de patients AF, FDXR et NBIA. En revanche, l'ensemble de ces cellules présente une quantité anormale de TfR1 et de ferritine lors d'une supplémentation en fer, reflétant une surcharge de ce métal. La capacité de l'IRP1 à se lier aux IRE s'est révélée augmentée dans les fibroblastes et les lymphoblastes AF⁶⁷ ainsi que dans des cellules déficitaires en FDXR²⁴⁴. Cependant, cette hausse de la capacité de liaison IRP1/IRE s'accompagne d'une perte progressive de l'activité aconitase dans les souris présentant un déficit conditionnel en *FXN*¹⁷⁵. Ce déficit en aconitase cytosolique est systématiquement constaté dans les modèles AF et FDXR^{67,90,244} en raison d'un déficit de biogenèse des centres Fe-S. Néanmoins, la régulation post-transcriptionnelle est majoritairement exercée par l'IRP2 *in vivo*²⁵³, sans que son activité ne soit affectée dans le foie¹⁷⁶, ni détectée dans le cœur de modèles murins AF¹⁷⁵. De plus, nous avons constaté que la quantité d'IRP2 diminue en présence de fer, démontrant que ce système semble fonctionner correctement dans les cellules de patients AF et de NBIA. Une étude de l'activité des IRP sera mise en œuvre pour confirmer cette hypothèse.

En revanche, une hausse de l'activité de liaison de l'IRP2 sur les motifs IRE, également associée à une élévation de la quantité de TfR1, a été rapportée dans des cellules HeLa déficitaires en FDXR²⁴⁴. Nous avons constaté que la dérégulation de ce récepteur n'est pas un phénomène constant dans les défauts de FDXR contrairement aux fibroblastes AF et NBIA. Il se pourrait donc que l'accumulation du TfR1 résulte d'une modulation de la régulation du système IRP/IRE en fonction des variants géniques FDXR testés.

Malgré la régulation par les IRP, nous avons observé une augmentation du TfR1 dans les fibroblastes de patients Friedreich et de NBIA. Ce phénomène a également été constaté dans le tissu cardiaque de modèles murins AF dès 4 semaines de vie²⁵⁴ ainsi que dans les cellules de

Purkinje au niveau du cervelet vers 13,5 semaines²²⁴. Cet échappement du TfR1 suggère que ce récepteur est sujet à un autre niveau de régulation qui pourrait être anormal dans les cellules de patients AF et de NBIA.

3. Dérégulation de TfR1 et accumulation de fer

Nous avons émis l'hypothèse que l'accumulation du TfR1 pouvait être responsable de la surcharge en fer observée. Notre étude a mis en évidence une accumulation de ce récepteur à la membrane plasmique associée à une augmentation de l'endocytose de la transferrine dans les fibroblastes AF, FDXR et NBIA. Le TfR1 faisant l'objet de nombreux cycles d'internalisations et de recyclages avant d'être dégradé, nous nous attendions à observer une accélération de la dynamique de recyclage du complexe Tf/TfR1 en cohérence avec une hausse de sa cinétique d'endocytose. Cependant, le recyclage de la Tf n'est pas aussi rapide que son internalisation, évoquant la possibilité d'une dégradation anormale du TfR1 en raison du déroutage des vésicules vers les lysosomes ou le protéasome.

Un excès de fer promeut la dégradation du TfR1 à la fois par ubiquitylation et par la voie lysosomale²⁵⁵. Une expérience de localisation des agrégats périnucléaires de Tf a été menée dans les fibroblastes de NBIA en présence d'un marqueur lysosomal, Lamp2, et a révélé que la quantité de vésicules Tf/Lamp2 positives était plus faible que dans les cellules contrôles, démontrant que les vésicules d'endocytose ne sont pas acheminées vers le compartiment lysosomal pour y être dégradées. Une étude plus approfondie de ces vésicules a mis en évidence une colocalisation avec Rab11, nous permettant d'affirmer qu'il s'agit de vésicules de recyclage tardif. Ces données mettent ainsi en évidence que le TfR1 n'est pas dégradé dans le compartiment lysosomal mais retourne à la membrane par une voie lente de recyclage. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure à ce stade une possible dégradation du TfR1 par le protéasome. Des expériences complémentaires basées sur le taux d'ubiquitination de ce récepteur et/ou l'utilisation d'inhibiteur du protéasome devront être mises en œuvre pour exclure définitivement cette hypothèse.

II. Palmitoylation de protéines, un nouveau niveau de régulation de l'entrée du fer cellulaire

1. Défaut de palmitoylation du TfR1

Pour essayer de comprendre la dérégulation du TfR1 dans les cellules de patients AF et de NBIA, nous nous sommes intéressés aux modifications post-traductionnelles de ce récepteur.

Le TfR1 peut subir l'addition réversible de plusieurs groupements prosthétiques dont seulement deux ont un impact fonctionnel sur son activité. Un défaut de glycosylation du TfR1 provoque une baisse de son expression à la surface cellulaire¹³⁴ tandis qu'une absence de palmitoylation conduit à une augmentation de la quantité de TfR1 membranaire et de son endocytose¹³². Nous avons étudié le taux de palmitoylation du TfR1 qui s'est révélé fortement déficitaire dans les fibroblastes AF et de NBIA. Une augmentation du taux de palmitate a permis de diminuer la quantité de récepteurs à la surface cellulaire et de limiter drastiquement le contenu en fer dans les cellules de patients Friedreich. Une baisse de la ferritine a également été constatée dans les cellules NBIA en parallèle de la restauration partielle du taux de palmitoylation du TfR1. Par conséquent, l'hypopalmitoylation du TfR1 est directement liée à une absorption anormale de fer et à la surcharge de ce métal dans les cellules de patients AF et de NBIA. Nonobstant, ces faits ne pourront s'avérer exacts qu'après la quantification du contenu en fer dans les fibroblastes NBIA à l'issue d'un traitement provoquant une augmentation du taux de palmitoylation du TfR1.

La palmitoylation du TfR1 est un mécanisme d'acylation de protéines permettant de moduler sa localisation subcellulaire en quelques minutes²⁵⁶. Le TfR1 non palmitoylé est majoritairement présent à la membrane plasmique tandis que le pool de TfR1 palmitoylé est situé dans le cytoplasme. En revanche, la régulation post-transcriptionnelle du TfR1 par le système IRP/IRE requiert plusieurs heures²⁵⁷. L'acylation du TfR1 pourrait ainsi constituer une alternative efficace et rapide pour la modulation du contenu en fer cellulaire. Cependant, l'impact physiologique de ce défaut d'ajout de palmitate sur le TfR1 n'a jamais été démontré *in vivo*.

Les fonctions des protéines palmitoylées restent encore largement méconnues. Néanmoins, des preuves de l'implication du niveau d'acylation de protéines dans des pathologies humaines ont été mises en évidence ces dernières années. En effet, des altérations de la palmitoylation peuvent contrôler de manière substantielle l'excitabilité cardiaque constituant un facteur important dans les arythmies acquises et congénitales²⁵⁸. Les protéines palmitoylées jouent également un rôle prépondérant dans les fonctions synaptiques et dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie, la maladie de Huntington, et des déficiences intellectuelles où près d'une dizaine de protéines différentes ont présenté des défauts d'acylation²⁵⁹. Ces découvertes nous laissent penser que

l'hypopalmitoylation du TfR1 pourrait jouer un rôle dans le développement de la physiopathologie de l'AF et des NBIA.

2. Palmitoylation et NTBI

L'absorption du fer sous la forme de citrate d'ammonium de fer (FAC) ne fait pas intervenir le TfR1. Son hypopalmitoylation n'a donc aucun impact dans la surcharge en fer induite lors de l'incubation des cellules en présence de FAC. Il est possible que des protéines de la voie NTBI subissent également une palmitoylation et qu'elle soit anormale dans les cellules de patients AF. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons supplémenté les cellules en présence de FAC avec du 2-bromopalmitate (2BP), un inhibiteur de la palmitoylation des protéines. Nous avons observé une exacerbation de la surcharge en fer dans les cellules de patients AF cultivées avec du 2BP. Par conséquent, le défaut de palmitoylation semble être étendu à plusieurs protéines de l'homéostasie du fer impliquées dans la voie NTBI et TBI. Dans ce sens, il pourrait être intéressant de regarder le profil d'acylation globale des protéines cellulaires en imagerie à l'aide d'une sonde fluorescente Alk-16²⁵⁶ ou par étude protéomique²⁶⁰. Une analyse du taux de palmitoylation de certains acteurs de la voie TBI et/ou NTBI, tels que DMT1, Steap3, ou ZIP14, permettrait également d'appréhender l'impact de l'acylation de ces protéines dans l'absorption du fer cellulaire.

3. Hypopalmitoylation liée à un défaut de synthèse du CoA

L'acide palmitique, ou palmitoyl-CoA, est incorporé aux apoprotéines dans le cytosol par des palmitoyl acyl transférases et retiré sous l'action des palmitoyl thioestérase (**Figure 43**). Ce palmitoyl-CoA est synthétisé à partir de CoA et de palmitate. Ces précurseurs étant obtenu à partir d'acétyl-CoA lors de la biosynthèse des acides gras, le substrat prépondérant dans la palmitoylation de protéines est donc l'acétyl-CoA cytosolique. Ce substrat est initialement fabriqué dans la mitochondrie par le processus de β -oxydation des acides gras et de la décarboxylation oxydative du pyruvate à partir du CoA avant d'être exporté vers le cytosol sous forme de citrate et dans une moindre mesure d'acétate. Dans le cytosol, l'acétyl-CoA permet la synthèse des acides gras tel que le palmitate et l'acétylation des protéines.

La voie de synthèse du CoA fait intervenir quatre enzymes dont deux sont mutées dans les NBIA (**Figure 42**). Le CoA mitochondrial est obtenu exclusivement par sa biosynthèse *de novo* à partir de la transformation de pantothénate (vitamine B5) issu de l'alimentation sous l'action de PANK2, PPCS, PPCDC et de la CoA synthase, codée par *COASY* (**Figure 42**). Dans la

mitochondrie, le CoA est transformé en acétyl-CoA par décarboxylation oxydative du pyruvate par la PDH où il entrera dans le cycle de Krebs ou permettra l'acétylation de protéines. Cet acétyl-CoA peut être converti de nouveau en CoA sous l'action de CRAT (**Figure 42**).

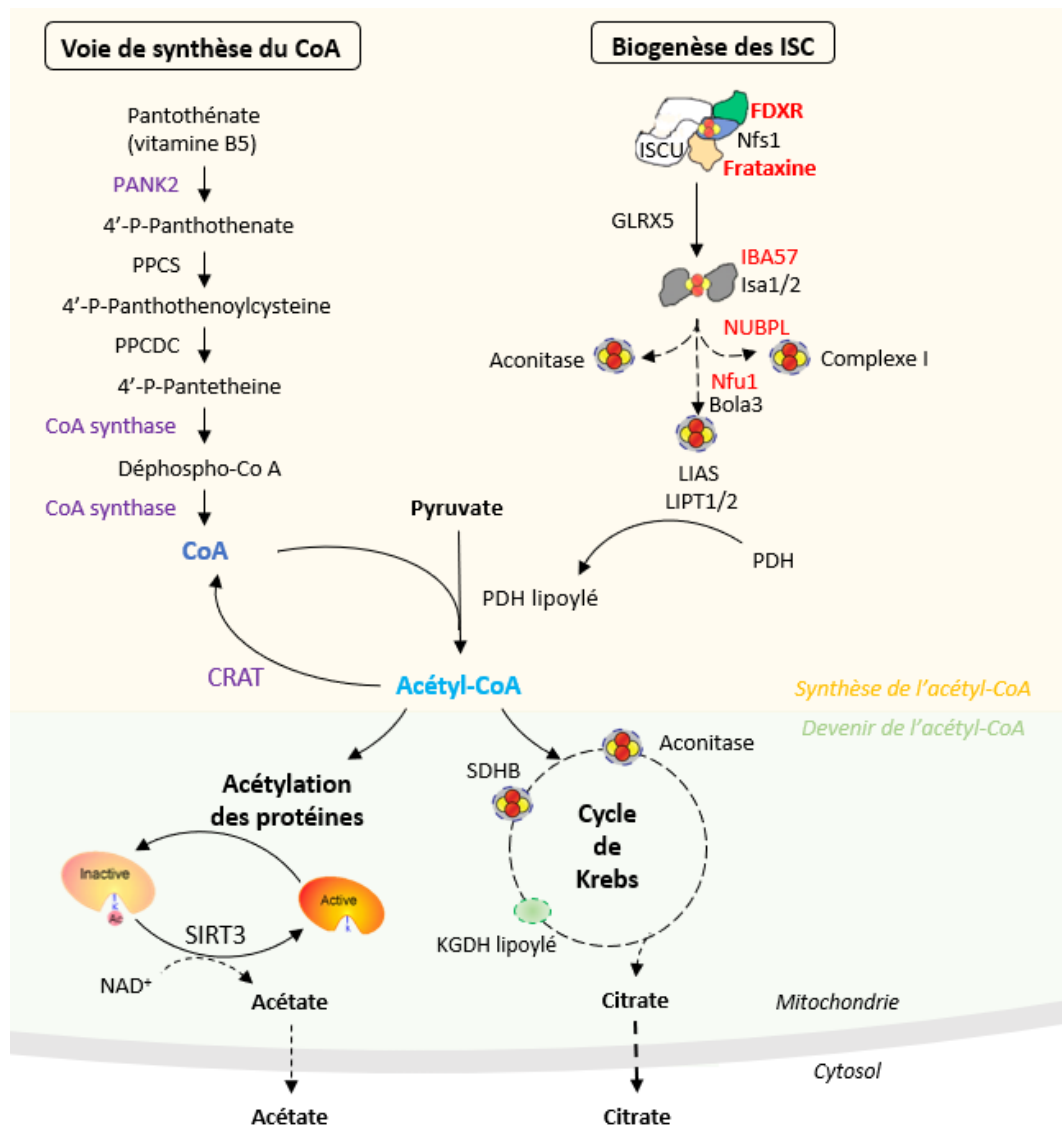


Figure 42 : Représentation synthétique de la voie de synthèse de l'acétyl-CoA mitochondriale à partir de la décarboxylation oxydative du pyruvate via la pyruvate déshydrogénase (PDH). Cette réaction nécessite un apport de CoA synthétisé par le métabolisme du pantothénate faisant intervenir des enzymes impliquées dans les NBIA (en violet). Une diminution de ces enzymes conduit à un déficit en CoA. La PDH est active sous sa forme lipoylée dont son état de lipoylation est sous le contrôle des enzymes LIAS, LIPT1 et LIPT2. La LIAS est une protéine contenant un centre Fe-S dont la biogenèse est affectée dans plusieurs défauts des ISC. Les déficits en ISC que nous avons étudiés au cours de cette étude sont indiqués en rouge. Dans la mitochondrie, l'acétyl-CoA peut rentrer dans le cycle de Krebs ou servir à l'acétylation des protéines. Cette modification post-traductionnelle conduit à l'inactivation des protéines mitochondriales. La désacétylation fait intervenir la sirtuine 3 (SIRT3) dont l'action est dépendante du NAD^+ . Le cycle de Krebs implique des protéines à centre Fe-S, l'aconitase et la succinate déshydrogénase (SDHB), ainsi qu'une protéine lipoylée, α -cétoglutarate déshydrogénase (KGDH), qui sont déficitaires dans l'AF. Le citrate et l'acétate formés respectivement à partir du cycle de Krebs et de la désacétylation de protéines seront exportés vers le cytosol pour la synthèse de l'acétyl-CoA. Le citrate est la source

majeure d'acétyl-CoA cytosolique dans des conditions physiologiques. PPCS : Phosphopantothenoyl-cystéine synthétase. PPCDC : Phosphopantothenoyl-cystéine décarboxylase.

