



HAL
open science

Développement et caractérisation d'un nouveau modèle de neurones sensitifs de l'ataxie de Friedreich : étude de la neurophysiopathologie et mise en place d'un criblage pharmacologique

Olivier Griso

► **To cite this version:**

Olivier Griso. Développement et caractérisation d'un nouveau modèle de neurones sensitifs de l'ataxie de Friedreich : étude de la neurophysiopathologie et mise en place d'un criblage pharmacologique. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ048 . tel-04416264

HAL Id: tel-04416264

<https://theses.hal.science/tel-04416264v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

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

THÈSE présentée par :

Olivier GRISO

soutenue le : 18 septembre 2020

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Développement et caractérisation d'un nouveau
modèle de neurones sensitifs de l'ataxie de
Friedreich : étude de la neurophysiopathologie et
mise en place d'un criblage pharmacologique

THÈSE dirigée par :

Dr. Hélène Puccio

PhD, Directrice de Recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr. Olga Corti

PhD, Directrice de Recherches, Institut du Cerveau, Paris

Pr. Bernard Brais

MD, Professeur de Neurologie, Université McGill, Montréal

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Examineur Dr. Nicolas Charlet-Berguerand

PhD, Directeur de Recherches, Université de Strasbourg

« Tout le monde est un génie. Mais si vous jugez un poisson à sa capacité de grimper à un arbre, il vivra toute sa vie en croyant qu'il est stupide »

Albert Einstein (1879 - 1955)

*À ma maman Corinne,
et mes deux sœurs Emmanuelle et Cécile*

Remerciements

J'aimerais profiter de cette occasion pour remercier toutes les personnes qui m'ont aidé pendant mon projet de thèse, que ce soit mes collègues à l'IGBMC ainsi que ma famille et mes amis. Mes premiers mots vont à ma directrice de thèse Dr. Hélène Puccio. **Hélène**, cela fait déjà plus de cinq ans que j'ai débarqué pour la première fois dans ton bureau. Le 15 avril 2015, je me suis rendu à l'IGBMC pour y passer un entretien de stage de master, sans vraiment savoir que cela changerait le cours ma vie. Il n'a pas été difficile de me convaincre de travailler avec toi. Pour un entretien qui devait être banal, nous avons discuté pendant plus de deux heures, et je me souviens être rentré chez moi avec la ferme conviction que je devais faire confiance à mon ressenti et poser mes affaires dans ton laboratoire. Merci Hélène, vraiment, de m'avoir fait confiance ce jour-là comme les jours suivants. Tu m'as donné l'occasion de travailler sur un sujet passionnant et profondément concret. Je voulais faire de mes recherches quelque chose d'utile, agir pour une cause, et je suis fier d'avoir pu apporter ma contribution à la recherche sur l'Ataxie de Friedreich, dans l'espoir de voir un jour cette maladie disparaître. Je tiens à te remercier pour la liberté et la confiance que tu m'as accordé, pour nous avoir donné l'occasion de voyager et présenter nos recherches en France comme à l'international. Je te remercie également pour tous les moments hors du cadre scientifique, telles que les rencontres AFAF, qui m'ont énormément apporté et qui resteront des instants inoubliables. Je suis fier d'avoir fait ma thèse sous la direction d'une chercheuse si brillante et à la carrière impressionnante. Je ne te souhaite que du succès pour la suite, notamment dans le développement de ton labo à Lyon. Je ne doute pas que c'est le début d'une belle histoire, tu as l'air d'être entourée de très bons scientifiques et ta nouvelle équipe ne compte que des personnes brillantes. Je te remercie également de me faire confiance pour que je poursuive le projet quelques temps encore.

J'aimerais remercier tous mes collègues et amis de mon labo, des autres équipes et des plateformes. **Aurélié, Nadège, Antoine, Valentine, Anna, Laurence**, merci pour toutes les aides et surtout les moments partagés, les déconnades à n'en plus finir. Vous avez fait de mes journées au labo des moments super. **Antoine**, t'es une personne géniale, t'as débarqué au labo avec ton humour cinglant et plein de répartie. T'es un scientifique hors pair je te souhaite que le meilleur ! Merci **Yvon** pour les conseils et l'expertise précieuse que tu m'as apporté lors de nos échanges. Merci également aux supers collègues de labo partis vers de nouveaux horizons : **Charline, Tiphaine, Pankaj**, et surtout **Alain M.**, sans qui je n'aurais pas acquis l'expérience et les

connaissances nécessaires pour démarrer ce projet. Je regrette de ne pas avoir pu travailler avec toi plus longtemps, quand je vois à quel point j'ai appris à tes côtés en ces quelques mois.

Je remercie la communauté internationale de chercheurs et associations de l'ataxie de Friedreich, en particulier l'**AFAF** et **FARA** pour leur soutien crucial dans mes recherches. Un grand merci à **Kyle**, un sportif impressionnant et une âme ultra inspirante.

Je remercie le personnel des plateformes et l'ICS, sans qui je n'aurais pas été aussi efficace dans mon travail. Entre autres, **Pascale** pour les dizaines de vecteurs synthétisés, les filles du service de culture cellulaire, **Nadia** pour la microscopie électronique, la plateforme d'imagerie, **Amélie**, **Anne** et **Laurent** de la plateforme de criblage. Amélie, qu'aurait été ma thèse sans toi ? Je me le demande... Outre les tonnes de résultats que j'ai récolté grâce à toi, j'ai apprécié les moments passés à discuter, au robot comme ailleurs, à refaire le monde, à stresser ensemble dans l'attente des résultats. On a formé un duo tellement complet ! Quand l'un commençait à perdre espoir devant les échecs, l'autre restait ultra optimiste et inversement. Je n'aurais pas pu pousser mon projet aussi loin sans tes compétences et ta détermination. Tu es vraiment le genre de recrue qu'on veut avoir dans son équipe. Merci pour tout !

J'aimerais également remercier mes collègues du parcours Biologie et Génétique Moléculaire de l'Université de Strasbourg, et les professeurs formidables que j'ai pu rencontrer. Merci également à **Alain L.** pour m'avoir brillamment accompagné dans mon tout premier projet de recherche. Mes deux années dans ce master ont propulsé ma motivation et mon envie de faire de la recherche. C'était également deux années incroyables car je débarquais à Strasbourg et ma classe de master est tout de suite devenue ma famille. Cette ambiance qu'on a instauré (profondément basée sur la fête, avec une dose d'entraide et de discussions inspirantes) m'a clairement permis de me surpasser et de pouvoir accomplir ce que je voulais. Merci entre autres à **JN**, **Duygu**, **Farah**, **Chloé**, **Émeline**, **Nathou**, **Sirine**, ...

Martial et **Simon**. Comment aurais-je pu deviner l'amitié qu'on allait créer la première fois que je vous ai rencontré aux réunions de l'**AFAF**. Une rencontre exceptionnelle et quelques années plus tard nous sommes de vrais amis, avec qui j'ai déjà partagé beaucoup de choses, entre autres le concert de Roger Waters ! (et bientôt Aerosmith).

Ioannis, **Yiannis**, **Yannis**, **Giannis**, **Γιάννης**, **Ιωάννης** (*rayez les mentions inutiles*). Autant de prénoms pour une seule personne, mais une personne exceptionnelle ! Je t'écris en français, comme ça tu peux bosser en même temps. Il y a quatre ans tu as débarqué dans le labo et ça a littéralement changé le cours de ma vie. J'ai énormément appris à tes côtés. Tu es l'une des rares

personnes qui ont réellement influencé la personne que je suis. Que dis-je, tu as carrément façonné la personne que je suis. Les enseignements que tu m'as apporté n'ont fait que de me rendre meilleur. Tu as toujours été et tu resteras le vieux sage, celui qui a toujours eu les réponses à mes questions et avec qui j'ai refait le monde 100 fois. La connexion qu'on a eu tout de suite nous a, je pense, galvanisé tous les deux et nous a fait grandir à la fois scientifiquement et humainement. Je ne pourrai aussi jamais te remercier de m'avoir fait découvrir et partager ta culture, si belle, chaleureuse et accueillante, et que j'aime énormément. Je ne pourrais même pas te citer d'anecdote en particulier tellement il y en a à raconter. Les conneries au labo, les soirées (beaucoup de soirées), Pink Floyd et toutes les heures à écouter de la musique, les concerts, les raclettes (trop de raclettes), les voyages en Grèce, en Italie, aux USA (si si non non). Tu es un véritable ami, le genre d'ami qu'on ne rencontre que très peu, et dont l'amitié est éternelle. Je te souhaite de réussir dans ta nouvelle aventure et dans ta vie future, et j'espère que tu réussiras à combiner toutes tes ambitions en pouvant vivre au plus près des gens que tu aimes, dans ce pays magnifique qui est le tien. Comment parler de Yiannis sans parler de Lisa. **Lisa**, je me demande comment un aussi grand cœur peut rentrer dans une si petite personne ! Je suis heureux d'avoir pu te rencontrer. Tu es mon amie, et je te souhaite d'être heureuse et épanouie. Je te dois la moitié de la découverte de la culture Grecque. Yiannis, Lisa et vos familles merveilleuses, je vous remercie pour tout le bonheur et la compagnie que vous m'avez apporté pendant ces quatre années, et que vous continuez encore de faire.

Duygu. Tu es certainement LA personne qui m'a le plus influencé. Depuis le début de mon aventure à Strasbourg tu as été à mes côtés. Tu as été mon amour, mon amie, ma confidente et mon pilier tout ça en même temps. Je n'aurais clairement pas réussi sans ton soutien sans faille que je reçois depuis le début, malgré toutes les épreuves et difficultés. Tu es une personne exceptionnelle, intelligente et dotée d'une immense empathie comme j'ai très peu vu. Tu es aussi une scientifique incroyable et promise à une superbe carrière si tu le désires. Bien sûr tu sais déjà tout ça et tout le reste. Je ne peux que te souhaiter d'être la femme la plus heureuse au monde car tu le mérites. Merci pour tout, à toi et ta famille merveilleuse, de m'avoir fait découvrir votre superbe culture et m'avoir tant apporté ces dernières années.

Jean-Nicolas, ou JN, dit « le JN », ou « JN le JN ». Tu es clairement l'un des responsables de mon amour pour la science. Le master ensemble, les instants de philosophie autour d'une bonne bière (et accompagnements). Avec toi j'ai dû refaire le monde au moins 1000 fois. C'est fou la quantité de choses qu'on a pu faire, de conneries qu'on a pu dire, en 6 ans. La quantité de trucs qui nous sont arrivés aussi. Merci d'être mon meilleur pote, et de m'avoir fait marrer depuis toujours. **Timothée**, mon bon Timothée, tu voudrais pas écrire un livre pour recenser toutes tes blagues de

génie et autres philosophies ? Attends non tu devrais réaliser un film ou développer un jeu ! Mon ami, tu es également responsable de la majorité de mes fous rires et je t'en remercie.

Merci également à mes meilleurs amis du Sud et d'ailleurs (par ordre alphabétique, bande de vicelards) que je regrette de ne pas pouvoir voir autant que j'aimerais :

Alicia B., Anabelle V., Camille B., Edward H., Hugo A., Hugo L. Katia L., Lilian E., Neill F., Pierre H., Thomas M., et tous les autres !

Enfin, quelques mots pour ma famille. **Maman**, je te dois tout, c'est bien simple. Je n'en serais jamais, mais jamais arrivé jusque-là si ça n'était pas pour toi. Tout ce que j'ai accompli dans ma vie c'est à la fois pour toi et grâce à toi. Tu es une femme extraordinaire, si forte, tu as su me guider, me protéger et me rassurer toute ma vie. Tu sais comme moi que je n'aurais jamais pu faire de belles études si tu n'avais pas été là pour me supporter et me pousser vers le haut. Les temps ont été difficiles mais aujourd'hui tu peux être fière d'avoir réussi à faire grandir tes enfants et les faire évoluer en de très belles personnes. Je ne pourrais jamais assez te remercier de tout ce que tu as fait pour nous, les sacrifices que tu as dû faire et ce que tu as affronté pour nous permettre d'être heureux. Tu as réussi, nous sommes heureux et lancés sur un beau début de vie. Merci également de toujours écouter mes histoires, tu sais toujours me conseiller et me rassurer, tu es ma meilleure confidente. Je souhaite que mes enfants puissent être aussi heureux de m'avoir que je suis heureux que tu sois ma mère, car tu es mon exemple et je t'aime profondément.

Cécile, Emmanuelle. Emmanuelle, Cécile. Les deux autres femmes de ma vie. Je suis tellement heureux d'être votre frère. Vous me rendez fier toutes les deux, et je suis comblé de vous voir si heureuses. Grâce à vous j'ai pu grandir dans l'amour et je ne me suis jamais senti seul. On a su se serrer les coudes, traverser les tempêtes ensemble et on en est ressortis plus forts. J'aimerais pouvoir vivre plus près de vous, pouvoir partager beaucoup plus de moments ensemble, et voir grandir vos enfants. Manu, tu as fait une fille si adorable, je suis heureux de savoir qu'elle va pouvoir grandir dans tout cet amour. Cécile, je dois dire que ça y'est, je suis impatient que tu nous en ponde un aussi !! Mes sœurs je vous aime et je ne peux que vous souhaiter tout le meilleur du monde.

Philippe, Axel et Stéphane. Les gars, merci. Il en fallait trois pour accompagner les trois femmes de ma vie, et je suis content que ça soit vous. Merci pour toutes les déconnades, les repas, les apéros (surtout !), etc. Axel et Stéphane, vous rendez mes sœurs heureuses, je crois que je n'aurais pas pu rêver de meilleurs beaux-frères. Ça promet les repas de famille pour les années à venir !!

Table des matières

LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS	18

INTRODUCTION

1 L'ATAXIE DE FRIEDREICH, ATAXIE RECESSIVE LA PLUS REPANDUE	26
1.1 QU'EST-CE QU'UNE ATAXIE ?	26
1.2 LES ATAXIES AUTOSOMIQUES DOMINANTES.....	27
1.3 LES ATAXIES AUTOSOMIQUES RECESSIVES.....	27
1.4 HISTORIQUE DE LA MALADIE ET EPIDEMIOLOGIE	28
2 DESCRIPTION CLINIQUE	29
2.1 SIGNES CLINIQUES	30
2.2 ANATOMOPATHOLOGIE DE L'ATAXIE DE FRIEDREICH.....	33
2.2.1 <i>Système nerveux périphérique et Sensibilité.....</i>	<i>33</i>
2.2.2 <i>Atteinte neurologique dans l'AF.....</i>	<i>39</i>
2.2.3 <i>Atteintes extra-neurologiques.....</i>	<i>45</i>
3 L'ATAXIE DE FRIEDREICH, UNE MALADIE GENETIQUE.....	46
3.1 HISTORIQUE D'IDENTIFICATION ET DESCRIPTION DU GENE FXN	46
3.2 LES TYPES DE MUTATIONS.....	48
3.2.1 <i>Expansion de triplets GAA, mutation majeure</i>	<i>48</i>
3.2.2 <i>Autres mutations.....</i>	<i>49</i>
3.2.3 <i>Conséquences de l'expansion de triplets GAA sur l'expression du gène FXN</i>	<i>51</i>
4 LA FRATAXINE, UNE PETITE PROTEINE MITOCHONDRIALE	55
4.1 STRUCTURE, MATURATION ET LOCALISATION	55
4.2 HISTORIQUE DE RECHERCHE DE LA FONCTION DE LA FRATAXINE	58
4.3 LA FRATAXINE, CATALYSEUR DE LA SYNTHÈSE DES CENTRES FER-SOUFRE.....	60
4.3.1 <i>Les centres Fe-S, des cofacteurs protéiques essentiels.....</i>	<i>60</i>
4.3.2 <i>Biosynthèse des Fe-S et rôle de la frataxine dans ce processus</i>	<i>69</i>
5 MODELES ET PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AF	77
5.1 L'APPORT DES MODELES	77
5.1.1 <i>Modèles à déplétion partielle.....</i>	<i>77</i>
5.1.2 <i>Modèles à déplétion totale</i>	<i>81</i>
5.1.3 <i>Fibroblastes, lymphoblastes et iPSC dérivés de patients AF.....</i>	<i>83</i>
5.1.4 <i>Modèles humanisés avec mutations ponctuelles.....</i>	<i>84</i>
5.2 DESCRIPTION DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'AF.....	84

5.2.1	<i>Déficit en centres Fe-S et métabolisme du fer</i>	85
5.2.2	<i>Stress oxydant</i>	86
5.2.3	<i>Mécanismes émergents</i>	88
6	LES APPROCHES THERAPEUTIQUES	93
6.1	AMELIORATION DE LA FONCTION/DISPONIBILITE MITOCHONDRIALE.....	94
6.2	MODULATION DU METABOLISME DU FER.....	94
6.3	PROTECTION CONTRE LE STRESS OXYDANT.....	95
6.4	MODULATION GENETIQUE ET STABILISATION DE LA FRATAXINE.....	96
6.5	THERAPIES PROTEIQUES ET GENIQUES.....	98
6.6	AUTRES STRATEGIES THERAPEUTIQUES.....	100
6.6.1	<i>Correction génétique</i>	100
6.6.2	<i>Oligonucléotides</i>	100
6.7	CONCLUSION.....	101
7	LES CRIBLAGES DE MOLECULES THERAPEUTIQUES	102
7.1	HIGH-THROUGHPUT SCREENING (HTS) ET HIGH-CONTENT SCREENING (HCS).....	102
7.1.1	<i>Définitions</i>	102
7.1.2	<i>Les banques de molécules</i>	103
7.1.3	<i>Développement d'un essai : choix du readout et indicateurs de confiance</i>	103
7.1.4	<i>Sélection et validation des hits</i>	104
7.2	CRIBLAGES SUR CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES OU DIFFERENTIES A PARTIR D'IPSC.....	105
7.3	LES CRIBLAGES EFFECTUEES DANS LE CADRE DE L'ATAXIE DE FRIEDREICH.....	106
8	LA VOIE DE L'AMPK	108
8.1	STRUCTURE DE L'AMPK ET ACTIVATION.....	108
8.1.1	<i>Structure</i>	108
8.1.2	<i>Activation</i>	110
8.2	REGULATION DU METABOLISME PAR L'AMPK.....	110
8.2.1	<i>Inhibition des voies anaboliques</i>	110
8.2.2	<i>Stimulation des voies cataboliques</i>	111
8.2.3	<i>AMPK et biogénèse des mitochondries</i>	112

RESULTATS

1	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	116
2	PUBLICATION DU CHAPITRE « GRISO AND PUCCIO, 2020 »	117
2.1	SUJET TRAITÉ DANS LA PUBLICATION.....	117
2.2	PUBLICATION.....	117
3	MANUSCRIT « FRATAXIN DEPLETION LEADS TO DECREASED SOMA SIZE AND ACTIVATION OF AMPK METABOLIC PATHWAY IN DRG SENSORY NEURONS »	131
3.1	SUJET TRAITÉ DANS LE MANUSCRIT.....	131
3.2	MANUSCRIT.....	131
4	RESULTATS COMPLEMENTAIRES DU PROJET	161
4.1	ÉTUDE DU RÔLE DU METABOLISME DE L'ACIDE LIPOÏQUE DANS LA TAILLE DES NEURONES DU MODELE	161

4.1.1	<i>Métabolisme des acides aminés en rapport avec LA dans le modèle</i>	162
4.1.2	<i>Développement et test du système mtLplA</i>	163
4.1.3	<i>Etude de l'impact de l'expression de mtLplA sur la taille des cellules</i>	166
4.1.4	<i>Recherche d'un lien entre acide lipoïque et restauration de la taille</i>	168
4.1.5	<i>Développement d'un système alternatif à interférence à ARN</i>	175
4.1.6	<i>Impact de l'Acide lipoïque sur les centres Fe-S</i>	176
4.2	P62 ET AUTOPHAGIE	178
4.3	DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE DE CRIBLAGE PHARMACOLOGIQUE	186
4.3.1	<i>Avant-propos</i>	186
4.3.2	<i>Mise au point des conditions de culture</i>	186
4.3.3	<i>Développement du readout</i>	190
4.3.4	<i>Contrôle positif, facteurs Z' et puissance des readouts</i>	193
4.3.5	<i>Choix des readouts</i>	196
4.3.6	<i>Pilote</i>	197
MATERIEL ET METHODES		199

DISCUSSION

1	DISCUSSION ET PERSPECTIVES COMPLEMENTAIRES AU MANUSCRIT « FRATAXIN DEPLETION LEADS TO DECREASED SOMA SIZE AND ACTIVATION OF AMPK METABOLIC PATHWAY IN DRG SENSORY NEURONS »	204
1.1	DISCUSSION ET PERSPECTIVES DIRECTES :	204
1.2	PERSPECTIVES A PLUS LONG TERME	206
2	DISCUSSION ET PERSPECTIVES, PARTIE « METABOLISME DE L'ACIDE LIPOÏQUE DANS LA TAILLE DES NEURONES DU MODELE »	208
3	DISCUSSION ET PERSPECTIVES, PARTIE « AUTOPHAGIE ET P62 »	214
4	DISCUSSION ET PERSPECTIVES, PARTIE « DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE DE CRIBLAGE PHARMACOLOGIQUE »	217
4.1	DEVELOPPEMENT INITIAL	217
4.1.1	<i>Protocole de culture</i>	217
4.1.2	<i>Développement des essais</i>	218
4.2	DIFFICULTES	219
4.3	PERSPECTIVES DIRECTES	219
4.4	PERSPECTIVES A LONG TERME	220
5	CONCLUSION GENERALE	222
REFERENCES		223

Liste des Figures

<i>Figure 1 : Gradient de prévalence de l'AF en Europe</i>	29
<i>Figure 2 : Systèmes nerveux central (SNC) et périphérique (SNP)</i>	34
<i>Figure 3 : Propriocepteurs, réflexes myotatique et myotatique inverse</i>	35
<i>Figure 4 : Les neurones sensitifs de DRG</i>	37
<i>Figure 5 : Faisceaux spino-cérébelleux postérieur, cunéocérébelleux et spino-cérébelleux ventral. C = cervical ; T = thoracique, L = lombaire, S = sacré (issu de Carpenter, Core text of neuroanatomy, 1991).</i>	38
<i>Figure 6 : Neuropathie du DRG dans l'ataxie de Friedreich.</i>	40
<i>Figure 7 : Démyélinisation des fibres sensibles dans l'AF</i>	42
<i>Figure 8 : Atteinte de la moelle épinière dans l'AF</i>	43
<i>Figure 9 : Le noyau dentelé (ND) du cervelet dans l'AF.</i>	45
<i>Figure 10 : Localisation chromosomique et structure de FXN</i>	46
<i>Figure 11 : Les mutations du gène FXN</i>	47
<i>Figure 12 : Mécanisme d'inhibition de la transcription par les répétitions GAA</i>	52
<i>Figure 13 : Durée de la maladie et âge de décès en fonction de la taille de l'expansion GAA la plus courte</i>	54
<i>Figure 14 : Conservation de la structure de la frataxine</i>	55
<i>Figure 15 : Étapes de maturation de la frataxine humaine</i>	56
<i>Figure 16 : Structures de la frataxine humaine et du complexe de biosynthèse des Fe-S</i>	58
<i>Figure 17 : Les centres Fe-S les plus courants chez les mammifères</i>	60
<i>Figure 18 : Les centres Fe-S, des cofacteurs présents dans toute la cellule</i>	61
<i>Figure 19 Les Fe-S jouent le rôle de transporteurs d'électrons au sein de la chaîne respiratoire</i>	62
<i>Figure 20 : Mécanisme de régulation de l'expression fer-dépendante par la protéine IRP1</i>	63
<i>Figure 21 : Enzymes utilisant l'acide lipoïque comme cofacteur</i>	65

<i>Figure 22 : Comparaison des mécanismes de biosynthèse de l'acide lipoïque entre la bactérie et l'homme</i>	66
<i>Figure 23 : Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S chez les mammifères</i>	69
<i>Figure 24 : Principaux modèles murins à délétion partielle de l'AF</i>	78
<i>Figure 25 : Modèles murins conditionnels de l'AF</i>	82
<i>Figure 26 : Physiopathologie de l'ataxie de Friedreich</i>	84
<i>Figure 27 : État actuel des recherches cliniques pour l'ataxie de Friedreich</i>	93
<i>Figure 28 : Régulation du métabolisme par l'AMPK et mTORC1</i>	109
<i>Figure 29 : Biosynthèse de l'acide lipoïque dans les neurones sensitifs</i>	161
<i>Figure 30 : Métabolisme des acides aminés dans le modèle</i>	162
<i>Figure 31 : Description et expression du système mtLplA</i>	163
<i>Figure 32 : Test du système mtLplA dans des fibroblastes de souris</i>	164
<i>Figure 33 : Test du système mtLplA dans les cultures de neurones de DRG</i>	165
<i>Figure 34 : Mesure de la taille du soma des neurones en présence du système mtLplA</i>	166
<i>Figure 35 : Distribution des cellules selon leur taille après expression de mtLplA et traitement au LA à 21 dpi et 25 dpi</i>	167
<i>Figure 36 : Mesure du stress oxydant mitochondrial après expression de mtLplA et traitement au LA</i>	169
<i>Figure 37 : Mesure des niveaux de glycine après expression de mtLplA et traitement au LA</i>	170
<i>Figure 38 : Mesure des niveaux de PHGDH et PSAT1 après expression de mtLplA et traitement au LA</i>	172
<i>Figure 39 : Mesure des niveaux d'ATP après expression de mtLplA et traitement au LA</i>	173
<i>Figure 40 : Quantification des niveaux protéiques des phosphorylations des cibles de l'AMPK après expression de mtLplA et traitement au LA</i>	174
<i>Figure 41 : Mesure de la taille des cellules en présence du système mtLplA, après inhibition de la voie mTOR/P70S6K</i>	175
<i>Figure 42 : Test des shLIAS-930 et impact sur la taille des cellules</i>	176

<i>Figure 43 : Stabilisation des centres Fe-S en présence de LA</i>	177
<i>Figure 44 : Récepteurs de l'autophagie et autophagosome à 21 dpi et 30 dpi</i>	179
<i>Figure 45 : Vésicules P62-positives entre WT et KO</i>	180
<i>Figure 46 : Niveaux de LC3-II et P62 après blocage de l'autophagie</i>	181
<i>Figure 47 : Vésicules P62-positives après blocage de l'autophagie</i>	182
<i>Figure 48 : Ultrastructure des neurones de DRG</i>	183
<i>Figure 49 : Activation de l'autophagie par ULK1 à 30 dpi</i>	183
<i>Figure 50 : Niveaux transcriptionnels et traductionnels de gènes du stress associés à P62</i>	185
<i>Figure 51 : Comportement des cultures en 96 puits en fonction du coating des plaques (DIV 20)</i>	187
<i>Figure 52: Comportement des cultures en 96 puits en fonction de la densité cellulaire (DIV 15)</i>	188
<i>Figure 53: Profil morphométrique et viabilité de la suspension cellulaire</i>	189
<i>Figure 54: Essai d'isolation des neurones par gradient de Percoll</i>	189
<i>Figure 55: Segmentation du corps cellulaire grâce au Hoechst</i>	190
<i>Figure 56 : Segmentation des noyaux et création d'un anneau ou collar (exemple du TMRM)</i>	191
<i>Figure 57: Évaluation de cinq différentes sondes fluorescentes</i>	192
<i>Figure 58 : Rescue des phénotypes par hFXN</i>	194
<i>Figure 59 : Calcul des facteurs Z'</i>	195

Liste des Tableaux

<i>Tableau 1 : Fréquence des signes cliniques observés chez les patients de l'ataxie de Friedreich</i>	31
<i>Tableau 2 : Classification des fibres sensibles dans les nerfs périphériques</i>	34
<i>Tableau 3 : Les mutations ponctuelles identifiées chez FXN</i>	50
<i>Tableau 4 : Enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide lipoïque au cours de l'évolution</i>	67
<i>Tableau 5 : Liste des criblages à moyen/haut débit sur culture de neurones relevés dans la littérature</i>	106
<i>Tableau 6 : Calcul de puissances pour 3 réplicats</i>	196
<i>Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot</i>	202
<i>Tableau 8 : Liste des oligonucléotides utilisés en qPCR</i>	202

Liste des Abréviations

4EBP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
AAV	<i>Adeno Associated Virus</i>
ABCB7	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 7</i>
ABCE1	<i>ATP-binding cassette sub-family E member 1</i>
ACC	<i>Acetyl-CoA carboxylase</i>
ACP	<i>Acyl Carrier Protein</i>
ACSM1	<i>Acyl-CoA Synthetase Medium Chain Family Member 1</i>
ADN	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>
AF	<i>Ataxie de Friedreich</i>
AIFM3	<i>Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 3</i>
ALA	<i>alpha-Lipoic Acid</i>
ALB	<i>Albumine</i>
ALU	<i>Arthrobacter luteus</i>
AMP	<i>Adénosine monophosphate</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ARSACS	<i>Ataxie Récessive Spastique Autosomique de Charlevoix-Saguenay</i>
ASNS	<i>Asparagine Synthetase</i>
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATG	<i>Autophagy-related protein</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	<i>Adénosine triphosphate</i>
BCAA	<i>Branched-chain Amino Acid</i>
BCKDH	<i>Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BIP/GRP78	<i>Binding Immunoglobulin Protein</i>
BOLA	<i>BolA Family Member</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAMKK2	<i>Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase 2</i>
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CAT	<i>Catalase</i>
CDKAL1	<i>Cdk5 regulatory associated protein 1-like 1</i>
CFD1	<i>Cytosolic Fe-S cluster assembly factor</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CHIP	<i>Chromatin immuno-precipitation</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>

CHRU	<i>Centre Hospitalier Regional et Universitaire</i>
CIA	<i>Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly</i>
CIAPIN1	<i>Cytokine Induced Apoptosis Inhibitor 1</i>
CLPP	<i>Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
Cnc	<i>Cap-n-Collar</i>
CNTNAP2	<i>Contactin Associated Protein 2</i>
COXIV	<i>Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1</i>
cPMP	<i>Cyclic pyranopterin monophosphate</i>
cPMP	<i>Cyclic pyranopterin monophosphate</i>
CREB	<i>C-AMP Response Element-binding protein</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
CyaY	<i>Iron-sulfur cluster assembly protein (frataxin)</i>
DHR123	<i>Dihydrorhodamine 123</i>
DIV	<i>Days in vitro</i>
DLFT	<i>Dégénérescence lobaire frontotemporale</i>
DM1	<i>Dystrophic Myotony type 1</i>
DMSO	<i>Diméthylsulfoxyde</i>
DPYD	<i>Dihydropyrimidine Dehydrogenase</i>
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i>
EA	<i>Episodic ataxia</i>
EIF2A/Hri	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>
ELP3	<i>Elongator Acetyltransferase Complex Subunit 3</i>
EndoIII	<i>Endonuclease III</i>
EPO	<i>érythropoïétine</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADH2	<i>Flavin adenine dinucleotide, hydroquinone</i>
FANCI	<i>Fanconi anemia group J protein</i>
FARA	<i>Friedreich Ataxia Ration Scale</i>
FARS	<i>Friedreich Ataxia Research Alliance</i>
FAST-1	<i>FXN Antisense Transcript 1</i>
FCCP	<i>Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDX	<i>Ferredoxin</i>
FDX1	<i>Ferredoxin 1</i>
FDX2	<i>Ferredoxin 2</i>
FDXR	<i>Ferredoxin Reductase</i>
Fe-S	<i>Fe-Soufre/Iron-Sulfur</i>
FECD	<i>Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy</i>
FECH	<i>Ferrochelatase</i>
FIP200	<i>200-kDa FAK-family interacting protein</i>

FOXO	<i>Forkhead box protein O</i>
FPN	<i>Ferroportin</i>
FRDA	<i>Friedreich's Ataxia</i>
FRT	<i>Ferritin</i>
FRTL	<i>Ferritin Light Chain</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
FXN	<i>Frataxin</i>
GAL4	<i>Galactose-responsive transcription factor 4</i>
GAPDH	<i>Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase</i>
Gclc	<i>Glutamate—cysteine ligase catalytic subunit</i>
GCSH	<i>Glycine Cleavage System Protein H</i>
Gcv3	<i>Glycine Cleavage System Protein H</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLRX5	<i>Glutaredoxin 5</i>
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter 5</i>
GPAT/PPAT	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferase</i>
GRP75	<i>Chaperone glucose-regulated protein 75</i>
Grx5	<i>Monothiol glutaredoxin-5</i>
Gstd1	<i>Glutathione S-transferase 1</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
H2O2	<i>Hydrogen Peroxide</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCS	<i>High content screening</i>
HDAC	<i>Histone désacétylase</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidneys</i>
HMGCR	<i>Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase</i>
HMOX1	<i>Heme Oxygenase 1</i>
HscA	<i>HscA Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Cochaperone</i>
HSCB	<i>HscB Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Cochaperone</i>
HSPA9	<i>Mitochondrial 70kDa heat shock protein</i>
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
IARC	<i>International Ataxia Research Conference</i>
IBA57	<i>iron-sulfur cluster assembly factor 57</i>
ICARS	<i>International Cooperative Ataxia Rating Scale</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IHC	<i>Immunohistochimie</i>
Ins2	<i>Insulin II</i>
IOP1	<i>Iron-only hydrogenase-like protein 1</i>
IPSC	<i>Induced-pluripotent stem cell</i>
IRE	<i>Iron Responsive Element</i>
IRM	<i>Imagerie par Résonance Magnétique</i>