Une mutation de *PANK2* ou *COASY* conduit à un déficit en CoA^{261,262}. Nous avons démontré que les cellules de ces patients présentent une hypopalmitoylation du TfR1 qui est partiellement restaurée grâce à une supplémentation en CoA. Ces éléments nous permettent d'établir un lien direct entre le défaut de palmitoylation et une altération de la biosynthèse de CoA. Dans ce sens, des essais cliniques sont actuellement en cours d'évaluation sur l'utilisation d'un dérivé du CoA, le CoA-Z, chez des patients PKAN (source : clinicaltrial.gov).

Des observations semblables ont également été réalisées dans les fibroblastes de patients AF. Cependant, la relation entre le déficit en CoA intracellulaire et la baisse d'expression de frataxine n'est pas évidente. Pour essayer de comprendre cette interaction, nous nous sommes focalisés sur la principale conséquence du défaut en *FXN*, une altération de la biogenèse des ISC. Nous avons ainsi essayé de déterminer si une ou plusieurs protéines à centre Fe-S étaient impliquées dans la formation d'acétyl-CoA. Ce dernier peut être synthétisé sous l'action de la pyruvate déshydrogénase (PDH) dont l'activité est dépendante de son niveau de lipoylation, qui s'est retrouvé déficitaire dans le cœur de souris MCK dès 8 semaines de vie²²⁵. Nous avons également observé que la lipoylation de la PDH était également plus faible dans les fibroblastes AF comparativement aux cellules contrôles. L'ajout d'acide lipoïque sur les protéines réceptrices est permis grâce à l'action de l'acide lipoïque synthase (LIAS), une protéine à centre Fe-S. Il est donc probable que l'hypopalmitoylation des protéines résulte directement d'un déficit des ISC provoquant une baisse du pool d'acétyl-CoA intracellulaire (**Figure 42**).

Au-delà de la quantité d'acétyl-CoA libre pour l'acylation des protéines, la seconde limitation de ce processus serait la disponibilité de l'acide palmitique (C16:0) (**Figure 43**). Le modèle *knock down* pour *fh1*, l'homologue drosophile de *FXN*, présente une augmentation de la quantité de lipides libres dont des acides gras C16:0¹⁸⁵. Cette dyshoméostasie lipidique a été rapportée dans plusieurs modèles cellulaires et animaux de l'AF^{90,108,263,264}. Ces éléments nous permettent ainsi d'exclure qu'une carence en palmitate soit également impliquée dans le défaut d'acylation des protéines.

Cette altération de l'homéostasie des lipides n'est pas exclusive à l'AF et a été décrite dans de nombreuses maladies neurodégénératives dont les NBIA. Les produits des gènes *PLA2G6* et *FA2H* sont impliqués respectivement dans le remodelage des lipides membranaires ainsi que dans la dégradation des phospholipides ou des céramides, un type de sphingolipides. Une

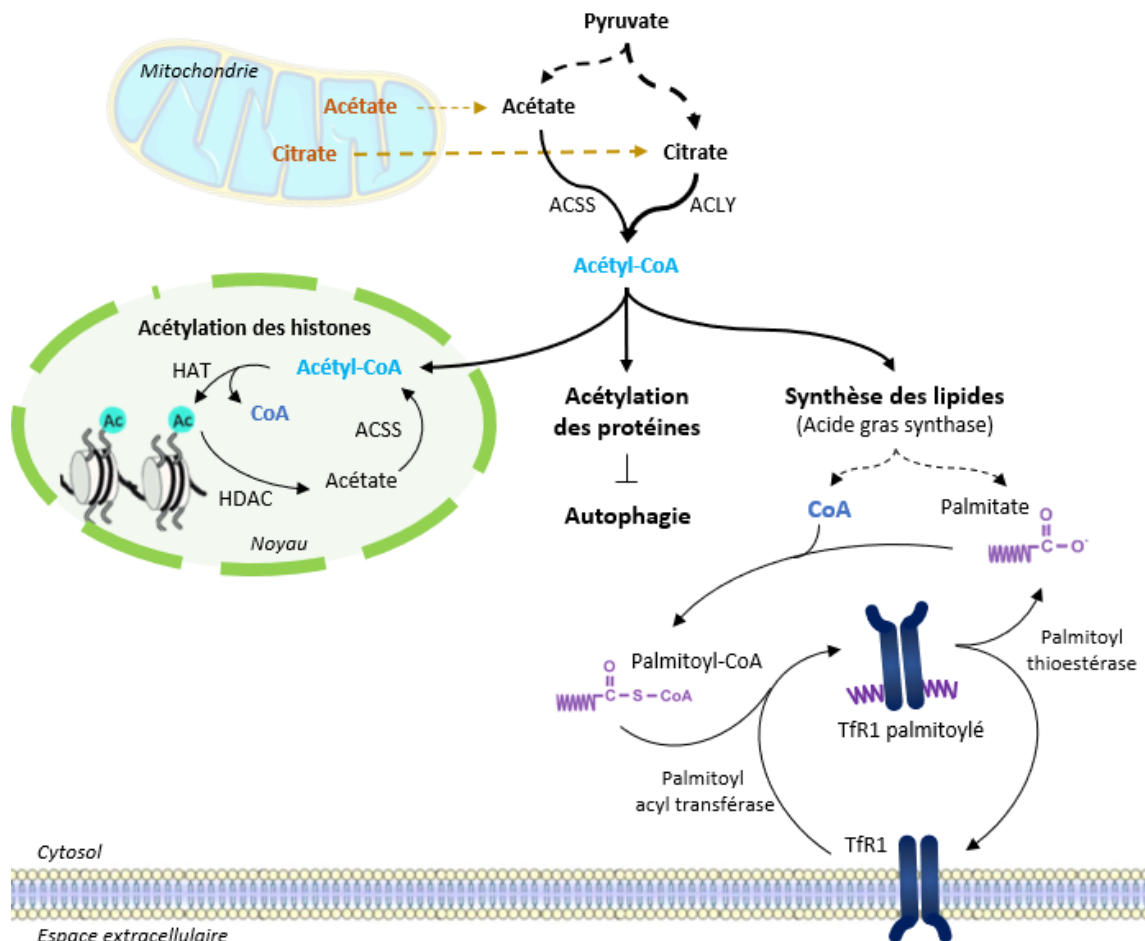
accumulation de ces lipides dans le cerveau provoque une neurotoxicité^{265,266}. Une hausse de la synthèse des sphingolipides a également été rapportée dans l'AF avant l'apparition des symptômes neurologiques^{185,267}. Ces sphingolipides régulent les exosomes et d'autres mécanismes de sécrétion qui peuvent contribuer soit à la propagation des protéines neurotoxiques entre les cellules du cerveau, soit à leur élimination²⁶⁸. Des interactions anormales entre sphingolipides et protéines seraient responsables, au moins en partie, de mauvaises conformations de certains isoformes protéiques tels que le peptide b amyloïde dans la maladie d'Alzheimer, la huntingtine dans la maladie de Huntington, l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson, et des prions dans les encéphalopathies transmissibles²⁶⁹. La perturbation du métabolisme des lipides étant un mécanisme commun aux symptômes neurodégénératifs, il a été proposé que ces acides gras puissent constituer un biomarqueur de ces pathologies²⁶⁹⁻²⁷¹.

4. Rôle des protéines à centre Fe-S dans la synthèse du CoA

Le déficit en protéines à centre Fe-S semble jouer un rôle majeur dans la surcharge en fer cellulaire dans l'AF. Malgré leur impact commun dans le processus de biogenèse des centres Fe-S, tous les défauts des ISC n'aboutissent pas aux mêmes conséquences fonctionnelles sur l'homéostasie du fer. Nous avons montré que seules des cellules déficitaires dans des protéines impliquées dans les premières étapes de la synthèse des ISC (frataxine et ferrédoxine réductase) conduisaient à une dérégulation de l'homéostasie du fer. Des études précédentes ont également démontré que le déficit des protéines du stade précoce de la voie de synthèse des ISC telles que ISCU, LYRM4, FDX1 et FDX2 provoquait une accumulation de fer mitochondrial. En revanche, nous n'avons observé aucune surcharge en fer dans les fibroblastes de patients présentant une mutation dans les gènes *NFUI*, *NUBPL* ou *IBA57*. Par ailleurs, ces patients ne présentent aucune altération de l'homéostasie du fer sur le plan clinique²⁷². Les protéines impliquées dans les stades tardifs des ISC peuvent être spécialisées dans le transfert des centres Fe-S à certaines apoprotéines réceptrices (**Figure 42**). Nous avons d'abord pensé que cette spécificité d'incorporation des centres Fe-S pouvait être responsable des variations des phénotypes observées.

Cependant, les fibroblastes présentant un déficit dans les protéines de la voie de synthèse de l'acide lipoïque (LIPT1 et LIPT2) n'ont aucune accumulation de fer malgré un déficit de la lipoylation de la PDH et de CoA²⁷³. Ces données ajoutent une dimension plus complexe à notre compréhension des déficits en CoA/acétyl-CoA. Il est connu que la quantité de CoA dans la

cellule n'est pas uniformément répartie et diffère considérablement selon les compartiments²⁷⁴. La concentration de CoA mitochondriale est de l'ordre de 2,2 à 5,0 mM tandis que les concentrations cytosoliques sont nettement plus faibles, entre 0,02 et 0,14 mM, selon le type cellulaire²⁷⁵. Dans des conditions physiologiques, la majorité du CoA et d'acétyl-CoA est générée dans la mitochondrie et ensuite transportée dans les autres compartiments par un système actif de transporteurs. Seuls les pores nucléaires ont la capacité de faire passer librement l'acétyl-CoA du cytoplasme vers le noyau (**Figure 43**). Cependant, dans certaines conditions pathologiques, le compartiment cytosolique est capable de produire de l'acétyl-CoA afin de subvenir aux besoins cellulaires. La biodisponibilité du CoA/acétyl-CoA est ainsi finement régulée au sein d'un compartiment et les flux inter-organelles sont influencés par les besoins énergétiques. Dans ce contexte, il est possible d'imaginer que les déficits en CoA/acétyl-CoA observés dans les divers défauts des ISC ne sont pas semblables entre les



compartiments cellulaires et modulent ainsi des voies métaboliques affectées.

Figure 43 : Représentation de la synthèse de l'acétyl-CoA cytosolique et nucléaire ainsi que de son devenir cellulaire. L'acétyl-CoA cytosolique est majoritairement issu de la transformation du citrate, exporté de la

mitochondrie (flèches orange), par l'ATP citrate lyase (ACLY). Dans certaines conditions, l'acétate permet également de générer de l'acétyl-CoA via l'acétyl-CoA synthétase (ACSS). En cas de défaut de synthèse mitochondriale, la dégradation du pyruvate permet de générer ces deux substrats pour la biogenèse d'acétyl-CoA (flèche noires). L'acétyl-CoA peut circuler librement entre les compartiments cytosoliques et nucléaires. Dans le noyau, il permet l'acétylation des histones sous l'action des histones acétylases (HAT). Sa désacétylation fait intervenir des histones désacétylases (HDAC) et induit la formation d'acétate qui pourra être retransformé en acétyl-CoA sous l'action de l'ACSS. Dans le cytosol, le pool d'acétyl-CoA sert également à modifier les protéines et ainsi à bloquer les processus d'autophagie cellulaire. L'acétyl-CoA est également le précurseur de la synthèse des lipides tel que le palmitate ainsi que du CoA. L'addition de ces deux substrats génère du palmitoyl-CoA indispensable pour la palmitoylation du TfR1 via la palmitoyl acyl transférase. Cette modification post-traductionnelle des protéines est réversible et elle peut être éliminée grâce à la palmitoyl thioestérase.

Cette hypothèse est notamment soutenue par les besoins abondants en CoA/acétyl-CoA lors du développement embryonnaire et pendant la régulation de l'embryogenèse²⁷⁶. De plus, l'extinction totale des protéines du stade précoce de la biogenèse des ISC (FXN, NFS1, LYRM4, ISCU, FDX1, FDXR) engendre une létalité embryonnaire chez la souris alors qu'une absence d'expression des protéines de la phase tardive (GLRX5, NFU1, NUBPL, IBA57) conduit à des organismes viables²⁷⁷.

5. Ampleur du déficit du CoA et de l'acétyl-CoA

Comme le CoA et l'acétyl-CoA sont des métabolites intermédiaires centraux impliqués dans de nombreux processus cellulaires, nous avons essayé de comprendre comment leur réduction peut conduire aux différentes manifestations rencontrées dans les défauts des ISC, de l'AF et des NBIA. Malheureusement, le CoA ou l'acétyl-CoA sont généralement quantifiés sur des extraits cellulaires ou tissulaires entiers et très peu d'études ont pu mesurer des changements de concentrations subcellulaires de ces métabolites²⁷⁵. Nous nous sommes donc concentrés à répertorier les différentes observations faites chez les patients et dans différents modèles d'AF et de NBIA afin d'ajouter des arguments en faveur d'une altération potentielle de la distribution et de la biodisponibilité du CoA à travers différents compartiments subcellulaires.

L'acétylation des protéines mitochondriales :

L'acétylation constitue le principal mécanisme de régulation des protéines mitochondriales²⁷⁸ et se produit principalement de manière spontanée²⁷⁹ alors que la désacétylation nécessite systématiquement l'action de sirtuines (SIRT) dépendante du NAD⁺²⁸⁰ (**Figure 42**). Des modèles murins AF présentent une hyperacétylation de protéines mitochondriales dans le cœur due à une inhibition de la désacétylase SIRT3 provoquant l'apparition de l'hypertrophie cardiaque^{281,282}. Cependant, cette hyperacétylation est quelque peu en contradiction avec une

baisse de production en acétyl-CoA suite à une diminution de l'activité de la PDH et une baisse de la quantité de CoA. La quantité d'acétyl-CoA produite étant très faible, il se peut qu'il soit directement incorporé aux apoprotéines réceptrices par des mécanismes non enzymatiques au détriment de son utilisation dans d'autres voies métaboliques. Une diminution conjointe de l'activité des désacétylases peut ainsi conduire à une hyperacétylation progressive des protéines au long court.

Aucun défaut d'acétylation de protéines mitochondriales n'a été rapporté dans d'autres défauts de synthèse des ISC. Cependant, plusieurs preuves soutiennent l'impact des centres Fe-S dans la variation d'activité de SIRT3 dont notamment : 1) une baisse de la production de NAD⁺ suite à une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire dans le cœur ou les tissus musculaires des patients FXN, ISCU, LYRM4, FDX1-2, NUBPL, NFU1 et IBA57²⁷², 2) une prévalence de l'hyperglycémie dans l'ensemble des défauts des ISC provoquant une altération de lipoylation des protéines (FXN, GLRX5, IBA57, NFU1 et BOLA3)^{283,284} et 3) le rôle protecteur de l'expression de SIRT3 dans les mécanismes de résistance à l'insuline et la prédisposition au diabète²⁸⁵. Ces éléments évoquent ainsi une corrélation entre un défaut de lipoylation de protéines et l'apparition de symptômes métaboliques tel que le diabète. Une faible production d'acétyl-CoA couplée éventuellement à un défaut de l'activité des désacétylases mitochondriales semblent être des éléments importants pour l'émergence du diabète et des atteintes cardiaques, plaçant ainsi la mitochondrie et notamment la biogenèse des ISC en tant qu'acteur majeur des voies métaboliques cellulaires dans ces tissus. L'implication de SIRT3 dans les défauts de la biogenèse des ISC est actuellement en cours d'étude (A.S. Martin, Duke University).

L'acétylation des histones :

L'acétylation de protéines nucléaires est impliquée dans le remodelage de la chromatine et l'expression des gènes à travers la modification des histones. L'acétylation des histones est dépendante du niveau d'acétyl-CoA ainsi que de l'activité des histones acétylases (HAC) et désacétylases (HDAC)²⁸⁰ (**Figure 43**). Une hypoacétylation des histones H3 et H4 associée à une hyperméthylation de H3 a été rapportée dans des cellules de patients AF⁵³ promouvant ainsi l'hétérochromatinisation du locus *FXN*. Ces éléments sont ainsi en faveur d'une baisse de pool d'acétyl-CoA nucléaire.

Les pools d'acétyl-CoA cytosoliques et nucléaires peuvent se renouveler de manière indépendante en cas de défaut de synthèse mitochondriale ou dans des conditions physiologiques particulières telle que l'hypoxie²⁷⁵. Ces deux compartiments possèdent des mécanismes de génération d'acétyl-CoA à partir de l'acétate via l'acétyl-CoA synthase par un processus dépendant de l'ATP ou de citrate via l'ATP citrate lyase (ACLY) et l'aconitase 1²⁸⁶ (**Figure 43**). Dans l'AF, le déficit en frataxine conduit à une baisse de la production d'ATP²⁸⁷ ainsi qu'à un déficit en aconitase 1, une protéine à centre Fe-S. De plus, une étude a montré que l'hypoxie permettait d'atténuer les symptômes neurologiques dans les modèles murins *shFXN* sans affecter la progression de la pathologie cardiaque²⁸⁸. Ces données suggèrent que les mécanismes de production d'acétyl-CoA cytosoliques et nucléaires sont également impactés dans les cellules déficitaires en frataxine et pourraient être responsables des désordres neurologiques observés.

L'autophagie :

Le pool d'acétyl-CoA cytosolique joue également un rôle majeur dans l'induction de l'autophagie et les dynamiques des radeaux lipidiques, dont sa déplétion affecte considérablement ces processus cellulaires²⁸⁹ (**Figure 43**). La formation de phagosome peut être appréhendée par la quantité de LC3BII qui est augmentée dans les fibroblastes de patients NBIA, démontrant la présence d'autophagosomes. Cet autophagosome doit ensuite fusionner avec un lysosome pour former un autolysosome et dégrader le matériel cellulaire. Une hausse de vésicules positives à LC3BII et à SQSTM1, une protéine cargo de l'autophagosome, associée à l'accumulation d'agrégats positifs à l'ubiquitine, révèle un blocage de l'autophagie cellulaire dans les neurones de souris KO conditionnel pour WDR45, un autre gène de NBIA^{290,291}. Les cellules déficientes en ATP13A2 (syndrome du Fufor-Rakeb) ont montré une altération de l'induction de l'autophagie²⁹². Par conséquent, l'altération de ce processus dans les NBIA suggère que la quantité de d'acétyl-CoA cytosolique est diminuée.

Un défaut d'autophagie conduisant à l'agrégation de protéines est une caractéristique commune de plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington²⁹³, la maladie de Parkinson²⁹⁴, la maladie l'Alzheimer²⁹⁵. En revanche, l'impact d'un déficit en frataxine dans les mécanismes d'autophagie est contradictoire selon les modèles^{108,109,296}. Toutes les études constatent néanmoins qu'une augmentation de l'autophagie est bénéfique pour la survie des modèles animaux et pour promouvoir les réponses antioxydantes^{108,296}.

Il est encore prématuré de tirer des conclusions sur les différences de concentrations de CoA/acétyl-CoA dans les diverses pathologies sans quantifications subcellulaires fiables. Bien que la mitochondrie joue un rôle prépondérant dans la synthèse de ce métabolite, une diminution de CoA/acétyl-CoA dans cette organelle ne semble pas suffisante pour induire une dérégulation de l'homéostasie du fer dans les déficits tardifs des ISC ou les défauts de lipoylation. Les altérations lipidiques, la sensibilité au stress oxydant, les problèmes d'autophagie et la dérégulation de l'homéostasie du fer observés dans des modèles cellulaires ou animaux d'AF et de NBIA suggèrent que de nombreuses voies métaboliques sous-jacentes sont imbriquées entre elles. Le déficit en CoA/acétyl-CoA semble ainsi s'étendre à plusieurs compartiments subcellulaires. Le mécanisme physiopathologique que nous avons décrit à travers l'hypopalmitoylation du TfR1 dans ces deux pathologies constitue un premier axe de recherche dans lequel il est nécessaire de poursuivre les investigations dans le but de mieux appréhender les désordres métaboliques sous-jacents.

III. *PIP5K1B*, un gène d'atténuation ou d'amplification de la dérégulation de l'homéostasie du fer dans l'AF ?

Notre étude préliminaire a montré l'existence d'une balance fine de régulation de l'expression de *FXN* et de *PIP5K1B* dans la modulation du contenu en fer cellulaire. Les cultures primaires de fibroblastes et les cellules immortalisées (HEK et HeLa) présentent des niveaux d'expression différents des protéines frataxine et pip5k1 β . En outre, *FXN* est beaucoup moins exprimé dans les fibroblastes contrôles que dans les cellules cancéreuses tandis que *PIP5K1B* est très exprimé dans les fibroblastes contrairement aux lignées HEK ou HeLa. De plus, les variations du TfR1 et de la ferritine en réponse à la présence de fer sont plus importantes dans les cultures primaires que dans les cellules immortalisées. La combinaison des niveaux variables de la frataxine, de pip5k1 β , de la régulation de l'homéostasie du fer et du nombre de mitochondries entre les types cellulaires, ou éventuellement d'un organe à l'autre, pourrait participer à la tissu-spécificité de l'AF.

La frataxine est une protéine ubiquitaire majoritairement exprimée dans le cœur, les muscles squelettiques, la moelle épinière, le cerveau et le pancréas²³⁶, en cohérence avec le développement de symptômes cliniques dans ces tissus. *PIP5K1B* possède deux transcrits majeurs détectés dans plusieurs tissus dont principalement le cerveau, la moelle épinière, le

cœur, et les muscles squelettiques²³⁶. Ces spécificités d'expression suggèrent que *PIP5K1B* pourrait également être responsable, au moins en partie, de la pathogénicité de l'AF.

Nous avons ainsi étudié l'impact d'un déficit en frataxine et/ou *pip5k1β* dans l'homéostasie du fer. Une expression réduite de *FXN* provoque une dérégulation de l'homéostasie du fer semblable aux observations réalisées sur les cellules de patients AF. A l'inverse, un déficit de *pip5k1β* a des effets opposés sur le contenu en fer en diminuant la quantité de TfR1 membranaire. Les phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases de type 1 (*pip5k1*) permettent la conversion de PI4P en PI(4,5)P₂, particulièrement abondant dans la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes et le noyau²⁹⁷. A la surface cellulaire, le PI(4,5)P₂ est important pour initier l'endocytose de récepteur membranaire dans des vésicules de clathrines (**Figure 44**), pour la régulation des canaux ioniques et l'induction de signaux intracellulaires. Une baisse du taux de PI(4,5)P₂ membranaire réduit l'internalisation de la Tf et ralentit son recyclage²⁹⁸, démontrant que la fusion de vésicule de recyclage à la membrane plasmique est également dépendante de ce phosphoinositide. Par conséquent, la réduction du contenu en fer intracellulaire observée dans les cellules déficitaires en *pip5k1β* pourrait résulter d'un déficit en PI(4,5)P₂ membranaire.

Dans un modèle murin, la suppression de *PIP5K1C* dans le cerveau, un isoforme de *PIP5K1B*, entraîne un défaut de recyclage des vésicules synaptiques²⁹⁹. La baisse de PI(4,5)P₂ dans le tissu cérébral conduit à des altérations de dépolarisation dans les terminaisons nerveuses entraînant une létalité précoce suite à des défauts synaptiques importants chez la souris²⁹⁹. Cette endocytose dépendante du taux de PI(4,5)P₂ membranaire est également perturbée dans la maladie d'Alzheimer où la synaptojanine ne permet pas de déphosphoryler le PI(4,5)P₂ en PI4P lors de la seconde phase du processus d'endocytose (**Figure 44**)³⁰⁰. Ces éléments soutiennent ainsi qu'une baisse d'expression de *PIP5K1B* pourrait avoir un impact dans le développement de symptômes neurologiques de l'AF.

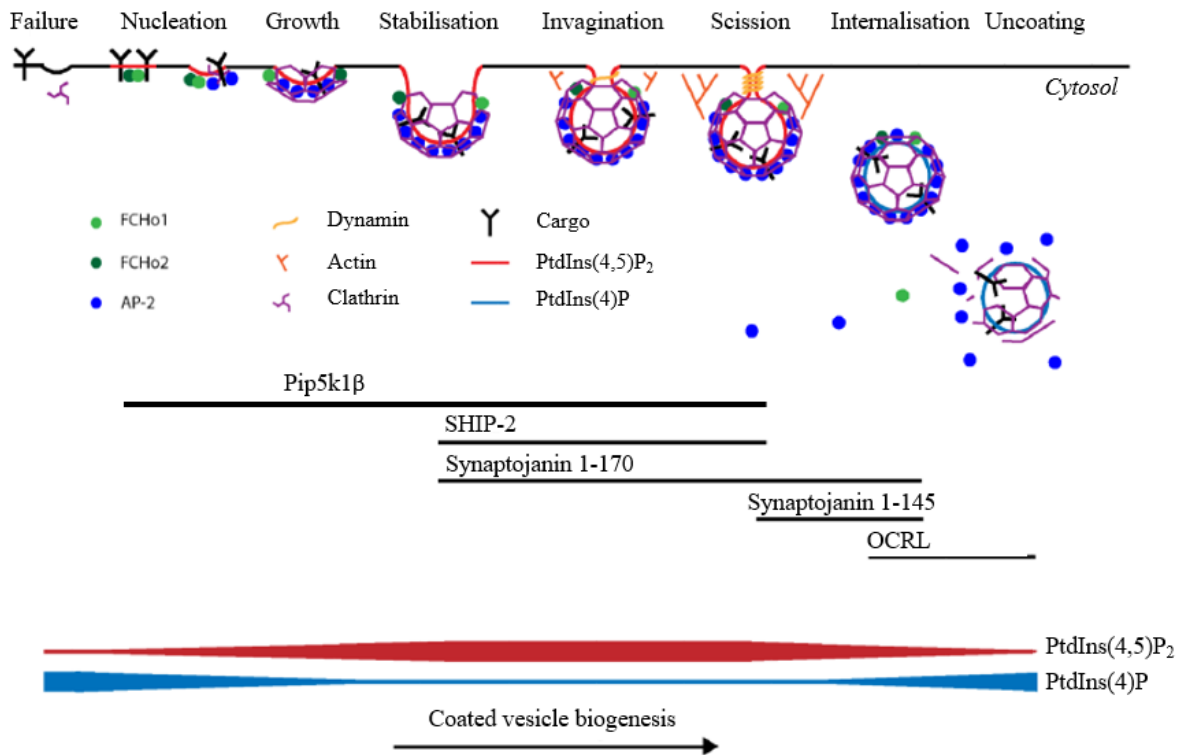


Figure 44 : Implication des phosphoinositides dans l'endocytose de vésicules de clathrine (adapté de Cullen *et al.*³⁰¹). La transformation du PI(4)P en PI(4,5)P₂ est requise pour initier les premières étapes d'endocytose, comportant la formation de la vésicule de clathrine jusqu'à sa scission membranaire. Une fois la vésicule formée et endocytée, le PI(4,5)P₂ est converti en PI(4)P dans le cytoplasme. Plusieurs phosphoinositides kinases sont impliquées dans la transition du PI(4)P en PI(4,5)P₂ et inversement telles que pip5k1β, la synaptojanine 1 (synaptojanine 1-170 et synaptojanine 1-145), SHIP2 (inositol 5-phosphatase contenant un domaine SH2) et OCRL (syndrome oculo-cérébro-rénal de Lowe).