IRP1	<i>IRE Regulatory Protein 1</i>
ISCA1/Isa1	<i>Iron-Sulfur Cluster Assembly 1</i>
ISCA2/Isa2	<i>Iron-Sulfur Cluster Assembly 2</i>
IscS	<i>Cysteine desulfurase IscS</i>
ISCU/IscU	<i>Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme</i>
ISD11	<i>Iron-sulfur protein biogenesis, desulfurase-interacting protein 11</i>
IscU	<i>Iron sulfur cluster assembly protein 1</i>
Jac1	<i>J-type co-chaperone 1</i>
KGDH	<i>Alpha-ketoglutarate dehydrogenase</i>
KI	<i>Knock-in</i>
KIF4A	<i>Kinesin family member 4A</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LA	<i>Lipoic Acid</i>
LC3	<i>Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B</i>
LD	<i>Lipoyl Domain</i>
LDHb	<i>Lactate Dehydrogenase B</i>
LIAS/Lip5/LipA	<i>Lipoic acid synthetase</i>
LIPT1/Lip3	<i>Lipoyltransferase 1</i>
LIPT2 /Lip2/LipB	<i>Lipoyl (Octanoyl) Transferase 2</i>
LKB1	<i>Liver kinase B1</i>
LN	<i>Long Normal</i>
LOPAC	<i>Library of Pharmacologically Active Compounds</i>
LplA	<i>Lipoate-protein ligase A</i>
LrrK	<i>Leucine-rich repeat kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MCK	<i>Muscle creatine kinase</i>
ME	<i>Microscopie électronique</i>
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor-2</i>
MFF	<i>Mitochondrial fission factor</i>
Mge1	<i>GrpE protein homolog</i>
MHY1485	<i>4,6-Di-4-morpholinyl-N-(4-nitrophenyl)-1,3,5-triazin-2-amine</i>
MMS19	<i>MMS19 Homolog, Cytosolic Iron-Sulfur Assembly Component</i>
MoCo	<i>Cofacteur à molybdène</i>
MOCS1	<i>Molybdenum cofactor biosynthesis protein 1</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MPP	<i>Mitochondrial Processing Peptidase</i>
MSUD	<i>Maple syrup urine disease</i>
MTG	<i>Mitotracker Green FM</i>
MTHFD2	<i>Bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase</i>
mTOR	<i>mechanistic Target Of Rapamycin</i>
mTORC1	<i>mTOR Complex 1</i>
mTORC2	<i>mTOR Complex 2</i>

MTS	<i>MitoSOX</i>
NADH	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide</i>
NBP35	<i>Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NBP35</i>
NBR1	<i>Neighbor of BRCA1 gene 1</i>
ND	<i>Noyau Dentelé</i>
NDOR1	<i>NADPH Dependent Diflavin Oxidoreductase 1</i>
NDUFS3	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NF200	<i>Neurofilament heavy, 200 kDa</i>
NFS1	<i>Cysteine desulfurase</i>
NFU1	<i>Iron-Sulfur Cluster Scaffold</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NIX/BNIP3L	<i>BCL2 interacting protein 3 like</i>
NKH	<i>Nonketotic hyperglycinemia</i>
NRF1	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
NRF2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NSE	<i>Neuron-specific enolase</i>
NT	<i>Non transfecté</i>
NT3	<i>Neurotrophin-3</i>
OPTN	<i>Optineurin</i>
P62/SQSTM1	<i>Sequestosome-1</i>
P70S6K	<i>Ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDC-E2	<i>Pyruvated Dehydrogenase Complex, E2 subunit</i>
PDH	<i>Pyruvated Dehydrogenase</i>
PKD1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PEV	<i>Position effect variegation</i>
PGC1α	<i>PPAR gamma coactivator 1 alpha</i>
PHGDH	<i>Phosphoglycerate dehydrogenase</i>
PINK1	<i>PTEN- induced putative kinase 1</i>
PLD1	<i>Phospholipase D1</i>
PLP	<i>pyridoxal 5' phosphate</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
Prp	<i>Prion protein</i>
PSAT1	<i>Phosphoserine aminotransferase 1</i>
Pvalb	<i>Parvalbumine</i>
Q10	<i>Coenzyme Q10</i>
QS	<i>QuickStain</i>
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
RET	<i>Ret Proto-Oncogene</i>
RNF126	<i>E3 ubiquitin ligase ring finger protein 126</i>

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPA	<i>Rhodamine B-[(1,10-phenanthroline-5-yl)aminocarbonyl]benzyl ester</i>
RSAD2	<i>Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase quantitative PCR</i>
RTEL1	<i>Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1</i>
SAM	<i>S-adénosyl-L-méthionine</i>
SARA	<i>Scale for the Assessment and Rating of Ataxia</i>
SCA	<i>spinocerebellar ataxia</i>
SDH	<i>Succinate dehydrogenase</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SLA	<i>Sclérose latérale amyotrophique</i>
SN	<i>Short Normal</i>
SNC	<i>Système Nerveux Central</i>
SNP	<i>Système Nerveux Périphérique</i>
SOD2	<i>Superoxide dismutase 2</i>
SPP1	<i>Secreted Phosphoprotein 1</i>
SREBP1	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TALNs	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
TAT	<i>Trans-Activator of Transcription</i>
TFEB	<i>Transcription Factor EB</i>
TFR1	<i>Transferrin receptor protein 1</i>
TMRM	<i>Tetramethylrhodamine, Methyl Ester</i>
TrkA	<i>Tropomyosin receptor kinase A</i>
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
TrkC	<i>Tropomyosin receptor kinase C</i>
TRPV1	<i>Transient receptor potential vanilloide 1</i>
TSC1	<i>Tuberous sclerosis 1</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis 2</i>
TWY1	<i>Thy-1 Cell Surface Antigen</i>
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>
ULK1	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VIH	<i>Virus de l'immunodéficience Humaine</i>
WT	<i>Wild Type</i>
XO	<i>Xanthine oxidase</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum group D</i>
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>
Yfh1	<i>Yeast frataxin homolog</i>

INTRODUCTION



1 L'ataxie de Friedreich, ataxie récessive la plus répandue

1.1 Qu'est-ce qu'une ataxie ?

Le nom « ataxie » tire son origine dans la combinaison du mot grec « τάξις » ou « ordre » et du préfixe négatif « α », signifiant littéralement, « désordre » (Anheim et al., 2012a). Une ataxie se définit comme une coordination altérée des mouvements musculaires volontaires, pouvant inclure une démarche anormale, un trouble de la parole et des anomalies de mouvements oculaires (Ashizawa and Xia, 2016). L'ataxie correspond à une manifestation clinique plutôt qu'une maladie en soit. Elle peut se manifester telle que le composant majeure d'une maladie, ou n'être qu'un des symptômes d'une maladie multi-systémique (Ashizawa and Xia, 2016). L'étiologie de l'ensemble des symptômes et signes cliniques permet d'investiguer la cause de l'ataxie. L'ataxie est généralement causée par un dysfonctionnement du cervelet et/ou une déficience des afférences vestibulaires et proprioceptives (voies spinocérébelleuses). On parle d'ataxie proprioceptive lorsque les voies sensitives profondes centrales ou périphériques sont affectées, et spinocérébelleuse lorsque les faisceaux spinocérébelleux, la moelle épinière, les pédoncules cérébelleux et/ou le cervelet sont atteints (Akbar and Ashizawa, 2015).

L'ataxie peut être acquise, héréditaire ou sporadique. Les ataxies dites « acquises » n'ont pas d'origine génétique, et se manifestent la plupart du temps de manière aiguë et rapide. Elles peuvent avoir des origines très variées telles qu'une consommation excessive d'alcool, une déficience en vitamines, intoxication aux agents chimio thérapeutiques, traitements antiépileptiques, intoxication aux métaux lourds, attaques cérébelleuses ischémiques, méningites, abcès cérébelleux, infections et maladies auto-immunes (Akbar and Ashizawa, 2015; Anheim et al., 2012a). Parmi les ataxies héréditaires on retrouve les ataxies autosomiques dominantes, autosomiques récessives, liées à l'X et les ataxies mitochondriales (Di Donato et al., 2001). Les ataxies héréditaires sont considérées comme des maladies rares, bien qu'elles soient de nos jours plus fréquemment diagnostiquées grâce à l'avancement des technologies de séquençages.

1.2 Les ataxies autosomiques dominantes

Les ataxies autosomiques dominantes forment un groupe hétérogène d'ataxies caractérisées par une dysfonction du cervelet et du tronc cérébral. Une seule copie du gène défectueux est nécessaire pour induire la maladie. Les autres signes cliniques et symptômes sont très variés et maladie-spécifiques. Ils incluent des caractéristiques extrapyramidales, affection des longues fibres, neuropathies périphériques, déclin cognitif et convulsions (Mundwiler and Shakkottai, 2018). Les ataxies autosomiques dominantes peuvent être divisées en trois catégories : les ataxies progressives, spinocérébelleuses (SCA) et épisodiques (EA). Les ataxies de type SCA sont les mieux décrites, et elles s'étendent de SCA1 à SCA37. Les SCA peuvent être causées par des expansions de répétitions microsatellites : CAG (poly glutamine), ATTCT, TGGAA ou GGCCTG ; ainsi que des mutations ponctuelles (Akbar and Ashizawa, 2015; Mundwiler and Shakkottai, 2018).

1.3 Les ataxies autosomiques récessives

Les ataxies autosomiques récessives forment un ensemble de maladies très hétérogènes, affectant principalement les enfants et les jeunes adultes, bien qu'il existe une proportion non négligeable de cas tardifs (Anheim, 2011). Étant donné que deux copies défectueuses du gène sont requises pour déclencher les symptômes, les parents sont très souvent porteurs sains. La consanguinité parentale augmente ainsi le risque d'héritabilité. Les avancées du séquençage *whole exome* a permis d'augmenter l'identification de ces gènes causals (Akbar and Ashizawa, 2015). Le symptôme cérébelleux est présent dans la plupart de ces maladies, mais il est également associé à d'autres troubles tels qu'une neuropathie périphérique, myopathie, spasticité ou un retard mental (Anheim et al., 2012a). Elles peuvent être sous-divisées en deux groupes majeurs : les ataxies sensitives ou spinocérébelleuses, pour lesquelles les connections périphériques avec le cervelet (corne postérieure, la moelle épinière et les nerfs périphériques) sont principalement affectées, et les ataxies cérébelleuses pour lesquelles le cervelet est principalement affecté (Anheim, 2011). Parmi les ataxies autosomiques récessives, on retrouve l'ataxie de Friedreich (AF), la plus répandue, mais également l'ataxie à paraplégie spastique de type 7, l'ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS), l'ataxie télangiectasie (ATM) ou l'ataxie associée à une déficience en vitamine E (Akbar and Ashizawa, 2015; Anheim et al., 2012a; Synofzik and Németh, 2018). L'AF est classée parmi les ataxies

spinocérébelleuses avec atteinte de la corne postérieure, de la moelle épinière et des nerfs périphériques.

1.4 Historique de la maladie et épidémiologie

En 1863, Nikolaus Friedreich, neuropathologiste allemand, isole un syndrome clinique distinct chez une dizaine de patients répartis en trois familles. En 1876, il détermine que cette pathologie est de nature héréditaire (Friedreich, 1863; Koeppen and Mazurkiewicz, 2013). Ce n'est qu'en 1882 que le nom d'ataxie de Friedreich est proposé (Harding, 1981). L'AF est la plus répandue des ataxies récessives, avec une prévalence entre 1/30.000 et 1/50.000 en France (Schulz et al., 2009; Vankan, 2013). La répartition est très hétérogène entre les différentes populations. Très rare en Afrique sub-saharienne et en Asie, elle atteint des prévalences proches de 1/20.000 au nord de l'Espagne et en Irlande (Vankan, 2013) (**Figure 1**). Il existe un gradient de prévalence des régions proches de l'Atlantique en direction des pays Scandinaves et la Russie (prévalence de 1/750.000 en Finlande) (**Figure 1**). En France, le sud-ouest constitue la région la plus affectée avec une prévalence de 1/25.000 (Vankan, 2013). La prévalence des porteurs sains corrèle et est estimée à 1/85 en France, 1/55 en Espagne et 1/58 en Irlande (Vankan, 2013). Ces observations ont suggéré la présence d'un effet fondateur au niveau de la région franco-cantabre (du nord de l'Espagne au sud de la France), probablement lors de la dernière période glaciaire au paléolithique (estimée il y a 682 ± 203 générations) (Cossée et al., 1997; Vankan, 2013).

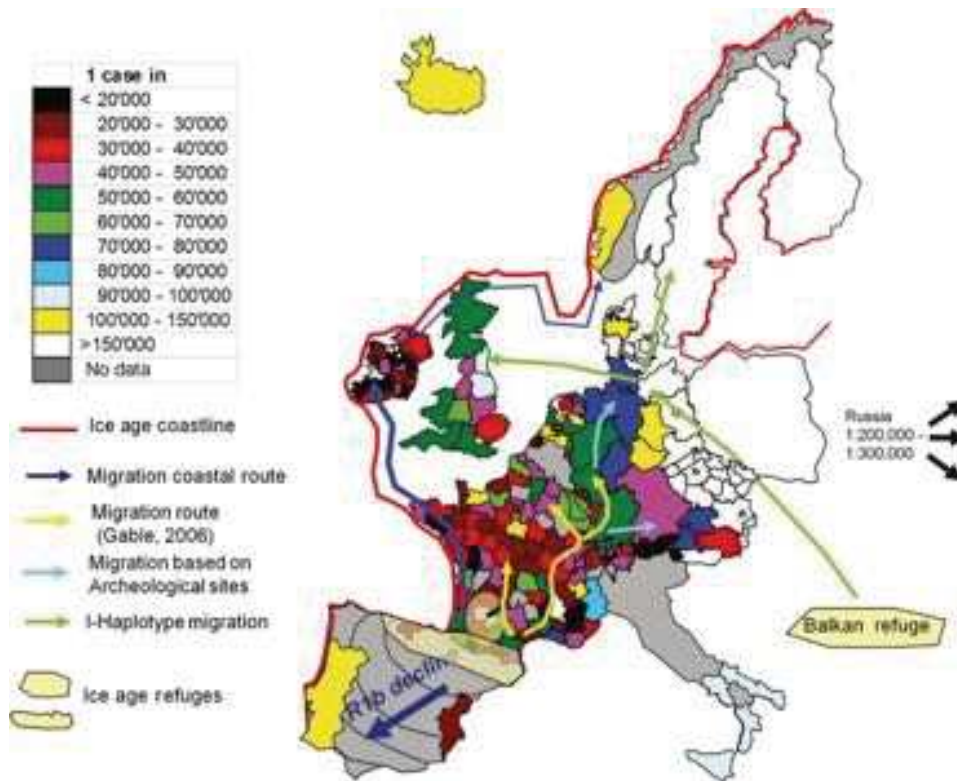


Figure 1 : Gradient de prévalence de l’AF en Europe

Le gradient de prévalence de l’AF corrèle avec les migrations des populations en provenance de la région Franco-cantabre lors de la dernière période glaciaire au paléolithique (issu de Vankan, 2013).

2 Description clinique

C’est à l’adolescence, entre 10 et 20 ans que l’AF est généralement diagnostiquée. Un âge d’apparition des symptômes inférieur à 25 ans a été défini comme critère dans le diagnostic par le Dr. Harding (Harding, 1981). Cependant, l’apparition des symptômes est très variable entre les patients, et peut s’étendre de 2 ans à l’âge adulte, jusqu’à plus de 40 ans pour les cas les plus tardifs (Fearon et al., 2020). Le tableau clinique est dominé par les symptômes neurologiques bien que des symptômes non-neurologiques y sont presque toujours associés, avec en majorité la présence d’une cardiomyopathie (90% des patients), et des diabètes (20%) (Delatycki and Corben, 2012; Dürr et al., 1996; Harding, 1981). L’ensemble de ces symptômes est listé en **Tableau 1**.

2.1 Signes cliniques

L'AF étant une maladie très progressive, les premiers signes neurologiques sont souvent légers et identifiés par l'entourage des patients (parents, professeurs) : troubles de la marche et chutes ainsi qu'une augmentation d'épisodes de maladresse. Les proches remarquent également des différences de capacité motrice et d'équilibre quand ils comparent ces individus aux enfants du même âge (Koeppen, 2011). Ces signes sont révélateurs d'un symptôme neurologique principal qui correspond à une ataxie spinocérébelleuse et sensitive. La composante cérébelleuse est à l'origine des troubles de la marche avec perte de coordination motrice et de balance des muscles agonistes et antagonistes (Anheim, 2011). L'ataxie sensitive se traduit par une perte de la proprioception, ou sensibilité profonde (perception de la position des membres dans l'espace), qui conduit à des troubles de l'équilibre et une perte des sens de position et vibratoires (Pandolfo, 2009). Ces caractéristiques se traduisent par une démarche dite « ébrieuse » accompagnée de pertes fréquentes de l'équilibre qui conduit éventuellement le patient à utiliser une aide pour la marche, d'abord occasionnellement (une canne, des béquilles), puis constante à mesure que la maladie progresse : déambulateur puis fauteuil roulant, en moyenne 10 à 15 ans après l'apparition des premiers symptômes (Pandolfo, 2009). Le manque

Symptôme	<u>Harding (1981)</u>	<u>Filla et al. (1990)</u>	<u>Dürr et al. (1996)</u>	<u>Schöls et al. (1997)</u>	<u>Delatycki et al. (1999)</u>	<u>McCabe et al. (2000)</u>
Nombres de patients	115	80	140	38	51	58
Age moyen au début de la maladie*	10.52 ± 7.4	11.6 ± 4.5	15.5 ± 8	14.15 ± 5.03	10.5 ± 6.4	-
En fauteuil roulant	72%	43%	-	78%	55%	-
Ataxie marche	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ataxie des membres	99%	94%	99%	100%	100%	-
Dysarthrie	97%	84%	91%	100%	95%	93%
Aréflexie des membres inférieurs	99%	100%	87%	84%	98%	86%
Perte de sensibilité profonde	73%	91%	78%	83%	88%	89%
Réflexe cutané plantaire	89%	75%	79%	95%	74%	93%
Faiblesse musculaire	88%	80%	67%	69%	-	72%
Cardiomyopathie	-	28%	63%	75%	65%	67%
Scoliose	79%	94%	60%	84%	78%	84%
Déformation des pieds	55%	90%	55%	82%	74%	79%
Amyotrophie membres supérieurs	49%	49%	25%	-	-	29%
Amyotrophie membres inférieurs	39%	61%	39%	50%	-	67%
Nystagmus	20%	29%	40%	39%	-	40%
Mouvements oculaires saccadés	12%	-	30%	-	-	52%
Diabète	10%	14%	32%	6%	8%	7%
Dysphagie	-	30%	27%	76%	-	-
Troubles du sphincter	-	18%	23%	12%	41%	-
Troubles de l'audition	8%	9%	13%	39%	-	-
Troubles de la vue	18%	-	13%	6%	-	-

Tableau 1 : Fréquence des signes cliniques observés chez les patients de l'ataxie de Friedreich.

* Age moyen ± écart type. Adapté de Parkinson et al., 2013.

de coordination des mouvements est également très marqué et entraîne des difficultés à exécuter des mouvements précis tels que l'écriture, se nourrir ou s'habiller.

De manière générale, les membres inférieurs sont les premiers à être atteints. En effet, les analyses électrophysiologiques indiquent une absence quasi-totale de la conduction sensitive des nerfs périphériques depuis les membres inférieurs, bien qu'elle est simplement marquée concernant les membres supérieurs (Zouari et al., 1998). Une perte du réflexe ostéo-tendineux au niveau des extrémités inférieures est également observée chez 90% des patients (Delatycki and Corben, 2012; Parkinson et al., 2013). En revanche, la conduction des signaux moteurs n'est pas atteinte. Les patients développent une atteinte neuromusculaire se manifestant par une faiblesse des muscles proximaux des membres inférieurs dans un premier temps, suivie de tous les muscles à des stades plus avancés. Cette faiblesse peut se traduire en une amyotrophie qui contribue également à la progression de la maladie (Pandolfo, 2009).

D'autres manifestations neurologiques accompagnent également l'ataxie spinocérébelleuse et sensitive. Une majorité de patients présente une dysarthrie (trouble de l'articulation), qui apparaît assez tôt et progresse jusqu'aux stades avancés, où la voix devient inintelligible, ce qui rend la parole très difficile à comprendre (Folker et al., 2010). Une dysphagie (trouble de la déglutition) apparaît également à des stades avancés (Keage et al., 2017). Il arrive également que les systèmes visuels et auditifs soient atteints. On observe certains cas de nystagmus (oscillation non volontaire et saccadée du globe oculaire), d'atrophie optique et d'instabilité de la fixation oculaire (Fortuna et al., 2009; Noval et al., 2012). Une proportion des patients présente également une neuropathie auditive allant de simples difficultés d'écoute en environnement bruyant à une surdité sévère (Bürk, 2017; Giraudet et al., 2018). Le phénotype neurologique peut également être à l'origine de déformations squelettiques tels qu'une scoliose (notamment aux niveaux lombaires et thoraciques), ainsi qu'une déformation des pieds (pieds creux) (Reetz et al., 2018). Les patients ne montrent pas de déficience accentuée des fonctions cognitives bien que quelques déficits subtils soient reportés, tels qu'une diminution des fonctions visuo-spatiales complexes, une reconnaissance des émotions altérée et une très légère baisse de vitesse de traitement de l'information et des fonctions exécutives (Costabile et al., 2018; Nieto et al., 2012; Selvadurai et al., 2018). Plusieurs échelles ont été développées afin de permettre aux cliniciens d'évaluer la sévérité des symptômes et la progression de la maladie : FARS ou *Friedreich Ataxia Ration Scale*, ICARS ou *International Cooperative Ataxia Rating Scale* et SARA ou *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (Bürk et al., 2013).

2.2 Anatomopathologie de l'ataxie de Friedreich

Afin de pouvoir expliquer les dysfonctionnements anatomopathologiques associés à l'AF, il est nécessaire de rappeler les bases de l'anatomie et de la physiologie des systèmes nerveux impactés dans l'AF. Je me concentrerai sur les tissus impliqués dans les mécanismes de la sensibilité, car ce sont ceux principalement affectés dans l'AF. Cette partie a été écrite avec en référence principale « Essential Neurology », de Allan Siegel et Hreday Sapru (Siegel and Hreday, 2011). Toute information issue d'une autre publication est référencée ponctuellement.

2.2.1 Système nerveux périphérique et Sensibilité

2.2.1.1 Généralités

Le système nerveux se compose du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP) (**Figure 2**). Le SNC, qui comprend l'encéphale et la moelle épinière, est le centre de régulation et d'intégration du système nerveux. Son rôle est d'interpréter les informations qui lui proviennent du SNP et d'élaborer des réponses motrices. Le SNP de son côté se compose des nerfs crâniens, rachidiens, et de divers ganglions (**Figure 2**). Les nerfs crâniens permettent de relier la périphérie à l'encéphale, tandis que les nerfs rachidiens la relient à la moelle épinière. Le SNP se compose de la voie afférente (ou sensitive), qui permet d'acheminer l'information des récepteurs sensoriels vers le SNC, et de la voie efférente (ou motrice) qui conduit l'information depuis le SNC vers la périphérie, aux organes effecteurs.

Dans le système nerveux périphérique, les corps cellulaires des neurones sont regroupés en ganglions, tandis que leurs axones forment les nerfs. Il existe trois types de neurones dans le SNP : neurones sensitifs, moteurs et interneurones. Les neurones sensitifs permettent de transférer l'information des récepteurs de la périphérie vers le SNC. Leurs corps cellulaires sont regroupés en ganglions rachidiens et cervicaux. Les neurones moteurs trouvent leurs corps cellulaires au sein du SNC, et propagent l'information vers les organes, en périphérie. Enfin les interneurones, qui rassemblent 99% des neurones du système nerveux permettent le relai des influx nerveux. Les différents types de fibres nerveuses sont classées en fonction de leur diamètre, vitesse de conduction et myélinisation (**Tableau 2**).

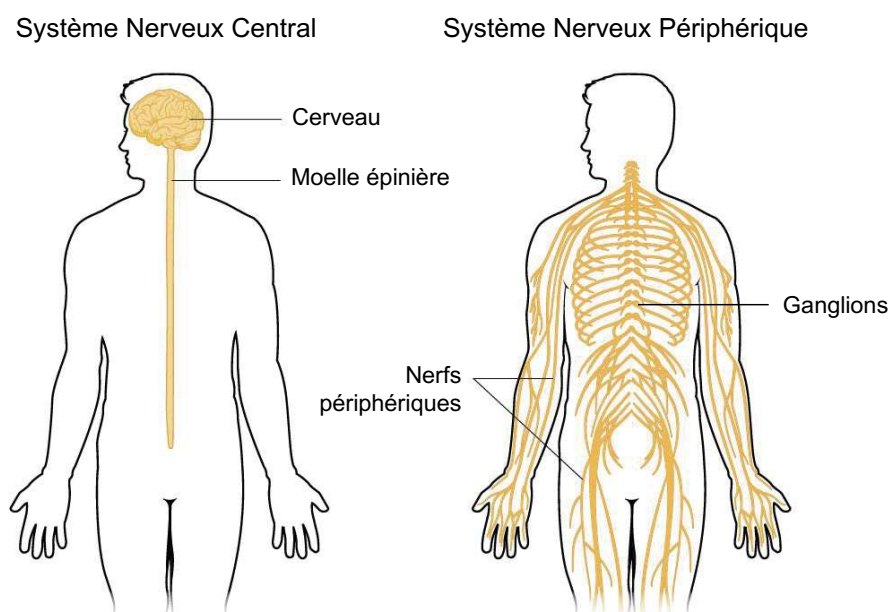


Figure 2 : Systèmes nerveux central (SNC) et périphérique (SNP)

Cerveau : perception et traitement des stimuli sensitifs. Exécution des réponses motrices volontaires. Régulation des mécanismes d'homéostasie. Moelle épinière : initiation des réflexes de la matière grise des cornes ventrale et latérale. Voies des fonctions sensitives et motrices entre la périphérie et le cerveau. Nerfs périphériques : fibres des neurones sensitifs et moteurs
 Ganglions : réception des stimuli sensitifs par les racines dorsales. Relai des réponses motrices par les ganglions autonomes. OpenStax, Psychology. OpenStax CNX. 29 févr. 2016 <http://cnx.org/contents/4abf04bf-93a0-45c3-9cbc-2cefd46e68cc@5.36>.

	Nomenclature numérique	Nomenclature alphabétique	Diamètre de la fibre (µm)	Vélocité de conduction (mètres/sec)	Exemples
Myélinisées	Ia	Aα	17 (approx)	80-120	Issues du fuseau neuromusculaire
	Ib	Aα	16 (approx)	80-120	Issues des organes tendineux de Golgi
	II	Aβ	8 (approx)	35-75	Récepteurs tactiles cutanés
	III	Aδ	1-5	5-30	Fibres conduisant sensations de température, toucher brut et douleur
Non-myélinisées	IV	C	0.2-1.5	0.5-2	Fibres conduisant douleur et température

Tableau 2 : Classification des fibres sensitives dans les nerfs périphériques

Adapté de Siegel et Hreday, Essential Neuroscience, 2011.

2.2.1.2 Récepteurs sensoriels

Les récepteurs sensoriels sont des structures capables d'être activées par des stimuli extérieurs. On en distingue trois types en fonction de leur localisation dans l'organisme. Les extérocepteurs sont placés à la surface du corps, et détectent les stimuli d'origines environnementales. Il peut s'agir de récepteurs de pression et du toucher (mécanorécepteurs à bas seuil), de récepteur de la douleur (nocicepteurs) mais aussi les récepteurs présents dans les organes associés aux sens. Les mécanorécepteurs à bas seuil (corpuscules de Meissner, Pacini, Ruffini et disques de Merkel) sont également responsables de la proprioception consciente lorsqu'ils sont situés dans les articulations. Les intérocepteurs ou viscérocepteurs, situés aux niveaux des viscères et des vaisseaux, détectent les changements d'état à l'intérieur du corps. Ainsi, ils peuvent informer de douleurs internes (nocicepteurs), de la pression sanguine (barorécepteurs), pression osmotique (osmorécepteurs), des substances chimiques (chémorécepteurs), etc. Enfin, les propriocepteurs, des mécanorécepteurs responsables de la proprioception inconsciente occupent muscles squelettiques, tendons, articulations, ligaments et tissus conjonctifs. Leur rôle est de mesurer les mouvements du corps et sa position dans l'espace, grâce à une sensibilité aux étirements et contraction des différents tissus. Il s'agit du fuseau neuromusculaire (détecte l'extension du muscle) et de l'organe tendineux de golgi (contraction, au niveau des tendons et articulations). Le stimulus ainsi acquis, atteint le système nerveux central par les neurones sensitifs périphériques (**Figure 3**).

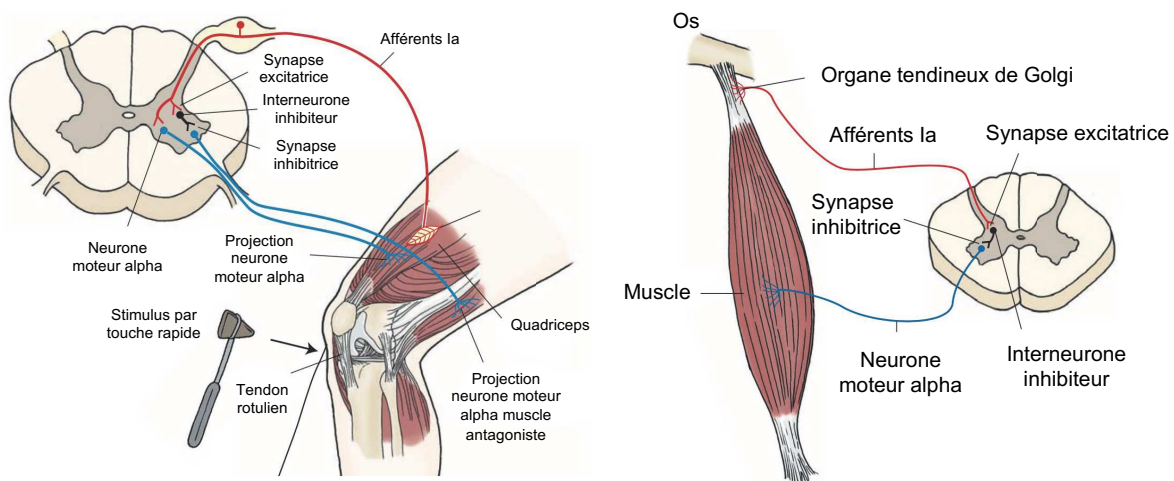


Figure 3 : Propriocepteurs, réflexes myotatique et myotatique inverse

Les fuseaux musculaires sont localisés dans les muscles squelettiques, parallèles aux fibres musculaires. Réflexe myotatique : lorsqu'une touche rapide est délivrée au tendon rotulien, le quadriceps est étendu, et la réponse réflexe provoque la contraction du muscle. Il y a également

une inhibition réciproque du muscle antagoniste. Organe tendineux de Golgi : localisé dans les tendons et les articulations. Réflexe myotatique inverse : contraction ou extension du muscle active l'organe tendineux de Golgi et un signal est initié dans les fibres Ib. Les neurones inhibiteurs sont excités et les neurones moteurs alpha sont inhibés, réduisant la période de contraction du muscle. (Adapté de Siegel et Hreday, Essential Neuroscience, 2011).

2.2.1.3 Ganglions des racines dorsales (DRG) et neurones sensitifs

Les neurones sensitifs ont leurs axones (ou fibres) au sein des nerfs spinaux, et leurs corps cellulaires (ou soma) sont localisés dans les ganglions des racines dorsale, ou ganglions spinaux (DRG) (**Figure 4**). Ces neurones ont un court prolongement, émergeant du corps cellulaire à partir duquel se forment un prolongement périphérique (vers les récepteurs sensoriels) et un prolongement central (vers le système nerveux central) (**Figure 4**). Ces deux prolongements constituent l'axone, et définissent les neurones sensitifs comme des neurones pseudo-unipolaires. On dénombre trois types de neurones sensitifs de DRG : les neurones nociceptifs, mécanoceptifs et proprioceptifs (**Figure 4**). Les neurones nociceptifs sont les plus petits (soma $<30 \mu\text{m}$) et possèdent des fibres légèrement myélinisées (fibres $A\delta$) ou non myélinisées (fibres C). Leur rôle est de transmettre les informations concernant la douleur et la température. Les neurones mécanoceptifs ont un large diamètre (soma $>50 \mu\text{m}$) et peuvent avoir des axones moyennement (fibres $A\beta$), peu (fibres $A\delta$) ou non myélinisées (fibres C). Ces neurones transmettent les informations concernant la pression et le toucher. Enfin, les neurones proprioceptifs sont les plus larges (soma $>50 \mu\text{m}$ également) et possèdent les fibres les plus larges appelées fibres $A\alpha$ largement myélinisées, ce qui permet une conduction très rapide. Primairement affectées dans l'AF, ces fibres sont également appelées Ia lorsque le récepteur associé est le fuseau neuromusculaire ou Ib quand il s'agit de l'organe tendineux de Golgi (**Tableau 2**). Ces neurones représentent environ 15% des neurones de DRG (Marmigère and Ernfors, 2007).

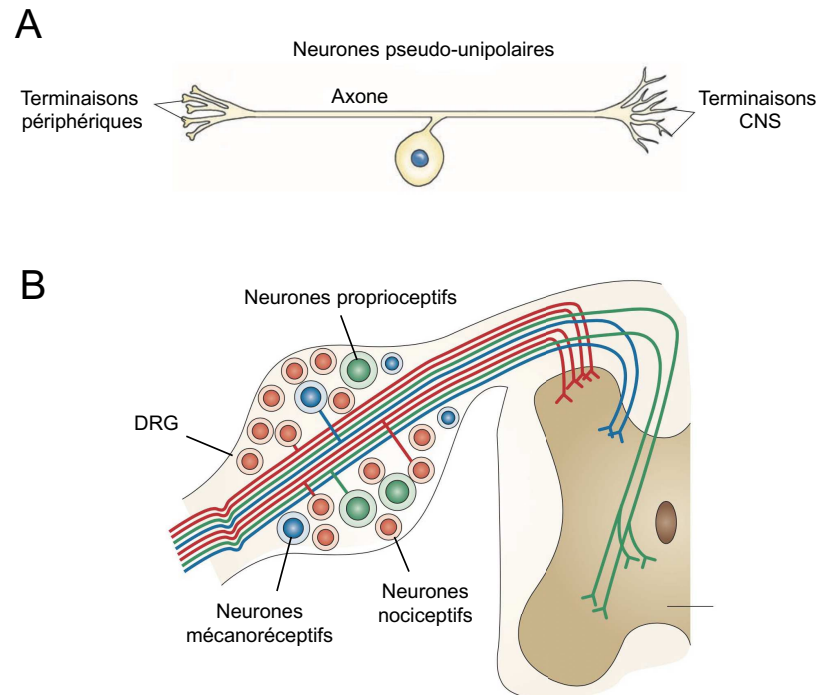


Figure 4 : Les neurones sensitifs de DRG

(A) Les neurones pseudo-unipolaires. D'un seul prolongement se développent deux projections dirigées respectivement vers le système nerveux central (SNC) et la périphérie. Chaque branche possède les caractéristiques structurales et fonctionnelles d'un axone. (Adapté de Siegel et Hreday, *Essential Neuroscience*, 2011). (B) Les ganglions des racines dorsales ou DRG renferment les corps cellulaires des neurones sensitifs. Ils sont classés en 3 groupes : proprioceptifs, mécanoréceptifs et nociceptifs (adapté de Marmigère and Ernfors, 2007).

Chaque type de neurone sensitif exprime un ensemble de marqueurs qui permet de les différencier. La complexité de ces structures et la difficulté d'accessibilité ont ralenti la découverte et le référencement de marqueurs exclusifs d'un certain type. Il est connu depuis de nombreuses années que les neurones nociceptifs expriment des marqueurs tels que TrkA, TRPV1, CGRP et la substance P (Marmigère and Ernfors, 2007). Les mécanoréceptifs expriment TrkB et TrkC, tandis que les proprioceptifs expriment TrkC et la parvalbumine Pvalb (Marmigère and Ernfors, 2007). L'émergence des techniques de séquençage et notamment de séquençage en *single cell* a permis d'affiner ces groupes de neurones en nouveaux sous-groupes plus détaillés (Alshawaf et al., 2018; Lopes et al., 2017; Usoskin et al., 2015). Suite à ces analyses transcriptomiques, 11 nouvelles populations ont pu être isolées : 6 sous-groupes nociceptifs, 3 mécanoréceptifs et 2 proprioceptifs. Cette étude a notamment permis l'identification de marqueurs spécifiques des proprioceptifs tels que les gènes CNTNAP2 et

SPP1, et déterminer que l'expression de TrkC par ces mêmes neurones était très faible en comparaison des neurones mécanoceptifs (Usoskin et al., 2015).

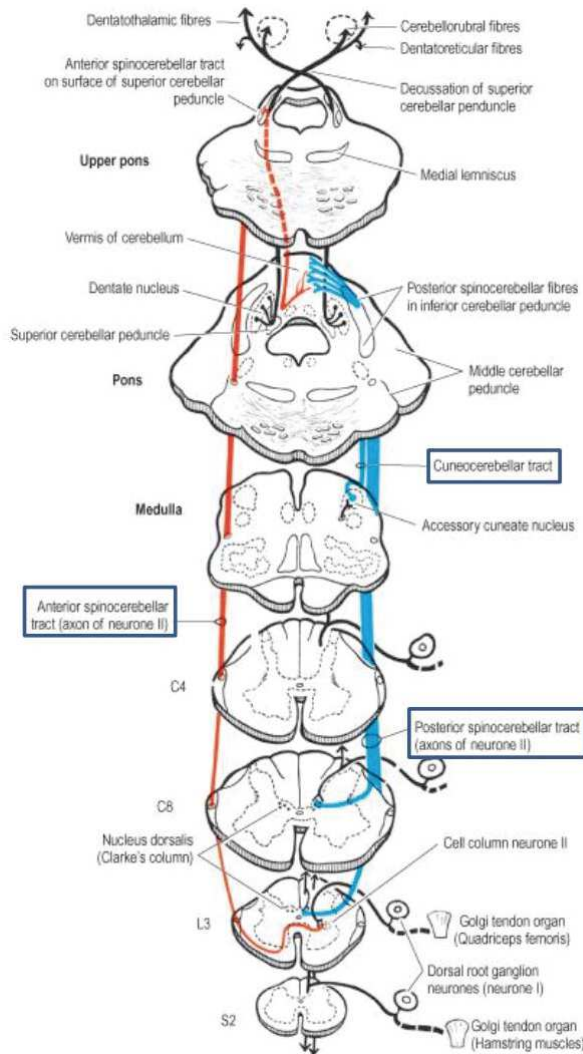


Figure 5 : Faisceaux spino-cérébelleux postérieur, cunéocérébelleux et spino-cérébelleux ventral.

C = cervical ; T = thoracique, L = lombaire, S = sacré (issu de Carpenter, Core text of neuroanatomy, 1991).

2.2.1.4 Les faisceaux spinocérébelleux

Comme énoncé plus haut, les neurones sensitifs possèdent deux prolongements : un dirigé vers les récepteurs, et un dirigé vers le SNC (**Figure 4**). En fonction de l'information sensitive qu'ils véhiculent, ce prolongement emprunte différentes voies qui forment les différents

faisceaux de la moelle épinière (**Figure 5**). Les voies spinocérébelleuses, servent à renseigner le cervelet de la proprioception inconsciente. Les neurones sensitifs (neurones de premier ordre) forment des synapses avec un deuxième groupe de neurones (neurones de deuxième ordre) dans les colonnes dorsales de la moelle épinière. Ces structures, situées dans la matière grise de la moelle épinière, sont appelées colonnes (ou noyaux) de Clarke pour les neurones issus des membres inférieurs et du tronc, et noyaux de Betcherew pour ceux des membres supérieurs, de lombaire haut à thoracique (**Figure 5**). Les neurones de deuxième ordre remontent le long des faisceaux spinocérébelleux postérieurs ou dorsaux (issus des noyaux de Clarke), et antérieur ou ventraux (issus des noyaux de Betcherew), et rejoignent le cervelet en pénétrant respectivement par le pédoncule cérébelleux inférieur et supérieur. Enfin, les neurones issus des membres supérieurs, du cou et du haut de la poitrine, pénètrent la colonne et rejoignent les neurones du deuxième ordre au niveau du noyau cunéiforme accessoire. Ces neurones remontent la moelle le long du faisceau cunéiforme de la colonne dorsale, et rejoignent le cervelet par le pédoncule cérébelleux inférieur.

2.2.2 Atteinte neurologique dans l'AF

2.2.2.1 Neurones proprioceptifs de DRG

Il est communément accepté par la communauté scientifique que les neurones proprioceptifs sont particulièrement affectés dans l'ataxie de Friedreich. D'une part, les observations cliniques traduisant une perte de la sensibilité profonde et du réflexe ostéotendineux, laissent présager que ces neurones sont les plus affectés (Pandolfo, 2009). Mais de nombreuses études réalisées sur des nécropsies de patients ont confirmé l'atteinte spécifique des neurones sensitifs les plus larges. N. Friedreich avait déjà décrit à la fin des années 1870 une absence des plus larges fibres dans les racines dorsales, sans toutefois remarquer des différences au sein des DRG (revu par A. Koeppen, (Koeppen, 2013)). L'ensemble des études qui ont suivi pointent vers des observations communes : diminution du nombre de gros neurones et de la taille des neurones du DRG et prolifération des cellules satellites dans ces mêmes structures (**Figure 6**), forte démyélinisation des axones et réduction du diamètre des fibres dans les racines dorsales, nerfs sural et sciatiques (**Figure 7**) (Goto and Hirano, 1990; Hughes et al., 1968; Inoue et al., 1979; Jitpimolmard et al., 1993; Koeppen and Mazurkiewicz, 2013; Koeppen et al., 2009, 2017a; Lamarche et al., 1982; Morral et al., 2010). Toutes données

rassemblées, il semble inéluctable que les larges neurones sensitifs sont sévèrement affectés dans l'ataxie de Friedreich.

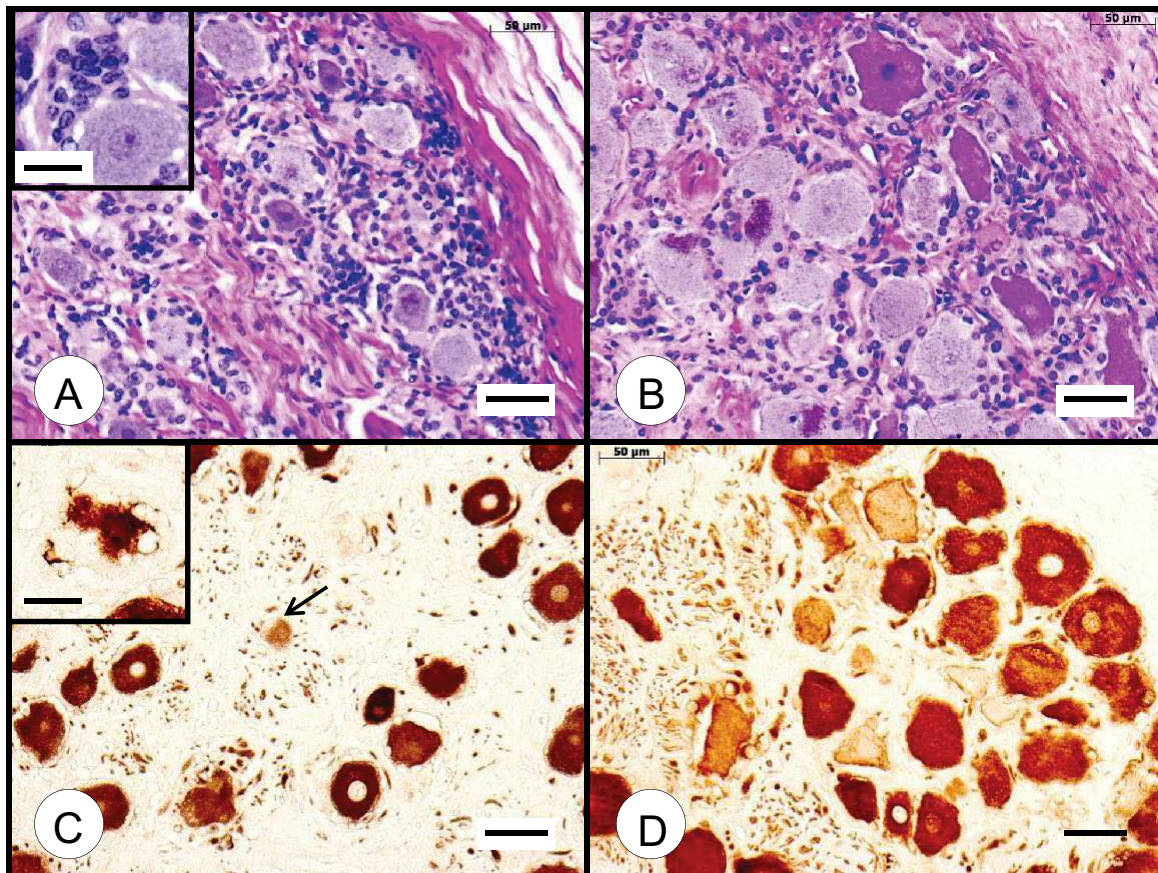


Figure 6 : Neuropathie du DRG dans l'ataxie de Friedreich.

(A, B). Coloration hématoxyline et éosine sur coupes de DRG humains. Les corps cellulaires de neurones sensitifs de DRG ont une taille réduite chez les patients AF (A) par rapport au contrôle (B). On observe également une invasion de cellules satellites visible par une abondance de noyaux autour des neurones (insert). (C, D) Immunohistochimie (IHC) contre la β -tubuline de classe III. Les contours des corps cellulaires sont irréguliers chez le patient AF (C) comparé au contrôle (D), à cause de l'invasion des cellules satellites. Certains neurones montrent un effondrement cytoplasmique (flèche et insert). Barres d'échelle : 50 μ m, inserts : 20 μ m. Adapté de Koeppen et Mazurkiewicz, 2013.

Pendant de longues années, l'ensemble de la communauté semblait s'accorder sur le postulat que la dégénérescence de ces neurones et de leurs fibres était à l'origine de la neuropathologie de l'AF. Cependant, depuis quelques années maintenant, certains chercheurs remettent en cause la dégénérescence à proprement parler, et mettent en avant l'hypothèse d'une composante développementale dans l'AF. A-t-on réellement affaire à une perte

spécifique de ces larges neurones, ou bien à un défaut dans leur développement, c'est à dire une hypoplasie plutôt qu'une atrophie ? Dans l'un ou l'autre des cas, les observations réalisées au moment de l'autopsie devraient être les mêmes, ce qui rend difficile la réponse à ces questions. Mais récemment, deux études réalisées par le Dr. A Koeppen semblent apporter des éléments de réponse à cette hypothèse. En effet, Koeppen rapporte en 2017 que la présence de réduction de la taille des neurones est similaire dans toutes les nécropsies, indépendamment de l'âge de début de progression de la maladie. Il a également publié une étude dans laquelle les résultats semblent indiquer une mauvaise organisation de la zone d'entrée de la racine dorsale, qu'il attribue à une erreur de migration de la crête neurale lors du développement (Koeppen et al., 2017b). Selon ces résultats, la frataxine serait essentielle à l'établissement des tracts issus des neurones proprioceptifs, le contrôle de leur taille, mais également de leur myélinisation. Il est raisonnable de penser en regard des résultats dont on dispose à ce jour, que la frataxine est essentielle non seulement pour le développement mais également pour le maintien de ces neurones et fibres associées. Cependant, une question essentielle, pour laquelle nous n'avons à ce jour que très peu d'éléments de réponse, subsiste : comment expliquer la spécificité des larges neurones sensitifs parmi toutes les cellules du système nerveux, qui observent pourtant tous l'expression du gène ? Un premier élément de réponse se trouverait peut être dans une étude publiée par notre laboratoire. Cette étude de 2018 démontre que les neurones proprioceptifs du DRG expriment à eux seuls 50 à 70% de la quantité totale de frataxine (voir partie 4 de l'introduction) dans le DRG (Piguet et al., 2018a).

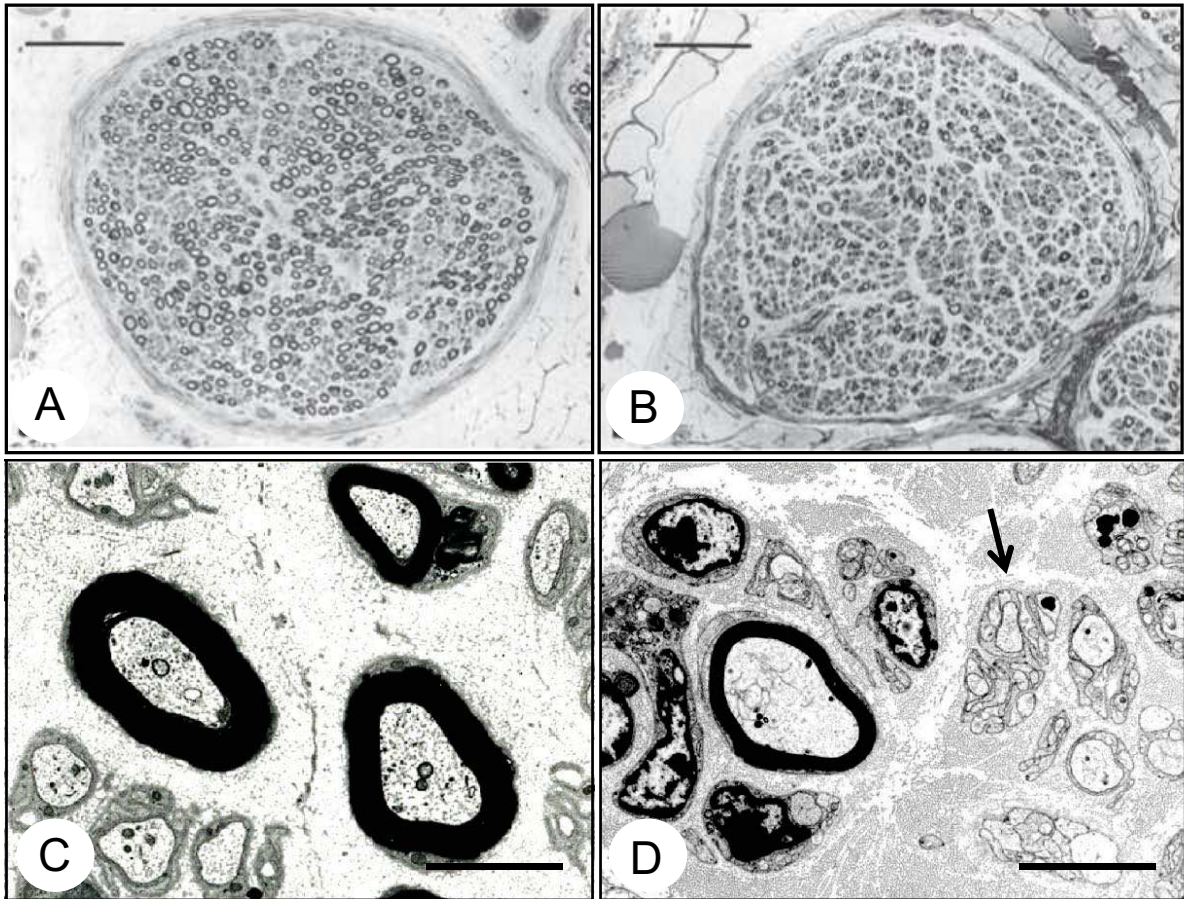


Figure 7 : Démyélinisation des fibres sensibles dans l'AF

Coupe de nerf sciatique (A, B) ou sural (C, D) de contrôle (A, C) ou de patient AF (B, D) par microscopie électronique. On observe une réduction générale du diamètre des fibres ainsi qu'une forte démyélinisation chez le patient AF, dans les nerf sciatique et sural (flèche). Barres d'échelles : 100 μm (A, B) ; 5 μm (C, D). Adapté de Jitpimolmard et al., 1993 ; Koeppen et Mazurkiewicz, 2013.

2.2.2.2 Les faisceaux spinocérébelleux

Les études réalisées sur nécropsies de patients rapportent un affinement générale de la moelle épinière des patients AF, ainsi qu'un affinement et démyélinisation des axones des colonnes postérieures de la moelle (**Figure 8**) (Hughes et al., 1968; Koeppen, 2013; Koeppen and Mazurkiewicz, 2013). Il est à ce jour difficile de tirer des conclusions quant au caractère primaire ou secondaire des défauts observés pour ces neurones. Les neurones des faisceaux spinocérébelleux pourraient dégénérer suite à la perte des neurones d'ordre primaire ou dégénérer de manière primaire mais plus tardivement que les neurones des DRG. A. Koeppen évoque une hypothèse développementale, postulant que le rétrécissement du canal de la moelle épinière résulte d'un élargissement incomplet de la moelle pendant la croissance (Koeppen et

al., 2017a). Il est également décrit une atteinte des faisceaux graciles et cunéiformes, qui font partie de la colonne dorsale, notamment au niveau lombaire (Koeppen, 2013; Koeppen and Mazurkiewicz, 2013) (**Figure 8**). Le noyau gracile (membres inférieurs) semble plus atteint que le noyau cunéiforme (membres supérieurs). Additionnellement, on note une absence de larges neurones dans la colonne de Clarke (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013) (**Figure 8**).

Au niveau moteur, il est décrit une atrophie progressive des faisceaux pyramidaux, avec notamment perte des cellules de Betz et atteinte en particulier des faisceaux cortico-spinaux, attribuée à un processus de *dying back* ou mort rétrograde (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013; Pandolfo, 2006)

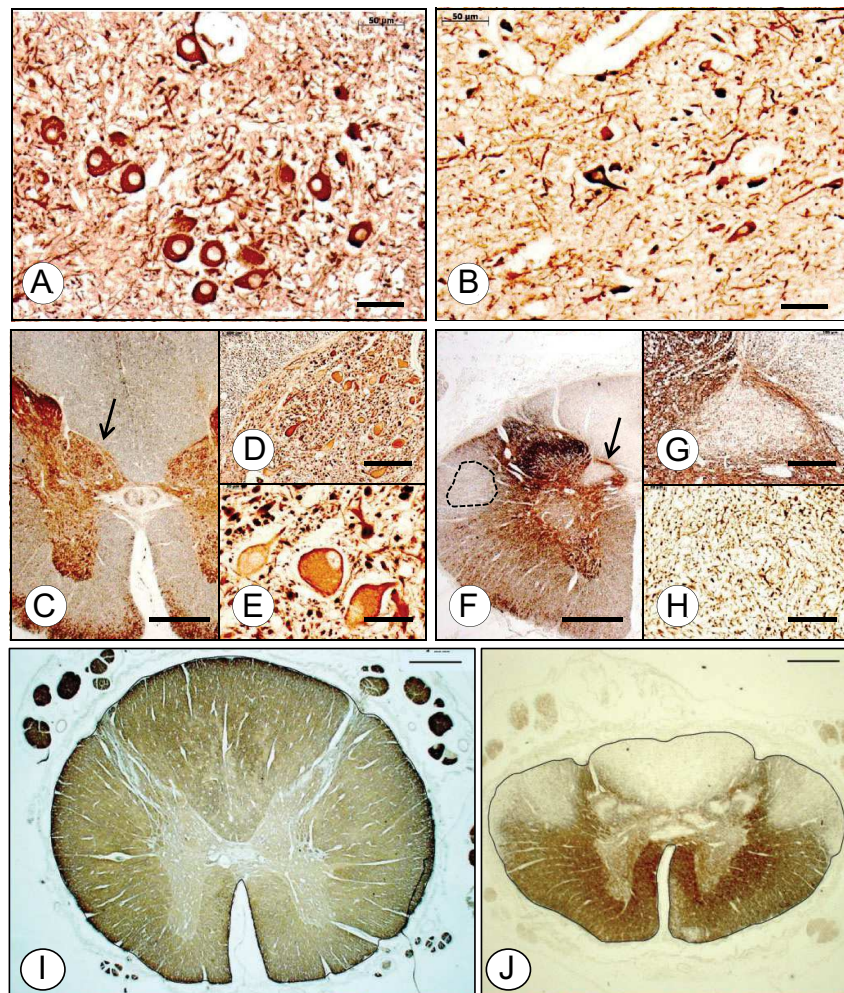


Figure 8 : Atteinte de la moelle épinière dans l'AF

(A, B) IHC contre la protéine non phosphorylée de neurofilament. Atrophie neuronale dans le noyau gracile de patients AF (A) par rapport au contrôle (B). Barre d'échelle 50 μ m. (C-H) IHC contre la β -tubuline classe III. On observe un rétrécissement des tractus corticospinaux latéraux et faisceaux spinocérébelleux dorsaux (ligne discontinue = tractus corticospinal latéral). (D, E)

Agrandissements de la région fléchée. Dégénérescence de la colonne de Clarke, perte des larges neurones dans la moelle AF (D, E) par rapport au contrôle (G, H). Barres d'échelle : 1 mm (C, F), 200 μ m (D, G) 50 μ m (E, H). (I,J) Sections transverses de moelle épinière thoracique chez un contrôle (I) ou un patient AF (J), IHC contre la protéine basique de la myéline (MBP). On observe une réduction de la taille de la moelle et une perte des cellules marquées dans les colonnes dorsales, tractus corticospinaux latéraux et faisceaux spinocérébelleux dorsaux. Barres d'échelle : 1 mm (Adapté de Koeppen and Mazurkiewicz, 2013 ; Koeppen et al., 2017).

2.2.2.3 Cervelet et cerveau

Une structure du cervelet est particulièrement atteinte dans l'AF. Il s'agit du noyau dentelé, retrouvé atrophié dans les nécropsies de patients (Koeppen, 2011, 2013). L'atrophie de cette structure s'illustre en particulier par la perte des gros neurones, la présence de gliose (prolifération des cellules gliales) (**Figure 9**), et la démyélinisation des fibres. Globalement, le cortex cérébelleux semble inatteint. Cependant, l'émergence des techniques poussées de neuro-imagerie ont permis de mettre en lumière de nouvelles atteintes cérébelleuses et cérébrales légères (Selvadurai et al., 2018). Notamment, des anomalies au niveau des microstructures des substances blanches et grises du cervelet, un élargissement des cellules de Purkinje et de leurs axones au niveau des synapses avec les neurones du noyau dentelé et de ses noyaux rouges (Kemp et al., 2016; Pandolfo, 2006; Selvadurai et al., 2018). On observe également une atrophie et démyélinisation du pédoncule cérébelleux supérieur (Corben et al., 2014).

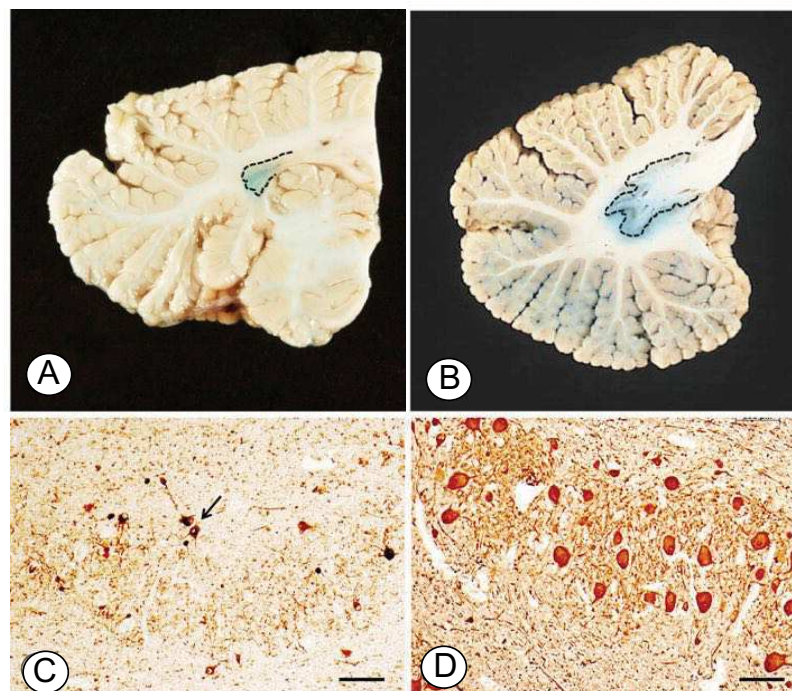


Figure 9 : Le noyau dentelé (ND) du cervelet dans l'AF.

Coloration pour le fer d'une coupe sagittale de cervelet de patient AF (A) ou de contrôle (B). On observe une réduction de la matière grise du ND chez le patient (lignes discontinues). (C, D) IHC contre l'énolase neurone-spécifique (NSE) sur coupe de ND de patient AF (C) ou de contrôle (D). Seuls quelques neurones marqués subsistent chez le patient AF (flèche). Barre d'échelle = 50 μm . Adapté de Koeppen, 2011 et Koeppen et al, 2012.

2.2.3 Atteintes extra-neurologiques

2.2.3.1 Cardiomyopathie

Une cardiomyopathie hypertrophique est présente chez une grande majorité de patients, et se déclare tôt au cours de la maladie. Les patients présentent un épaissement de la paroi du septum et du ventricule gauche (Payne, 2011). Suite à cette hypertrophie, se développe une dilatation cardiaque qui mène à une diminution de l'épaisseur de la paroi cardiaque donnant une impression d'amélioration de l'hypertrophie. La cause de cette dilatation est attribuée à la perte des cardiomyocytes et la présence de fibrose au niveau du ventricule gauche (Konstam et al., 2011; Payne and Wagner, 2012). Le phénotype cardiaque représente la cause primaire de décès chez les patients AF (60% des décès) (Tsou et al., 2011). Étonnamment, il n'existe pas de corrélation de sévérité entre le phénotype cardiaque et neurologique (Schadt et al., 2012).

2.2.3.2 Diabète

Environ 20% des patients développent un diabète ou une intolérance au glucose, attribués à l'atrophie des îlots β du pancréas associés à des défauts de production d'insuline (Koeppen, 2011). Une corrélation entre le phénotype diabétique et la durée de la maladie est décrite, et il est reporté que ce phénotype apparaît en moyenne 15 ans après le début de la maladie (Bürk, 2017).

3 L'ataxie de Friedreich, une maladie génétique

3.1 Historique d'identification et description du gène FXN

Dès 1873, Nikolaus Friedreich met en évidence le caractère héréditaire de l'ataxie de Friedreich (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013). L'AF observe un mode de transmission autosomique récessif. Il aura fallu attendre la fin des années 1980 pour que des chercheurs mettent en évidence l'emplacement chromosomique de la mutation causale de l'AF. Les chercheurs ont pu lier ce gène à deux marqueurs chromosomiques localisés sur le chromosome 9 : MCT112 et D9S5 (Chamberlain et al., 1988; Fujita et al., 1989). Grâce à des expériences d'hybridation *in situ*, la localisation du marqueur D9S5 a pu être affinée à la position 9q13-q21.1 (Hanauer et al., 1990). Plusieurs gènes candidats ont ensuite été proposés mais c'est en 1996 que le gène causal, nommé *X25* fut identifié (Campuzano et al., 1996). La majeure partie de ces travaux est attribuée à une collaboration des équipes des Professeurs Jean-Louis Mandel, Massimo Pandolfo et Michel Koenig, et a été réalisée à l'IGBMC. En lien avec le nom de la pathologie associée, le gène fut renommé *FXN* et la protéine qu'il encode frataxine (FXN).

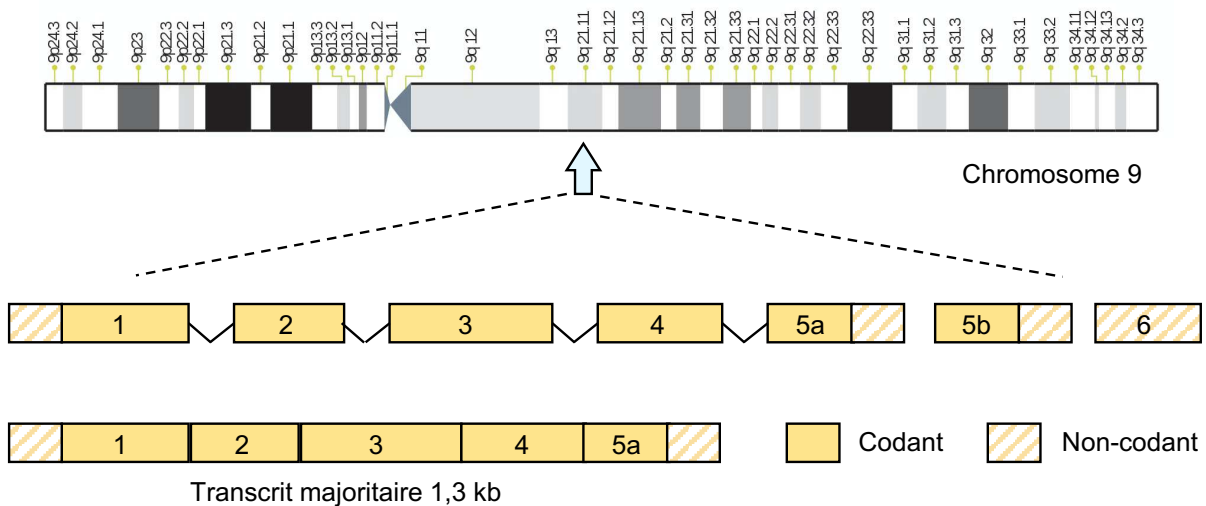


Figure 10 : Localisation chromosomique et structure de *FXN*

Le gène *FXN* est situé à la position q21.11 du chromosome 9 humain, et composé de 7 exons. Le transcrit majoritaire contient les exons 1 à 5a et mesure 1,3 kb.

FXN se compose de 7 exons, et le transcrit majoritaire rassemble les exons 1 à 5a (1,3 kb) (Figure 10). Un transcrit alternatif et minoritaire est formé en incluant l'exon 5b, mais aucune

fonction ne lui a été attribué (Pandolfo, 2009). Exprimé de manière ubiquitaire, *FXN* montre une variabilité de niveaux d'expression en fonction des tissus. Son expression est accentuée dans le cœur, la moelle épinière, et a des niveaux légèrement plus bas dans le pancréas, le foie et les muscles squelettiques (Campuzano et al., 1996). L'expression de *Fxn* chez la souris démarre au stade embryonnaire et augmente progressivement (Koutnikova et al., 1997). On retrouve chez les patients atteints de l'ataxie de Friedreich deux types de mutations du gène *FXN*. La mutation majeure correspond à une expansion de répétition de triplets GAA (Campuzano et al., 1996) (**Figure 11**). Chez 96% des patients, cette mutation est présente à l'état homozygote. 4% des patients sont dit hétérozygotes composites, et possèdent l'expansion sur un allèle, et une mutation sur l'autre allèle, dans la région codante de *FXN* (Cossée et al., 1999; Galea et al., 2016; Gellera et al., 2007). Les individus présentant l'expansion à l'état hétérozygote, associée à un allèle non muté, sont porteurs sains et ne présentent pas de symptômes.

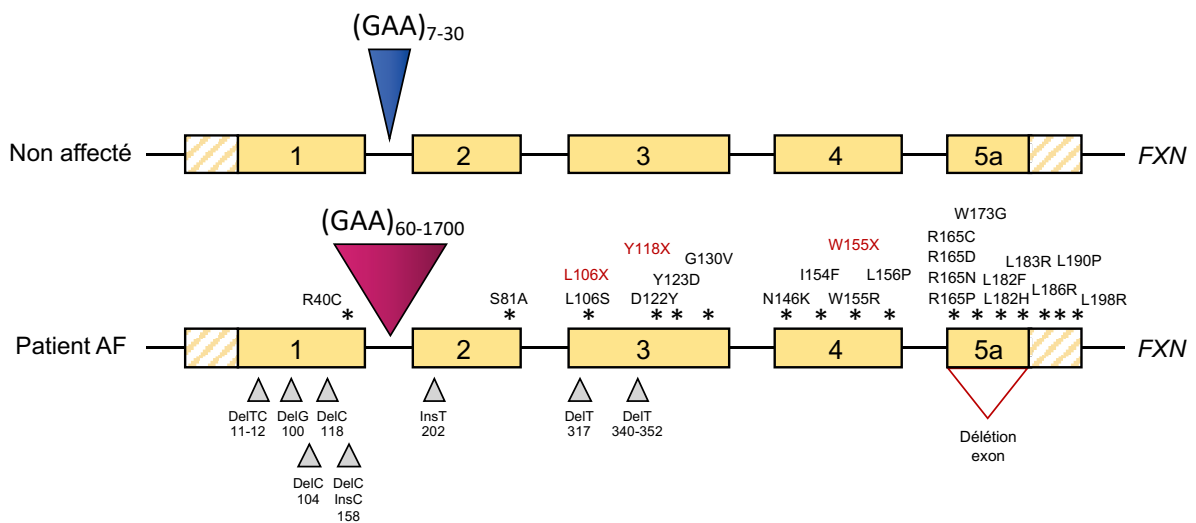


Figure 11 : Les mutations du gène *FXN*

L'expansion GAA est insérée dans l'intron 1 de *FXN*. D'une longueur de 7 à 30 répétitions chez les individus sains, elle devient pathogénique après 60 répétitions et peut en atteindre 1700. Elle est la mutation majoritaire de l'AF. Les hétérozygotes composites ont une mutation ponctuelle sur un des deux allèles. Il peut s'agir de mutation faux-sens (*), de micro insertions ou micro délétions (triangles), ou de mutations non-sens (rouge). Adapté de Cossée et al., 1999 et Galea et al., 2016.