Au niveau des lysosomes, la conversion du PI4P en PI(4,5)P₂ par pip5k1β joue un rôle primordial dans la dernière étape de l'autophagie pour reformer une vésicule de lysosome autophagique à partir de l'autophagosome afin de maintenir l'homéostasie lysosomale³⁰². La présence de PI(4,5)P₂ permet le recrutement de clathrine au niveau de l'autolysosome³⁰³. Ainsi, PI(4,5)P₂ affecte indirectement le mécanisme d'autophagie, en tant que précurseur de la formation de PI(3,4,5)P₃. L'accumulation anormale d'autophagosome ou des défauts d'autophagie ont été largement décrits dans plusieurs désordres neurologiques tels que les NBIA, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les épilepsies, et des troubles neurodéveloppementaux³⁰⁰.

Ces données témoignent ainsi qu'une baisse d'expression de *PIP5K1B* n'aurait aucun impact dans l'établissement de la dérégulation de l'homéostasie du fer observée dans les cellules de patients AF. Dans un contexte de diminution en frataxine, le déficit en PI(4,5)P₂ ne semble pas suffisant pour limiter l'entrée du fer via l'endocytose du TfR1. Au contraire, nous avons constaté que ce phénotype était accentué sous l'effet d'une baisse de pip5k1β, suggérant que

des altérations de la voie des phosphoinositides s'ajouteraient aux modifications biochimiques induites par une baisse d'expression de *FXN*. Par conséquent, le retard de recyclage de la Tf observé dans les cellules AF pourrait être le reflet de la réduction de pip5k1 β . La variabilité des altérations de l'autophagie dans différents modèles de l'AF pourrait également exprimer les modulations d'expression de *PIP5K1B*. Les nombreux modèles cellulaires et animaux qui ont été conçus en ciblant spécifiquement la frataxine ne peuvent ainsi prétendre représenter toute la complexité qui peut être envisagée dans l'AF, qui ne se limite pas forcément à une baisse de l'expression de *FXN*.

Malgré nos connaissances limitées sur le rôle de *PIP5K1B* dans l'AF, un défaut de la voie de synthèse de phosphoinositide pourrait être un constituant de base de la pathogénicité de cette maladie. À l'image de la variation tissulaire de l'expression de *FXN*, les déficits de PI(4,5)P₂ varient considérablement d'un type cellulaire à un autre⁶¹. Pour un même patient, le déficit de ce phosphoinositide n'est que de 40% dans les fibroblastes alors qu'il peut atteindre près de 60% dans les cellules sanguines⁶¹. De plus, les effets synaptiques d'une baisse de PI(4,5)P₂ ne sont observés que pour des taux résiduels inférieurs à 50%²⁹⁹. L'impact de l'extinction de *PIP5K1B* peut ainsi considérablement varier selon les tissus. Il semble donc primordial de se rapprocher le plus possible des organes touchés par la maladie pour comprendre le rôle d'un défaut de pip5k1 β dans l'établissement des mécanismes physiopathologiques de l'AF.

IV. L'artésunate, une piste thérapeutique

L'artésunate est un agent anti-malaria dont les thérapies combinatoires à bases d'artémisinine sont recommandées en tant que traitement de première intention dans les régions présentant un paludisme endémique grâce à son excellent profil de sécurité (source OMS). La présence importante de fer réduit (Fe²⁺) ou l'hème libre résultant de la dégradation de l'hémoglobine par *P. falciparum* entraîne l'activation des dérivés de l'artémisinine par le clivage des ponts endoperoxydes, produisant des radicaux libres et un stress oxydatif important qui endommagent les macromolécules du parasite²³⁵. Ces dommages intracellulaires sur les protéines et les lipides parasitaires entraînent finalement sa mort²³⁵. Les dérivés de l'artémisinine possèdent de nombreuses cibles cellulaires³⁰⁴ et tous les mécanismes d'action de l'artésunate sur le métabolisme ne sont pas entièrement caractérisés.

Nous avons testé l'artésunate et plusieurs dérivés sur des cellules sanguines de patients AF cultivées en présence de fer. Ces molécules ont permis de limiter l'entrée du fer et de diminuer

la surcharge de ce métal. Des résultats semblables ont été obtenus avec un ozonide dépourvu de pont endoperoxyde. Par conséquent, la réduction du taux de fer ne semble pas impliquer cette liaison peroxyde.

L'étude de l'artésunate dans des fibroblastes de patients AF et de NBIA a mis en évidence la capacité de cette molécule à réduire la surcharge en fer grâce à la restauration du niveau de palmitoylation, la baisse du taux de TfR1 membranaire et la réduction de la quantité de ferritine. L'action de l'artésunate semble donc résulter de plusieurs mécanismes coopératifs.

Il a été décrit que les dérivés de l'artémisinine ont la capacité de réduire la teneur en fer intracellulaire en augmentant la palmitoylation du TfR1³⁰⁵. La palmitoylation joue un rôle important dans la translocation de protéines membranaires vers des radeaux lipidiques ; ce qui suggère que le TfR1 pourrait être internalisé par une voie d'endocytose non classique indépendante du manteau de clathrine (**Figure 45**). Une seconde voie d'assimilation du fer par le TfR1 a été rapportée dans des cellules HeLa et implique son internalisation par des radeaux lipidiques³⁰⁶. Une fois endocyté, le TfR1 est dégradé par voie lysosomale³⁰⁶. Cette voie alternative n'étant pas induite de manière constitutive et ne représentant pas la voie d'endocytose majoritaire du TfR1, il est possible d'envisager que la capacité de réduction de la surcharge en fer de l'artésunate passerait par une dégradation importante du TfR1 grâce au rétablissement de sa palmitoylation. La quantité totale de ce récepteur diminuant au cours du temps d'administration, il est moins présent à la surface membranaire pour se lier à la Tf provoquant ainsi une diminution de l'entrée du fer dans les cellules de patients.

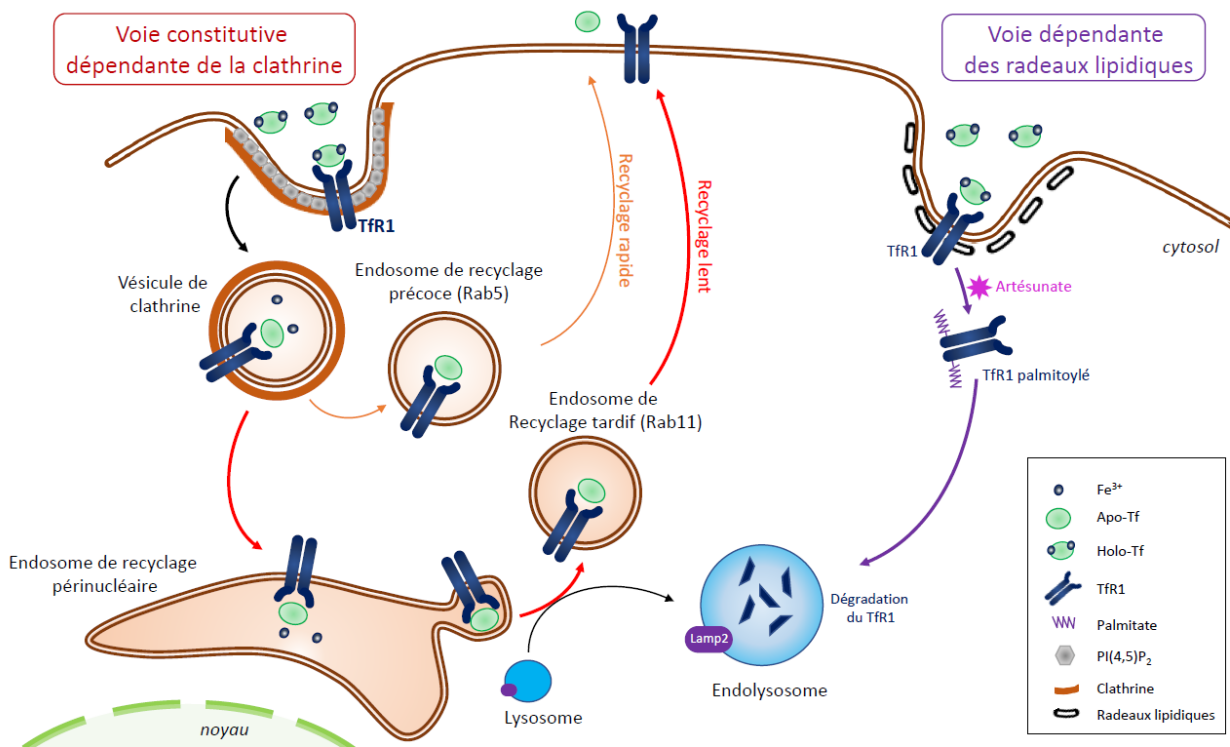


Figure 45 : Les différentes voies d'endocytose du TFR1. La voie constitutive implique la formation d'un manteau de clathrine autour de la vésicule d'endocytose pour aboutir à un recyclage rapide (dépendant de Rab5) ou tardif (dépendant de Rab11). Après une centaine de cycles d'intériorisations et de recyclages, le TFR1 est dégradé dans les endolysosomes. La palmitoylation du TFR1, induite de manière physiologique ou sous l'action de l'artésunate, provoque son endocytose par des radeaux lipidiques qui le transporte vers les lysosomes pour y être dégradé.

Cet agent anti-malarien agissant sur la voie TBI, il est tout à fait concevable d'observer ces effets sur le contenu en fer lorsque les fibroblastes AF sont incubés en présence d'holo-Tf. Cependant, il est bien plus surprenant que cette diminution de la teneur en ce métal soit également constatée quand les cellules sont placées dans un milieu riche en fer oxydé (FAC) absorbé par la voie NTBI. Ces éléments suggèrent l'existence d'autres niveaux de régulations du fer par l'artésunate. Il a été rapporté que le DHA diminue l'expression de deux autres participants de l'homéostasie du fer, Steap3 et DMT1³⁰⁵, impliqués respectivement dans la réduction du fer ferrique en fer ferreux et son passage à travers la paroi cellulaire ou endosomale. Ces deux protéines ont la particularité de participer aux deux voies d'entrée du fer (TBI et NTBI). Il a également été constaté que la baisse de DMT1 et de Steap3 apparaissait plus tardivement que celui du TFR1 membranaire (environ 6-12 h pour DMT1 et Steap3 contre 1 h pour le TFR1) suite à un traitement en DHA³⁰⁵. De plus, la modification de l'expression de ces acteurs est indépendante de celle de l'internalisation du TFR1 et insensible au blocage de la voie d'endocytose par des radeaux lipidiques. Ces données suggèrent donc que les dérivés de l'artémisinine peuvent affecter l'entrée du fer par la voie NTBI *via* un mécanisme ne faisant

pas intervenir la palmitoylation. En outre, ce procédé permettrait d'expliquer la baisse de la surcharge en fer intracellulaire constatée lors d'une co-incubation des cellules en présence de FAC et d'artésunate. Toutefois, en l'absence de preuve attestant d'un déficit global de palmitoylation des protéines dans les cellules de patients AF et de NBIA, nous pouvons écarter la possibilité d'une action plus générale de l'artésunate sur l'acylation de résidus cystéines de polypeptides.

L'artésunate a également la capacité d'induire des mécanismes d'autophagie³⁰⁷ qui accélèrent la dégradation des ferritines, la libération du fer et l'accumulation de ROS³⁰⁸ conduisant à la ferroptose³⁰⁹. La ferroptose correspond à une mort cellulaire dépendante du fer se caractérisant par la peroxydation des lipides. Cette détérioration oxydante des lipides a déjà été observée dans les cellules gliales d'un modèle drosophile de l'AF et conduit à la dégénérescence cellulaire et des symptômes neurodégénératifs¹⁸⁵. L'accumulation de peroxydes lipidiques en fonction de l'âge des Drosophiles est corrélée avec l'augmentation endogène de la production de ROS suite à une perte de frataxine¹⁸⁵. Par conséquent, l'induction de mort cellulaire par l'artésunate est un phénomène oxydatif très nocif promouvant une cytotoxicité. Nous avons également observé cette toxicité cellulaire de l'artésunate dans des cellules de fibroblastes contrôles ainsi que sur des PBMC témoins et de patients AF cultivées en condition riche en fer (FAC). En revanche, elle n'est pas observée lors de la co-incubation des cellules avec de l'holo-Tf (données non montrées), suggérant que l'action de l'artésunate sur la voie NTBI semble impliquer des mécanismes additionnels telle que la ferroptose promouvant une sensibilité au stress.

Au vu de l'action globale de l'artésunate dans l'absorption du fer intracellulaire, cette molécule rassemble toutes les propriétés pharmacologiques pour son utilisation pour le traitement de l'AF et des NBIA. Néanmoins, il semble évident que nous pouvons prévoir sa toxicité probable sur le long terme. L'artésunate est généralement bien toléré sur des périodes courtes de l'ordre d'une semaine chez les patients atteints de paludisme. L'ataxie de Friedreich étant une maladie progressive s'installant sur plusieurs années, tous les traitements sont pris sur le long terme. Ainsi nous devons envisager des périodes d'exposition nettement plus importantes que celles utilisées dans le traitement de la malaria. Dans ce sens, nous avons étudié si les effets de l'artésunate pouvaient se prolonger au-delà de sa période d'incubation et nous avons observé des diminutions du contenu en fer comparables pour des incubations de 16 h et de 40 h. Cet effet prolongé de l'artésunate peut être exploité pour la mise en place d'un protocole

thérapeutique d'essais cliniques combinant des périodes d'expositions et d'arrêts temporaires du traitement. Ces essais cliniques devront également s'acquitter de tester différentes concentrations d'artésunate à travers un essai d'escalade de dose afin d'identifier la dose thérapeutique minimale.

Toutefois, il est important de considérer que des cas d'anémies hémolytiques tardives ont été signalés suite à des injections d'artésunate (source OMS 2013). Les instances sanitaires internationales ont établi que les bénéfices thérapeutiques dépassaient de loin les effets indésirables des dérivés de l'artémisinine dans un contexte de malaria (source OMS 2013). Ainsi, il convient de réaliser des analyses sanguines régulières des patients sous traitement thérapeutique afin de détecter toute anomalie du bilan martial. De plus, l'artésunate est contre-indiqué avec la prise simultanée de médicaments inhibant les enzymes hépatiques car son métabolite actif, la DHA, est inactivé sous l'action de plusieurs enzymes de la famille des cytochromes P450 dont CYP2B6, CYP2C19 et CYP3A4³¹⁰. L'activité de ces protéines enzymatiques peut également être prise en compte dans les futurs essais cliniques afin d'explorer les effets de l'artésunate dans l'AF. Enfin, les mécanismes d'actions connus de l'artésunate amènent à penser que les traitements couramment pris par les patients AF tels que des chélateurs de fer ou des antioxydants pourraient venir atténuer les effets de cette molécule. Les médecins référents pourront ainsi juger de la possibilité d'adapter ces traitements au cours de l'essai clinique à base d'artésunate. L'ensemble de ces éléments constituent les premières pistes de réflexion du futur essai thérapeutique qui pourrait être lancé dans le service de génétique de l'hôpital Necker-Enfants malades.

Références bibliographiques

1. Cossee, M. *et al.* Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: Founder effect and premutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 7452–7457 (1997).
2. Vankan, P. Prevalence gradients of Friedreich's Ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *J. Neurochem.* **126**, 11–20 (2013).
3. Labuda, M. *et al.* Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion. *Neurology* **54**, 2322–2324 (2000).
4. Bürk, K. Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias* **4**, 4 (2017).
5. Koeppen, A. H. Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J. Neurol. Sci.* **303**, 1–12 (2011).
6. Koeppen, A. H. & Mazurkiewicz, J. E. Friedreich ataxia: neuropathology revised. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**, 78–90 (2013).
7. Harding, I. H. *et al.* Fronto-cerebellar dysfunction and dysconnectivity underlying cognition in friedreich ataxia: The IMAGE-FRDA study. *Hum. Brain Mapp.* **37**, 338–350 (2016).
8. Harding, I. H. *et al.* Tissue atrophy and elevated iron concentration in the extrapyramidal motor system in Friedreich ataxia: the IMAGE-FRDA study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **87**, 1261–1263 (2016).
9. Fortuna, F. *et al.* Visual system involvement in patients with Friedreich's ataxia. *Brain J. Neurol.* **132**, 116–123 (2009).
10. Harding, A. E. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain J. Neurol.* **104**, 589–620 (1981).
11. Rajagopalan, B. *et al.* Analysis of the factors influencing the cardiac phenotype in Friedreich's ataxia. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **25**, 846–852 (2010).
12. Koeppen, A. H. *et al.* The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich ataxia. *PloS One* **10**, e0116396 (2015).
13. Schadt, K. A. *et al.* Cross-sectional analysis of electrocardiograms in a large heterogeneous cohort of Friedreich ataxia subjects. *J. Child Neurol.* **27**, 1187–1192 (2012).
14. De Michele, G. *et al.* Age of onset, sex, and cardiomyopathy as predictors of disability and survival in Friedreich's disease: a retrospective study on 119 patients. *Neurology* **47**, 1260–1264 (1996).
15. Cnop, M., Mulder, H. & Igoillo-Esteve, M. Diabetes in Friedreich ataxia. *J. Neurochem.* **126 Suppl 1**, 94–102 (2013).
16. De Michele, G. *et al.* Late onset Friedreich's disease: clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **57**, 977–979 (1994).
17. Dürr, A. *et al.* Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1169–1175 (1996).
18. Lecocq, C. *et al.* Delayed-onset Friedreich's ataxia revisited. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **31**, 62–69 (2016).
19. Tsou, A. Y. *et al.* Mortality in Friedreich ataxia. *J. Neurol. Sci.* **307**, 46–49 (2011).
20. Campuzano, V. *et al.* Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. **271**, 6 (1996).
21. Epplen, C. *et al.* Differential stability of the (GAA)_n tract in the Friedreich ataxia (STM7) gene. *Hum. Genet.* **99**, 834–836 (1997).
22. Monrós, E. *et al.* Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 101–110 (1997).
23. De Biase, I. *et al.* Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich's ataxia patients. *Ann. Neurol.* **61**, 55–60 (2007).
24. De Biase, I. *et al.* Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics* **90**, 1–5 (2007).
25. Parkinson, M. H., Boesch, S., Nachbauer, W., Mariotti, C. & Giunti, P. Clinical features of Friedreich's ataxia: classical and atypical phenotypes. *J. Neurochem.* **126 Suppl 1**, 103–117 (2013).
26. Pastore, A. & Puccio, H. Frataxin: a protein in search for a function. *J. Neurochem.* **126 Suppl 1**, 43–52 (2013).
27. Lynch, D. R., Deutsch, E. C., Wilson, R. B. & Tennekoon, G. Unanswered Questions in Friedreich Ataxia. *J. Child Neurol.* **27**, 1223–1229 (2012).
28. Anheim, M. *et al.* Exonic deletions of FXN and early-onset Friedreich ataxia. *Arch. Neurol.* **69**, 912–916 (2012).
29. Tsai, C.-L., Bridwell-Rabb, J. & Barondeau, D. P. Friedreich's ataxia variants I154F and W155R diminish frataxin-based activation of the iron-sulfur cluster assembly complex. *Biochemistry* **50**, 6478–6487 (2011).
30. Correia, A. R., Adinolfi, S., Pastore, A. & Gomes, C. M. Conformational stability of human frataxin and effect of Friedreich's ataxia-related mutations on protein folding. *Biochem. J.* **398**, 605–611 (2006).

31. Lamba, L. D. *et al.* Friedreich's ataxia: a new mutation in two compound heterozygous siblings with unusual clinical onset. *Eur. Neurol.* **61**, 240–243 (2009).
32. Cossée, M. *et al.* Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.* **45**, 200–206 (1999).
33. Forrest, S. M. *et al.* The correlation of clinical phenotype in Friedreich ataxia with the site of point mutations in the FRDA gene. *Neurogenetics* **1**, 253–257 (1998).
34. Galea, C. A. *et al.* Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* **79**, 485–495 (2016).
35. Candayan, A. *et al.* The first biallelic missense mutation in the FXN gene in a consanguineous Turkish family with Charcot-Marie-Tooth-like phenotype. *Neurogenetics* **21**, 73–78 (2020).
36. Cossée, M. *et al.* Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1219–1226 (2000).
37. Campuzano, V. *et al.* Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1771–1780 (1997).
38. Deutsch, E. C. *et al.* A rapid, noninvasive immunoassay for frataxin: utility in assessment of Friedreich ataxia. *Mol. Genet. Metab.* **101**, 238–245 (2010).
39. Punga, T. & Bühler, M. Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol. Med.* **2**, 120–129 (2010).
40. Kumari, D. & Usdin, K. Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clin. Epigenetics* **4**, 2 (2012).
41. Bacolla, A., Wang, G. & Vasquez, K. M. New Perspectives on DNA and RNA Triplexes As Effectors of Biological Activity. *PLOS Genet.* **11**, e1005696 (2015).
42. Li, J. *et al.* Ion Mobility-Mass Spectrometry Reveals Details of Formation and Structure for GAA·TCC DNA and RNA Triplexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **30**, 103–112 (2019).
43. Mirkin, S. M. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* **447**, 932–940 (2007).
44. Burnett, R. *et al.* DNA sequence-specific polyamides alleviate transcription inhibition associated with long GAA·TTC repeats in Friedreich's ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11497–11502 (2006).
45. Sakamoto, N., Ohshima, K., Montermini, L., Pandolfo, M. & Wells, R. D. Sticky DNA, a self-associated complex formed at long GAA·TTC repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription. *J. Biol. Chem.* **276**, 27171–27177 (2001).
46. Sakamoto, N. *et al.* Sticky DNA: self-association properties of long GAA·TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia. *Mol. Cell* **3**, 465–475 (1999).
47. Young, S. L., Krawczyk, S. H., Matteucci, M. D. & Toole, J. J. Triple helix formation inhibits transcription elongation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10023–10026 (1991).
48. Kovacs, A., Kandala, J. C., Weber, K. T. & Guntaka, R. V. Triple helix-forming oligonucleotide corresponding to the polypyrimidine sequence in the rat alpha 1(I) collagen promoter specifically inhibits factor binding and transcription. *J. Biol. Chem.* **271**, 1805–1812 (1996).
49. Ku, S. *et al.* Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA·TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell* **7**, 631–637 (2010).
50. Al-Mahdawi, S. *et al.* GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* **88**, 580–590 (2006).
51. Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z. & Festenstein, R. DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* **422**, 909–913 (2003).
52. Al-Mahdawi, S. *et al.* The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 735–746 (2008).
53. Herman, D. *et al.* Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 551–558 (2006).
54. Sahdeo, S. *et al.* Dyclonine rescues frataxin deficiency in animal models and buccal cells of patients with Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 6848–6862 (2014).
55. Castaldo, I. *et al.* DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J. Med. Genet.* **45**, 808–812 (2008).
56. Chutake, Y. K., Lam, C., Costello, W. N., Anderson, M. & Bidichandani, S. I. Epigenetic promoter silencing in Friedreich ataxia is dependent on repeat length: Epigenetic Silencing in FRDA. *Ann. Neurol.* **76**, 522–528 (2014).
57. Stevanoni, M., Palumbo, E. & Russo, A. The Replication of Frataxin Gene Is Assured by Activation of Dormant Origins in the Presence of a GAA-Repeat Expansion. *PLOS Genet.* **12**, e1006201 (2016).
58. Baralle, M., Pastor, T., Bussani, E. & Pagani, F. Influence of Friedreich ataxia GAA noncoding repeat expansions on pre-mRNA processing. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 77–88 (2008).
59. Shishkin, A. A. *et al.* Large-scale expansions of Friedreich's ataxia GAA repeats in yeast. *Mol. Cell* **35**, 82–92 (2009).

60. Bidichandani, S. I., Ashizawa, T. & Patel, P. I. The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 111–121 (1998).
61. Bayot, A. *et al.* Cis-silencing of PIP5K1B evidenced in Friedreich's ataxia patient cells results in cytoskeleton anomalies. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2894–2904 (2013).
62. Lacalle, R. A. *et al.* Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase homo- and heterodimerization determines its membrane localization and activity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **29**, 2371–2385 (2015).
63. Senju, Y. & Lappalainen, P. Regulation of actin dynamics by PI(4,5)P2 in cell migration and endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **56**, 7–13 (2019).
64. Tan, X., Thapa, N., Liao, Y., Choi, S. & Anderson, R. A. PtdIns(4,5)P2 signaling regulates ATG14 and autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 10896–10901 (2016).
65. Chakrabarti, R. *et al.* Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase 1 α Modulates Ribosomal RNA Gene Silencing through Its Interaction with Histone H3 Lysine 9 Trimethylation and Heterochromatin Protein HP1- α . *J. Biol. Chem.* **290**, 20893–20903 (2015).
66. Karlberg, T. *et al.* The Structures of Frataxin Oligomers Reveal the Mechanism for the Delivery and Detoxification of Iron. *Structure* **14**, 1535–1546 (2006).
67. Li, K., Besse, E. K., Ha, D., Kovtunovych, G. & Rouault, T. A. Iron-dependent regulation of frataxin expression: implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2265–2273 (2008).
68. Rasheed, M. *et al.* Structural and functional characterization of a frataxin from a thermophilic organism. *Febs J.* **286**, 495–506 (2019).
69. Fekry, M. *et al.* SAXS and stability studies of iron-induced oligomers of bacterial frataxin CyaY. *PloS One* **12**, e0184961 (2017).
70. Adinolfi, S. *et al.* The Factors Governing the Thermal Stability of Frataxin Orthologues: How To Increase a Protein's Stability. *Biochemistry* **43**, 6511–6518 (2004).
71. Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A. & Puccio, H. The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3521–3531 (2008).
72. Condò, I. *et al.* In vivo maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1534–1540 (2007).
73. Yoon, T., Dizin, E. & Cowan, J. A. N-terminal iron-mediated self-cleavage of human frataxin: regulation of iron binding and complex formation with target proteins. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **12**, 535–542 (2007).
74. Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y. I., Ristow, M. & Shoelson, S. E. Crystal structure of human frataxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 30753–30756 (2000).
75. Cho, S. J. *et al.* Crystal structure of Escherichia coli CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8932–8937 (2000).
76. Popovic, M. *et al.* Selective observation of the disordered import signal of a globular protein by in-cell NMR: the example of frataxins. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **24**, 996–1003 (2015).
77. Bencze, K. Z. *et al.* The Structure and Function of Frataxin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 269–291 (2006).
78. Correia, A. R., Wang, T., Craig, E. A. & Gomes, C. M. Iron-binding activity in yeast frataxin entails a trade off with stability in the alpha1/beta1 acidic ridge region. *Biochem. J.* **426**, 197–203 (2010).
79. Gomes, C. M. & Santos, R. Neurodegeneration in Friedreich's Ataxia: From Defective Frataxin to Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, (2013).
80. Roman, E. A. *et al.* Protein Stability and Dynamics Modulation: The Case of Human Frataxin. *PLoS ONE* **7**, (2012).
81. Lill, R. & Mühlenhoff, U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 669–700 (2008).
82. Rouault, T. A. The indispensable role of mammalian iron sulfur proteins in function and regulation of multiple diverse metabolic pathways. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **32**, 343–353 (2019).
83. Lill, R. & Freibert, S.-A. Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **89**, annurev-biochem-013118-111540 (2020).
84. Maio, N. & Rouault, T. A. Mammalian Fe-S proteins: definition of a consensus motif recognized by the co-chaperone HSC20. *Met. Integr. Biometal Sci.* **8**, 1032–1046 (2016).
85. Rouault, T. A. Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis. Model. Mech.* **5**, 155–164 (2012).
86. Pandey, A. *et al.* Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *J. Biol. Chem.* **288**, 36773–36786 (2013).
87. Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–838 (2009).