3.2 Les types de mutations

3.2.1 Expansion de triplets GAA, mutation majeure

L'ataxie de Friedreich est une maladie à expansion de trinuécléotides. Mais au sein de cette famille de maladies, l'AF se distingue par son caractère récessif, le type de trinuécléotides et sa localisation dans le gène muté. En effet, l'expansion de triplet GAA est inséré dans le premier intron du gène *FXXN*, au sein d'une séquence ALU (riche en G/A) (Campuzano et al., 1996). La répétition de triplets est présente chez les individus sains, à hauteur de 7 à 30 successions de GAA (**Figure 11**). La majorité des allèles portent une expansion dite normale courte (SN, *short normal*) : entre 7 et 10 répétitions. Les expansions comprenant entre 11 et 30 répétitions sont dites normales longues (LN, *long normal*). Chez les patients, les expansions pathogéniques sont nommées E pour *Expanded*, et ont des longueurs variant entre 60 et 1700 GAA. La moyenne des expansions se situe entre 600 et 900 triplets (Dürr et al., 1996). De 30 à 60 GAA, on parle de pré-mutation, en raison de l'instabilité de ces répétitions (considérées stables jusqu'à 30 répétitions), qui sont susceptibles de développer une mutation pathologique (Cossée et al., 1997; Montermini et al., 1997). L'apparition des expansions pathologiques tiendrait ainsi leur origine en un effet fondateur entraînant la duplication d'une expansion SN en une LN. C'est une nouvelle duplication de cette longue expansion qui aurait résulté en la formation d'une expansion instable (Cossée et al., 1997). L'instabilité de ces larges expansions est particulièrement importante au moment de la transmission, avec un effet parental important. Il est donc possible que les générations suivantes ont vu apparaître progressivement des expansions de plus en plus larges et donc pathologiques. Toutefois, l'instabilité peut également conduire à une contraction de l'expansion, et elle n'est pas égale entre les hommes et les femmes. En effet, l'expansion semble pouvoir se contracter ou s'étendre sur l'allèle maternel, tandis qu'elle peut uniquement se contracter sur l'allèle paternel (Montermini et al., 1997; Pandolfo, 2009).

Il a également été démontré que l'instabilité de l'expansion est somatique, c'est à dire que la longueur de l'expansion varie entre les tissus et au sein d'un même tissu : on parle alors de mosaïcisme (De Biase et al., 2007b, 2007a; Long et al., 2017). Les quelques études sur le sujet montrent que l'instabilité des expansions est plus élevée dans le cœur, le pancréas et le système nerveux (De Biase et al., 2007b; Long et al., 2017). La longueur des répétitions aurait également tendance à augmenter au cours du temps à raison d'une moyenne de 9 répétitions

par an (Long et al., 2017). A noter également que la taille des répétitions varie fréquemment entre les deux allèles.

3.2.2 Autres mutations

3.2.2.1 Mutations ponctuelles

De nombreuses mutations ponctuelles ont été identifiées (au moins 44), parmi lesquelles on retrouve des mutations non-sens, faux-sens, des insertions et délétions associées à un décalage du cadre de lecture ainsi que des mutations affectant l'épissage de l'ARNm (Cossée et al., 1999; Galea et al., 2016; Gellera et al., 2007; Musco et al., 2000) (**Figure 11 ; Tableau 3**). La présence de ces mutations conduit à la production d'une frataxine tronquée, à fonction altérée ou à l'absence de sa synthèse. Tous les résidus conservés sont touchés (Pandolfo, 2009). La mutation G130V est la plus fréquente et cause une perte incomplète de la fonction avec une maturation et stabilités réduites de la frataxine (Correia et al., 2008). Les patients ont une présentation clinique atypique : début précoce mais lente progression des symptômes (Delatycki et al., 1999). La mutation I154F cause des défauts de maturation et de fonction, et mène à un phénotype classique chez les patients (Campuzano et al., 1996; Correia et al., 2008). Certaines mutations touchent le repliement et la dégradation de la frataxine mature (L106S, G137V), tandis que d'autres empêchent la correcte interaction entre la frataxine et ses partenaires (N146K, W155R, R165C) (Calmels et al., 2009a; Clark et al., 2017; Faggianelli et al., 2015; Schmucker et al., 2011). Récemment une nouvelle mutation a été identifiée et impacte la maturation de la frataxine (W168R) (Clark et al., 2019). A noter que l'effet de toutes les mutations identifiées n'est pas encore déterminé.

3.2.2.2 Grandes délétions

De grandes délétions exoniques dans le gène *FXN* ont été identifiées chez 10 cas de hétérozygotes composites (Parkinson et al., 2013). Ces individus présentent en majorité de sévères symptômes et une rapide progression de la maladie. Des délétions dans les exons 2, 3, 4 et 5a ont été décrites, à chaque fois menant à des atteintes neurologiques précoces, très sévères, ainsi que de fortes atteintes extra-neurologiques telles que le diabète, la scoliose et la cardiomyopathie (Anheim et al., 2012b; Saccà et al., 2013).

La présence de mutations ponctuelles ou grandes délétions à l'état homozygote n'a pour l'instant jamais été reportée. Deux facteurs peuvent expliquer cette observation : leur faible

Exon/Intron	Mutation	Effet	Type de mutation	Nombre de familles	Origine ethnique
Exon1	c.1 A>C	p.M1L	Faux-sens (initiation incorrecte)	1	Etats-Unis
	c.2 T>C	p.M1T p.M1S	Faux-sens (initiation incorrecte)	1	Suède
	c.2 delT	p.M1T p.M1S	Faux-sens (initiation incorrecte)	1	Australie
	c.3 G>T	p.M1I	Faux-sens (initiation incorrecte)	3	Allemagne
	c.3 G>A	p.M1I	Faux-sens (initiation incorrecte)	1	Etats-Unis
	c.11-12 delTC	p.L4RfsX90	Décalage du cadre de lecture	1	Malaisie
	c.100 delG	p.A34PfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	Italie
	c.104 delC	p.P35HfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	Italie
	c.118 C>T	p.R40C	Faux-sens	1	Etats-Unis
	c.118 delC	p.R40VfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	Espagne
c.157 delC	p.R53AfsX75	Décalage du cadre de lecture	1	France	
c.157 insC	p.R53PfsX92	Décalage du cadre de lecture	1	Pologne	
Intron 1	g.IVS1+5 G>C	Epissage aberrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Etats-Unis
Exon 2	c.202_205 delGTCAinsTTG	p.V68Lfs X75	Décalage du cadre de lecture	1	Caucasien
Exon 3	c296_297 insT	p.A99VfsX111	Décalage du cadre de lecture	1	Basque
	c.317 T>G	p.L106X	Non-sens	1	France
	c.317 T>C	p.L106S	Faux-sens	1	Etats-Unis
	c.317 delT	p.L106X	Non-sens	1	Caucasien
	c340_352 del13	p.A114TfsX128	Décalage du cadre de lecture	1	Caucasien
	c.354 C>G	p.Y118X	Non-sens	1	Italie
c.364 G>T	p.D122Y	Faux-sens	1	Allemagne	
Intron 3	g.IVS3+1 G>A	Epissage aberrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Caucasien
	g.IVS3-2 A>G	Epissage aberrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Espagne
Exon 3/Intron 3	g.168_180delTGGGGTACTCTT	Epissage aberrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Italie
Exon 4	c.389 G>T	p.G130V	Faux-sens	5	Etats-Unis, Australie, France, Irlande
	c.438 C>G	p.N146K	Faux-sens	1	Allemagne
	c.460 A>T	p.I154F	Faux-sens	2	Italie
	c.464 C>T	p.W155R	Faux-sens	1	Etats-Unis
	c.465 G>A	p.W155X	Non-sens	1	Cuba
	c.467 T>C	p.L156P	Faux-sens	1	Suède
Intron 4	g.IVS4+2 T>G	Epissage aberrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Australie
	g.IVS4+3 delA	Epissage aberrant	Mutation du site donneur d'épissage	1	Italie
Exon 5a	c.493 C>T	p.R165C	Faux-sens	2	Etats-Unis, Australie
	c.494 G>C	p.R165P	Faux-sens	1	Italie
	c.517 T>G	p.W173G	Faux-sens	2	Etats-Unis, Italie
	c.544 C>T	p.L182F	Faux-sens	1	Australie
	c.545 T>A	p.L182H	Faux-sens	1	France
	c.548 A>G	p.H183R	Faux-sens	1	France
	c.557 T>G	p.L186R	Faux-sens	1	Allemagne
	c.93 T>G	p.L198R	Faux-sens	1	Irlande

Tableau 3 : Les mutations ponctuelles identifiées chez FXN

Issu de Gellera et al., 2007, Galea 2016

fréquence et leur sévérité. En effet, la frataxine étant essentielle à la division cellulaire et au long du développement, son absence totale ou complète perte de fonction résulte en une létalité précoce (Calmels et al., 2009a; Cossée et al., 2000). A l'inverse, une mutation ayant un faible impact sur l'activité de la frataxine présente à l'état homozygote ne déclencherait pas de symptôme, ce pourquoi ces cas éventuels ne seraient pas détectés.

3.2.3 Conséquences de l'expansion de triplets GAA sur l'expression du gène *FXN*

3.2.3.1 Généralités

Peu après la découverte de l'expansion de triplets GAA au sein de l'intron 1 du gène de la frataxine, des évidences de répression transcriptionnelle induite par les GAA ont été rapportées (Bidichandani et al., 1998; Ohshima et al., 1998). En effet, les cellules présentant une expansion de triplet GAA expriment entre 5 et 30% des niveaux courants de frataxine, et ces niveaux corrélaient avec l'âge de début de la maladie et inversement avec la taille de l'expansion (De Michele et al., 1998). Étant donné que l'expansion se situe dans un intron, les chercheurs se sont demandés si elle pouvait impacter l'épissage de l'ARN de la frataxine. Les études montrent qu'il n'y a pas de défauts d'épissage concernant l'ARN de la frataxine (Bidichandani et al., 1998; Punga and Bühler, 2010; Sznajder et al., 2018), et qu'aucun transcrite stable issu d'un épissage alternatif n'est détecté (Punga and Bühler, 2010), éliminant ainsi les possibilités d'accumulation d'ARN toxique comme dans des maladies telles que la Myotonie Dystrophique de type 1 (DM1) et la Dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs (FECD) (Zhang and Ashizawa, 2017). Les différentes hypothèses concernant l'effet de l'expansion GAA sur l'expression du gène de la frataxine sont détaillées ci-après.

3.2.3.2 Mécanismes de diminution de la transcription

3.2.3.2.1 Hétérochromatinisation du locus

Il est communément accepté que le *silencing* du gène *FXN* implique une transition d'une conformation ouverte de la chromatine vers une conformation condensée ou hétérochromatine (Gottesfeld, 2019) (**Figure 12**). Les premiers signes de cette transition proviennent d'une étude employant des transgènes artificiels liés à des expansions de triplets GAA. Dans cette étude, l'expansion de triplet induisait la formation d'hétérochromatine répressive, dans un contexte de variéation par effet de position (PEV = *position effect variegation*) (Saveliev et al., 2003). On parle de PEV quand un gène est localisé au sein ou près d'hétérochromatine silencieuse, caractérisée notamment par la présence de modifications d'histones telles que H3K9me2/3 et H3K27me3, d'histones déacétylases ou d'ADN méthyltransférases (Elgin and Grewal, 2003). Des études de CHIP-seq réalisées sur des fibroblastes et cellules lymphoïdes de patients AF ont révélées que le locus *FXN* inactif présente une perte d'acétylation des histones H3 et H4 et est hautement tri-méthylé aux positions H3K9 et H3K27 (Chan et al., 2013; Greene et al., 2007; Herman et al., 2006a; Kim et al., 2011; Punga and Bühler, 2010). Des observations similaires

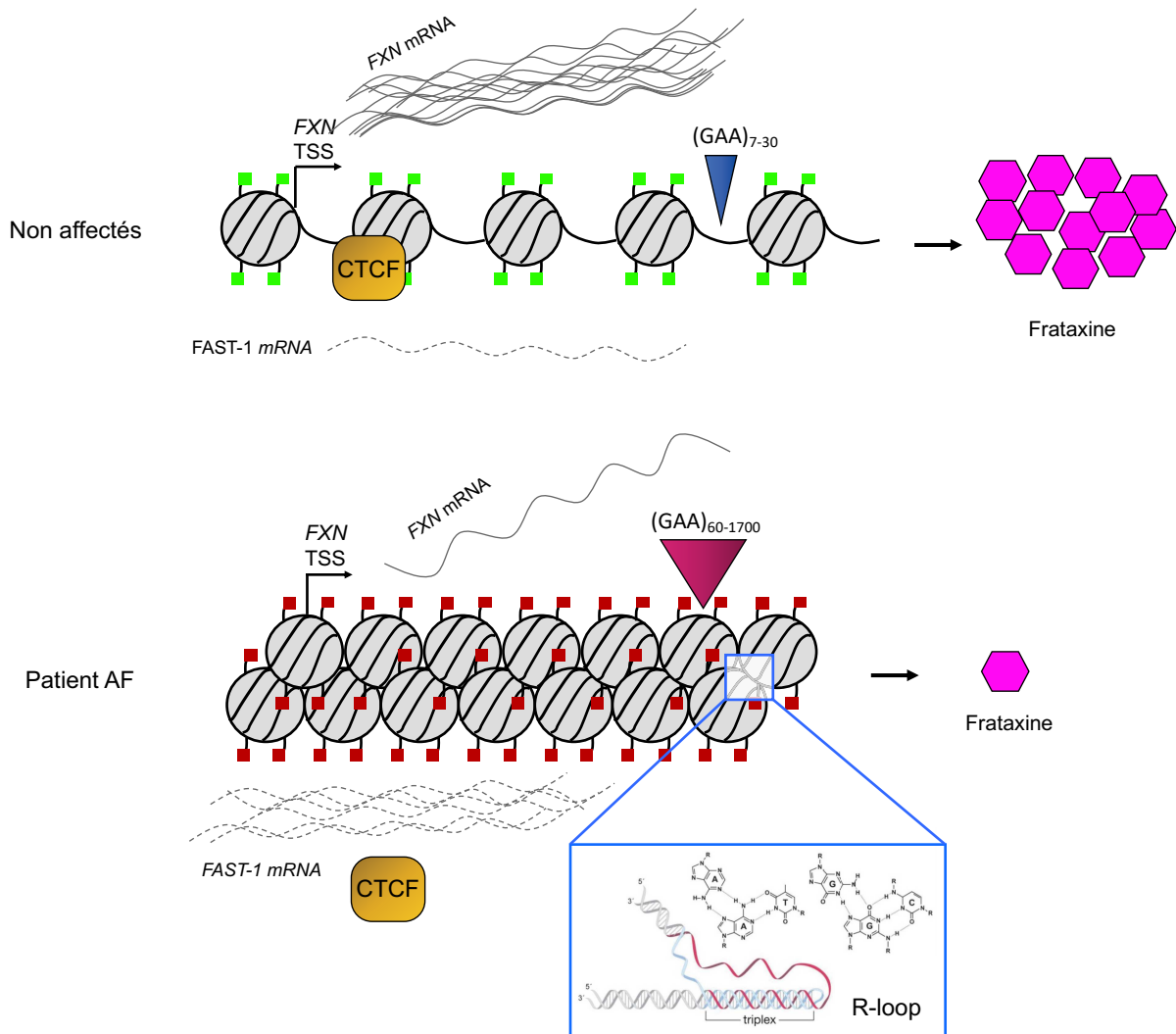


Figure 12 : Mécanisme d’inhibition de la transcription par les répétitions GAA

Dans les cellules des individus non affectés, le gène *FXN* comporte un faible nombre de répétitions GAA, et est en conformation d’euchromatine ou chromatine ouverte, permettant la transcription par la polymérase. Cette euchromatine se traduit par la présence de marques actives de chromatine telles que l’acétylation des histones (carrés verts). Dans les cellules des patients AF, le gène de la frataxine est condensé en hétérochromatine ou chromatine fermée, due à la présence de larges répétitions GAA. Cette transition en chromatine fermée empêche la transcription du gène, et donc la production de frataxine, et se traduit par la présence de marques inactives telles que la méthylation des histones (carrés rouges). Cette transition résulte notamment de la formation de triplexes avec l’ARN messager en formation (R-loop, encart), et de la présence de l’ARN *FAST-1* empêchant le recrutement de la protéine CTCF.

ont été révélées sur tissus de patients issus d’autopsies : cerveau, cervelet et cœur (Al-Mahdawi et al., 2008). Une hyperméthylation des îlots CpG situés à proximité de l’intron 1 de *FXN* est également observée dans plusieurs modèles cellulaires, animaux, cellules et tissus de patients :

on observe une méthylation de 70 à 95% des CpG contre seulement 10% pour l'allèle sans expansion (Al-Mahdawi et al., 2008; Castaldo et al., 2008; Evans-Galea et al., 2012; Greene et al., 2007; Soragni et al., 2014a). Intéressamment, le niveau de méthylation semble corrélérer avec la répression de *FXN*. La présence de ces marques de méthylation permet le recrutement de complexes répresseurs contenant des histones déacétylases (HDACs) à travers des protéines se liant aux CpG méthylés (El-Osta and Wolffe, 2000), menant à la condensation de la chromatine au niveau du locus *FXN*.

3.2.3.2.2 Structures secondaires

Les répétitions de triplets GAA sont également susceptibles de former des structures non conventionnelles d'ADN, qui jouent un rôle dans la baisse de transcription du gène *FXN* (Bidichandani et al., 1998; Ohshima et al., 1998; Sakamoto et al., 1999). Des structures non B de l'ADN peuvent notamment être adoptées telles que des triplexes RRY (hybridation entre deux purines et une pyrimidine, laissant une pyrimidine en simple brin), qui peuvent aussi s'associer et former des structures dites de *sticky DNA*. Il a été montré que ces structures sont capables d'inhiber la transcription (Sakamoto et al., 2001). En support de cela, des molécules inhibant la formation de *sticky DNA* augmentent l'expression de la frataxine dans des lignées de lymphoblastes AF (Burnett et al., 2006). Des études complémentaires montrent qu'elles pourraient également bloquer l'étape d'élongation de la transcription (Grabczyk and Usdin, 2000a, 2000b). Un enrichissement en boucles R ou *R loops* est également observé en présence de l'expansion (**Figure 12**). Les boucles R sont formées par des duplexes ADN-ARN entre l'ARN naissant et le brin non transcrit de l'ADN. La formation de ces boucles participe également à la formation d'hétérochromatine au niveau des répétitions (Groh et al., 2014).

3.2.3.2.3 Autres mécanismes

Bidichandani et collègues ont décrit un transcrit antisens de *FXN*, appelé FAST-1 (*FXN* Antisense Transcript 1), qui aurait un rôle dans le silencing de *FXN* dans l'AF (**Figure 12**). Plusieurs études rapportent des niveaux augmentés de FAST-1 dans des cellules de patients ainsi que dans le cervelet de souris YG8R (Al-Mahdawi et al., 2013; Biase et al., 2009). Cet antisens se chevauche avec le site de fixation de l'isolateur de chromatine CTCF (CCCTC-binding factor) proche du gène de la frataxine. L'augmentation de l'expression de FAST-1 est associée avec une déplétion de CTCF. Les chercheurs ont émis un modèle selon lequel la

transcription de FAST-1 déclencherait une baisse de CTCF menant à la formation locale d'hétérochromatine (**Figure 12**). Ce modèle a été confirmé dans une étude où la surexpression en trans de FAST-1 déclenche une déplétion de CTCF et un silencing de *FXN* (Mikaeili et al., 2018). En complément, un knockdown de CTCF affecte l'expression de la frataxine dans des cellules sauvages (Biase et al., 2009). Cependant, les raisons pour lesquelles l'expansion de triplets GAA déclenchent une augmentation de transcription de FAST-1 doivent encore être élucidées.

3.2.3.3 Corrélation génotype/phénotype

Une corrélation existe entre la taille de l'expansion pathogénique et la sévérité de la maladie (Dürr et al., 1996; Filla et al., 1996; Montermini et al., 1997) (**Figure 13**). En effet, la quantité de frataxine produite et l'âge d'apparition des symptômes sont inversement corrélés avec la taille de l'expansion (Tsou et al., 2011) (**Figure 13**). La taille de l'expansion corrèle également inversement avec l'âge de décès des patients (**Figure 13**). Ces observations ne permettent toutefois pas d'assumer totalement que la taille de l'expansion GAA définit à elle seule un pronostic vital. De nombreux autres facteurs rentrent en compte tels que le fond génétique, l'instabilité des répétitions, le mosaïsme somatique, et l'environnement (Pandolfo, 2009).

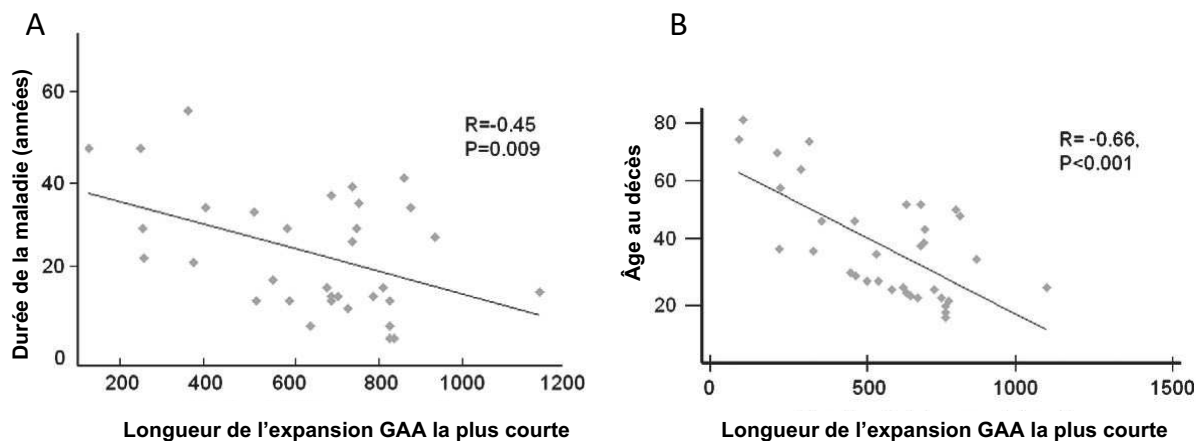


Figure 13 : Durée de la maladie et âge de décès en fonction de la taille de l'expansion GAA la plus courte

On observe une corrélation modérée ($R = 0,45$) entre la taille de l'expansion GAA la plus courte et la durée de la maladie (A), et prononcée ($R = 0,66$) avec l'âge des patient au moment du décès (B). Issu de Tsou et al., 2011.

4 La Frataxine, une petite protéine mitochondriale

4.1 Structure, maturation et localisation

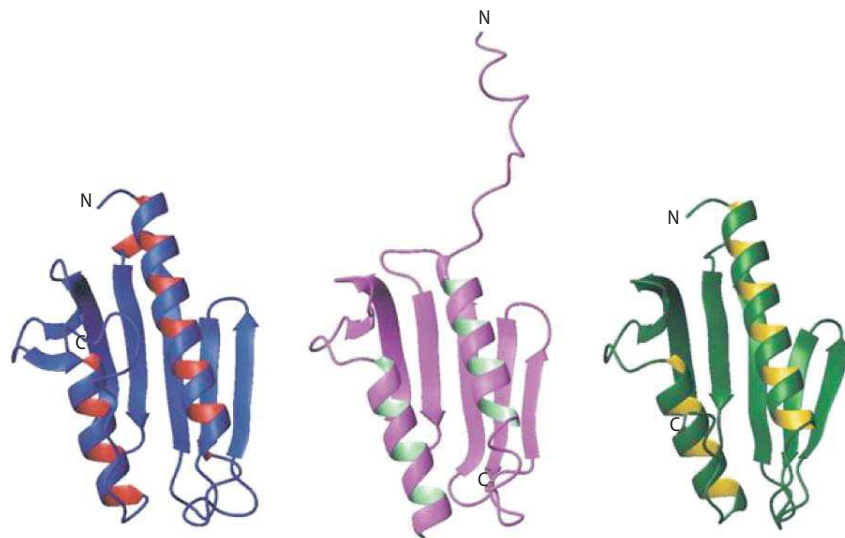


Figure 14 : Conservation de la structure de la frataxine

Comparaison des structures de FXN (bleu), Yfh1 (rose) et CyaY (vert). Issu de Pandolfo et Pastore, 2009

La frataxine est une protéine mitochondriale, codée par l'ADN nucléaire, et conservée de la bactérie (gène *CyaY*) aux levures (*Yfh1*) et aux mammifères (*FXN*) (Koutnikova et al. 1997 ; Pandolfo et Pastore 2009) (**Figure 14**). Le gène *FXN* produit un précurseur protéique de 23 kDa (encodé par les acides aminés 1-210), adressé à la mitochondrie grâce à son signal d'adressage mitochondrial (MTS) localisé en N-terminal, et subissant une maturation en deux étapes (**Figure 15**). Un premier clivage, effectué par la protéine MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*) au niveau du résidu 42, produit une forme intermédiaire, appelée i-FXN de 19 kDa (FXN₄₂₋₂₁₀). Un second clivage intervient entre les résidus Lys80 et Ser81 produisant une forme mature de 14.5 kDa appelée m₈₁-FXN (81-210) (Li et al., 2008; Schmucker et al., 2008).

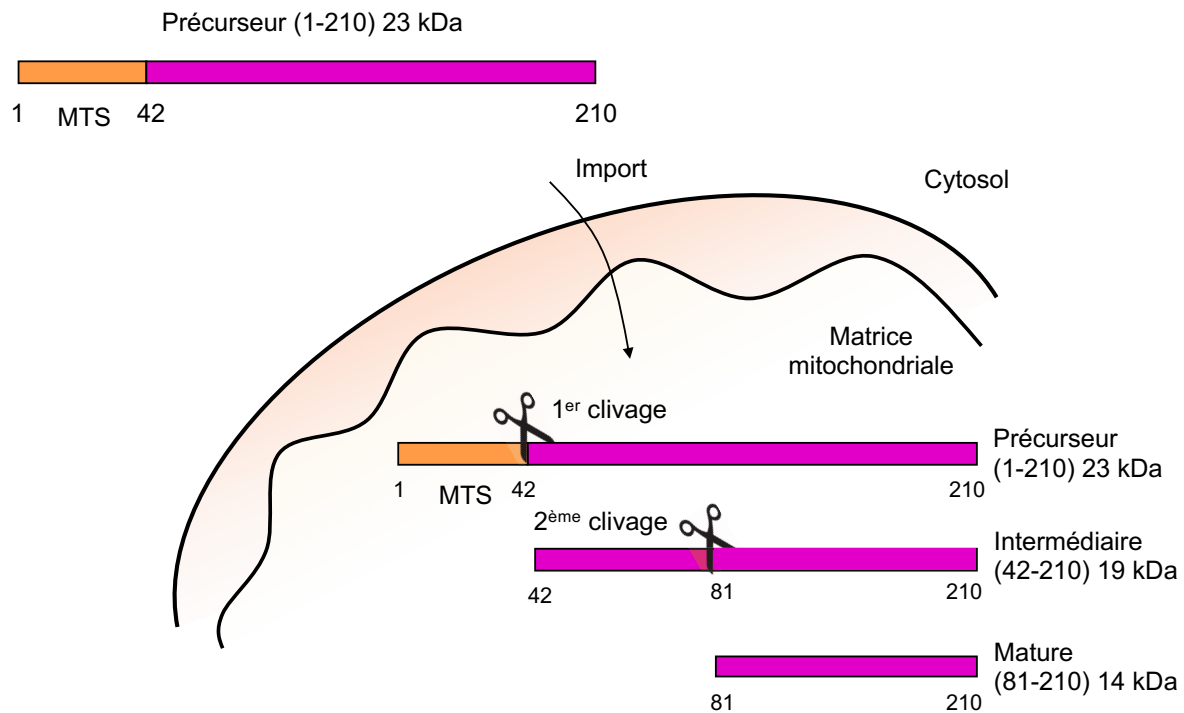


Figure 15 : Étapes de maturation de la frataxine humaine

Un précurseur protéique de 23 kDa (FXN₁₋₂₁₀) est adressé à la mitochondrie grâce à son signal d'adressage mitochondrial (MTS) et subit une maturation en deux étapes : un premier clivage au niveau du résidu 42, produit une forme intermédiaire de 19 kDa (FXN₄₂₋₂₁₀), puis un second menant à la forme mature de 14.5 kDa (FXN₈₁₋₂₁₀). MTS = *Mitochondrial targeting sequence*, signal d'adressage mitochondrial.

La frataxine mature est structurée en un feuillet β central interagissant avec deux hélices α (longue en N-terminal et courte en C-terminal) (Castro et al., 2019; Musco et al., 2000) (**Figure 16**). Au sein de l'hélice α_1 , une dizaine de résidus chargés négativement forment une crête acide constituant un potentiel site de fixation du fer (Castro et al., 2019; Dhe-Paganon et al., 2000). La protéine contient également un cœur hydrophobe et un sillon chargé, tous deux importants pour l'interaction avec d'autres protéines (**Figure 16**). La frataxine est exprimée de manière ubiquitaire chez les mammifères, bien qu'il a été montré que son expression est plus élevée dans le tissu cardiaque, les DRG, le foie, les muscles squelettiques et le pancréas (Campuzano et al., 1997). Notre laboratoire a démontré que chez la souris, 50 à 70% de la frataxine des DRG est exprimée dans les neurones proprioceptifs (Piguet et al., 2018a). La frataxine est une protéine essentielle au développement et à la division cellulaire, il a été montré que sa déplétion totale chez la souris est létale à l'état embryonnaire (E6.5) (Cossée et al., 2000).

Au moins 3 isoformes de la frataxine ont été décrits et validés, résultant de *splicing* alternatifs. Il s'agit des isoformes I, II et III (Xia et al., 2012). L'isoforme I correspond à l'isoforme canonique observé dans la mitochondrie, d'une séquence de 130 acides aminés et un poids moléculaire de 14,2 kDa. L'isoforme II a une séquence de 135 résidus et un poids de 14,9 kDa. Enfin l'isoforme III possède 164 résidus et un poids moléculaire de 18,2 kDa. Les isoformes II et III sont localisés principalement dans le cytosol et le noyau, respectivement, et observent une expression tissu-spécifique. Ainsi, le II est abondant dans le système nerveux, tandis que le III dans le cœur (Xia et al., 2012). Une étude récente rapporte l'existence d'un quatrième isoforme, appelé isoforme E, et d'une longueur de 135 acides aminés (Guo et al., 2018). Cette isoforme manque le signal d'adressage mitochondrial, et serait acétylé en N-terminal. Les résultats de l'étude suggèrent que cet isoforme est 3 fois plus abondant dans les érythrocytes que la frataxine mature présente dans les mitochondries des autres cellules sanguines. Si l'existence de cet isoforme est confirmée par de nouvelles études, on peut imaginer mesurer les niveaux de cet isoforme dans le sang des patients, en tant que biomarqueur pour des traitements visant à augmenter l'expression de la frataxine endogène.

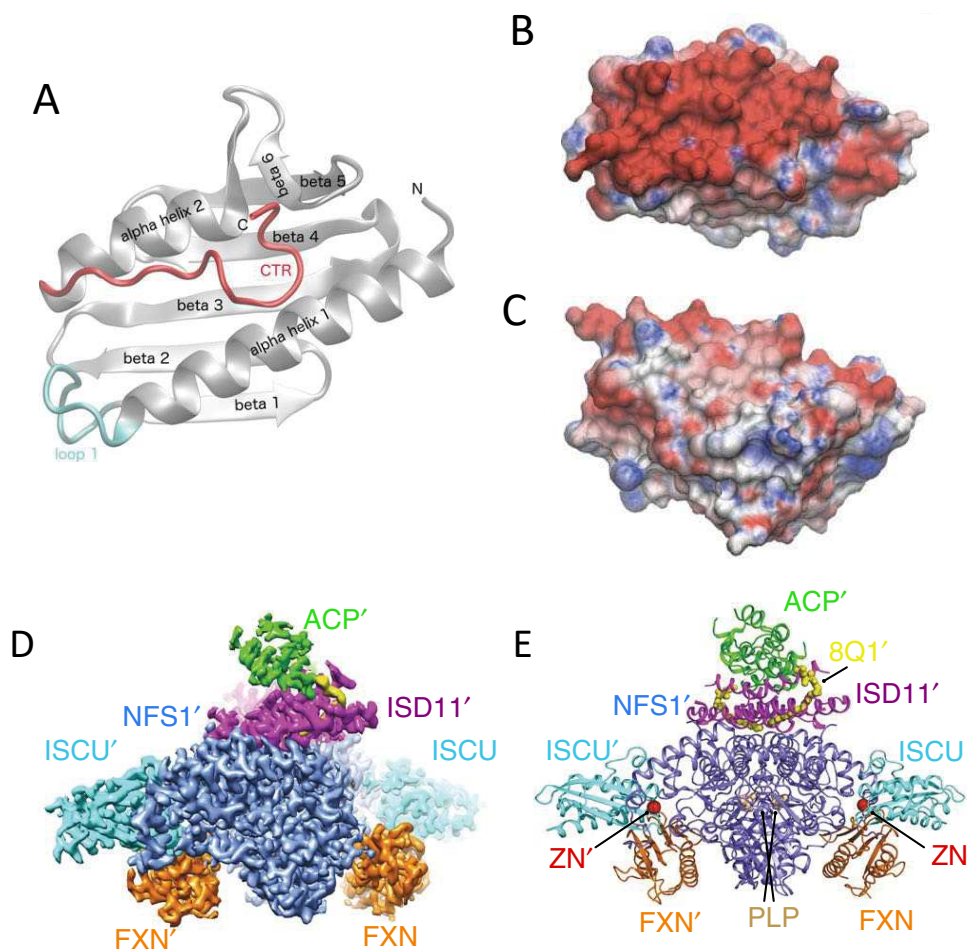


Figure 16 : Structures de la frataxine humaine et du complexe de biosynthèse des Fe-S

(A) Motifs de la structure de la frataxine (ID PDB : 1EKG). (B, C) Surface électrostatique de la frataxine dans deux orientations : pont acide de face (B) ou de dos (C). Échelle de couleur : de +5 (bleu) à 5 kT/e (rouge). (D) Densité électronique du supercomplexe NFS1/ISD11-ACP/ISCU/FXN par cryo-microscopie électronique (cryo-ME). (E) représentation schématisée des motifs structuraux des sous-unités du complexe. 8Q1' = chaîne phosphopantéthéine acyl ; ZN = ions Zn^{2+} ; PLP = pyridoxal 5' phosphate.