88. Lill, R. *et al.* The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **94**, 280–291 (2015).
89. Rötig, A. *et al.* Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**, 215–217 (1997).
90. Puccio, H. *et al.* Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **27**, 181–186 (2001).
91. Martelli, A. *et al.* Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2651–2658 (2007).
92. Tsai, C.-L. & Barondeau, D. P. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**, 9132–9139 (2010).
93. Gerber, J., Mühlhoff, U. & Lill, R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**, 906–911 (2003).
94. Yoon, T. & Cowan, J. A. Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **279**, 25943–25946 (2004).
95. Bencze, K. Z. *et al.* Human frataxin: iron and ferrochelatase binding surface. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 1798–1800 (2007) doi:10.1039/b703195e.
96. Lesuisse, E. *et al.* Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum. Mol. Genet.* **12**, 879–889 (2003).
97. Seguin, A. *et al.* Overexpression of the yeast frataxin homolog (Yfh1): contrasting effects on iron-sulfur cluster assembly, heme synthesis and resistance to oxidative stress. *Mitochondrion* **9**, 130–138 (2009).
98. Park, S. *et al.* Yeast Frataxin Sequentially Chaperones and Stores Iron by Coupling Protein Assembly with Iron Oxidation. *J. Biol. Chem.* **278**, 31340–31351 (2003).
99. Yoon, T. & Cowan, J. A. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6078–6084 (2003).
100. Adamec, J. *et al.* Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 549–562 (2000).
101. Cavadini, P., O’Neill, H. A., Benada, O. & Isaya, G. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 217–227 (2002).
102. Babcock, M. *et al.* Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**, 1709–1712 (1997).
103. Becker, E. M., Greer, J. M., Ponka, P. & Richardson, D. R. Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. *Blood* **99**, 3813–3822 (2002).
104. Chiang, S. *et al.* Frataxin and the molecular mechanism of mitochondrial iron-loading in Friedreich’s ataxia. *Clin. Sci.* **130**, 853–870 (2016).
105. Foury, F. & Cazzalini, O. Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich’s ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* **411**, 373–377 (1997).
106. Bulteau, A.-L. *et al.* Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1561–1570 (2007).
107. Heidari, M. M., Houshmand, M., Hosseinkhani, S., Nafissi, S. & Khatami, M. Complex I and ATP content deficiency in lymphocytes from Friedreich’s ataxia. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* **36**, 26–31 (2009).
108. Schiavi, A. *et al.* Autophagy induction extends lifespan and reduces lipid content in response to frataxin silencing in *C. elegans*. *Exp. Gerontol.* **48**, 191–201 (2013).
109. Simon, D. *et al.* Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia. *J. Neurosci.* **24**, 1987–1995 (2004).
110. Silva, B. & Faustino, P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 1347–1359 (2015).
111. Huang, M. L.-H., Lane, D. J. R. & Richardson, D. R. Mitochondrial mayhem: the mitochondrion as a modulator of iron metabolism and its role in disease. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 3003–3019 (2011).
112. Hadzhieva, M., Kirches, E. & Mawrin, C. Review: iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **40**, 240–257 (2014).
113. Trenor, C. C., Campagna, D. R., Sellers, V. M., Andrews, N. C. & Fleming, M. D. The molecular defect in hypotransferrinemic mice. *Blood* **96**, 1113–1118 (2000).
114. Bartnikas, T. B. Known and potential roles of transferrin in iron biology. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **25**, 677–686 (2012).
115. Hershko, C., Graham, G., Bates, G. W. & Rachmilewitz, E. A. Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. *Br. J. Haematol.* **40**, 255–263 (1978).

116. Grootveld, M. *et al.* Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **264**, 4417–4422 (1989).
117. van der Heul, C., van Eijk, H. G., Wiltink, W. F. & Leijnse, B. The binding of iron to transferrin and to other serum components at different degrees of saturation with iron. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **38**, 347–353 (1972).
118. Matias, C. *et al.* Citrate and albumin facilitate transferrin iron loading in the presence of phosphate. *J. Inorg. Biochem.* **168**, 107–113 (2017).
119. Levy, J. E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F. & Andrews, N. C. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat. Genet.* **21**, 396–399 (1999).
120. Barrientos, T. *et al.* Metabolic Catastrophe in Mice Lacking Transferrin Receptor in Muscle. *EBioMedicine* **2**, 1705–1717 (2015).
121. Xu, W. *et al.* Lethal Cardiomyopathy in Mice Lacking Transferrin Receptor in the Heart. *Cell Rep.* **13**, 533–545 (2015).
122. Fleming, R. E. *et al.* Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2214–2219 (2000).
123. Kawabata, H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 46–54 (2019).
124. Johnson, M. B. & Enns, C. A. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood* **104**, 4287–4293 (2004).
125. Luria-Pérez, R., Helguera, G. & Rodríguez, J. A. Antibody-mediated targeting of the transferrin receptor in cancer cells. *Bol. Méd. Hosp. Infant. México* **73**, 372–379 (2016).
126. Dong, X.-P. *et al.* The type IV mucopolidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* **455**, 992–996 (2008).
127. Blanc, L. *et al.* Abnormal erythroid maturation leads to microcytic anemia in the TSAP6/Steap3 null mouse model. *Am. J. Hematol.* **90**, 235–241 (2015).
128. Gunshin, H. *et al.* Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest.* **115**, 1258–1266 (2005).
129. Testi, C., Boffi, A. & Montemiglio, L. C. Structural analysis of the transferrin receptor multifaceted ligand(s) interface. *Biophys. Chem.* **254**, 106242 (2019).
130. Collawn, J. F. *et al.* YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis. *J. Biol. Chem.* **268**, 21686–21692 (1993).
131. Rothenberger, S., Iacopetta, B. J. & Kühn, L. C. Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell* **49**, 423–431 (1987).
132. Alvarez, E., Gironès, N. & Davis, R. J. Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid. *J. Biol. Chem.* **265**, 16644–16655 (1990).
133. Hayes, G. R., Enns, C. A. & Lucas, J. J. Identification of the O-linked glycosylation site of the human transferrin receptor. *Glycobiology* **2**, 355–359 (1992).
134. Williams, A. M. & Enns, C. A. A mutated transferrin receptor lacking asparagine-linked glycosylation sites shows reduced functionality and an association with binding immunoglobulin protein. *J. Biol. Chem.* **266**, 17648–17654 (1991).
135. Transferrin Receptor (Molecular Biology). <http://what-when-how.com/molecular-biology/transferrin-receptor-molecular-biology/>.
136. Shindo, M. *et al.* Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* **35**, 152–162 (2006).
137. Chua, A. C. G., Olynyk, J. K., Leedman, P. J. & Trinder, D. Nontransferrin-bound iron uptake by hepatocytes is increased in the Hfe knockout mouse model of hereditary hemochromatosis. *Blood* **104**, 1519–1525 (2004).
138. Shawki, A., Knight, P. B., Maliken, B. D., Niespodzany, E. J. & Mackenzie, B. H(+)-coupled divalent metal-ion transporter-1: functional properties, physiological roles and therapeutics. *Curr. Top. Membr.* **70**, 169–214 (2012).
139. Yanatori, I., Yasui, Y., Tabuchi, M. & Kishi, F. Chaperone protein involved in transmembrane transport of iron. *Biochem. J.* **462**, 25–37 (2014).
140. Wang, C.-Y. & Knutson, M. D. Hepatocyte divalent metal-ion transporter-1 is dispensable for hepatic iron accumulation and non-transferrin-bound iron uptake in mice. *Hepatol. Baltim. Md* **58**, 788–798 (2013).
141. Knutson, M. D. Non-transferrin-bound iron transporters. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 101–111 (2019).
142. Jenkitkasemwong, S. *et al.* SLC39A14 Is Required for the Development of Hepatocellular Iron Overload in Murine Models of Hereditary Hemochromatosis. *Cell Metab.* **22**, 138–150 (2015).

143. Bonilla, S. *et al.* Neonatal iron overload and tissue siderosis due to gestational alloimmune liver disease. *J. Hepatol.* **56**, 1351–1355 (2012).
144. Nam, H. *et al.* ZIP14 and DMT1 in the liver, pancreas, and heart are differentially regulated by iron deficiency and overload: implications for tissue iron uptake in iron-related disorders. *Haematologica* **98**, 1049–1057 (2013).
145. Wang, C.-Y. *et al.* ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *J. Biol. Chem.* **287**, 34032–34043 (2012).
146. Gálvez-Peralta, M. *et al.* ZIP8 zinc transporter: indispensable role for both multiple-organ organogenesis and hematopoiesis in utero. *PLoS One* **7**, e36055 (2012).
147. van Raaij, S. *et al.* Tubular iron deposition and iron handling proteins in human healthy kidney and chronic kidney disease. *Sci. Rep.* **8**, 9353 (2018).
148. Ji, C. & Kosman, D. J. Molecular mechanisms of non-transferrin-bound and transferrin-bound iron uptake in primary hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **133**, 668–683 (2015).
149. Tsushima, R. G. *et al.* Modulation of iron uptake in heart by L-type Ca²⁺ channel modifiers: possible implications in iron overload. *Circ. Res.* **84**, 1302–1309 (1999).
150. Oudit, G. Y. *et al.* L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat. Med.* **9**, 1187–1194 (2003).
151. Kumfu, S. *et al.* Combined iron chelator and T-type calcium channel blocker exerts greater efficacy on cardioprotection than monotherapy in iron-overload thalassemic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **822**, 43–50 (2018).
152. Tulpule, K., Robinson, S. R., Bishop, G. M. & Dringen, R. Uptake of ferrous iron by cultured rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **88**, 563–571 (2010).
153. Knutson, M. D. Steap Proteins: Implications for Iron and Copper Metabolism. *Nutr. Rev.* **65**, 335–340 (2007).
154. Tripathi, A. K. *et al.* Prion protein functions as a ferrireductase partner for ZIP14 and DMT1. *Free Radic. Biol. Med.* **84**, 322–330 (2015).
155. McDowall, J. S. *et al.* Alpha-synuclein ferrireductase activity is detectable in vivo, is altered in Parkinson's disease and increases the neurotoxicity of DOPAL. *Mol. Cell. Neurosci.* **85**, 1–11 (2017).
156. Philpott, C. C., Ryu, M.-S., Frey, A. & Patel, S. Cytosolic iron chaperones: Proteins delivering iron cofactors in the cytosol of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **292**, 12764–12771 (2017).
157. Anderson, G. J. & Frazer, D. M. Current understanding of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* **106**, 1559S–1566S (2017).
158. Arosio, P., Elia, L. & Poli, M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life* **69**, 414–422 (2017).
159. Carmona, F. *et al.* Study of ferritin self-assembly and heteropolymer formation by the use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) technology. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1861**, 522–532 (2017).
160. Sato, D. *et al.* Electrostatic Repulsion during Ferritin Assembly and Its Screening by Ions. *Biochemistry* **55**, 482–488 (2016).
161. Darshan, D., Vanoaica, L., Richman, L., Beermann, F. & Kühn, L. C. Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage. *Hepatol. Baltim. Md* **50**, 852–860 (2009).
162. Cozzi, A. *et al.* Human L-ferritin deficiency is characterized by idiopathic generalized seizures and atypical restless leg syndrome. *J. Exp. Med.* **210**, 1779–1791 (2013).
163. Li, W. *et al.* Systemic and cerebral iron homeostasis in ferritin knock-out mice. *PLoS One* **10**, e0117435 (2015).
164. Das, A., Nag, S., Mason, A. B. & Barroso, M. M. Endosome-mitochondria interactions are modulated by iron release from transferrin. *J. Cell Biol.* **214**, 831–845 (2016).
165. Senyilmaz, D. *et al.* Regulation of mitochondrial morphology and function by Stearoylation of TfR1. *Nature* **525**, 124–128 (2015).
166. Wolff, N. A. *et al.* A role for divalent metal transporter (DMT1) in mitochondrial uptake of iron and manganese. *Sci. Rep.* **8**, 211 (2018).
167. Shaw, G. C. *et al.* Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* **440**, 96–100 (2006).
168. Huang, M. L.-H. *et al.* Elucidation of the mechanism of mitochondrial iron loading in Friedreich's ataxia by analysis of a mouse mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16381–16386 (2009).
169. Whitnall, M. *et al.* Identification of nonferritin mitochondrial iron deposits in a mouse model of Friedreich ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 20590–20595 (2012).
170. Levi, S. *et al.* A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J. Biol. Chem.* **276**, 24437–24440 (2001).
171. Gao, G. & Chang, Y.-Z. Mitochondrial ferritin in the regulation of brain iron homeostasis and neurodegenerative diseases. *Front. Pharmacol.* **5**, 19 (2014).
172. Drakesmith, H., Nemeth, E. & Ganz, T. Ironing out ferroportin. *Cell Metab.* **22**, 777–787 (2015).

173. Calmels, N. *et al.* The first cellular models based on frataxin missense mutations that reproduce spontaneously the defects associated with Friedreich ataxia. *PLoS One* **4**, e6379 (2009).
174. Huang, M. L.-H. *et al.* Molecular and Functional Alterations in a Mouse Cardiac Model of Friedreich Ataxia: Activation of the Integrated Stress Response, eIF2 α Phosphorylation, and the Induction of Downstream Targets. *Am. J. Pathol.* **183**, 745–757 (2013).
175. Seznec, H. *et al.* Friedreich ataxia: the oxidative stress paradox. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 463–474 (2005).
176. Martelli, A. *et al.* Iron regulatory protein 1 sustains mitochondrial iron loading and function in frataxin deficiency. *Cell Metab.* **21**, 311–323 (2015).
177. Miranda, C. J. *et al.* Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett.* **512**, 291–297 (2002).
178. Pook, M. A. *et al.* Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics* **3**, 185–193 (2001).
179. Zarse, K., Schulz, T. J., Birringer, M. & Ristow, M. Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in Caenorhabditis elegans models of Friedreich Ataxia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 1271–1275 (2007).
180. Schiavi, A. *et al.* Iron-Starvation-Induced Mitophagy Mediates Lifespan Extension upon Mitochondrial Stress in C. elegans. *Curr. Biol. CB* **25**, 1810–1822 (2015).
181. Anderson, P. R., Kirby, K., Hilliker, A. J. & Phillips, J. P. RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in Drosophila. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3397–3405 (2005).
182. Shidara, Y. & Hollenbeck, P. J. Defects in mitochondrial axonal transport and membrane potential without increased reactive oxygen species production in a Drosophila model of Friedreich ataxia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 11369–11378 (2010).
183. Anderson, P. R., Kirby, K., Orr, W. C., Hilliker, A. J. & Phillips, J. P. Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 611–616 (2008).
184. Chen, K. *et al.* Loss of Frataxin activates the iron/sphingolipid/PDK1/Mef2 pathway in mammals. *eLife* **5**, (2016).
185. Navarro, J. A. *et al.* Altered lipid metabolism in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2828–2840 (2010).
186. Soriano, S. *et al.* Deferiprone and idebenone rescue frataxin depletion phenotypes in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Gene* **521**, 274–281 (2013).
187. Leidgens, S., De Smet, S. & Foury, F. Frataxin interacts with Isu1 through a conserved tryptophan in its beta-sheet. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 276–286 (2010).
188. Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J. & Lutz, T. A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2635–2643 (2002).
189. Gerber, J., Neumann, K., Prohl, C., Mühlenhoff, U. & Lill, R. The Yeast Scaffold Proteins Isu1p and Isu2p Are Required inside Mitochondria for Maturation of Cytosolic Fe/S Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4848–4857 (2004).
190. Han, T. H. L. *et al.* In Vitro interaction between yeast frataxin and superoxide dismutases: Influence of mitochondrial metals. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1863**, 883–892 (2019).
191. Sturm, B. *et al.* Recombinant human erythropoietin: effects on frataxin expression in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* **35**, 711–717 (2005).
192. Zanella, I. *et al.* The effects of frataxin silencing in HeLa cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 90–98 (2008).
193. Lu, C. *et al.* Frataxin Deficiency Induces Schwann Cell Inflammation and Death. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1052–1061 (2009).
194. Santos, M. M., Ohshima, K. & Pandolfo, M. Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1935–1944 (2001).
195. Stehling, O., Paul, V. D., Bergmann, J., Basu, S. & Lill, R. Biochemical Analyses of Human Iron-Sulfur Protein Biogenesis and of Related Diseases. *Methods Enzymol.* **599**, 227–263 (2018).
196. Vannocci, T. *et al.* A new cellular model to follow Friedreich's ataxia development in a time-resolved way. *Dis. Model. Mech.* **8**, 711–719 (2015).
197. Schmucker, S. *et al.* Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. *PLoS ONE* **6**, (2011).
198. Polak, U., Li, Y., Butler, J. S. & Napierala, M. Alleviating GAA Repeat Induced Transcriptional Silencing of the Friedreich's Ataxia Gene During Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cells Dev.* **25**, 1788–1800 (2016).
199. Liu, J. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev. Rep.* **7**, 703–713 (2011).

200. Lee, Y.-K. *et al.* Efficient attenuation of Friedreich's ataxia (FRDA) cardiomyopathy by modulation of iron homeostasis-human induced pluripotent stem cell (hiPSC) as a drug screening platform for FRDA. *Int. J. Cardiol.* **203**, 964–971 (2016).
201. Hick, A. *et al.* Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* **6**, 608–621 (2013).
202. Bird, M. J. *et al.* Functional characterization of Friedreich ataxia iPS-derived neuronal progenitors and their integration in the adult brain. *PLoS One* **9**, e101718 (2014).
203. Boddaert, N. *et al.* Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood* **110**, 401–408 (2007).
204. Pandolfo, M. *et al.* Deferiprone in Friedreich ataxia: a 6-month randomized controlled trial. *Ann. Neurol.* **76**, 509–521 (2014).
205. Rustin, P. *et al.* Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet Lond. Engl.* **354**, 477–479 (1999).
206. Hausse, A. O. *et al.* Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart Br. Card. Soc.* **87**, 346–349 (2002).
207. Mariotti, C. *et al.* Idebenone treatment in Friedreich patients: one-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology* **60**, 1676–1679 (2003).
208. Hart, P. E. *et al.* Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Arch. Neurol.* **62**, 621–626 (2005).
209. Cooper, J. M., Korlipara, L. V. P., Hart, P. E., Bradley, J. L. & Schapira, A. H. V. Coenzyme Q10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q10 therapy. *Eur. J. Neurol.* **15**, 1371–1379 (2008).
210. Clay, A., Hearle, P., Schadt, K. & Lynch, D. R. New developments in pharmacotherapy for Friedreich ataxia. *Expert Opin. Pharmacother.* **20**, 1855–1867 (2019).
211. Lynch, D. R. *et al.* A0001 in Friedreich ataxia: biochemical characterization and effects in a clinical trial. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **27**, 1026–1033 (2012).
212. Zesiewicz, T. *et al.* Double-blind, randomized and controlled trial of EPI-743 in Friedreich's ataxia. *Neurodegener. Dis. Manag.* **8**, 233–242 (2018).
213. Costantini, A. *et al.* Long-term treatment with thiamine as possible medical therapy for Friedreich ataxia. *J. Neurol.* **263**, 2170–2178 (2016).
214. Schöls, L. *et al.* L-carnitine and creatine in Friedreich's ataxia. A randomized, placebo-controlled crossover trial. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* **112**, 789–796 (2005).
215. Nachbauer, W. *et al.* Effects of erythropoietin on frataxin levels and mitochondrial function in Friedreich ataxia--a dose-response trial. *Cerebellum Lond. Engl.* **10**, 763–769 (2011).
216. Mariotti, C. *et al.* Erythropoietin in Friedreich ataxia: no effect on frataxin in a randomized controlled trial. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **27**, 446–449 (2012).
217. Rai, M. *et al.* HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. *PLoS One* **3**, e1958 (2008).
218. Soragni, E. *et al.* Rationale for the development of 2-aminobenzamide histone deacetylase inhibitors as therapeutics for Friedreich ataxia. *J. Child Neurol.* **27**, 1164–1173 (2012).
219. Sandi, C. *et al.* Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol. Dis.* **42**, 496–505 (2011).
220. Tomassini, B. *et al.* Interferon gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2855–2861 (2012).
221. Seyer, L. *et al.* Open-label pilot study of interferon gamma-1b in Friedreich ataxia. *Acta Neurol. Scand.* **132**, 7–15 (2015).
222. Marcotulli, C. *et al.* GIFT-1, a phase IIa clinical trial to test the safety and efficacy of IFN γ administration in FRDA patients. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* **37**, 361–364 (2016).
223. Rocca, C. J. *et al.* Transplantation of wild-type mouse hematopoietic stem and progenitor cells ameliorates deficits in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
224. Piguet, F. *et al.* Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **26**, 1940–1952 (2018).
225. Perdomini, M. *et al.* Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat. Med.* **20**, 542–547 (2014).
226. Riemer, J., Hoepken, H. H., Czerwinska, H., Robinson, S. R. & Dringen, R. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal. Biochem.* **331**, 370–375 (2004).
227. The Mitochondrial Medicine Society *et al.* A modern approach to the treatment of mitochondrial disease. *Curr. Treat. Options Neurol.* **11**, 414–430 (2009).

228. Stacpoole, P. W., Lorenz, A. C., Thomas, R. G. & Harman, E. M. Dichloroacetate in the treatment of lactic acidosis. *Ann. Intern. Med.* **108**, 58–63 (1988).
229. Stacpoole, P. W., Kurtz, T. L., Han, Z. & Langae, T. Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1478–1487 (2008).
230. Stacpoole, P. W., Moore, G. W. & Kornhauser, D. M. Metabolic effects of dichloroacetate in patients with diabetes mellitus and hyperlipoproteinemia. *N. Engl. J. Med.* **298**, 526–530 (1978).
231. Kankotia, S. & Stacpoole, P. W. Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1846**, 617–629 (2014).
232. Kaufmann, P. *et al.* Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology* **66**, 324–330 (2006).
233. Garon, E. B. *et al.* Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **140**, 443–452 (2014).
234. Dondorp, A. M. *et al.* Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *N. Engl. J. Med.* **13** (2009).
235. Giannangelo, C., Fowkes, F. J. I., Simpson, J. A., Charman, S. A. & Creek, D. J. Ozonide Antimalarial Activity in the Context of Artemisinin-Resistant Malaria. *Trends Parasitol.* **35**, 529–543 (2019).
236. Carvajal, J. J. *et al.* The Friedreich's ataxia gene encodes a novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Nat. Genet.* **14**, 157–162 (1996).
237. Bayot, A. & Rustin, P. Friedreich's ataxia, frataxin, PIP5K1B: echo of a distant fracas. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 725635 (2013).
238. Vannocci, T. *et al.* Adding a temporal dimension to the study of Friedreich's ataxia: the effect of frataxin overexpression in a human cell model. *Dis. Model. Mech.* **11**, dmm032706 (2018).
239. Mak, L. H. *et al.* A small molecule mimicking a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding pleckstrin homology domain. *ACS Chem. Biol.* **6**, 1382–1390 (2011).
240. Hasegawa, H. *et al.* Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is indispensable for mouse spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **86**, 136, 1–12 (2012).
241. Popoli, M., Brunello, N., Perez, J. & Racagni, G. Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs. *J. Neurochem.* **74**, 21–33 (2000).
242. Zhao, X. *et al.* PIP5k1 β controls bone homeostasis through modulating both osteoclast and osteoblast differentiation. *J. Mol. Cell Biol.* **12**, 55–70 (2020).
243. Zhang, Y. *et al.* Ferredoxin reductase is critical for p53-dependent tumor suppression via iron regulatory protein 2. *Genes Dev.* **31**, 1243–1256 (2017).
244. Shi, Y., Ghosh, M., Kovtunovych, G., Crooks, D. R. & Rouault, T. A. Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 484–492 (2012).
245. Peng, Y. *et al.* Biallelic mutations in the ferredoxin reductase gene cause novel mitochondriopathy with optic atrophy. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 4937–4950 (2017).
246. Müller, J. J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K. & Heinemann, U. Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 2786–2789 (2001).
247. Sheftel, A. D. *et al.* The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1157–1166 (2012).
248. Pérez-Gallardo, R. V. *et al.* Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res.* **13**, 804–819 (2013).
249. Bych, K. *et al.* The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *EMBO J.* **27**, 1736–1746 (2008).
250. Melber, A. *et al.* Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. *eLife* **5**, (2016).
251. Jeong, S. Y. *et al.* 4'-Phosphopantetheine corrects CoA, iron, and dopamine metabolic defects in mammalian models of PKAN. *EMBO Mol. Med.* **11**, e10489 (2019).
252. Campanella, A. *et al.* Skin fibroblasts from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients show altered cellular oxidative status and have defective iron-handling properties. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4049–4059 (2012).
253. Meyron-Holtz, E. G. *et al.* Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J.* **23**, 386–395 (2004).

254. Whitnall, M. *et al.* The MCK mouse heart model of Friedreich's ataxia: Alterations in iron-regulated proteins and cardiac hypertrophy are limited by iron chelation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9757–9762 (2008).
255. Tachiyama, R. *et al.* Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **16**, 448–466 (2011).
256. Zhang, M. M., Tsou, L. K., Charron, G., Raghavan, A. S. & Hang, H. C. Tandem fluorescence imaging of dynamic S-acylation and protein turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8627–8632 (2010).
257. Müllner, E. W. & Kühn, L. C. A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* **53**, 815–825 (1988).
258. Pei, Z., Xiao, Y., Meng, J., Hudmon, A. & Cummins, T. R. Cardiac sodium channel palmitoylation regulates channel availability and myocyte excitability with implications for arrhythmia generation. *Nat. Commun.* **7**, 12035 (2016).
259. Cho, E. & Park, M. Palmitoylation in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* **111**, 133–151 (2016).
260. Gao, X. & Hannoush, R. N. A Decade of Click Chemistry in Protein Palmitoylation: Impact on Discovery and New Biology. *Cell Chem. Biol.* **25**, 236–246 (2018).
261. Kotzbauer, P. T., Truax, A. C., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. Altered neuronal mitochondrial coenzyme A synthesis in neurodegeneration with brain iron accumulation caused by abnormal processing, stability, and catalytic activity of mutant pantothenate kinase 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 689–698 (2005).
262. Tello, C., Darling, A., Lupo, V., Pérez-Dueñas, B. & Espinós, C. On the complexity of clinical and molecular bases of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Clin. Genet.* **93**, 731–740 (2018).
263. Martelli, A. *et al.* Clinical data and characterization of the liver conditional mouse model exclude neoplasia as a non-neurological manifestation associated with Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* **5**, 860–869 (2012).
264. Obis, È., Irazusta, V., Sanchís, D., Ros, J. & Tamarit, J. Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets mitochondria and lipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **73**, 21–33 (2014).
265. Lin, G. *et al.* Phospholipase PLA2G6, a Parkinsonism-Associated Gene, Affects Vps26 and Vps35, Retromer Function, and Ceramide Levels, Similar to α -Synuclein Gain. *Cell Metab.* **28**, 605–618.e6 (2018).
266. Colombelli, C., Aoun, M. & Tiranti, V. Defective lipid metabolism in neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) syndromes: not only a matter of iron. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**, 123–136 (2015).
267. Chen, K. *et al.* Loss of Frataxin induces iron toxicity, sphingolipid synthesis, and Pdk1/Mef2 activation, leading to neurodegeneration. *eLife* **5**, (2016).
268. Czubowicz, K., Jęsko, H., Wencel, P., Lukiw, W. J. & Strosznajder, R. P. The Role of Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Mol. Neurobiol.* **56**, 5436–5455 (2019).
269. Shamim, A., Mahmood, T., Ahsan, F., Kumar, A. & Bagga, P. Lipids: An insight into the neurodegenerative disorders. *Clin. Nutr. Exp.* **20**, 1–19 (2018).
270. Mapstone, M. *et al.* Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* **20**, 415–418 (2014).
271. Schaefer, E. J. *et al.* Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch. Neurol.* **63**, 1545–1550 (2006).
272. Vanlander, A. V. & Van Coster, R. Clinical and genetic aspects of defects in the mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis pathway. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **23**, 495–506 (2018).
273. Lebigot, E. *et al.* Impact of mutations within the [Fe-S] cluster or the lipoic acid biosynthesis pathways on mitochondrial protein expression profiles in fibroblasts from patients. *Mol. Genet. Metab.* **122**, 85–94 (2017).
274. Martinez, D. L., Tsuchiya, Y. & Gout, I. Coenzyme A biosynthetic machinery in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1112–1117 (2014).
275. Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F. & Kroemer, G. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.* **21**, 805–821 (2015).
276. Tsuchiya, Y., Pham, U., Hu, W., Ohnuma, S.-I. & Gout, I. Changes in acetyl CoA levels during the early embryonic development of *Xenopus laevis*. *PLoS One* **9**, e97693 (2014).
277. Rouault, T. A. & Tong, W. H. Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet. TIG* **24**, 398–407 (2008).
278. Parodi-Rullán, R. M., Chapa-Dubocq, X. R. & Javadov, S. Acetylation of Mitochondrial Proteins in the Heart: The Role of SIRT3. *Front. Physiol.* **9**, 1094 (2018).