4.2 Historique de recherche de la fonction de la Frataxine

La recherche de la fonction de la frataxine a fait l'objet de nombreuses études, qui ont permis d'éclaircir son rôle au sein de la cellule. Après l'identification du gène, des observations faites chez les patients ainsi que dans des modèles de la maladie ont associé la frataxine au métabolisme du fer cellulaire et notamment mitochondrial. Dans ce contexte, la présence d'une crête acide dans la structure de la frataxine a suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle dans la régulation du transport du fer mitochondrial. Des expériences *in vitro* ont montré très tôt que la frataxine pouvait former des structures sphéroïdales oligomériques en milieu saturé en fer (Adamec et al., 2000; Gakh et al., 2002). Ces oligomères (jusqu'à 48-mère) ont été montrés comme capables de fixer plus de 50 atomes de fer. De par ces observations, les auteurs ont suggéré que la frataxine pourrait jouer le rôle de chaperone du fer, similairement à la ferritine, une protéine impliquée dans le stockage du fer cellulaire. Cette hypothèse fut par la suite supportée par le fait que l'expression de la ferritine pouvait partiellement compléter la déficience en frataxine (Zanella et al., 2008). Cependant, il a été plus tard décrit que ces oligomères ne sont pas stables dans des concentrations physiologiques de métaux et sels, questionnant le rôle de la frataxine dans la récupération du fer *in vivo* (Adinolfi et al., 2002). En outre, il a été montré qu'une frataxine de levure (Yfh1) portant une mutation ponctuelle prévenant la formation d'oligomères permet le sauvetage d'une souche de levure $\Delta Yfh1$ (Aloria et al., 2004), démontrant que l'oligomérisation n'est pas requise pour compléter la fonction principale de la frataxine *in vivo*. En addition, la forme mature de la frataxine humaine ne forme pas d'oligomères mais est capable de restaurer la viabilité cellulaire dans une lignée de fibroblasts déplétés en frataxine murine (Schmucker et al., 2011). Toutefois, la frataxine monomérique est capable de fixer le fer, dans une moindre mesure, au travers de sa crête acide conservée et située sur l'hélice α en N-terminal (Lane and Richardson, 2010). Cette

capacité semble avoir été conservée au travers de l'évolution puisqu'elle a été démontré non seulement pour la frataxine humaine mais également pour ses homologues CyaY (bactéries) et Yfh1 (levures) (Cook et al., 2006; Yoon and Cowan, 2003). Cette capacité ajoutée aux phénotypes de dérégulation du métabolisme du fer chez les patients AF et les levures $\Delta Yfh1$ ont suggéré que la frataxine joue tout de même un rôle clef dans le métabolisme du fer mitochondrial.

Des études phylogénétique préliminaires ont montré que le gène CyaY affichait une distribution phylogénétique identique à certaines protéines impliquées dans la biosynthèse des centres Fer-Soufre (Fe-S) telles que les protéines HscA et HscB (Iron-sulfur cluster co-chaperone protein A/B) (Huynen et al., 2001). Par la suite, des enzymes ayant comme cofacteur des centres Fe-S ont été trouvée affectées dans un model murins ayant une déplétion cardiaque-spécifique de la frataxine et reproduisant la cardiomyopathie de l'AF (Puccio et al., 2001). Ces études ont conduit vers l'assomption que la frataxine joue un rôle dans le métabolisme des centres Fe-S, confirmé plus tard chez la souche de levures $\Delta Yfh1$ (Duby et al., 2002; Mühlhoff et al., 2002). Gerber et collègues ont montré chez la levure que la frataxine formait un complexe avec les protéines ISCU et NFS1, deux protéines du mécanisme de la synthèse des Fe-S (voir paragraphe 4.3.2.1.1) (Gerber et al., 2003; Mühlhoff et al., 2003). Il a été montré que l'interaction de la frataxine avec ces protéines est fortement augmentée par le fer. Cette dépendance du fer à suggérer un rôle de la frataxine dans le chargement du fer sur ISCU, ainsi dans le mécanisme de biosynthèse des Fe-S. Par la suite, il a été montré que l'altération des propriétés électrostatiques de la crête acide de la frataxine perturbe l'assemblage des Fe-S et affaiblit l'interaction entre FXN et ISCU, suggérant que cette crête est essentielle dans le mécanisme de biosynthèse des Fe-S, et joue probablement le rôle de domaine d'interaction de la frataxine (Foury et al., 2007; Wang and Craig, 2008). Les études réalisées au sein de notre laboratoire, sous la direction du Dr. Puccio, ont apporté des précisions quant aux interactants de la frataxine. Il a été décrit en 2011 que la frataxine interagit non seulement avec ISCU et NFS1, mais aussi avec la protéines ISD11, tous trois composants essentiels de la machinerie d'assemblage des Fe-S. Grâce à des expériences sur une série de mutants, il a été démontré que la frataxine mammifère interagit à travers la crête acide et le feuillet béta avec le complexe préformé, plutôt qu'avec chaque protéine de manière individuelle (Schmucker et al., 2011). En 2019, est publiée pour la première fois la structure du complexe d'assemblage des Fe-S chez l'humain, contenant deux copies de l'hétéropentamère NFS1/ISD11-ACP/ISCU/FXN (Fox et al., 2019) (**Figure 16**). La nature de ces protéines et leur fonction est détaillée ci-après.

4.3 La frataxine, catalyseur de la synthèse des centres Fer-Soufre

4.3.1 Les centres Fe-S, des cofacteurs protéiques essentiels

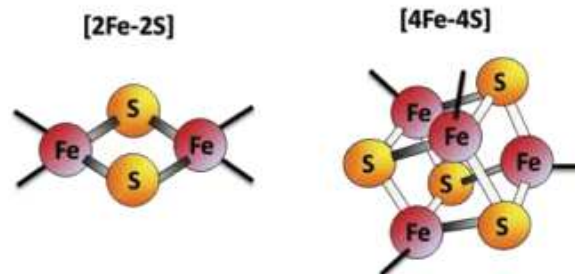


Figure 17 : Les centres Fe-S les plus courants chez les mammifères

Les centres fer-soufre (Fe-S) rhombiques [2Fe-2S] et cubiques [4Fe-4S] sont les plus courants chez les mammifères, et sont généralement coordonnés par des résidus cystéines. Fe = atome de fer ; S = atome de soufre.

Les centres Fe-S sont des cofacteurs inorganiques versatiles essentiels et présents chez l'ensemble des organismes vivants (Lill, 2009). Les noyaux rhombiques, ou [2Fe-2S], sont composés de deux atomes de fer et de deux atomes de soufre, tandis que les noyaux cubiques, ou [4Fe-4S], sont composés de quatre atomes de fer et de quatre atomes de soufre (**Figure 17**). Les centres rhombiques et cubiques sont les plus courants et contiennent uniquement du fer $Fe^{2+/3+}$ et du sulfure S^{2-} , mais il existe également des centres plus complexes pouvant contenir d'autres ions métalliques (Rouault, 2012). De manière générale, les centres Fe-S sont coordonnés par des résidus cystéines ou histidines via leurs atomes de fer. Ils sont également particulièrement sensibles à l'oxydation et à la dégradation (Rouault, 2012).

4.3.1.1 Mécanismes impliquant les Fe-S

Les centres Fe-S sont des cofacteurs présents et essentiels à travers toute la cellule (**Figure 18**) bien que leur rôle au sein des mitochondries ait été particulièrement étudié. Alors que de nombreuses protéines Fe-S aux rôles très diversifiés ont été identifiées, on considère que nombre d'entre elles restent encore inconnues. De nombreuses équipes de recherche travaillent à référencer les protéines à Fe-S, associant récurremment ces cofacteurs à de nouveaux mécanismes cellulaires.

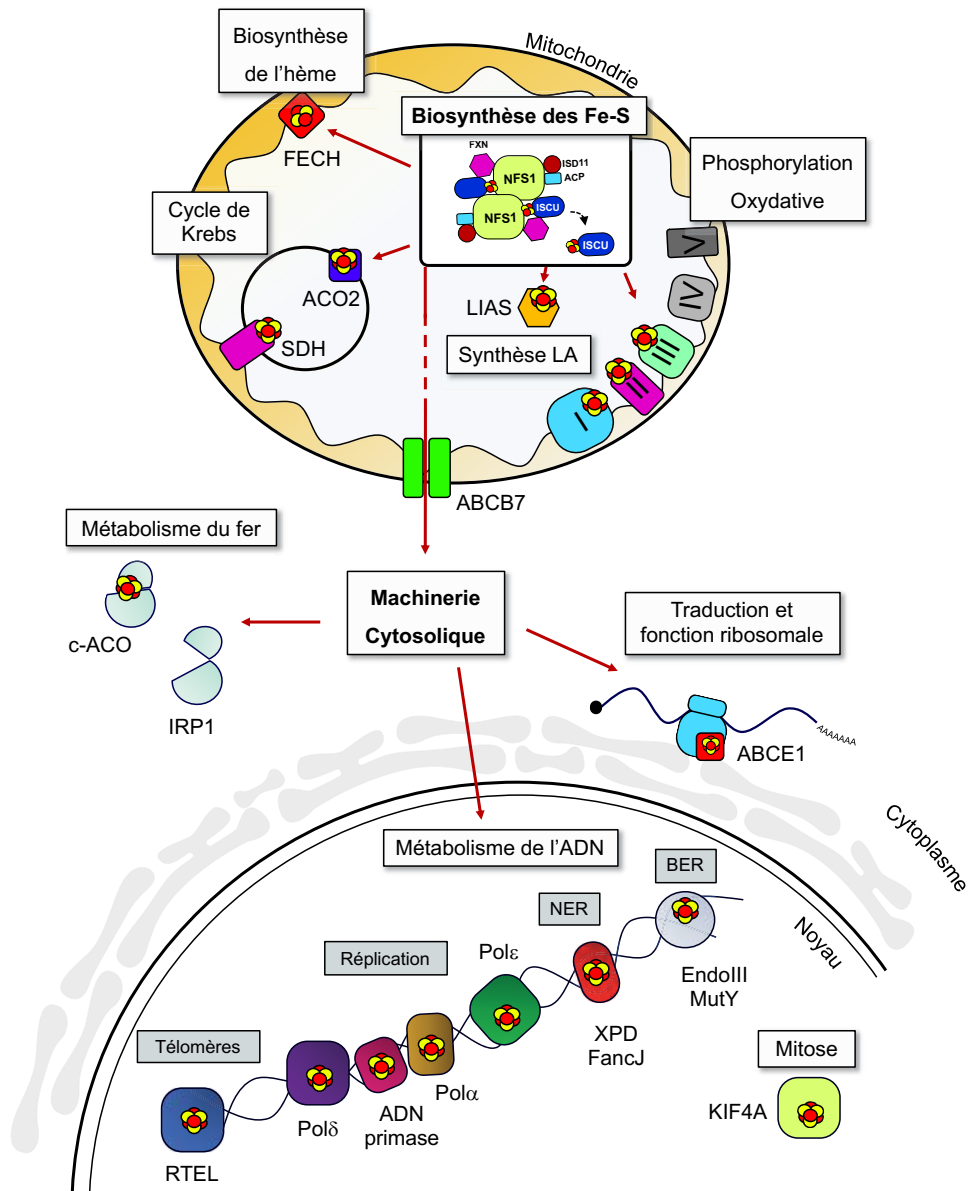


Figure 18 : Les centres Fe-S, des cofacteurs présents dans toute la cellule

Les centres Fe-S sont essentiels au fonctionnement et à la stabilité de protéines mitochondriales, nucléaires et cytosoliques.

4.3.1.1.1 Mitochondrie

Les centres Fe-S sont essentiels aux fonctions mitochondriales, et notamment à la production d'énergie. En effet, ils sont liés à plusieurs complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Sousa et al., 2018). Les complexes I et II contiennent respectivement huit ($2 \times [2\text{Fe-2S}] + 6 \times [4\text{Fe-4S}]$) et trois ($1 \times [2\text{Fe-2S}] + 1 \times [3\text{Fe-4S}] + 1 \times [4\text{Fe-4S}]$) centres Fe-S, tandis que le complexe III contient deux centres $[2\text{Fe-2S}]$ (Sousa et al., 2018) (**Figure 19**). Au sein de ces complexes, ils jouent le rôle de transporteur d'électrons, élément essentiel à la

création du gradient de proton nécessaire pour la conversion de l'ADP et ATP par l'ATP synthase (Sousa et al., 2018). L'aconitase, protéine mitochondriale du cycle de Krebs, possède un centre actif $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ qui peut se convertir en une forme inactive $[3\text{Fe-4S}]^+$, jouant donc le rôle de substrat activateur (Lill, 2009). Cette enzyme réalise l'isomérisation spécifique du citrate en isocitrate via le cis-aconitate, ce qui constitue l'une des premières étapes du cycle de Krebs (Beinert et al., 1996). La ferrochélatase (FECH) est une protéine Fe-S ($[2\text{Fe-2S}]$) impliquée dans la biosynthèse de l'hème. La perte du cluster, jouant plus probablement un rôle structural, affecte fortement l'activité de cette protéine (Crouse et al., 1996; Sellers et al., 1996, 1998). Les centres Fe-S servent également de catalyseurs rédox au sein des enzymes à radical S-adénosyl-L-méthionine (SAM) telles que la Lipoate synthase (LIAS) (Gelling et al., 2008).

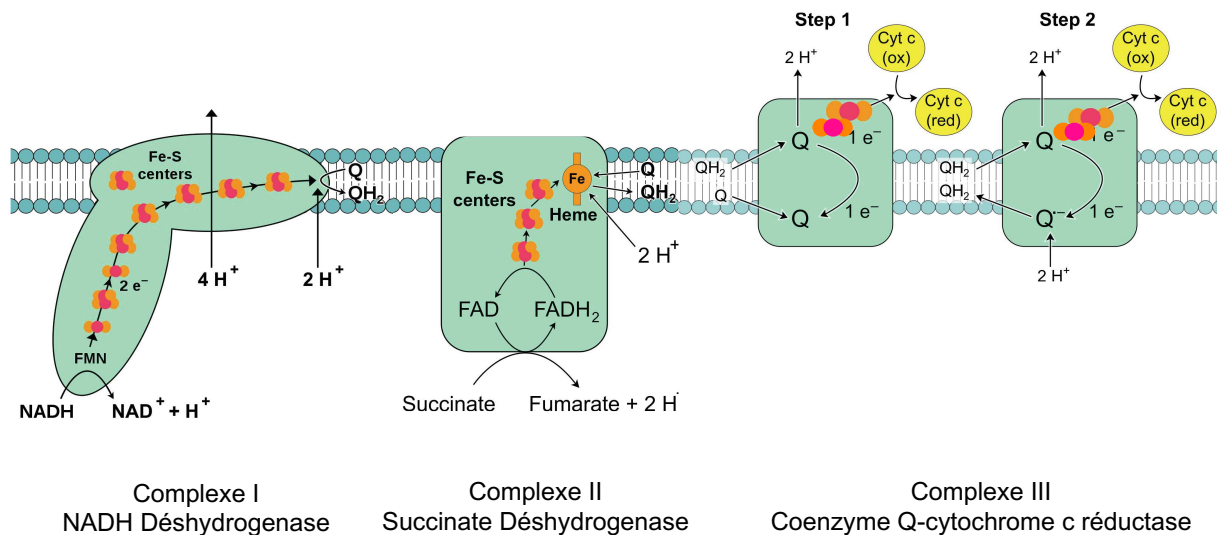


Figure 19 Les Fe-S jouent le rôle de transporteurs d'électrons au sein de la chaîne respiratoire

Au sein des complexes de la chaîne respiratoire, les Fe-S servent à transporter les électrons issus de l'oxydation des coenzymes réduits tels que NADH et FADH₂, afin de les mener jusqu'à la fin de la chaîne et de réduire l'O₂, accepteur final d'électron de la chaîne, en H₂O. Est décrite ici l'action des Fe-S jusqu'au complexe III, dernier de la chaîne associant ces cofacteurs.

4.3.1.1.2 Métabolisme du fer

Les centres Fe-S jouent également une fonction de régulation de l'expression de certains gènes associés au métabolisme du fer cellulaire de par leur liaison aux protéines régulatrices du fer telles que IRP1 (Iron Regulatory Protein 1). IRP1 est une protéine du cytosol à Fe-S qui

jouent le rôle d'aconitase cytosolique quand elle est liée à son cluster (Kaptain et al., 1991). En cas de perte de la synthèse des Fe-S, IRP1 se retrouve libre de son cofacteur et acquiert la capacité de régulateur d'expression, en fixant des motifs structuraux des ARN messagers (ARNm) appelés les Iron Responsive Elements ou IRE (Klausner et al., 1993) (**Figure 20**). Les IRE peuvent agir au niveau de la traduction des gènes auxquels ils sont associés, mais également sur la stabilité de l'ARNm dépendamment de leur localisation par rapport à la séquence codante. S'ils sont situés dans la partie 5' UTR de l'ARNm, la fixation des IRPs vient bloquer la traduction du gène, tandis qu'elle augmente la stabilité de l'ARNm lorsque les IRE sont situés en 3' UTR, conduisant à une traduction accrue (Rouault et al., 1992). Parmi les gènes régulés par ce mécanisme, on retrouve le récepteur de la transferrine 1 ou *TFRI* (Transferrin Receptor 1), ainsi qu'une protéine de stockage du fer, la ferritine (*FRT*) (Rouault et al., 1992).

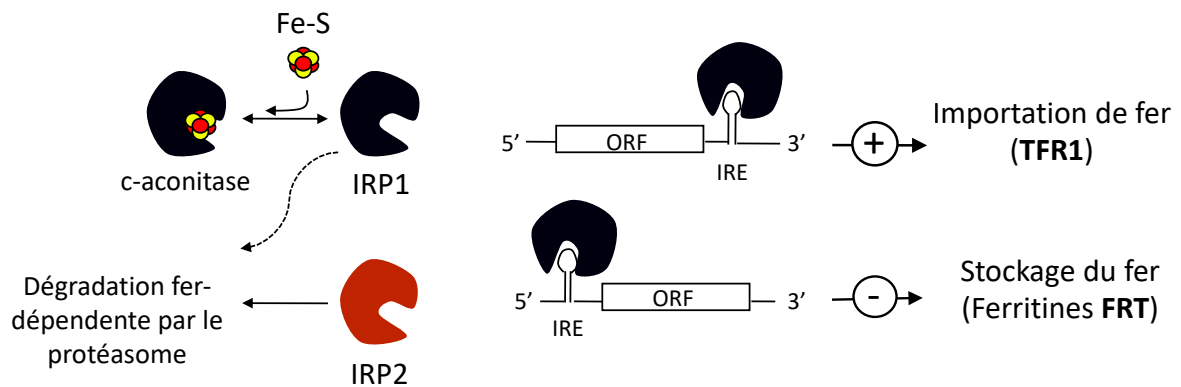


Figure 20 : Mécanisme de régulation de l'expression fer-dépendante par la protéine IRP1

Aconitase cytosolique, holo-IRP1 acquiert la capacité de régulateur de traduction en absence de son cofacteur Fe-S (apo-IRP1), et fixe des motifs Iron Responsive Elements (IRE) sur les ARNm. Quand l'IRE est en 3'UTR, IRP1 stabilise l'ARNm et bloque la traduction en 5' UTR. L'activité de IRP1 augmente ainsi l'expression protéique de *TFRI* et baisse celle de *FRT*.

4.3.1.1.3 Réplication et réparation de l'ADN

De nombreuses protéines nucléaires impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN sont liées à des centres Fe-S. La plupart de la synthèse de l'ADN chez les eucaryotes est réalisée par trois polymérases conservées : Pol α , Pol δ et Pol ϵ (Miyabe et al., 2011). Toutes ces ADN polymérases nécessitent un cluster Fe-S pour la formation d'une holo-protéine active (Jain et al., 2014; Netz et al., 2011; Prakash and Prakash, 2002; White and Dillingham, 2012).

Les primases eucaryotiques contiennent généralement une petite (PriS) et une grande (PriL) sous-unité. La grande sous-unité contient un centre Fe-S, nécessaire à l'initiation de la réplication de l'ADN (Kilkenny et al., 2013; Prakash and Prakash, 2002). Les centres Fe-S jouent également un rôle critique dans la réparation de l'ADN, étant liés à des DNA hélicases impliquées dans les mécanismes de réparation par excision de nucléotides (NER) telles que XPD et FANCD1 (Rudolf et al., 2006), et certaines protéines de la réparation par excision de bases (BER): MutY et EndoIII (Fuss et al., 2015). RTEL, une hélicase impliquée dans la maintenance des télomères contient également des centres Fe-S (Fuss et al., 2015).

4.3.1.1.4 Autres mécanismes

Au niveau de la traduction, la protéine ABCE1, essentielle à l'initiation et à la fonction ribosomale, contient également des Fe-S comme cofacteur (Barthelme et al., 2007). De plus, de nombreuses protéines à Fe-S font partie du métabolisme des nucléotides. C'est le cas pour GPAT (ou PPAT) et DPYD, deux protéines cytosoliques impliquées respectivement dans la biosynthèse des purines et la dégradation des pyrimidines en β -alanine (Martelli et al., 2007; Schnackerz et al., 2004). Une autre protéine à Fe-S cytosolique, la protéine MOCS1, est impliquée dans la cyclisation de la guanosine triphosphate en cPMP (cyclic pyranopterin monophosphate), précurseur du cofacteur à molybdène (MoCo) (Reiss and Johnson, 2003). MoCo est lui-même essentiel à l'activité de protéines à Fe-S telles que la Xanthine Oxidase (XO), impliquée dans le métabolisme des purines (Schwarz, 2005). Il existe également des protéines à Fe-S impliquées dans l'apoptose (AIFM3) (Chua-On et al., 2016), l'inflammation (RSAD2) (Zhang et al., 2007) ainsi que le métabolisme des ARNt (ELP3, CK5RPA1, CDKAL1 et TWY1) (Bento-Abreu et al., 2018; Pereira et al., 2018; Wei and Tomizawa, 2011).

Cette distribution importante des protéines Fe-S à travers la cellule et dans des mécanismes variés rend compte de l'importance qu'ont ces cofacteurs pour le fonctionnement de la cellule en général. Récemment, une nouvelle protéine à Fe-S, KIF4A, a été identifiée comme essentielle à la mitose. La perte du cluster chez cette protéine provoque sa mislocalisation perturbant fortement le déroulement de la mitose (Ben-Shimon et al., 2018). Cette information pourrait en partie expliquer pourquoi la perte totale de la frataxine est fatale aux cellules en division.

4.3.1.2 Le cas de l'acide lipoïque: rôle et biosynthèse

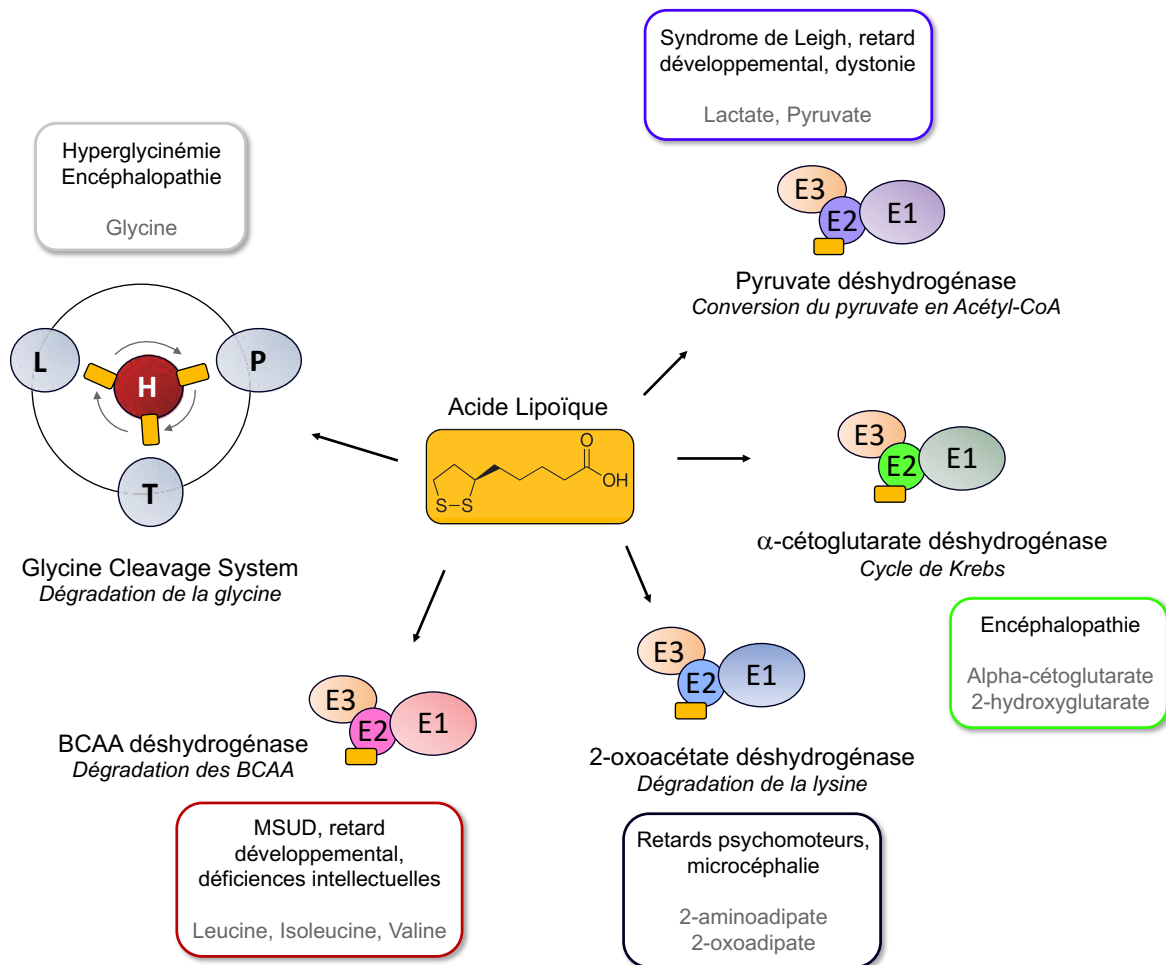


Figure 21 : Enzymes utilisant l'acide lipoïque comme cofacteur

L'acide lipoïque se lie au domaine lipoate de la sous unité E2 des complexes 2-cétoacide déshydrogénase tels que la pyruvate déshydrogénase (PDH), α-cétoglutarate déshydrogénase (KGDH), la déshydrogénase spécifique des α-cétoacides à chaîne branchées (BCKDH) ou la 2-oxoacétate déshydrogénase. Ces complexes sont tous constitués d'une sous-unité E1 (décarboxylase), E2 (acyltransférane) et E3 (oxydo-réductase). Il est également lié à protéine H du Système de clivage de la glycine. Les encarts indiquent les syndromes associés à un défaut de fonctionnement de ces complexes, ainsi que les métabolites s'accumulent en cas de perte d'activité de ces complexes. L = L-protein ou dihydrolipoyl dehydrogenase ; P = P-protein ou glycine dehydrogenase ; T = T-protein ou aminomethyltransferase. Adapté de Solmonson et DeBerardinis, 2018.

L'acide lipoïque (LA) est un cofacteur soufré essentiel au métabolisme mitochondrial (**Figure 21**). LA est utilisé comme cofacteur au sein de complexes 2-cétoacide déshydrogénases

impliqués dans des réactions de décarboxylation tels que la pyruvate déshydrogénase (PDH), α -cétoglutarate déshydrogénase (KGDH), deux enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, et la déshydrogénase spécifique des α -cétoacides à chaîne branchées (BCKDH) (Mayr et al., 2014; Reed, 2001). Dans ces enzymes, il est lié de manière covalente par une liaison amine à un résidu lysine conservé du domaine lipoyl (LD) de la sous unité E2 des complexes (Solmonson and DeBerardinis, 2018). Il est également lié à protéine H du Glycine Cleavage System, une enzyme essentielle au métabolisme de dégradation de la glycine, la GCSH (Glycine cleavage system H protein) (Schonauer et al., 2009).

4.3.1.2.1 Synthèse chez les eucaryotes

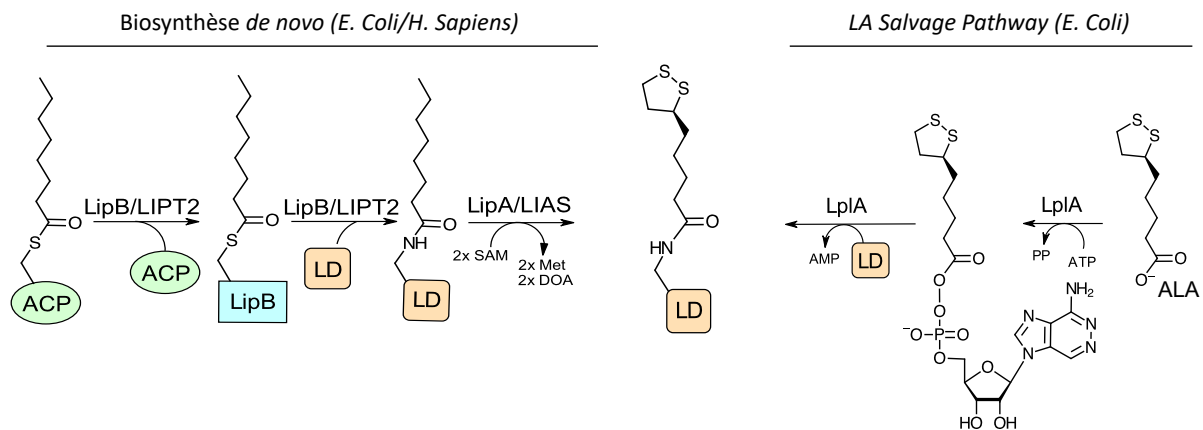


Figure 22 : Comparaison des mécanismes de biosynthèse de l'acide lipoyique entre la bactérie et l'homme

Biosynthèse *de novo* : l'octanoate est transféré de la protéine porteuse d'acyle (ACP) vers le site actif de l'octanoyltransférase LipB/LIPT2 (bactérie/humain), et associé au domaine lipoate (LD) d'un résidu lysine sur les protéines acceptrices. L'octanoate est ensuite converti en lipoate par la Lipoic Acid Synthase (LipA/LIAS), en utilisant deux molécules de S-adénosyl-L-méthionine (SAM) et deux atomes de soufre pourvus par le Fe-S de l'enzyme. *LA salvage pathway* ou mécanisme de sauvetage de l'acide lipoyique. Réaction de la Lipoate-protein ligase A (LpIA) bactérienne en deux étapes : catalyse la synthèse d'un lipoyl-adenylate à partir de l'acide lipoyique libre ou α -lipoic acid (ALA), suivie du transfert vers le domaine LD des enzymes de destination.

Le métabolisme de l'acide lipoyique chez les eucaryotes a été extensivement étudié chez *S. Cerevisiae*, et le mécanisme de sa synthèse n'a été que récemment élucidé. Chez les eucaryotes, l'acide lipoyique est synthétisé *de novo* dans les mitochondries en utilisant des

intermédiaires de synthèse des acide gras mitochondriaux, les radicaux SAM et les clusters Fe-S (**Figure 22**). Dans ce mécanisme, le précurseur de l'acide lipoïque, l'octanoate est synthétisé à partir du malonate et conjugué à une protéine porteuse de groupement acyle ou ACP (acyl carrier protein) (Solmonson and DeBerardinis, 2018). L'octanoate est ensuite transféré sur la GCSH (Gcv3 chez la levure) grâce à l'enzyme LIPT2 (LIP2 chez la levure) ou lipoyl(octanoyl) transférase 2 (Schonauer et al., 2009). La GCSH-octanoate est utilisée comme substrat pour l'insertion de deux atomes de soufre en positions C6 et C8, produisant la GCSH-lipoate, dans une réaction catalysée par l'enzyme à Fe-S, la Lipoic Acid Synthase ou LIAS (LIP5 chez la levure) (Miller et al., 2000; Reed and Cronan, 1993). Une enzyme additionnelle, LIPT1 (Lip3 chez la levure) catalyse le transfert de l'acide lipoïque aux domaines lipoates (LD) des sous-unités E2 des complexes 2-cétoacide déshydrogénases (Solmonson and DeBerardinis, 2018). Un dysfonctionnement de l'une de ces enzymes mène à une baisse de lipoylation de PDH et KGDH, ainsi qu'à un dysfonctionnement de la fonction mitochondriale (Heimer et al., 2016; Mayr et al., 2014; Smith et al., 2012). L'incapacité des souches mutantes Lip2 et Lip5 de survivre sur milieu supplémenté en LA fut la première indication que les eucaryotes ne possèdent pas de « mécanisme de sauvetage », permettant de compléter la production *de novo* de LA, contrairement aux bactéries (voir ci-après). Cette observation corrèle avec l'incapacité de l'acide lipoïque exogène d'améliorer le fonctionnement des cellules issues de patients ayant des mutation dans le gène LIAS, la létalité embryonnaire des souris KO-LIAS, ou d'améliorer les symptômes de ces patients (Baker et al., 2014; Mayr et al., 2014; Yi and Maeda, 2005). Les différents homologues bactériens des protéines de levures et mammifères de la synthèse de l'acide lipoïque sont référencées en **Tableau 4**.