279. Baeza, J., Smallegan, M. J. & Denu, J. M. Site-specific reactivity of nonenzymatic lysine acetylation. *ACS Chem. Biol.* **10**, 122–128 (2015).
280. Shi, L. & Tu, B. P. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* **33**, 125–131 (2015).
281. Wagner, G. R., Pride, P. M., Babbey, C. M. & Payne, R. M. Friedreich's ataxia reveals a mechanism for coordinate regulation of oxidative metabolism via feedback inhibition of the SIRT3 deacetylase. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2688–2697 (2012).
282. Martin, A. S. *et al.* Nicotinamide mononucleotide requires SIRT3 to improve cardiac function and bioenergetics in a Friedreich's ataxia cardiomyopathy model. *JCI Insight* **2**, (2017).
283. Tort, F., Ferrer-Cortes, X. & Ribes, A. Differential diagnosis of lipoic acid synthesis defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* **39**, 781–793 (2016).
284. Gao, T. *et al.* Reduction of mitochondrial 3-oxoacyl-ACP synthase (OXSM) by hyperglycemia is associated with deficiency of α -lipoic acid synthetic pathway in kidney of diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **512**, 106–111 (2019).
285. Lantier, L. *et al.* SIRT3 Is Crucial for Maintaining Skeletal Muscle Insulin Action and Protects Against Severe Insulin Resistance in High-Fat-Fed Mice. *Diabetes* **64**, 3081–3092 (2015).
286. Schug, Z. T. *et al.* Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell* **27**, 57–71 (2015).
287. Delatycki, M. B. & Bidichandani, S. I. Friedreich ataxia- pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiol. Dis.* **132**, 104606 (2019).
288. Ast, T. *et al.* Hypoxia Rescues Frataxin Loss by Restoring Iron Sulfur Cluster Biogenesis. *Cell* **177**, 1507–1521.e16 (2019).
289. Mariño, G. *et al.* Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol. Cell* **53**, 710–725 (2014).
290. Saitsu, H. *et al.* De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat. Genet.* **45**, 445–449, 449e1 (2013).
291. Zhao, Y. G. *et al.* The autophagy gene Wdr45/Wipi4 regulates learning and memory function and axonal homeostasis. *Autophagy* **11**, 881–890 (2015).
292. Gusdon, A. M., Zhu, J., Van Houten, B. & Chu, C. T. ATP13A2 regulates mitochondrial bioenergetics through macroautophagy. *Neurobiol. Dis.* **45**, 962–972 (2012).
293. Martin, D. D. O., Ladha, S., Ehrnhoefer, D. E. & Hayden, M. R. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends Neurosci.* **38**, 26–35 (2015).
294. Karabiyik, C., Lee, M. J. & Rubinsztein, D. C. Autophagy impairment in Parkinson's disease. *Essays Biochem.* **61**, 711–720 (2017).
295. Li, Q., Liu, Y. & Sun, M. Autophagy and Alzheimer's Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* **37**, 377–388 (2017).
296. Calap-Quintana, P. *et al.* TORC1 Inhibition by Rapamycin Promotes Antioxidant Defences in a Drosophila Model of Friedreich's Ataxia. *PLoS ONE* **10**, (2015).
297. Tan, X., Thapa, N., Choi, S. & Anderson, R. A. Emerging roles of PtdIns(4,5)P₂--beyond the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **128**, 4047–4056 (2015).
298. Abe, N., Inoue, T., Galvez, T., Klein, L. & Meyer, T. Dissecting the role of PtdIns(4,5)P₂ in endocytosis and recycling of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* **121**, 1488–1494 (2008).
299. Di Paolo, G. *et al.* Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature* **431**, 415–422 (2004).
300. Waugh, M. G. PIPs in neurological diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 1066–1082 (2015).
301. Cullen, P. J. & Carlton, J. G. Phosphoinositides in the mammalian endo-lysosomal network. *Subcell. Biochem.* **59**, 65–110 (2012).
302. Jang, D.-J. & Lee, J.-A. The roles of phosphoinositides in mammalian autophagy. *Arch. Pharm. Res.* **39**, 1129–1136 (2016).
303. Rong, Y. *et al.* Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nat. Cell Biol.* **14**, 924–934 (2012).
304. Zhou, Y., Li, W. & Xiao, Y. Profiling of Multiple Targets of Artemisinin Activated by Hemin in Cancer Cell Proteome. *ACS Chem. Biol.* **11**, 882–888 (2016).
305. Ba, Q. *et al.* Dihydroartemisinin exerts its anticancer activity through depleting cellular iron via transferrin receptor-1. *PLoS One* **7**, e42703 (2012).
306. Horonchik, L. & Wessling-Resnick, M. The small-molecule iron transport inhibitor ferristatin/NSC306711 promotes degradation of the transferrin receptor. *Chem. Biol.* **15**, 647–653 (2008).
307. Wang, Z., Hu, W., Zhang, J.-L., Wu, X.-H. & Zhou, H.-J. Dihydroartemisinin induces autophagy and inhibits the growth of iron-loaded human myeloid leukemia K562 cells via ROS toxicity. *FEBS Open Bio* **2**, 103–112 (2012).

308. Du, J. *et al.* DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin. *Free Radic. Biol. Med.* **131**, 356–369 (2019).
309. Ooko, E. *et al.* Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **22**, 1045–1054 (2015).
310. Hess, K. M., Goad, J. A. & Arguin, P. M. Intravenous artesunate for the treatment of severe malaria. *Ann. Pharmacother.* **44**, 1250–1258 (2010).

Liste des figures

Introduction :

Figure 1 : Localisation de mutations dans la séquence nucléotidique (A) et dans la structure protéique (B) ³⁴	15
Figure 2 : Différents modèles de structures en triplex dans l'AF.....	17
Figure 3 : Composition de la région 5' du gène FXN, composé du promoteur, de l'exon 1 et de l'extrémité proximale de l'intron 1 ³⁹	19
Figure 4 : Modèle d'épissage alternatif dans l'ataxie de Friedreich ³⁹	21
Figure 5 : Carte chromosomique du locus FXN avec les gènes avoisinants ⁶⁰	22
Figure 6 : Alignement de la séquence d'acides aminés de la frataxine provenant de la levure, de l'homme, de la souris, de la drosophile et de bactéries issues de <i>S. typhimurium</i> (SALTY), <i>E. Coli</i> (ECOLI) et <i>P. aeruginosa</i> (PSEAE) ⁶⁵	23
Figure 7 : Structures de la frataxine humaine (HsFtx), de levure (Yfh1) et de bactérie (CyaY) ⁷⁶	25
Figure 8 : Rôles des protéines à centre Fe-S dans différentes voies métaboliques (A) ⁸³ et les complexes de la chaîne respiratoire (B) ⁸⁴	29
Figure 9 : Biogenèse des centres Fe-S ⁸³	30
Figure 10 : Machinerie de synthèse des ISC cytosoliques (CIA) incorporés à des protéines du cytosol et du noyau ⁸⁸	31
Figure 11 : Structure de la forme oligomère de la frataxine (à gauche) et de la ferritine (à droite) ⁶⁵	34
Figure 12 : Mécanisme cellulaire de production et de dégradation de l'anion superoxyde (O_2^-).....	35
Figure 13 : Mécanisme d'absorption du fer alimentaire par les entérocytes.....	39
Figure 14 : Comparaison des transcrits du TfR1 et du TfR2 ¹²²	43
Figure 15 : Import du fer cellulaire par la voie TBI ¹²⁵	44
Figure 16 : Structure du récepteur à la transferrine TfR1.....	46
Figure 17 : Transporteurs (en rouge) et ferriréductases (en vert) impliqués dans l'absorption du NTBI selon les organes (adapté de Knutson ¹⁴¹).....	50
Figure 18 : L'homéostasie du fer cellulaire (adapté de Anderson et al. ¹⁵⁷).....	51

Résultats :

<i>Figure 19 : Détermination du contenu en fer cellulaire par une méthode colorimétrique à base de ferrozine dans des fibroblastes contrôles (C1-C3) et de patients AF (P1-P5) cultivés dans un milieu riche en fer (FAC 100 μM) supplémenté par 5 mM de dichloroacétate (DCA) et/ou 25 μM d'artésunate pendant 48 h.</i>	<i>116</i>
<i>Figure 20 : Cinétique d'accumulation de fer dans les cellules sanguines de patients AF. ...</i>	<i>117</i>
<i>Figure 21 : Relation effet-dose de l'artésunate et du dichloroacétate (DCA) sur le contenu en fer de PBMC.....</i>	<i>118</i>
<i>Figure 22 : Relation effet-dose de l'artésunate et du dichloroacétate (DCA) sur la viabilité cellulaire de PBMC.....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 23 : Etude de l'effet différentiel de l'artésunate au cours du temps sur des PBMC après 16 h d'incubation en présence de fer</i>	<i>120</i>
<i>Figure 24 : Etude d'une courte exposition d'artésunate sur des PBMC cultivés en présence de fer</i>	<i>121</i>
<i>Figure 25 : Tests doses-réponses des effets d'artésunate sur des PBMC en fonction du temps.</i>	<i>122</i>
<i>Figure 26 : Etude d'ozonides sur des fibroblastes cultivés en présence de fer</i>	<i>123</i>
<i>Figure 27 : Structure chimique du DHA, de l'artésunate et du MMV000019 (adaptée de Giannangelo et al.²³⁵).....</i>	<i>125</i>
<i>Figure 28 : Extinction des gènes FXN (A, C) et PIP5K1B (B, C) dans des cellules HEK transfectées par siRNA (siFXN, siPIP5K1B ou siFXN/PIP5K1B) 48h post-transfection</i>	<i>128</i>
<i>Figure 29 : Déficit quantitatif en frataxine et pip5k1β dans les fibroblastes de patients AF.</i>	<i>130</i>
<i>Figure 30 : Dérégulation de l'homéostasie du fer dans les modèles cellulaires HEK déficients en FXN et/ou PIP5K1B</i>	<i>131</i>
<i>Figure 31 : Extinction transcriptionnelle (A, B) et protéique (C, D, E) dans les cellules HEK contrôle (C) ou transfectées (siFXN, siPIP5K1B et siFXN/PIP5K1B) cultivées en milieu pauvre (-FAC) ou riche (+FAC 100 μM) en fer pendant 48 h</i>	<i>132</i>
<i>Figure 32 : Régulation post-transcriptionnelle du TfR1 et de la ferritine dans les cellules HEK contrôle (C) ou transfectées (siFXN, siPIP5K1B et siFXN/PIP5K1B).....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 33 : Régulation de l'homéostasie du fer dans les modèles déficients en FXN et/ou PIP5K1B.....</i>	<i>135</i>

<i>Figure 34 : Régulation du récepteur de la transferrine 1 (TfR1) dans des cellules HEK déficientes en FXN et/ou PIP5K1B cultivées dans un milieu pauvre (-FAC) ou riche (+FAC 100 μM) en fer.....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 35 : Extinction de FXN et PIP5K1B dans chaque clone HeLa transfecté par shRNA (shFXN, shPIP5K1B ou shFXN/PIP5K1B) cultivé en condition standard (10% FBS).....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 36 : Dérégulation de l'homéostasie du fer dans les clones shFXN, shFXN/PIP5K1B et shPIP5K1B cultivés en milieu standard.....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 37 : Accumulation de fer et du TfR1 membranaire dans les modèles déficients en frataxine.</i>	<i>140</i>
<i>Figure 38 : Expression de la ferrédoxine réductase dans les fibroblastes FDXR.....</i>	<i>158</i>
<i>Figure 39 : Dosage en fer intracellulaire dans des fibroblastes contrôles (C* : moyenne de trois contrôles) et de patients traités par 13 mM d'holo-Tf (A) ou 100 μM FAC (B) pendant 72 h.....</i>	<i>159</i>
<i>Figure 40 : Dérégulation de l'homéostasie du fer dans les fibroblastes de deux patients FDXR.....</i>	<i>159</i>
<i>Figure 41 : Accumulation du TfR1 membranaire associée à une endocytose accrue et un retard de recyclage dans les fibroblastes FDXR.</i>	<i>161</i>

Discussion :

<i>Figure 42 : Représentation synthétique de la voie de synthèse de l'acétyl-CoA mitochondriale à partir de la décarboxylation oxydative du pyruvate via la pyruvate déshydrogénase (PDH).</i>	<i>191</i>
<i>Figure 43 : Représentation de la synthèse de l'acétyl-CoA cytosolique et nucléaire ainsi que de son devenir cellulaire.....</i>	<i>194</i>
<i>Figure 44 : Implication des phosphoinositides dans l'endocytose de vésicules de clathrine (adapté de Cullen et al.³⁰¹).....</i>	<i>200</i>
<i>Figure 45 : Les différentes voies d'endocytose du TfR1.....</i>	<i>203</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Liste des protéines cellulaire à centre Fe-S.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 2 : Listes des tailles d'expansion GAA des patients AF</i>	<i>74</i>
	<i>220</i>