Organisme	Nom des gènes		
	<i>E. Coli</i>	<i>S. Cerevisiae</i>	<i>H. Sapiens</i>
Lipoyl synthase	<i>lipA</i>	<i>LIP5</i>	<i>LIAS</i>
Octanoyltransférase	<i>lipB</i>	<i>LIP2</i>	<i>LIPT2</i>
Amidotransférase	Aucun	<i>LIP3</i>	<i>LIPT1</i>
Lipoate ligase	<i>lplA</i>	Aucun ?	Aucun ?

Tableau 4 : Enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide lipoïque au cours de l'évolution

4.3.1.2.2 Chez les bactéries

Chez *Escherichia coli*, le métabolisme de l'acide lipoïque se décompose en un mécanisme biosynthèse *de novo* et une voie de sauvetage ou « salvage pathway », capable d'utiliser l'acide lipoïque exogène comme substrat (**Figure 22**). Chacun de ces deux mécanismes mène à la modification covalente du groupement amine sur des lysines conservées au sein du domaine lipoyl de sous unités E2 des complexes 2-oxo acide déshydrogénase (Green et al., 1995; Morris et al., 1994). Dans la synthèse *de novo*, la LipB (homologue de LIPT2 et LIP2) réalise dans une première étape le transfert de l'octanoate vers le domaine LD des sous-unités E2 des 2-cétoacide déshydrogénases. Dans une seconde étape, deux atomes de soufres sont insérés en position C6 et C8 par une enzyme à Fe-S LipA (Miller et al., 2000; Parry and Trainor, 1978; Reed and Cronan, 1993) (homologue de LIAS et LIP5), considérée comme une protéine suicide plutôt qu'une enzyme, car elle transfère des atomes de soufre de LipA à partir du cluster [4Fe-4S] de manière non réversible (Cronan, 2014). Contrairement aux eucaryotes, chacune de ces deux étapes peut être remplacée par l'activité du *salvage pathway*, dans lequel une enzyme appelée Lipoate-protein ligase A (LplA) est capable de conjuguer dans un premier temps l'acide lipoïque exogène à l'intermédiaire adénylé lipoyl-AMP, puis de réaliser sa ligation aux sous-unités E2 ainsi qu'aux protéines H (Green et al., 1995; Morris et al., 1994; Reed et al., 1958). LplA peut utiliser à la fois l'acide lipoïque et l'octanoate pour modifier les sous unités E2, bien que l'utilisation de l'octanoate requiert l'activité de LipA pour insérer les atomes de soufre et générer le résidu lipoate sur les protéines cibles (Morris et al., 1994, 1995).

Chez les eucaryotes, l'existence d'un *salvage pathway* est discutée. L'homologue le plus proche de LplA chez les eucaryotes correspond au gène LIPT1/Lip3, qui montre moins de 30% d'identité de séquence protéique, conférant à ces protéines qu'une fonction partielle de la ligase LplA (Solmonson and DeBerardinis, 2018). De manière très intéressante, les mutations induites dans LIPT1 ne semblent affecter que la lipoylation de PDH et α KGDH, et non des autres enzymes LA-dépendantes telles que celles associées au métabolisme des acides aminés branchés et de la glycine (Soreze et al., 2013; Tort et al., 2014). Ces résultats suggèrent que le mécanisme *de novo* et un *salvage pathway* limité pourrait fonctionner en parallèle chez les mammifères sans toutefois pouvoir se compléter.

4.3.2 Biosynthèse des Fe-S et rôle de la frataxine dans ce processus

4.3.2.1 Machinerie mitochondriale et frataxine

4.3.2.1.1 Assemblage des centres Fe-S

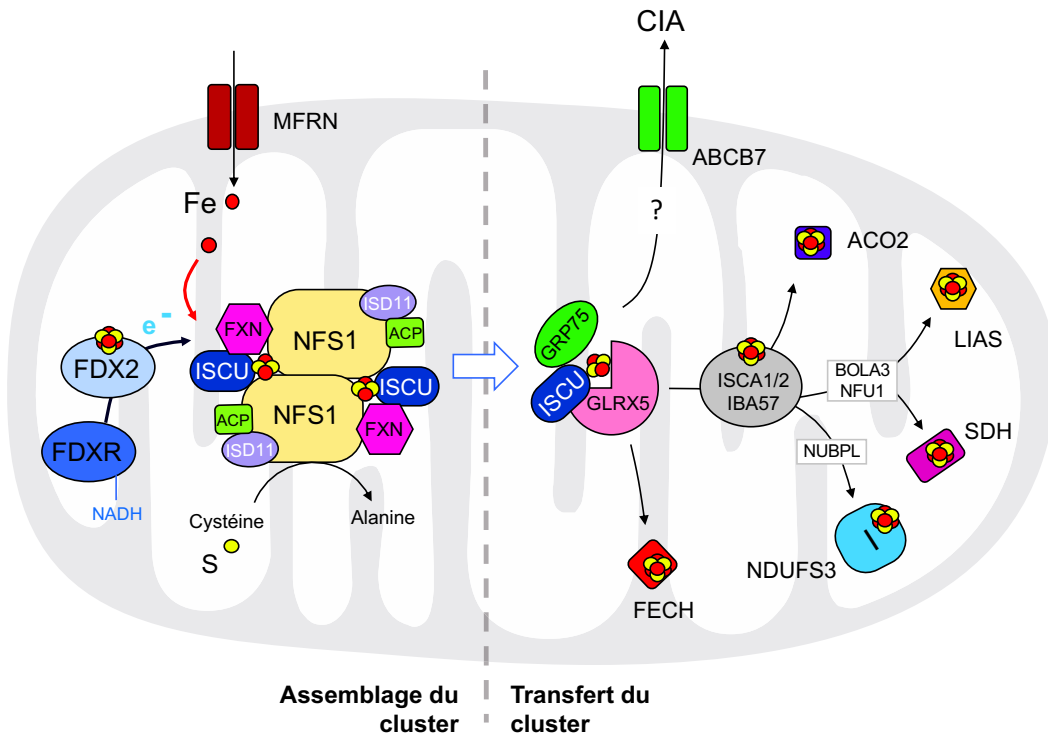


Figure 23 : Mécanisme de biosynthèse des centres Fe-S chez les mammifères

La biosynthèse des centres Fe-S a lieu dans la matrice mitochondriale et se fait en deux étapes : l'assemblage *de novo* du centre Fe-S sur la protéine échafaud ISCU, puis le transfert des Fe-S aux protéines acceptrices. Adapté de Beilschmidt and Puccio, 2014.

Les centres Fe-S sont synthétisés par un mécanisme complexe impliquant plus de 20 protéines mitochondriales. Ce mécanisme peut se décomposer en deux étapes : l'assemblage des atomes de fer et soufre, suivi du transfert aux protéines acceptrices (**Figure 23**). La première étape prend place dans la matrice mitochondriale, où les atomes de fer et de soufre sont assemblés sur une protéine échafaud appelée ISCU (IscU, bactéries ; Isu, levure) (Beilschmidt and Puccio, 2014). L'apport du soufre et du fer doivent être coordonnés car les deux doivent être emmenés en même temps. L'atome de soufre est pourvu par l'activité de la cystéine désulfurase NFS1/IscS/Nfs1 qui catalyse la conversion pyridoxal phosphate (PLP)-dépendante d'une L-cystéine en une alanine et un sulfane-soufre (Loiseau et al., 2003). Un intermédiaire

persulfure coordonné à une cystéine catalytique de NFS1 (-SSH) est formé suite à cette réaction. Le soufre, présent sur la cystéine désulfurase en tant que persulfate de cystéine est transféré vers un résidu cystéine conservé de ISCU, par une réaction de trans-persulfuration (Loiseau et al., 2003). Le sulfane-soufre (S°) du persulfate de cystéine situé sur ISCU est ensuite réduit en sulfate et combiné à l'ion ferreux Fe^{2+} afin de générer le centre Fe-S. Chez les eucaryotes, NFS1 interagit directement avec ISD11, une protéine eucaryote-spécifique dont le rôle a été proposé de stabiliser et d'activer NFS1 (Pandey et al., 2011). ISCU interagit avec NFS1/ISD11 pour former un complexe ternaire ISCU/NFS1/ISD11 (Schmucker et al., 2011). Il a été montré que la protéine porteuse d'acyl ACP interagit avec ISD11/NFS1, et pourrait permettre d'assurer le repliement de ISD11 (Herrera et al., 2018; Van Vranken et al., 2016). Il a été montré que la frataxine interagissait directement avec le complexe ISCU/NFS1/ISD11 (Schmucker et al., 2011), formant ainsi un « supercomplexe » NFS1/ISD11-ACP/ISCU/FXN (Boniecki et al., 2017; Fox et al., 2019). L'homologue bactérien de la frataxine CyaY, lie IscS en même temps que IscU, suggérant la formation d'un complexe IscS-IscU-CyaY également chez la bactérie (Prischi et al., 2010).

En 2015, il est suggéré que l'interaction entre la frataxine et NFS1 induit un changement de conformation permettant la boucle persulfate de NFS1 d'être en contact rapproché d'une cystéine conservée de ISCU (Parent et al., 2015). Ce changement de conformation permettrait un transfert direct du soufre pour la génération du cluster Fe-S, augmentant sensiblement la cadence de la synthèse. L'interaction pourrait également induire un changement de conformation de ISCU qui faciliterait le transfert de l'atome de soufre depuis NFS1 (Parent et al., 2015). Récemment, une nouvelle étude apporte des précisions. FXN est liée à une boucle cystéine mobile de transfert du soufre sur NFS1 (Patra and Barondeau, 2019). Cette boucle cystéine constitue le résidu critique dans la réaction de désulfuration de cystéine (comme énoncé précédemment). Cette étude démontre que la frataxine permet de faire passer cette boucle d'une conformation ouverte et « non productive », à une conformation fermée et « active ». Ainsi, la présence de FXN induit un réarrangement architectural du complexe, permettant l'accélération des étapes chimiques menant à la formation du cluster sur la protéine échafaud ISCU (Patra and Barondeau, 2019). Ces résultats ainsi que ceux des études précédentes mènent à l'hypothèse que la frataxine agit en tant qu'activateur allostérique de la cystéine désulfurase NFS1, activant sensiblement la production des centres Fe-S (Fox et al., 2015; Gervason et al., 2019; Parent et al., 2015; Patra and Barondeau, 2019; Schmucker et al., 2011).

Le mécanisme par lequel le fer entre dans le complexe reste à caractériser. Il a été montré que des sources passives de fer à l'état ferreux pouvaient permettre l'assemblage de Fe-S *in vitro*. Il a été montré que certaines protéines de la machinerie de synthèse des centres Fe-S telles que IscA bactérienne fixent le fer quand elles sont incubées en présence d'oxygène de d'ions ferreux dans des conditions réductrices (Ding and Clark, 2004). De par sa capacité à fixer le fer et son interaction avec les protéines de la biosynthèse des Fe-S, il a été proposé que CyaY joue le rôle de donneur de fer dans ce mécanisme. CyaY aiderait à solubiliser et transporter le fer vers le complexe (Yoon and Cowan, 2003). Cependant, aucune perturbation de l'homéostasie du fer ni baisse significative de l'activité des Fe-S ont été observées en l'absence de CyaY chez la bactérie, questionnant le rôle de la frataxine comme source de fer (Li et al., 1999). Chez les eucaryotes, le fer est présent dans les mitochondries sous une forme pouvant être utilisée dans la formation des Fe-S. Bien que la source du fer ne soit pas bien déterminée, il se pourrait que le fer cytoplasmique soit transporté aux mitochondries par des transporteurs tels que les mitoferrines (Paradkar et al., 2009). La frataxine pourrait assurer l'apport ultérieur du fer à la protéine échafaud. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que la frataxine interagit de manière fer-dépendante avec NFS1 et ISCU (Gerber et al., 2003). Il a également été montré que la frataxine chargé en Fe^{2+} se fixe au supercomplexe sans relargage de fer (Cai et al., 2018). Additionnellement, il a été suggéré que la frataxine contrôle l'entrée du fer dans le mécanisme à travers la régulation de l'activité de la cystéine désulfurase (Colin et al., 2013).

La liaison de deux atomes de soufre requière quatre électrons. Deux d'entre eux sont pourvus par les deux ions Fe^{2+} et deux autres électrons proviennent d'un composé exogène. Il a été proposé que la ferrédoxine (FDX), une petite protéine globulaire à noyau Fe-S remplisse cette fonction (Mühlenhoff et al., 2002). Les ferredoxines mitochondriales FDX1 et FDX2 interagissent avec le supercomplexe, quand elles sont liées à leur Fe-S (Cai et al., 2017). Lorsque les persulfates et le fer sont présents sur l'échafaud, la ferrédoxine doit déplacer la frataxine en dehors du complexe afin de réduire les persulfates. La ferrédoxine est elle-même réduite par la ferrédoxine réductase FDXR (Rouault, 2019; Shi et al., 2012).

4.3.2.1.2 Transfert des centres Fe-S

Une fois assemblé sur ISCU, le cluster doit être transféré aux protéines acceptrices, constituant la deuxième étape de la synthèse des Fe-S (**Figure 23**). Cette étape implique la participation de composants additionnels de la machine d'assemblage des Fe-S tels que le système de chaperones HscB/HSPA9, NFU1, IBA57 et les protéines ISCA1/ISCA2 (Lill,

2009). Toutes les étapes du transfert des clusters aux protéines à Fe-S ne sont pas encore clairement définies. Après avoir été assemblé sur ISCU, le cluster serait transféré avec l'aide des protéines chaperones HSCB et GRP75 (ou HSPA9). Chez la bactérie et la levure, la co-chaperone HscB/Jac1 (homologue de HSCB) fonctionne en coordination avec sa chaperone HscA/Ssq1 (homologue de HSPA0) et le facteur d'échange de nucléotides Mge1, qui réalise le relargage d'ATP dans l'interaction entre Isu1 et Ssq1 (Craig and Marszalek, 2002; Uhrigshardt et al., 2010; Vickery and Cupp-Vickery, 2007). Cette interaction hautement spécifique induit un changement de conformation de Isu1 qui mène à la dislocation du cluster du complexe (Dutkiewicz et al., 2004; Hoff et al., 2003). Grx5 (levure) interagirait avec Ssq1 à travers un site de fixation proche de celui d'Isu1. Cette interaction permettrait le transfert d'un cluster fixé sur Isu1 vers Grx5 (Uzarska et al., 2013). Les protéines Isa1 et Isa2 (ISCA1 et ISCA2), formant un complexe avec Iba57 (IBA57) accepterait un cluster [2Fe-S₂] de Grx5, et assurerait le transfert vers la machinerie tardive (Mühlenhoff et al., 2017). Il a été montré que ISCA1 était essentielle pour la maturation des centres 4Fe-4S (Beilschmidt et al. 2017). Des facteurs additionnels facilitent le transit du [4Fe-4S] du complexe Isa1-Isa2-Iba57 vers les protéines acceptrices. Des éléments suggèrent que Nfu1 (NFU1) interagit avec la machinerie d'assemblage des [4Fe-4S] et avec certaines protéines acceptrices à [4Fe-4S], suggérant son rôle dans le transfert de ces clusters (Melber et al., 2016), même si la fonction exacte de NFU1 reste mal connue. La caractérisation de patients portant des mutations dans NFU1 et de cellules déplétées en NFU1 suggèrent fortement un rôle de transfert des [4Fe-4S] spécifiquement vers les protéines SDHb (complexe II) et LIAS (Lipoic Acid Synthase) (Cameron et al., 2011; Ferrer-Cortès et al., 2013; Navarro-Sastre et al., 2011). En effet, la perte de NFU1 résulte en une baisse d'activité partielle et spécifique de SDHb et LIAS (Ferrer-Cortès et al., 2013). De manière similaire, les facteurs Bol1 et Bol3 (BOLA1 et BOLA3) établiraient également un lien tardif vers une sous-classe de protéines à [4Fe-4S] (Uzarska et al., 2016). Six patients portant une mutation dans BOLA3 présentent un phénotype similaire aux patients NFU1-déficients (Cameron et al., 2011).

4.3.2.2 Machinerie cytosolique

Plusieurs des éléments requis pour la synthèse des Fe-S mitochondriaux sont également essentiels pour la maturation de tous les Fe-S de la cellule. C'est le cas de FXN, NFS1 et ISD11, ISCU ainsi que le transporteur ABCB7 (Bekri et al., 2000; Martelli et al., 2007; Schmucker et

al., 2011). Un composant encore inconnu est exporté en dehors de la mitochondrie grâce au transporteur ABCB7 (Atm1 chez la levure), et est utilisé comme substrat pour la biogénèse des Fe-S cytosoliques et nucléaires dans la machinerie CIA (Cytosolic Iron-sulfur protein Assembly) (Sharma et al., 2010). Toutes les étapes de la machinerie cytosolique n'ont pas encore été clairement identifiées, bien que certains aspects soient connus. Les [4Fe-4S] sont assemblés sur un complexe échafaud composé de deux NTPases à boucle P CFD1 et NBP35 (Netz et al., 2012). Les électrons sont apportés par une chaîne de transport d'électrons composée du NADPH, de la diflavine réductase NDOR1 ainsi que de la protéine à Fe-S CIAPIN1. Le cluster doit ensuite être transféré aux protéines destinataires grâce à plusieurs facteurs tels IOP1, CIA1 et CIA2, ainsi que la protéine à répétitions HEAT, MMS19. (Netz et al., 2014; Stehling et al., 2014). MMS19 a été montré comme essentielle à la maturation d'un nombre de protéines Fe-S cytosoliques et nucléaires telles que la sulfide réductase dans la synthèse de la méthionine, des hélicases de l'ADN, des glycosylases et des polymérases impliquées dans la synthèse d'ADN, ainsi que l'hélicase RTEL1, impliquée dans la régulation de la longueur des télomères (Gari et al., 2012; Stehling et al., 2012).

4.3.2.3 Rôle de la frataxine chez les bactéries

Alors qu'un effet régulateur positif est observé pour la frataxine de la levure et humaine, la frataxine bactérienne CyaY a un effet négatif sur l'activité de IscS due à une baisse de la formation de persulfate (Iannuzzi et al., 2011). Bridwell-Rabb et collègues ont étudié les différences entre les frataxines humaines et bactériennes en échangeant les composants de la machinerie de synthèse des Fe-S et réalisant des mesures cinétiques. Les résultats ont montré que l'effet de la frataxine en activateur ou inhibiteur semble être déterminé par le type de cystéine désulfurase, plutôt que le type d'homologue de la frataxine (Bridwell-Rabb et al., 2012). La frataxine bactérienne est d'ailleurs capable de compléter pour la souche $\Delta yfh1$ (Bedekovics et al., 2007) Une autre explication au rôle négatif de CyaY dans la machinerie bactérienne a été suggérée par Kim et collègues. CyaY et la ferrédoxine bactérienne [2Fe-2S]-Fdx se disputent la liaison à IscS. En se fixant à IscS, CyaY préviendrait la fixation de Fdx ainsi que son activité de donneur d'électron dans la biosynthèse des Fe-S, ce qui a été suggéré dans des études préliminaires (Lange et al., 2000). Cela impacterait négativement le taux de production des centres Fe-S (Kim et al., 2013). Contrairement à son homologue FXN, CyaY ne semble pas être essentielle à la survie des cellules. Il a été montré que la délétion de CyaY

n'affecte pas la croissance ou ne génère de dérégulation du métabolisme du fer (Li et al., 1999). Chez la levure, une mutation ponctuelle de la protéine échafaud Isu capable de « bypasser » le besoin en frataxine et ainsi compléter les phénotypes sévères de la souche $\Delta yfh1$ a été identifiée (Yoon et al., 2015). Cette effet résulte de la conversion du résidu méthionine M141 en un résidu isoleucine. Isu ainsi muté est capable de fixer et d'activer la cystéine désulfurase Nfs1 sans avoir besoin de la frataxine. Intéressamment, insérer cette mutation sur l'homologue bactérien IscU rend la bactérie frataxine-dépendante. La souche ainsi mutée montre des défauts de croissance, déficiences en protéines à Fe-S, dérégulation de l'homéostasie du fer et sensibilité accrue au stress oxydatif (Roche et al., 2015).

4.3.2.4 Autres fonctions proposées pour la frataxine

4.3.2.4.1 Métabolisme du fer

Comme énoncé précédemment, la capacité de la frataxine à fixer le fer à longterm suggère que cette protéine pouvait avoir un rôle dans le stockage du fer similaire à celui de la ferritine. Les détails de ces hypothèses ont déjà été décrit en « 4.2. Historique de recherche de la fonction de la Frataxine ».

4.3.2.4.2 Biosynthèse de l'hème

Une interaction directe de la frataxine avec la ferrochelatase fut assez tôt démontrée (Yoon and Cowan, 2004). La ferrochelatase est une protéine mitochondriale membranaire, catalysant l'étape finale de la biosynthèse de l'hème : insertion d'un Fe^{2+} au sein de la protoporphyrine IX. De ces observations, il a été suggéré que la frataxine joue un rôle dans la biosynthèse de l'hème. Cette interaction est strictement dépendante du fer, et augmente en présence de frataxine chargée en fer (Söderberg et al., 2016). Additionnellement, des résultats récents dans des lymphocytes B de patients FRDA, ont montré une baisse d'expression de 2,5 fois de la protoporphyrinogen oxidase, une autre enzyme de ce mécanisme (Télot et al., 2018). Il a été montré qu'une déficience en frataxine déclenche une baisse d'expression de cinq enzyme du mécanisme de biosynthèse de l'hème ainsi qu'en une sous production de l'hème chez certains modèles (Lu and Cortopassi, 2007; Napoli et al., 2007; Schoenfeld et al., 2005), bien que cette dernière observation est assez controversée et modèle-dépendante (Steinkellner

et al., 2017). L'absence d'anémie parmi les symptômes des patients de l'AF contribuent à remettre en cause le rôle de la frataxine dans la biosynthèse de l'hème.

4.3.2.4.3 Régulation de la ferroptose

La ferroptose est une forme de nécrose cellulaire dépendante du fer. Elle a été découverte grâce à l'utilisation de l'éraستine (Yagoda et al., 2007). Cette molécule, identifiée initialement comme anti-cancéreuse, induit une nécrose pouvant être prévenue par l'application de chélateurs de fer (Dixon et al., 2012). Deux études récentes relient la frataxine et la ferroptose. Dans ces études, les chercheurs rapportent que la déficience en frataxine rend les cellules plus sensibles à l'éraستine, évoquant ainsi la possibilité que la frataxine participe à la régulation de cette réponse, en modulant les niveaux de fer intracellulaires (Cotticelli et al., 2019; Du et al., 2020). Les cellules déficientes en frataxine ont tendance à être exposées à de hauts niveaux de fer (voir le chapitre 5 : Modèles et Physiopathologie de l'AF). Si la frataxine régule la ferroptose, ces cellules seraient donc plus exposées à une nécrose induite par de fortes concentrations en fer. Il a été montré que l'utilisation de différents inhibiteurs de la ferroptose prévient la mort cellulaire associée au *knock-down* de la frataxine dans des fibroblastes, ouvrant la voie à de potentielles pistes thérapeutiques (Cotticelli et al., 2019).

4.3.2.5 Autres maladies liées à des défauts de biosynthèse des Fe-S

4.3.2.5.1 Mutations dans l'assemblage de novo

Myopathie ISCU

Une mutation à l'état homozygote au niveau de ISCU induit un défaut d'épissage de l'ARNm de ISCU, résultant en l'inclusion d'un pseudo-intron générant une protéine tronquée et aberrante (Mochel et al., 2008; Olsson et al., 2008). On observe une baisse sévère des niveaux d'ISCU dans les cellules musculaires, car le site d'épissage touché semble être muscle-spécifique (Nordin et al., 2011). Les phénotypes incluent une forte intolérance à l'effort musculaire avec de hautes concentrations de lactate et pyruvate dans le sang (Larsson et al., 1964). La baisse d'ISCU provoque une forte baisse d'activité des enzymes à Fe-S dans les cellules touchées, ainsi qu'une accumulation de fer (Hall et al., 1993; Mochel et al., 2008).

Myopathie FDX2

Causée par une mutation dans le premier intron du gène FDX1L codant pour FDX2. La mutation, au niveau du codon *start* ATG, induit une forte perte des niveaux de FDX2 dans les muscles et les fibroblastes. Les patients ont une activité fortement réduite des complexes de la chaîne respiratoire, de l'aconitase et de la pyruvate déshydrogénase (Spiegel et al., 2014).

4.3.2.5.2 Mutations dans le transfert des clusters

Anémie microcytique de type sidéroblastique et accumulation de fer (GLRX5)

A ce jour, deux types de mutations au niveau de GLRX5 ont été reportées. Deux patients montrent une mutation homozygote au niveau de l'exon 1 du gène, interférant avec l'épissage de l'ARNm et menant à une forte baisse de l'ARNm et une perte de la protéine GLRX5 (Baker et al., 2014; Ye et al., 2010). Le troisième patient présente une mutation au niveau de la cystéine 67 provoquant une mauvaise coordination du cluster [2Fe-2S] (Daher et al., 2019). Les tissus les plus touchés sont ceux où l'expression de GLRX5 est la plus forte, à savoir le foie, la moelle osseuse et la rate (Wingert et al., 2005). Les patients présentent une baisse d'activité des enzymes à Fe-S notamment des complexes I et II de la chaîne respiratoire, de la ferrochélatase ainsi que de LIAS (Daher et al., 2019; Ye et al., 2010).

Syndromes de malfunctions mitochondriales multiples : types NFU1, BOLA3 et IBA57

Plusieurs mutations ont été identifiées dans le gène NFU1, avec des sites très variables et conduisant soit à des activités altérées de NFU1 soit à des baisses de niveaux d'expression. Pour l'ensemble des patients, une déficience d'activité de LIAS est décrite, résultant en un défaut de fixation de l'acide lipoïque à PDH et KGDH. Un défaut d'activité de la SDH et de l'aconitase sont également décrits (Cameron et al., 2011; Lebigot et al., 2017; Navarro-Sastre et al., 2011). Plusieurs patients avec des mutations dans les gènes BOLA3 et IBA57 ont été identifiés et présentent des caractéristiques similaires aux patients NFU1 (Ajit Bolar et al., 2013; Baker et al., 2014; Lebigot et al., 2017; Navarro-Sastre et al., 2011).

5 Modèles et physiopathologie de l'AF

5.1 L'apport des modèles

Après la découverte du gène en 1996 (Campuzano et al., 1996), les équipes de recherche ont commencé à développer des modèles en utilisant des technologies différentes. Tous ont pour but de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui définissent l'AF, et le développement de stratégies thérapeutiques. Chacun de ces modèles est d'une grande importance pour la communauté. Tous ensemble, ils récapitulent les principaux événements de l'AF, des dérégulations génétiques aux défauts physiologiques. La combinaison des données de chacun d'eux est requise pour pouvoir développer des stratégies thérapeutiques prometteuses pour les patients. Les différentes approches utilisées pour générer ces modèles sont décrites ci-dessous.

5.1.1 Modèles à déplétion partielle

5.1.1.1 Modèles à répétitions de triplets GAA

Afin de développer un modèle présentant une réduction de l'expression de la frataxine proche de ce qui est observé chez les patients, de nombreux efforts ont été investis dans la génération de modèles basés sur la répétition de triplets GAA, étant la mutation majoritaire de l'AF. Miranda et collègues ont introduit une expansion de 230 GAA dans l'intron 1 du gène de la frataxine murine (Miranda et al., 2002). Deux lignées ont été créées : une lignée *knock-in* homologue KIKI ($frda^{230/230GAA}$), et une lignée hétérozygote *knock-in/knock-out* KIKO ($frda^{-/230GAA}$) (**Figure 24**), tous deux présentant des phénotypes très légers bien que présentant une baisse significative d'expression de la frataxine (respectivement 75% et 25-36% des niveaux sauvages). Ces résultats suggèrent que cette baisse transcriptionnelle n'est pas suffisante pour atteindre le seuil critique de niveaux de frataxine requis pour induire la pathologie. Les souris ne présentent pas de défauts de coordination ou de balance (Miranda et al., 2002), mais ont une légère réduction de la force d'attachement à 9 mois et une sensibilité périphérique réduite (test Von Frey, bien que plutôt adapté à une mesure de la nociception) (McMackin et al., 2017). Aucun phénotype cardiaque n'a été observé.

Un deuxième modèle à expansion de triplets GAA a été obtenu en insérant initialement un *Yeast Artificial Chromosome* (YAC) contenant le locus entier de la frataxine humaine,

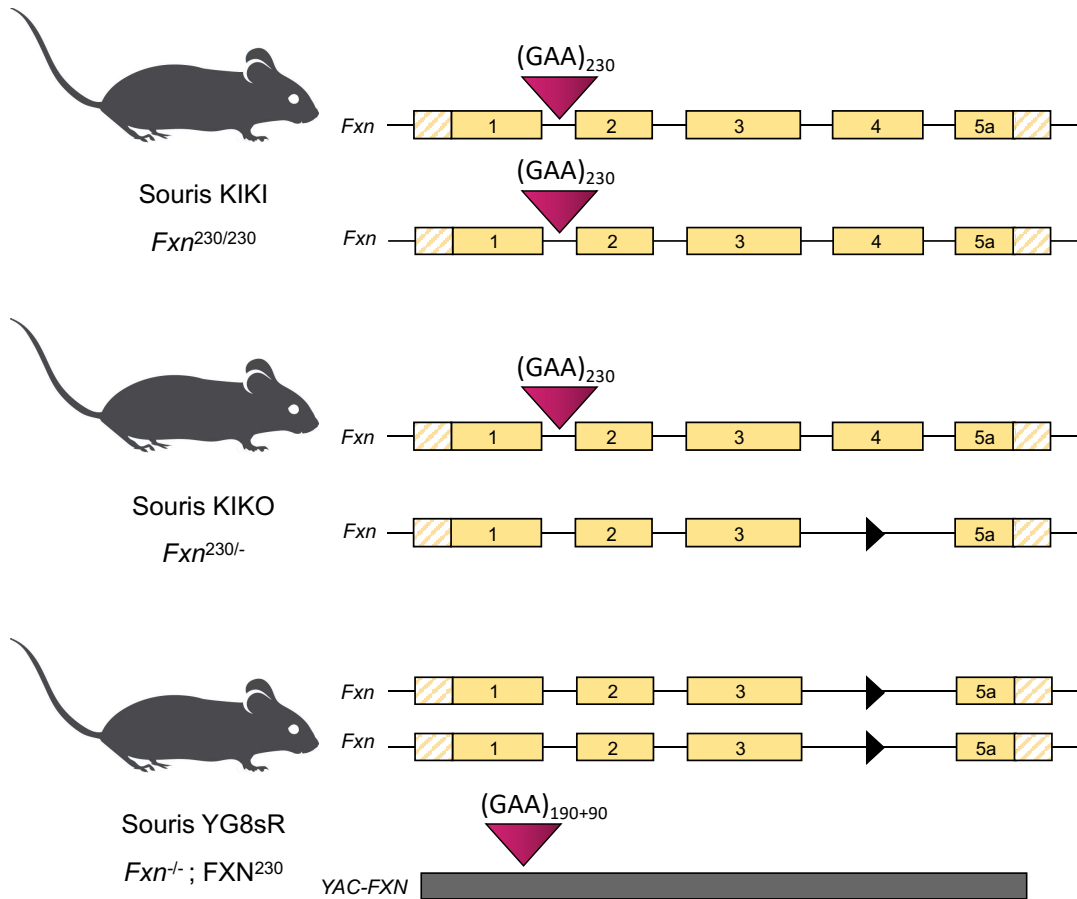


Figure 24 : Principaux modèles murins à délétion partielle de l'AF

Les modèles à délétion partielle ont été générés selon deux stratégies : insertion d'une expansion de GAA au sein du gène *Fxn* (souris KIKI ou KIKO) ou inactivation homozygote de *Fxn* et expression d'un transgène comprenant un locus humain de FXN avec une expansion, au sein d'un chromosome artificiel de levure (YAC) (souris YG8sR, ici en exemple).

combiné avec une suppression de la frataxine murine. Ce modèle démontre que la frataxine humaine peut entièrement fonctionner chez la souris (Pook et al., 2001). Deux lignées de souris transgéniques contenant additionnement des répétitions de GAA ont été générées de la même façon (Al-Mahdawi et al., 2004). Les lignées YG8 et YG22 contiennent respectivement 190 + 90 (deux copies) et 190 répétitions (copie unique). À l'inverse des souris KIKI et KIKO, les répétitions GAA sont positionnées correctement dans les séquences génomiques humaines correspondantes, ce qui conduit à l'instabilité somatique des répétitions connue chez les patients. Intéressamment, cette instabilité s'est montrée plus marquée dans le système nerveux central et en particulier dans le cervelet (Al-Mahdawi et al., 2004). Par la suite, ces lignées ont été croisées avec des souris hétérozygotes *knock-out* afin d'obtenir des souris YG8R et YG22R (R pour *Rescue*), qui contiennent donc des répétitions GAA et expriment seulement la frataxine

humaine (Al-Mahdawi et al., 2006) (**Figure 24**). Ces souris montrent respectivement des niveaux de frataxine de 67% et 42% dans le cervelet, 37% et 25% dans le cœur et 10% et 9% dans les muscles squelettiques. Les deux mutants montrent de légers défauts neurologiques progressifs dont une légère baisse de la coordination et de l'activité locomotrice (Al-Mahdawi et al., 2006). Ces souris ont également une force musculaire diminuée (Anjomani Virmouni et al., 2014).

Les modèles à répétitions de triplets GAA respectent le contexte génétique de l'AF, car ils portent la mutation principalement retrouvée chez les patients, bien que ne montrant qu'un faible phénotype. Un seuil de baisse transcriptionnelle doit être atteint pour développer les symptômes de l'AF, et il est possible que cette valeur varie entre l'humain et la souris, expliquant potentiellement le faible phénotype observé pour 200 GAA, une taille d'expansion pourtant considérée comme pathologique chez l'humain. Les efforts sont maintenus pour générer de nouveaux modèles avec des expansions plus importantes, mais la difficulté réside toujours dans l'instabilité de ces répétitions au fil des divisions cellulaires. Cependant, de nouveaux modèles de souris développées par l'équipe de Mark Pook à l'Université Brunel de Londres ont récemment été rendus disponibles aux différentes équipes de recherches, et contiennent plus de 800 répétitions GAA. Les résultats préliminaires tirés de l'expérience de notre laboratoire ainsi que de différents posters à la conférence internationale sur les ataxies de 2019 (IARC 2019, Washington D.C.), montrent que les souris ne semblent pas présenter de phénotypes drastiques, et que les premiers signes comportementaux sont mis en évidence après 6-9 mois de vie. Les études se poursuivent sur ces modèles et apporteront des résultats dans les prochaines années.

5.1.1.2 Modèles *knock-down* à interférence à ARN

Les chercheurs ont utilisé l'interférence à ARN *in vivo* avec la même intention que pour les modèles basés sur les triplets GAA : reproduire une perte partielle similaire à celle observée chez les patients. Dans cette stratégie, des petites boucles d'ARN ou hairpins (shRNA) sont désignées pour cibler l'ARN messager de la frataxine et doivent être exprimés dans les tissus cibles. Katsu-Jiménez et collègues ont utilisé des lentivirus comme vecteur afin d'introduire ces shRNA dans le cervelet murin. Ces souris montrent une coordination affectée, une perte des cellules de Purkinje et une augmentation de l'apoptose (Katsu-Jiménez et al., 2016). Chandran et collègues ont plus récemment généré un nouveau modèle inductible et réversible dans lequel

les shRNA sont exprimés de manière endogène, sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline (Chandran et al., 2017). Cette particularité permet d'induire et stopper la perte de frataxine aux temps voulus. Il s'agit du premier modèle permettant non seulement de provoquer le développement de l'AF mais également le rétablissement des symptômes. Ces souris récapitulent certains des événements conduisant à la physiopathologie de l'AF tels que la cardiomyopathie avec dépôts de fer, démarche ataxique, défauts de coordination et équilibre ainsi que des signes de dégénérescence des neurones sensitifs de DRG (Chandran et al., 2017). Ces souris montrent également une dégénérescence des neurones de la rétine, une caractéristique non commune chez les patients AF bien que l'incidence d'une composante visuelle a été reportée chez certains patients et modèles de souris (Carroll et al., 1980; Crombie et al., 2015). Les souris *rescue* montrent une espérance de vie stabilisée et une réversion de la plupart des phénotypes (Chandran et al., 2017). La stratégie utilisée pour ce modèle est très prometteuse concernant l'identification de nouveaux biomarqueurs associés avec la récupération après traitement, qui seront d'un intérêt majeur dans le développement préclinique de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'interférence à ARN a également été utilisée pour générer plusieurs modèles cellulaires de la maladie (Kemp et al., 2017; Loría and Díaz-Nido, 2015; Lu and Cortopassi, 2007; Napoli et al., 2007; Obis et al., 2014; Palomo et al., 2011; Santos et al., 2001; Stehling et al., 2004; Zanella et al., 2008). Le *knock-down* de la frataxine dans ces cellules affecte généralement la survie et la différenciation des cellules, et induit des phénotypes biochimiques typiques de l'AF (voir 5.2). Cependant les phénotypes reportés sont plutôt variables entre les différentes études, dû aux différentes lignées cellulaires utilisées mais également à la séquence et les niveaux d'expression des shRNA. Toutefois, utiliser des shRNA sur des lignées cellulaires reste avantageux dans le cas de criblages pharmacologiques à grande échelle car il reste facile à établir et ces lignées faciles à manipuler (Calmels et al., 2009b).

L'interférence à ARN (RNAi) reste également très utile afin d'établir des modèles d'autres organismes multicellulaires tels que la drosophile (Anderson et al., 2005; Calap-Quintana et al., 2015; Llorens et al., 2007; Navarro et al., 2010; Soriano et al., 2016). Le système à RNAi UAS-GAL4 a été utilisé pour downréguler l'expression de la frataxine (homologue *dfh*) chez la drosophile. Ce système permet d'obtenir une répression tissu-spécifique de la frataxine. Les études ont montré que la suppression de *dfh* mène à des phénotypes différents entre les larves et les adultes. La fonction de *dfh* s'est montrée essentielle pendant le développement puisque seulement un faible pourcentage de larves déplétées en frataxine est capable de se développer jusqu'à l'âge adulte. Ces adultes montrent une espérance de vie très

réduites et des altérations biochimiques concordant avec un rôle de la frataxine conservé (Anderson et al., 2005, 2008; Navarro et al., 2010; Shidara and Hollenbeck, 2010; Soriano et al., 2016). L'utilisation d'un modèle de drosophile s'est également révélée très utile dans la mise en place d'un crible pharmacologique *in vivo* de moyenne échelle (Palandri et al., 2018a).

5.1.2 Modèles à déplétion totale

Une stratégie différente des modèles à déplétion partielle, consiste en enlever totalement l'expression du gène de la frataxine. Cette stratégie drastique permet notamment d'augmenter la sévérité et la rapidité d'apparition des phénotypes. Afin de réaliser le *knock-out* complet du gène de la frataxine, les chercheurs ont utilisé le système Cre/LoxP, en plaçant des sites LoxP autour de l'exon 4 de la frataxine, essentiel à sa fonction catalytique (**Figure 25**). Rapidement, il a été observé que le développement et la division cellulaire ne sont pas viables en absence totale de frataxine, avec une létalité embryonnaire à E6.5 chez la souris (Cossée et al., 2000) et une mort cellulaire chez les fibroblastes (Calmels et al., 2009a). Afin de surmonter cette létalité, les chercheurs ont choisi de restreindre la délétion de la frataxine à certains tissus, en exprimant la *Cre recombinase* (Cre) sous le contrôle d'un promoteur spécifique des tissus ciblés. Ces modèles sont appelés modèles conditionnels. Les tissus ciblés sont ceux qui sont particulièrement affectés dans l'AF. Le modèle MCK-Cre, pour lequel la Cre est sous le contrôle du promoteur de la créatine kinase du muscle ou MCK, présente une délétion spécifique dans le cœur et les muscles striés, et développe la cardiomyopathie progressive associée à l'AF (Puccio et al., 2001). Plusieurs modèles conditionnels ont été générés, dans le but d'étudier le développement et la physiopathologie de l'aspect neurologique de l'AF. On compte parmi eux, les mutants NSE-Cre (spécifique aux neurones (Puccio et al., 2001), Prp-Cre (cerveau, hippocampe et cervelet (Simon et al., 2004), et Pvalb-Cre (neurones proprioceptifs du DRG, cellules de Purkinje et interneurons (Piguet et al., 2018b)). A eux tous, ces modèles résument les éléments de la neuropathologie des patients AF, à savoir une démarche anormale, et la perte progressive de la proprioception avec des défauts modérés d'équilibre et de coordination. Outre les phénotypes cardiaques et neurologiques, 20% des patients montrent également un diabète et une intolérance au glucose (Delatycki and Corben, 2012). A ce jour, quelques études ont été réalisées afin de comprendre les mécanismes derrière ce phénotype. Le modèle conditionnel Ins2-Cre porte une perte de la frataxine spécifique des cellules β du pancréas. Ces souris développent une intolérance au glucose ainsi qu'un diabète

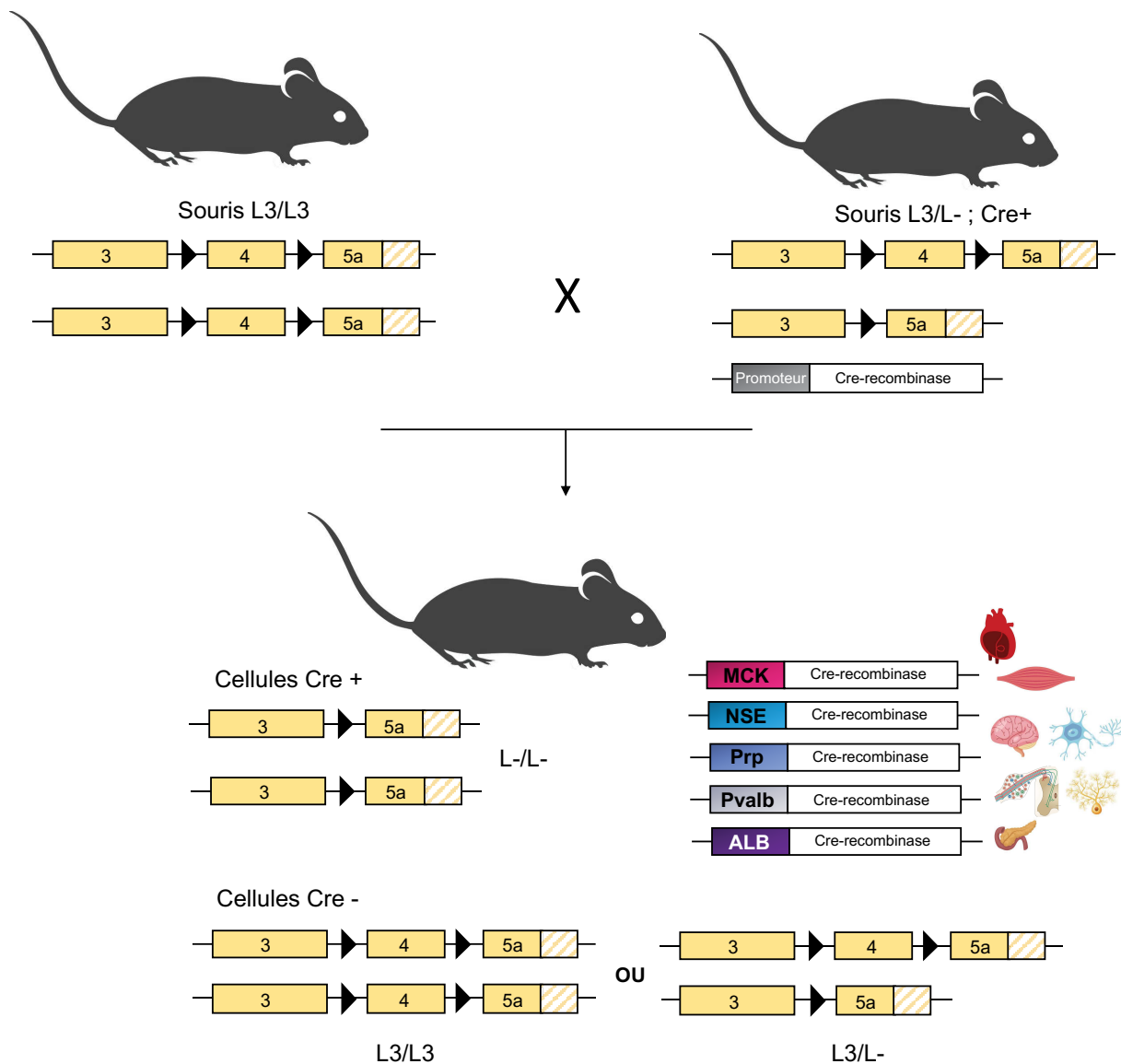


Figure 25 : Modèles murins conditionnels de l'AF

En insérant des sites *LoxP* autour de l'exon de 4 de *Fxn*, il est possible d'inactiver totalement l'expression de la frataxine en présence de la Cre recombinase. En plaçant l'expression de la Cre sous le contrôle de promoteurs tissus-spécifiques, on peut choisir de déléter le gène dans des tissus d'intérêt. MCK (muscle creatine kinase) : cœur, muscles squelettiques ; NSE (neuron-specific enolase) : système nerveux ; Prp (prion protein) : DRG et cellules granulaires du cervelet ; Pvalb (parvalbumine) : neurones proprioceptifs de DRG, cellules de purkinje et interneurons ; ALB (albumine) : cellules β du pancréas.

progressif (Ristow et al., 2003). Un modèle spécifique du foie, ALB-Cre, a également été généré à cause du rôle clé de cet organe dans l'homéostasie du fer (Martelli et al., 2007).

Les modèles conditionnels sont d'une importance majeure dans la compréhension des mécanismes menant aux dysfonctions associées à l'AF et à l'établissement de stratégies

thérapeutiques. Néanmoins, ces modèles montrent quelques inconvénients, tels que la déplétion en frataxine qui est totale, contrairement aux patients où elle n'est que partielle. Ils manquent également l'aspect génétique lié à l'expansion de triplets GAA dans le gène de la frataxine.

5.1.3 Fibroblastes, lymphoblastes et iPSC dérivés de patients AF

Les cellules dérivées de patients AF constituent les modèles cellulaires les plus pertinents car ils portent le contexte génétique complet, comprenant une expansion de GAA de taille adéquate, ainsi que tous les éléments régulateurs, gènes adjacents, et l'architecture 3D du génome associés à l'AF. L'inconvénient principal et évident, est que les cellules primaires affectées dans l'AF ne peuvent en aucun cas être obtenues à partir de biopsies de patients (cardiomyocytes et neurones). Les seules cellules accessibles sont les fibroblastes et les lymphoblastes, qui ne récapitulent pas nécessairement les mêmes caractéristiques biochimiques, bien qu'ayant des niveaux réduits en frataxine (Rötig et al., 1997; Sturm et al., 2005a). Afin d'obtenir des cellules plus pertinentes physiologiquement, des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) dérivées de patients ont été générées, dans lesquelles une taille d'expansion de GAA pathologique est conservée au fil de la reprogrammation, bien que l'expansion montre une instabilité importante (Hick et al., 2013; Ku et al., 2010; Liu et al., 2011). Similairement aux fibroblastes et lymphoblastes dérivés de patients, les iPSC ne montrent pas de perte d'activité des enzymes Fe-S, ce qui suggère que le niveau de Fe-S produit malgré un déficit en frataxine reste suffisant pour subvenir à leurs besoins (Hick et al., 2013). La différenciation des iPSC en neurones a été étudiée extensivement ces dix dernières années (Bird et al., 2014; Codazzi et al., 2016; Crombie et al., 2017; Hick et al., 2013; Igoillo-Esteve et al., 2015; Li et al., 2019; Liu et al., 2011; Wong et al., 2019). D'une étude à l'autre, les phénotypes observés sont variables, notamment à cause des niveaux variables de la frataxine, mais aussi de l'efficacité et la spécificité de différenciation atteinte. Le manque de spécificité et la faible efficacité de différenciation sont des paramètres qui doivent impérativement être résolus pour pouvoir se servir des iPSC dans l'étude de la physiopathologie de l'AF. Très récemment, de nouvelles études présentent des protocoles de différenciation de plus en plus sophistiqués de différenciation en neurones sensitifs de DRG ou cardiomyocytes (Bolotta et al., 2019; Dionisi et al., 2019; Georges et al., 2019; Lai et al., 2019). L'utilisation de ces nouveaux modèles constitue une voie d'étude très prometteuse dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement de ces cellules en absence de frataxine.

5.1.4 Modèles humanisés avec mutations ponctuelles

Comme énoncé précédemment, quatre pourcents des patients AF sont hétérozygotes composites, et possèdent l'expansion de triplets GAA sur un allèle, et une mutation dans la région codante de la frataxine sur l'autre allèle (Galea et al., 2016). Les chercheurs ont émis comme hypothèse qu'introduire ces mutations dans des cellules pourrait reproduire les défauts moléculaires et cellulaires associés à l'AF. Ils ont généré des lignées de fibroblastes murins exempts de frataxine endogène, mais sur-exprimant une version mutée de la frataxine (Calmels et al., 2009a). Deux mutations ont été sélectionnées : G130V et I154F. La mutation G130V est la plus fréquente et cause une perte incomplète de la fonction avec une maturation et stabilités réduites de la frataxine (Correia et al., 2008). Les patients ont une présentation clinique atypique : début précoce mais lente progression des symptômes (Delatycki et al., 1999). La mutation I154F cause des défauts de maturation et de fonction, et mène à un phénotype classique chez les patients (Campuzano et al., 1996; Correia et al., 2008). Pour les deux lignées cellulaires, la frataxine humaine ainsi mutée est capable de sauver la létalité induite par la perte de la frataxine murine. Les cellules mutantes montrent une morphologie cellulaire et mitochondriales altérées, une déficience en activité des enzymes Fe-S et une sensibilité accrue au stress oxydant (Calmels et al., 2009a). Ces cellules constituent un modèle récapitulant les défauts biochimiques associés à l'AF sans baisse d'expression de la frataxine, et avec une sévérité dépendant de la mutation. Ces modèles sont de bons candidats pour réaliser des criblages pharmacologiques à grande échelle pour l'AF.

5.2 Description de la physiopathologie de l'AF

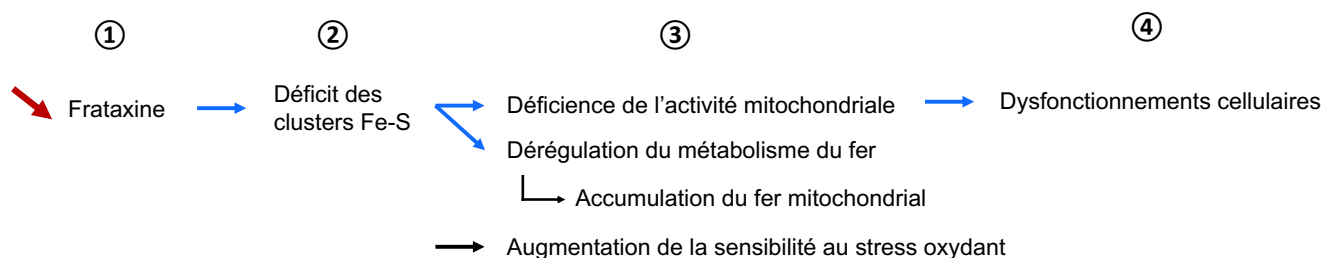


Figure 26 : Physiopathologie de l'ataxie de Friedreich

5.2.1 Déficit en centres Fe-S et métabolisme du fer

Des études préliminaires à partir de biopsies et autopsies de patients ont révélé un lien entre la déficience en frataxine et une dérégulation du métabolisme du fer. Très tôt, Lamarche et collègues ont observé des dépôts de fer dans les cardiomyocytes de patients (Lamarche et al., 1980), suggérant qu'une accumulation de fer joue un rôle causal dans l'ataxie de Friedreich. À l'appui de cela, il a été montré que le fer s'accumule en grandes quantités dans les mitochondries de souches de levures déficientes en frataxine (Babcock et al., 1997; Foury and Cazzalini, 1997). Outre l'accumulation de fer mitochondrial, il a été trouvé que l'activité des enzymes à Fe-S était diminuée dans des biopsies et autopsies de patients : les complexes I à III de la chaîne respiratoire et l'aconitase dans le cœur et aconitase seulement dans des tissus de DRG (Bradley et al., 2000; Rötig et al., 1997). Des observations similaires ont été faites chez la levure (Mühlenhoff et al., 2002; Rötig et al., 1997). Cependant, la présence d'accumulation de fer dans les mitochondries des neurones est moins claire. Outre un rapport issu de données d'imagerie par résonance magnétique suggérant une augmentation totale du fer dans le noyau dentelé des patients (Boddaert et al., 2007; Waldvogel et al., 1999), aucune différence de concentration du fer n'a été mesurée lors d'autopsies, dans le noyau dentelé comme les DRG (Koeppen et al., 2007, 2009). Cependant, des modifications d'expression de protéines du métabolisme du fer telles que le récepteur 1 de la transferrine (TFR1), les ferritines (FRT) et la ferroportine (FPN) ont été rapportées, suggérant une dérégulation du fer cellulaire (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013; Koeppen et al., 2007). Malgré les difficultés à les mettre en évidence dans les tissus neuronaux des patients, l'accumulation du fer mitochondrial et la déficience en Fe-S restent des éléments clés de la physiopathologie de l'AF.

Il est difficile de savoir d'un premier abord qui entre la dérégulation du fer et le déficit en Fe-S est primaire ou secondaire suivant la déplétion de la frataxine, car dans les tissus de patients la pathologie est déjà présente. Les modèles de *knock-out* complet montrent une létalité embryonnaire sans accumulation de fer, ce qui suggère que l'accumulation du fer serait plutôt secondaire (Cossée et al., 2000). Dans le même sens, les modèles conditionnels montrent une forte déficience précoce d'activité des enzymes à Fe-S dans les tissus où la frataxine est supprimée, suivie par des signes d'accumulation du fer mitochondrial (Piguet et al., 2018b; Puccio et al., 2001; Simon et al., 2004; Thierbach et al., 2005). Chez les modèles MCK et NSE-Cre, les activités de l'aconitase et de la SDH diminuent avant toute dysfonction cardiaque et neurologique, ce qui suggère que la perte des Fe-S agit en tant qu'évènement primaire de la physiopathologie.

La biosynthèse des Fe-S semble être très sévèrement affectée uniquement dans les modèles qui possèdent une déplétion totale, qu'elle soit conditionnelle ou générale. Ces modèles induisent un phénotype très sévère à cause du manque total de frataxine, quand sa réduction est partielle chez les patients. En ce qui concerne les modèles à déplétion partielle, tels que les modèles GAA, il n'est toujours pas clair si le déficit en Fe-S est présent ou non. Quelques études rapportent que l'activité de l'aconitase est légèrement diminuée dans le coeur et le cervelet de mutant YG8R (Al-Mahdawi et al., 2006; Sandi et al., 2011a), et celle des complexes I, II et IV de la chaîne respiratoire dans les souris KIKO (Lin et al., 2017). Dans ces mêmes souris, les niveaux de fer semblent similaire aux souris sauvages à l'exception du pancréas où les mutants montrent une légère baisse des niveaux de fer (Miranda et al., 2002). Les souris YG8R montrent tardivement des dépôts de fer éparses dans les cardiomyocytes (Al-Mahdawi et al., 2006). Ces données suggèrent une nouvelle fois que la baisse transcriptionnelle doit atteindre un pallier critique afin d'induire une pathologie. En ce qui concerne les cellules dérivées de patients, fibroblastes, lymphoblastes et IPS ne montrent pas de déficit en activité Fe-S (Hick et al., 2013), mais il a été montré que des neurones dérivés d'IPS ont un déficit en Fe-S et une altération de l'homéostasie du fer (Codazzi et al., 2016).

Les souris basées sur l'expression inductible de shRNA montrent un plus grand degré de réduction de l'expression de la frataxine, à des niveaux proches d'un KO. Ce modèle montre une cardiomyopathie associée avec des dépôts éparses de fer, une morphologie mitochondriale anormale ainsi qu'une activité diminuée de l'aconitase dans les cardiomyocytes (Chandran et al., 2017). Des résultats similaires ont été obtenus chez les modèles cellulaires à interférence ARN (Napoli et al., 2007; Stehling et al., 2004; Zanella et al., 2008).

5.2.2 Stress oxydant

Comme discuté précédemment, la baisse de biosynthèse des Fe-S affecte sévèrement la chaîne respiratoire des mitochondries. Une chaîne respiratoire défectueuse et des niveaux élevés de fer sont susceptibles de générer des radicaux superoxydes et hydroxyles. En effet, une faible partie du flux d'électron de la chaîne respiratoire mène à la formation d'ion superoxyde O_2^- , qui dans des conditions physiologiques est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . En présence de métaux de transitions réduits, tels que le fer, H_2O_2 produit un radical hautement réactif et dommageable, l'hydroxyle OH^- , à travers un mécanisme appelé réaction de Fenton (Kehrer, 2000). Ce phénomène a mené à la suggestion qu'un stress oxydant causé par l'accumulation de fer associée à l'AF pourrait contribuer à la dégénérescence cellulaire. En

soutien à cette théorie, des études ont montré la présence de marqueur du stress oxydant tels que le malondialdéhyde dans le sang de patients (Emond et al., 2000), ou la 8-hydroxy-2-désoxiguanosine S-transférase dans l'urine (Schulz et al., 2000). De faibles niveaux de composés protecteurs tels que le glutathion et la glutathion S-transférase ont également été rapportés chez les patients (Piemonte et al., 2001; Tozzi et al., 2002). De plus, les fibroblastes et lymphoblastes AF montrent une plus grande sensibilité au stress oxydant et des niveaux accrus en glutathion oxydé (Jauslin et al., 2003; Marmolino et al., 2010; Napoli et al., 2007; Santos et al., 2001; Wong et al., 1999), et les levures déficientes *Yfh1* ont une hypersensibilité au stress oxydant (Babcock et al., 1997; Lefevre et al., 2012). C'est également le cas des lignées de fibroblastes murins sur-exprimant une frataxine humaine mutée (Calmels et al., 2009a).

Des signes de stress oxydant ont également été rapportés dans le cœur, muscles squelettiques et le cervelet des souris YG8R et YG22R et DRG des souris YG8R (Al-Mahdawi et al., 2006; Mollá et al., 2016; Shan et al., 2013), et des cultures primaires de neurones sensitifs issus des souris YG8R sont également plus sensibles au stress oxydant (Abeti et al., 2016; Mollá et al., 2017). D'autres biomarqueurs de stress tels que des produits de la peroxydation des lipides ont été trouvés dans un modèle de drosophile (Anderson et al., 2005; Navarro et al., 2010; Soriano et al., 2013), et de *C. Elegans* (Vázquez-Manrique et al., 2006), chez lequel une surexpression des enzymes de *scavenging* de H_2O_2 augmentent la survie et l'activité enzymatique de l'aconitase (Anderson et al., 2008).

Ces données rassemblées suggèrent que le stress oxydant joue un rôle central dans la dégénérescence des cellules dans l'AF. Cependant, il a été montré que la perte spécifique de l'activité des enzymes à Fe-S et l'accumulation de fer rapportée chez les souris MCK-Cre, ne génère pas d'augmentation significative du stress oxydant (Seznec et al., 2004). Similairement, aucune sensibilité accrue au stress oxydant n'a été rapportée pour le modèle inductible et réversible à shRNA (Chandran et al., 2017). Chacun de ces deux modèles montrent des phénotypes très sévères. L'absence de dommages oxydants pourrait être la conséquence d'une extinction quasi-complète de la chaîne respiratoire dans les cellules où la frataxine est totalement absente.

5.2.3 Mécanismes émergents

5.2.3.1 Réponse associée à NRF2

Il a été suggéré que l'hypersensibilité aux dommages oxydants observés dans les modèles et chez les patients AF pourrait être due à une déficience des réponses de défense au stress oxydant. Il a été montré que des cellules présentant une déficience en frataxine n'activent pas efficacement les mécanismes de défenses de la voie NRF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) en réponse à un stress (Paupé et al., 2009). NRF2 est un facteur de transcription régulant l'expression de protéines de la réponse anti-oxydante. Des observations similaires ont été effectuées dans un modèle de motoneurones déplétés en frataxine (D'Oria et al., 2013) et dans des cultures de neurones sensitifs de DRG issus de la souris YG8R, pour lesquelles des données de transcriptomique ont montré une baisse de l'expression des protéines régulées par NRF2 (Shan et al., 2013).

5.2.3.2 Autophagie

Plusieurs études, sur différents modèles de l'AF, évoquent l'autophagie parmi les mécanismes affectés. Il n'existe à ce jour pas d'étude complète du processus d'autophagie dans le contexte de l'AF, mais plusieurs points de convergences sont retrouvés parmi les résultats. Une accumulation du marqueur d'autophagosome LC3-II est relevée dans les cardiomyocytes des souris MCK-Cre (Huang et al., 2013), dans des lignées de neuroblastomes (Bolinches-Amorós et al., 2014) et chez le ver *C. elegans* (Schiavi et al., 2013) exprimant des shRNA dirigés contre la frataxine, ainsi que chez des lymphoblastes de patients (Schiavi et al., 2013). Une accumulation est également relevée pour la protéine liant l'ubiquitine P62, dont la fonction est de signaler les cargos à adresser à l'autophagosome. Cette accumulation est observée chez la souris MCK (Huang et al., 2013), dans des neurones de DRG issus d'un modèle murin à GAA (Mollá et al., 2017), ainsi que chez un modèle de drosophile (Edenharter et al., 2018). La seule observation d'une accumulation de LC3-II et de P62 peut avoir deux interprétations. Dans les deux cas les cargos à dégrader s'accumulent car ils sont en quantités trop importantes par rapport à la capacité du flux autophagique. Mais cela peut résulter à la fois d'une augmentation de l'autophagie, comme d'un blocage. Il existe des méthodes permettant d'investiguer le flux autophagique sur toutes les étapes (revues dans Klionsky et al., 2016). La présence de vacuoles autophagiques et d'accumulation de lipofuscine ont été rapportées dans les neurones de DRG

des souris YG8R, Prp-Cre et Pvalb-Cre (Al-Mahdawi et al., 2006; Piguet et al., 2018; Simon et al., 2004). Ces résultats sont compatibles avec un blocage du flux autophagique dans ces cellules. Cependant, les résultats de l'étude réalisée sur le modèle de drosophile semble indiquer que le flux reste intact dans ce modèle malgré l'accumulation de P62 (Edenharter et al., 2018). L'ensemble de ces résultats ne permettent pas de conclure sur l'autophagie, et suggèrent que ce mécanisme pourrait servir de réponse protectrice à l'absence de frataxine, mais également agir être un acteur dans la pathologie de la maladie.

5.2.3.3 Inflammation

Les résultats de plusieurs études indépendantes pointent du doigt un rôle de l'inflammation dans la physiopathologie de l'AF. Une inflammation accrue a été identifiée dans des modèles animaux (Shen et al., 2016) ainsi que sur des tissus de patients (Koeppen et al., 2016). Une étude transcriptomique réalisée sur sang de patients a révélé une signature enrichie en gènes de la réponse immunitaire innée chez les patients AF (Nachun et al., 2018). Intéressamment, le traitement d'un modèle murin avec des facteurs de croissance hématopoïétiques a eu pour effet d'améliorer la neurologique, réduire l'inflammation et la gliose (Kemp et al., 2016). Agir sur les voies d'inflammation pourrait donc constituer une approche thérapeutique à explorer dans l'AF.

5.2.3.4 Voie mTOR

mTOR ou mechanistic Target Of Rapamycin, est une protéine conservée jouant le rôle de senseur de signaux intra et extracellulaires variés, régulant la croissance et l'homéostasie des cellules eucaryotes. mTOR forme deux complexes, mTORC1 et mTORC2. mTORC1 régule principalement la synthèse protéique, lipidique, nucléotidique, la biogénèse des lysosomes et l'autophagie (Rabanal-Ruiz et al., 2017). Plusieurs composants de la voie de signalisation mTOR sont dérégulés dans un modèle drosophile de l'AF : la sous-unité 1 du complexe de la Sclérose tubéreuse de Bourneville (Tsc1), la kinase P70S6K, le facteur d'initiation de la traduction 4E (eIF4E) et la kinase à répétitions leucine-riches (LrrK) (Calap-Quintana et al., 2015). L'inhibition chimique de TORC1 par la rapamycine a pu restaurer la performance motrice des mouches à des niveaux normaux, et rétablir l'expression de P70S6K et de eIF4E et la réduction des marqueurs de stress (Calap-Quintana et al., 2015). Des résultats similaires ont été obtenus chez la levure où un traitement à la rapamycine réduit la production de dérivés

réactifs de l'oxygène (ROS) (Marobbio et al., 2012). Chez la drosophile, la protection contre le stress-oxydant médiée par la rapamycine corrèle avec l'augmentation de la transcription de gènes régulés par l'orthologue de NRF2, Cnc (cap-n-collar), tels que Gclc et Gstd1 (Calap-Quintana et al., 2015). Une augmentation de la voie NRF2 par inhibition de mTORC1 a également été décrite dans des cellules souches (Kofman et al., 2012) ainsi que chez *C. Elegans* (Robida-Stubbs et al., 2012). L'ensemble de ces résultats suggère qu'une interaction entre mTOR et la voie NRF2 pourrait jouer un rôle dans les événements de réponse au stress oxydant observés dans l'AF.

5.2.3.5 La voie PGC1 α

PGC1 α ou le *Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- γ) coactivator 1 α* , est le régulateur principal de la biogénèse mitochondriale. L'expression de PGC1 α semble être dérégulée dans des tissus issus des souris KIKO : muscles squelettiques, foie, précurseurs neuronaux (Coppola et al., 2009), cervelet (Lin et al., 2017) et des fibroblastes issus des souris YG8R (Sandi et al., 2014). Cependant, des données contradictoires sur la dérégulation de l'expression de PGC1 α dans les fibroblastes de patients sont reportées. Autant une baisse de l'expression (Coppola et al., 2009; Marmolino et al., 2010), qu'une augmentation (García-Giménez et al., 2011) ont été décrites. Il se pourrait que la voie de PGC1 α soit différemment sollicitée en fonction de l'âge et la sévérité de la maladie des patients. L'expression de marqueurs de la biogénèse mitochondriale tels que NRF1 et Tfam pourrait être dérégulée dans les fibroblastes et le sérum des patients ainsi que des tissus cérébraux issus des souris KIKO (Jasoliya et al., 2017). L'ensemble de ces résultats suggère qu'une modification de la biogénèse mitochondriale associée à PGC1 α pourrait avoir lieu dans l'AF et pourrait potentiellement servir de biomarqueur de la maladie. Il est intéressant de noter que la sous-régulation de PGC1 α est un paramètre qui n'a seulement été décrit que dans des modèles présentant de très légers phénotypes tels que les souris KIKO et les fibroblastes de patients.

5.2.3.6 La voie PDK1-Mef2

Il a été montré chez la drosophile que l'inactivation de la frataxine déclenche la dégénérescence des photorécepteurs accompagnée d'une accumulation de fer associée à une

dérégulation du métabolisme lipidique. En particulier, une augmentation de la synthèse des sphingolipides activée par la kinase Pdk1 ou *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1* et Mef2, pour *myocyte enhancer factor-2* (Chen et al., 2016a). Intéressamment, l'inhibition de la synthèse des sphingolipides ou la réduction des niveaux de Pdk1 ou Mef2 réduit la neurodégénérescence chez les mouches mutantes (Chen et al., 2016a). La même équipe de recherche a démontré que la perte de frataxine dans le système nerveux, via le système CRISPR/Cas9, déclenche également une activation des mêmes voies de Pdk1 et Mef2 (Chen et al., 2016b), suggérant un mécanisme conservée par l'évolution. Les chercheurs ont également montré dans cette étude que les niveaux de sphingolipides et l'activité de PDK1 sont augmentés dans des tissus cardiaques de patients AF. De plus amples investigations doivent être conduites afin de déterminer l'état de la voie PDK1-Mef2 dans d'autres modèles ainsi que d'autres tissus de patients.

5.2.3.7 La voie UPR : Unfolded Protein Response

Dès 2006, l'AF a été liée à une activation de l'UPR associée à un stress du réticulum endoplasmique (UPR^{ER}) et un stress mitochondrial (UPR^{mt}). Des expériences à puces d'ADN ou *microarray* réalisée sur des fibroblastes de patients ont révélé que l'expression de plusieurs gènes de l'UPR^{ER} était augmentée (Cortopassi et al., 2006). Parmi ces gènes, on retrouve ATF4 (activating transcription factor 4) et les protéines CHOP (C/EBP homologous protein) et BIP (Binding Immunoglobulin Protein) ou GRP78. La même équipe a fait des observations similaires dans des cellules exprimant des shRNA contre la frataxine (Lu and Cortopassi, 2007). BIP semble également être augmentée dans d'autres modèles tels que les souris MCK-Cre (Huang et al., 2013), les drosophiles à déplétion gliale-spécifique (Edenharter et al., 2018) et une lignée de neuroblastomes exprimant des shRNA anti-frataxine (Bolinches-Amorós et al., 2014). La protéase CLPP (*ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit*), spécifique de l'UPR^{mt}, est également dérégulée dans le modèle MCK-Cre (Guillon et al., 2009). Le *knock-down* de la frataxine sensibilise également les cellules β à l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique (Cnop et al., 2012). Ces observations suggèrent que les mécanismes de l'UPR sont activés à la fois aux niveaux mitochondriaux et réticulum endoplasmique.

Plusieurs hypothèses ont été suggérées afin de relier l'AF à l'UPR. Le déficit en centres Fe-S mène à une privation des protéines Fe-S de leur cluster. Chez les protéines où le cluster joue un rôle structural important, on s'attend à une accumulation de protéines mal repliées à travers toute la cellule puisque la perte de frataxine induit un déficit généralisé en Fe-S.

L'accumulation de ces protéines anormalement repliées serait en partie responsable de l'activation de l'UPR (Lu and Cortopassi, 2007). En addition, le facteur eIF2 α peut être phosphorylé par la kinase EIF2A/Hri (*Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1*), qui agit en senseur de l'hème, et s'active en cas de déficience en hème. Une éventuellement baisse de production de l'hème dans le contexte de l'AF pourrait jouer le rôle d'activateur de l'UPR. En support de cette hypothèse, le ration p-Hri/Hri semble dérégulé chez les souris MCK (Huang et al., 2013). Une hypothèse additionnelle provient des observations que l'UPR peut être activé en présence de stress oxydant (Wang et al., 2016), ce qui pourrait être le cas également dans l'AF.

6 Les approches thérapeutiques

Plus de 20 ans après la découverte du gène impliqué dans l'Ataxie de Friedreich, cette maladie reste incurable, et il n'existe à ce jour aucune thérapie modificatrice de la maladie ni améliorant les symptômes de manière significative. Malgré cela, les équipes de recherche et de nombreuses boîtes pharmaceutiques œuvrent intensément à développer des stratégies thérapeutiques, et permettent chaque année que de nouveaux composés entrent dans les phases de recherche clinique et soient testés sur des groupes de patients. L'ensemble de ces composés est rassemblé sur une *pipeline* mise à disposition et mise à jour chaque année par l'association américaine pour l'ataxie de Friedreich FARA (*Friedreich's Ataxia Research Alliance*) (**Figure 27**). Dans les paragraphes suivant, différentes stratégies seront évoquées et classées selon le type de l'approche et les mécanismes ciblés.

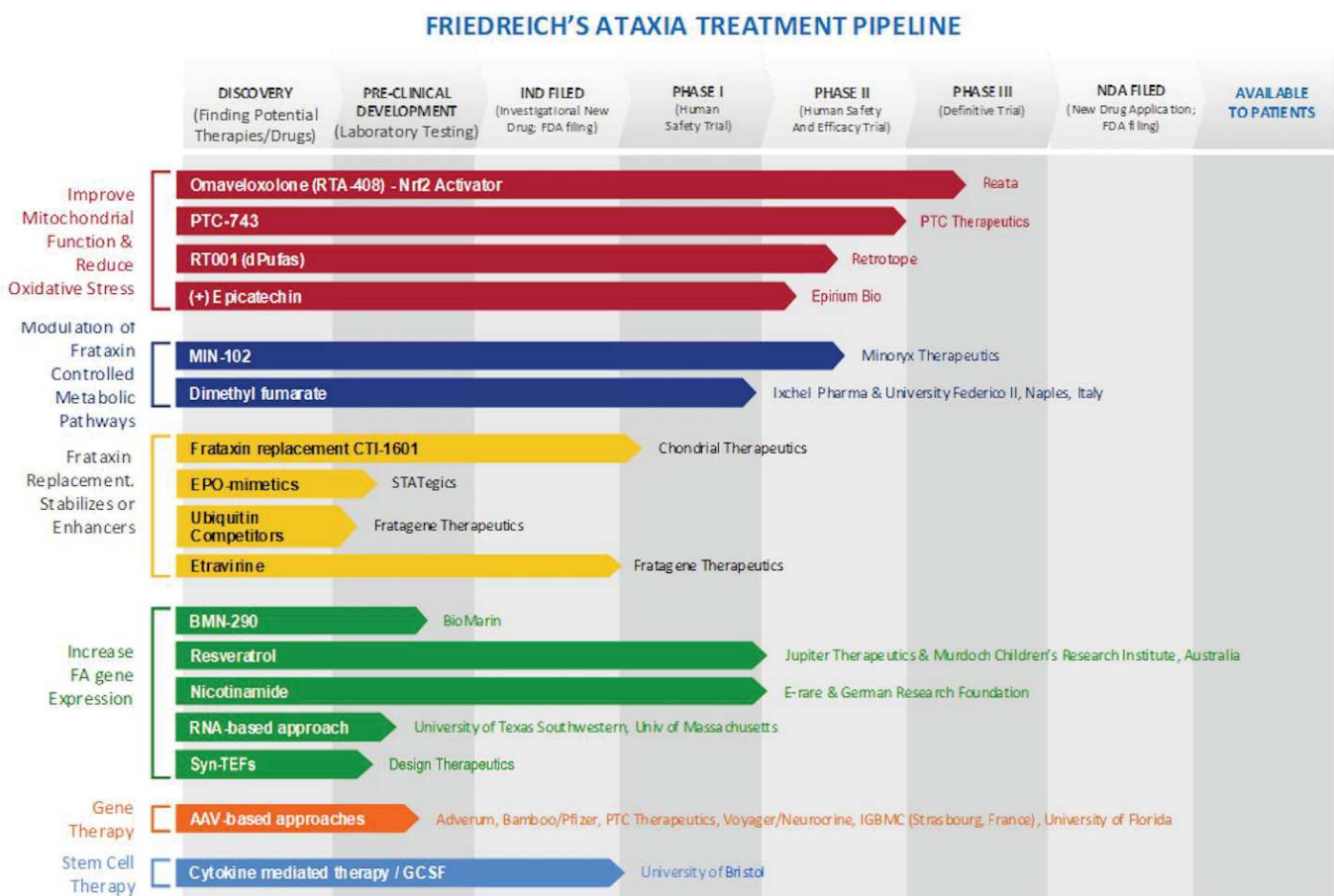


Figure 27 : État actuel des recherches cliniques pour l'ataxie de Friedreich

Frise annuelle de l'association américaine de l'ataxie de Friedreich (FARA), concernant l'état de la recherche en matière de traitement. Issu de www.curefa.org/pipeline.

6.1 Amélioration de la fonction/disponibilité mitochondriale

Les composés de cette classe ont été sélectionnés selon leur capacité à augmenter la fonction des mitochondries. Le premier composé de ce type, l'ubédénone, est également l'unique composé qui a été rendu disponible aux patients. L'ubédénone est un antioxydant similaire au coenzyme Q10 optimisé afin de passer la barrière hémato-encéphalique pour faciliter le transport des électrons au sein des mitochondries. L'ubédénone a montré des propriétés cellule-protectrices et contribue à maintenir un équilibre électronique correct pour produire de l'énergie *in vitro* (Meier and Buyse, 2009). Bien qu'il ait été montré efficace dans la réduction de l'hypertrophie du myocarde et la baisse des marqueurs que stress oxydant chez les patients AF (Meier et al., 2012) et dans un modèle de souris (Seznec et al., 2004), le traitement ne montre pas de bénéfices thérapeutiques statistiquement significatifs (Lynch et al., 2010). Néanmoins, l'ubédénone semble apporter un léger effet bénéfique aux patients, montrer très peu d'effets indésirables et est relativement peu coûteux. Pour ces raisons, une partie des patients continue de l'utiliser. Une version améliorée de l'ubédénone, la molécule EPI-743 (*alpha tocopheryl quinone*, BioElectron Technology Corporation) présente des caractéristiques chimiques combinées de l'ubédénone et de la vitamine E, également testée en clinique sur une durée de 24 mois, et semble montrer des résultats statistiquement significatif d'amélioration de la fonction neurologique et de la progression de la maladie chez les patients (Gottesfeld, 2019).

Comme mentionné précédemment, PGC-1 α est un facteur de transcription promouvant la biogénèse mitochondriale et l'induction des réponses anti-oxydantes (Austin and St-Pierre, 2012). Un antagoniste du PPAR γ , inducteur majeur de l'activité de PGC-1 α , le *Azelaoyl platelet activating factor* (PAF), montre une augmentation de la frataxine aux niveaux transcriptionnels et protéiques dans les fibroblastes de patients (Marmolino et al., 2010). Le Pioglitazone, une molécule similaire à l'Azélaoyl PAF a été testée en dans une étude de Phase III (NCT00811681), mais les résultats n'ont jamais été publiés bien que l'essai clinique est terminé depuis 2013 (Gottesfeld, 2019).

6.2 Modulation du métabolisme du fer

Certains composés ont été désignés pour cibler l'accumulation du fer dans les mitochondries associée à l'AF. Puisque les niveaux de fer sont augmentés dans l'AF, les chercheurs ont postulé que les baisser chimiquement pourrait améliorer la fonction cellulaire.

Différents chélateurs de fer tels que le Défériprone ont été étudiés extensivement en clinique. Alors qu'on observe effectivement une baisse significative du contenu ferrique dans les mitochondries, les études n'ont montré que de très légers voire aucun bénéfice sur les symptômes, à faible dose de Défériprone (Pandolfo and Hausmann, 2013; Pandolfo et al., 2014). A forte dose, les patients ont en revanche développé des effets secondaires importants tels que des douleurs musculaires, des vertiges ainsi qu'un syndrome de Guillain-Barre (syndrome auto-immun pouvant provoquer une atteinte des nerfs périphériques ainsi qu'une paralysie), qui se sont estompés après avoir stoppé la prise de Défériprone (Boddaert et al., 2007; Pandolfo and Hausmann, 2013). L'utilisation des chélateurs de fer en tant que stratégie thérapeutique est actuellement discutée pour plusieurs raisons : les résultats alarmants des études cliniques précédemment énoncés ; il n'a pas été montré que l'accumulation de fer est un paramètre causal de l'AF ; l'accumulation de fer dans les mitochondries semble dépléter le cytosol en fer (Pandolfo and Hausmann, 2013). Par ailleurs, les travaux d'Alain Martelli, ancien membre de notre laboratoire, ont servi à démontrer que cette augmentation du fer constitue une réponse de défense des cellules pour compenser la perte de la frataxine, plutôt qu'un phénomène délétère (Martelli et al., 2015). Par conséquent, une stratégie de chélation sélective des mitochondries accompagnée d'une augmentation parallèle du fer cytosolique pourrait être éventuellement envisagée comme une thérapie plus pertinente et moins nocive.

6.3 Protection contre le stress oxydant

En raison des observations suggérant une augmentation du stress oxydant ou de la sensibilité au stress dans l'AF, des stratégies dédiées à la résolution de ces paramètres sont développées. L'une de ces stratégies consiste en l'activation du facteur NRF2, une protéine montrée déficiente dans des modèles de la maladie (Shan et al., 2013), comme discuté précédemment. Un criblage d'une banque de composés approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) a servi à révéler deux drogues agissant comme activateurs de NRF2 et ayant une activité significative sur les paramètres biochimiques de l'AF (Abeti et al., 2015). C'est le cas de l'Omaveloxolone (RTA-408) ainsi que de la Dyclonine. Un traitement avec le RTA-408 a restauré partiellement le potentiel membranaire mitochondrial dans des modèles murins (Abeti et al., 2015). Il a été montré que la dyclonine restaure partiellement la déficience en frataxine dans des fibroblastes et modèles murins (Sahdeo et al., 2014). Le RTA-408 a fait

l'objet d'une étude clinique de phase 2 dont les résultats positifs ont récemment été publiés. La molécule s'est montrée non toxique et a amélioré la fonction neurologique (Lynch et al., 2019a).

Une autre classe de molécules vise à stabiliser et protéger l'intégrité des membranes cellulaires et mitochondriales contre les dommages infligés par les ROS : les acides gras deutérés ou dPUFAs (ref). Dans la cellule, les acides gras poly-insaturés (PUFAs) sont des acides gras essentiels à la structure et la fonction des membranes lipidiques. Cependant, ils contiennent de faibles liaisons carbone-hydrogène qui peuvent être facilement clivées en présence de stress oxydant. Ce clivage résulte en une réaction en chaîne de dommages et oxydations des membranes, altérant également l'intégrité et la fonction des mitochondries. Les dPUFAs sont des PUFAs dans lesquels les atomes d'hydrogènes ont été remplacés par du deutérium, ralentissant la réaction en chaîne d'oxydation. Ces molécules augmentent la stabilité des membranes, représentant ainsi une stratégie intéressante pour protéger l'intégrité des mitochondries ainsi que de toute la cellule. Des études pionnières ont montré qu'un traitement aux dPUFAs protège efficacement les fibroblastes AF du stress oxydant (Cotticelli et al., 2013). Sous le nom de RT001, cette stratégie a été testée dans une étude clinique de phase I/II et a donné des résultats encourageants d'amélioration de la fonction neurologiques (score FARS) (Shchepinov, 2020; Zesiewicz et al., 2018).

6.4 Modulation génétique et stabilisation de la frataxine

Les répétitions de triplets GAA étant localisés dans un intron, la séquence codante de la frataxine n'est pas altérée dans l'AF. L'augmentation de l'expression de la frataxine dans les cellules de patients peut ainsi être considérée comme une thérapie prometteuse. Plusieurs stratégies ont été développées dans ce but. L'un des moyens d'augmenter l'expression de la frataxine est de palier au *silencing* provoqué par l'expansion de triplet GAA. Notamment, les inhibiteurs d'histone désacétylases ou HDAC ont été particulièrement étudiés dans le cadre de l'AF. Les inhibiteurs d'HDAC sont des molécules interférant avec la formation d'hétérochromatine induite par les histones désacétylases. Il a été montré que certaines de ces molécules renversent le *silencing* de la frataxine à la fois dans des modèles murin de l'AF (Rai et al., 2008, 2010; Sandi et al., 2011b), des lignées de lymphoblastes de patients (Herman et al., 2006b), et des cellules neuronales dérivées d'IPS de patients AF (Codazzi et al., 2016; Lai et al., 2019), pour lesquelles le traitement a réussi à améliorer les niveaux de certaines enzymes Fe-S et protéger les cellules du stress oxydant. Un inhibiteur de HDAC synthétique, le RG2833

augmente également l'expression de la frataxine lors d'essais cliniques, bien que générant des métabolites nocifs (Soragni et al., 2014b). De nouvelles générations de ces molécules sont développées afin d'éviter la production de ces métabolites tout en assurant un effet significatif sur l'expression du gène. Le développement de ces nouvelles générations vise également à cibler le locus de la frataxine de manière spécifique, afin d'éviter des effets *off targets*.

Similairement, le Nicotinamide, un inhibiteur de HDAC de classe III, agit au niveau de la chromatine et augmente significativement l'expression du gène dans un modèle murin GAA (Chan et al., 2013). Ces résultats prometteurs ont permis de réaliser une étude clinique du Nicotinamide sur des patients AF adultes. Les résultats de cette étude ont montré une bonne tolérance de la molécule (sauf aux doses les plus élevées), une augmentation significative des niveaux de frataxine sans toutefois montrer d'effet d'amélioration clinique (Libri et al., 2014).

Certaines molécules de différentes classes, issues principalement de criblages pharmacologiques, se sont montrées efficaces dans la modulation de l'expression du gène de la frataxine, bien que le mécanisme exact de cette régulation ne soit pas entièrement compris. C'est le cas de l'interféron gamma, qui augmente l'expression de la frataxine à la fois dans des modèles animaux et cellulaires de l'AF (Tomassini et al., 2012). Les effets très prometteurs de l'interféron gamma lui ont permis d'atteindre une étude clinique de phase III (efficacité et surveillance des effets indésirables). Malheureusement, ces essais n'ont pas montré d'amélioration significative des symptômes et ont été stoppés malgré l'absence de résultats complets (Lynch et al., 2019b). Un autre exemple est le cas de l'érythropoïétine (EPO) qui a été montrée comme augmentant l'expression de la frataxine chez un modèle murin ainsi que des cellules de sang de patient (Miller et al., 2017; Sturm et al., 2005b). Des analogues de l'EPO (*EPO-mimetics*), testés lors de plusieurs essais cliniques ont montré une capacité à augmenter l'expression de la frataxine et diminuer des marqueurs de stress oxydant, sans toutefois montrer un effet sur les mécanismes impactés dans l'AF ou sur la fonction neurologique (Boesch et al., 2007; Mariotti et al., 2012; Saccà et al., 2016).

Augmenter la quantité de frataxine dans les cellules peut également être accompli en inhibant sa dégradation. Afin de diriger une protéine à dégrader vers le protéasome, des protéines appelées *ubiquitine ligases* les lient à l'ubiquitine. Benini et collègues ont identifié le résidu de la frataxine primairement ciblé par l'ubiquitine (K147) et démontré que bloquer chimiquement l'ubiquitination à cette position pouvait augmenter la quantité de frataxine et restaurer certains défauts tels que l'activité de l'aconitase et la production d'ATP dans des modèles cellulaires de l'AF (Rufini et al., 2011, 2015). Par la suite, la même équipe a identifié la protéine la ligase E3 spécifique de la frataxine appelée RNF126 (Benini et al., 2017). Le

knock-down de RNF126 conduit à l'accumulation de la frataxine dans des fibroblastes de patients. Les molécules agissant en tant que compétiteurs de l'ubiquitine, stabilisant la frataxine, représentent donc en ce sens une stratégie thérapeutique à explorer.

6.5 Thérapies protéiques et géniques

Les thérapies basées sur le remplacement protéique ou génique sont très prometteuses. Elles consistent à ramener une protéine soit en apportant directement une version synthétique, soit en délivrant le gène aux cellules touchées. Ce genre de thérapie n'est pas compatible avec toutes les maladies génétiques. L'ataxie de Friedreich est une maladie provoquée par la baisse d'expression de la frataxine, due à une mutation dans une région non codante. Une expression résiduelle de la frataxine est toujours présente, et pour la majeure partie des patients, il s'agit d'une version non mutée de la frataxine. Simplement ramener de la frataxine pourrait suffire à rétablir le métabolisme des cellules. Le Dr. Mark Payne a été le premier à décrire la possibilité d'une thérapie de remplacement de la frataxine, via une frataxine synthétique associée à un système d'acheminement unique vers les mitochondries appelé TAT pour *Trans-Activator of Transcription* (Vyas et al., 2012). Les souris MCK-Cre, traitées à la TAT-FXN, ont une espérance de vie augmentée de 53% et une fonction cardiaque améliorée. De plus, les animaux traités ont une activité de l'aconitase augmentée dans le cœur par rapport aux non traités. Cette étude montre que le remplacement de la frataxine en utilisant la TAT-FXN est capable de reconstituer les enzymes à Fe-S. Plus récemment, les résultats d'une étude sur des cultures de neurones de DRG de rats montrent que la TAT-FXN permet de ralentir la dégénérescence et de réduire les marqueurs d'apoptose (Britti et al., 2018). L'enjeu principal de cette stratégie est de pouvoir apporter une quantité suffisante de frataxine et de cibler correctement les cellules d'intérêt. Néanmoins,

Les stratégies de thérapies géniques sont particulièrement prometteuses car elles permettent de résoudre en théorie les deux problèmes que sont le ciblage des cellules, et la quantité de protéine délivrée. En effet, la thérapie génique repose sur l'apport d'un gène par le biais de vecteurs viraux, sélectionnés soigneusement pour leur tropisme préférentiel vers les cellules d'intérêt. Une fois la cellule infectée, le gène codé par le matériel génétique du virus sera incorporé, et transcrit grâce à la machinerie de la cellule. Les premières études preuves de concepts ont été réalisées dans notre laboratoire, sous la direction du Dr. Hélène Puccio. Les chercheurs ont montré qu'une injection intra-veineuse d'un vecteur adéno associé ou AAV,

exprimant la frataxine humaine (AAV-CAG-*FXN*) était capable de restaurer complètement la fonction cardiaque chez la souris MCK-Cre (Perdomini et al., 2014). En quelques jours, le traitement s'est montré capable de renverser la cardiomyopathie des souris même après le début des symptômes. Des résultats similaires ont été obtenus par une autre équipe de recherche la même année (Gérard et al., 2014). Une étude complémentaire publiée par la suite montre qu'il suffit que 50% des cardiomyocytes soit infectés par les AAV-CAG-*FXN* suffisait à corriger la cardiomyopathie dans le même modèle (Belbellaa et al., 2019). Quelques années après, des résultats similaires ont été obtenus par la même équipe chez un modèle neurologique de l'AF : des souris ayant une délétion spécifique dans les neurones proprioceptifs de DRG, cellules de Pukinje et interneurons du cerveau (Pvalb-Cre). Le traitement par injection intraveineuse a permis de renverser complètement l'ataxie sensitive observée chez les souris non traitées (Piguet et al., 2018b). D'autres équipes s'intéressent à une stratégie de thérapie génique par le biais de vecteurs HSV (*Herpes simplex virus*), bien que ces études soient moins avancées que les stratégies par AAV (Ventosa et al., 2017). Ces résultats très encourageants démontrent que la thérapie génique pourrait devenir la stratégie la plus efficace dans le traitement de l'AF. Cependant, ces approches restent encore compliquées à mettre en place chez l'humain due à la quantité importante de vecteur viraux nécessaire pour traiter des adultes, et de par leur caractère irréversible qui demande donc une extrême vigilance quant à la toxicité sur le long terme.

Plusieurs équipes de recherches et groupes pharmaceutiques développent également des stratégies de thérapie génique innovantes, basées non pas sur l'utilisation de vecteurs viraux mais de nanosystèmes capables de délivrer le gène d'intérêt. Ces nanosystèmes consistent en des particules synthétiques capables de traverser la barrière hémato-encéphalique, permettant donc l'apport de l'ADN au système nerveux. Ces molécules génèrent également moins d'effets pro-inflammatoires que les particules virales. Une première étude, publiée en 2016, relate les effets bénéfiques sur les neurones sensitifs de DRG de l'apport d'un ARNm de frataxine encapsulé dans des nanoparticules lipidiques (Nabhan et al., 2016). Une étude récente propose une nouvelle stratégie grâce aux nanoparticules : les chercheurs sont parvenus à lier des plasmides codant pour la frataxine à des particules de formes multicouches de polymères (Czuba-Wojnilowicz et al., 2020). Ces particules ont permis d'augmenter l'expression de la frataxine dans des neurones dérivés d'IPSC de patients. Deux semaines après le traitement, la frataxine est toujours exprimée 1000 fois plus que dans le contrôle non traité. Cette stratégie très prometteuse offre, par rapport aux méthodes à ARNm, l'avantage d'une expression continue et donc de réduire le besoin de renouveler le traitement.

6.6 Autres stratégies thérapeutiques

6.6.1 Correction génétique

Avec l'avancée des technologies d'édition du génome telles que les nucléases à doigts de zinc, les TALENS et CRISPR-Cas9, l'idée d'une stratégie thérapeutique pour l'AF basée sur l'édition du génome a émergé. Théoriquement on peut envisager d'exciser l'expansion de répétitions GAA, et de remplacer ou non la portion d'ADN par une séquence de l'intron 1 de *FXN* sans répétitions délétères. Des études réalisées sur modèles cellulaires et murins ont d'ores et déjà montré que l'excision de ces triplets restaure la transcription de *FXN*, prouvant conjointement que la séquence de GAA est l'unique responsable de la baisse de transcription associée à l'AF (Li et al., 2015; Ouellet et al., 2017). Cependant, pour qu'une telle stratégie soit envisageable chez l'humain, il faut pouvoir emmener efficacement le système d'édition du génome par thérapie génique aux cellules cibles et s'assurer que le système ne montre aucun effet *off target*. Il sera également nécessaire de démontrer que l'excision d'une portion de l'intron 1 de la frataxine ne perturbe pas la régulation de la transcription et la maturation de l'ARN produit de ce gène excisé.

6.6.2 Oligonucléotides

Outre l'hétérochromatinisation du locus, l'expansion de triplets GAA induit la formation de boucles R (structure ternaire entre un hybride ADN:ARN et un ADN simple brin) altérant la transcription du gène (Bidichandani et al., 1998). Des oligonucléotides reconnaissant spécifiquement les répétitions GAA ont été développés afin de cibler l'expansion pathologique et prévenir la formation des boucles R (Li et al., 2016, 2018; Shen et al., 2018). Un traitement par ces oligonucléotides de fibroblastes de patients AF augmente significativement l'expression de la frataxine dans des fibroblastes (Li et al., 2016) ainsi que dans des lignées de progéniteurs neuronaux issus d'IPSC de patients (Shen et al., 2019).

6.7 Conclusion

Malgré l'absence de traitement pour les patients, de cure ou de ralentissement des symptômes, les chercheurs et groupes pharmaceutiques travaillent depuis de nombreuses années à développer des traitements efficaces pour l'ataxie de Friedreich. Chaque année de nouvelles stratégies prometteuses sont proposées et permutées en recherche clinique (**Figure 27**). Il est primordial que les différentes équipes de recherche travaillent au maximum en collaboration, en partageant les résultats des différentes études mais également en mettant à disposition les modèles animaux et cellulaires à la communauté, afin d'optimiser au mieux la recherche de traitements. Il est également essentiel qu'un maximum de patients s'enregistre dans les bases de données, et que ces bases soient mises en commun à l'échelle mondiale. Enfin, il est important que de nombreuses stratégies soient développées en parallèle, car il est très probable que seule la combinaison de plusieurs traitements puisse permettre une cure efficace de l'ataxie de Friedreich.

7 Les criblages de molécules thérapeutiques

7.1 High-throughput screening (HTS) et High-content screening (HCS)

7.1.1 Définitions

Les criblages à haut débit ou *high-throughput screening* (HTS) sont au cœur de la découverte de molécules thérapeutiques de l'industrie pharmaceutique, mais également de plus en plus au sein des laboratoires de recherche académique (Ohlmeyer and Zhou, 2010). Le HTS est une méthode permettant de tester des milliers de molécules rapidement et en parallèle, afin d'évaluer leur activité dans un ou plusieurs essais biologiques (Lederman, 2007). Les composants basiques des HTS sont la miniaturisation de l'essai, un système automatisé des étapes de transfert de liquide et de manipulation des supports, et la mise en place d'un *readout*, ou mesure quantitative automatisée de l'essai. Le développement des approches HTS a enfin pu être possible grâce aux progrès de la robotique qui ont permis l'automatisation et la miniaturisation des essais biochimiques et cellulaires. Il est important de différencier HTS de HCS ou *high-content screening*. Le principe de base est identique pour les deux techniques, c'est la nature de l'essai qui différencie les deux. Le terme HTS est le premier à avoir émergé, mais il est maintenant différencié du HCS car il fait référence aux criblages généralement basés sur des essais *in-vitro* « simples » tels que l'activité d'une enzyme. L'arrivée des technologies automatisées de microscopie et d'analyses d'images ont permis l'émergence des criblages à haut contenu ou HCS. Les HCS se différencient de par la complexité des essais, basés sur l'imagerie, et permettant d'étudier des procédés biologiques subcellulaires. En général, la quantité d'informations générée par ces criblages est bien supérieure, sacrifiant parfois le très haut débit que l'on peut atteindre en HTS (Varma et al., 2011).

Pour n'importe quel HTS ou HCS, l'une des étapes initiales et des plus critiques est le choix du *readout* ou *assay endpoint*. Il correspond à la méthodologie d'essai et les paramètres expérimentaux scientifiquement valides et robustes, choisis pour attester de la capacité d'une molécule à améliorer un phénotype. Il est important de rechercher un *readout* reflétant au mieux que possible un mécanisme associé à la maladie étudiée, tout en pouvant être miniaturisé et rendu compatible avec l'automatisation (Woodward et al., 2006). Le choix de l'essai peut être compliqué par le manque de compréhension du processus exact de la maladie ou la possibilité de générer un modèle qui récapitule tous les aspects d'une maladie complexe. Ainsi, il existe systématiquement une balance entre complexité et capacité de criblage à prendre en compte.

7.1.2 Les banques de molécules

Les composés pharmacologiques peuvent se diviser en deux catégories basées sur leurs activités : les composés avec activité biologique connue, et ceux pour lesquels l'activité n'est pas connue. Parmi les composés à activité biologique connue se trouvent les molécules approuvées par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux ou *Food and Drug Administration* (FDA) (Ashburn and Thor, 2004). Cet ensemble de composés est attrayant dans les criblages car on dispose de nombreuses informations concernant leurs propriétés biologiques et pharmacologiques. De ce fait, les composés actifs de cette banque retenus à l'issue des criblages (*hits*), peuvent rapidement évoluer vers des études cliniques. Parmi ces collections de molécules, on peut donner l'exemple de la *Prestwick Chemical Library* (Prestwick Chemical, 1520 molécules) et de la LOPAC®1280 (Library of Pharmacologically Active Compounds, Sigma-Aldrich, 1280 molécules) (Varma et al., 2011). De nombreuses banques sont assemblées par différentes compagnies et institutions. Ces banques sont utilisées dans l'hypothèse que les molécules puissent cibler un mécanisme différent de celui pour lequel elles ont été développées initialement. On parle de repositionnement (*drug repositioning*) : certains médicaments déjà validés par la FDA peuvent être utilisés pour traiter d'autres maladies (Ashburn and Thor, 2004). L'inconvénient de ces banques est la gamme limitée de mécanismes biologiques pouvant être ciblés, en comparaison avec des banques comprenant des centaines de milliers de molécules. Néanmoins, ces banques restent le premier choix dans les études de criblages issues des laboratoires de recherche académique.

Les criblages à très haut débit sont souvent réalisés à une concentration unique en plusieurs réplicats : typiquement 10 μM pour des banques de plusieurs milliers, et 2 μM pour des centaines de milliers (Varma et al., 2011). Une stratégie est également de tester de plus petites collections, à plusieurs concentrations.

7.1.3 Développement d'un essai : choix du *readout* et indicateurs de confiance

Les criblages peuvent être basés sur des expériences *in vitro*, cultures de cellules ou organismes entiers. La molécule est ajoutée dans un système très miniaturisé, et sa capacité à faire varier des paramètres biologiques clés de ce système est évaluée par un essai automatisé. Cette expérience et son résultat constituent le *readout* (Inglese and Auld, 2008). Il peut s'agir d'acquisitions simples de fluorescence, luminescence ou absorbance, mais également plus complexes telles que l'analyse morphométrique de composants cellulaires, acquisition de signal

issus de compartiments intracellulaires, etc. Il est important que le *readout* reflète simplement et efficacement le mécanisme que l'on souhaite cibler. Un élément clé dans le design d'un *readout* est l'adaptation au haut débit, en le miniaturisant au possible. Cette étape passe impérativement par l'optimisation de nombreux paramètres du système, tels que le choix des plaques, la densité des cellules, le *coating* (revêtement du fond des puits de culture), le choix du milieu de culture, la concentration des drogues et réactifs, la manipulation des solutions (changements de milieu, étapes de lavages), etc.

Il est impératif de déterminer si l'essai en développement est compatible avec le haut débit. Pour cela, il doit être hautement reproductible, avec le moins de variabilité possible et montrer de larges dynamiques entre les contrôles positifs et négatifs. Dans ce but Zhang, Chung et Oldenburg ont établi un indicateur de confiance nommé *Z' factor* (Zhang et al., 1999). Ce facteur, dont la valeur dépend strictement des variations de signal entre les contrôles positifs et négatifs, peut être considéré comme un indicateur global de la qualité de l'essai. Il est défini par la relation suivante :

$$Z' = 1 - \frac{3 \times (SD_p + SD_n)}{1 - (Valeur_p - Valeur_n)}$$

Où SD définit l'écart type

p correspond au contrôle positif

n correspond au contrôle négatif

Selon la valeur du facteur *Z'* obtenue on estime la qualité d'un criblage HTS :

$1 > Z' \geq 0.7$ le criblage est d'excellente qualité

$0.7 > Z' \geq 0.5$ le criblage est bon

$0.5 > Z' > 0$ acceptable, mais dans le cas d'essais complexes (Varma et al., 2011)

Un *Z' factor* négatif est considéré inacceptable, car le bruit de fond est trop important comparé à la variabilité entre les mesures (Zhang et al., 1999).

7.1.4 Sélection et validation des *hits*

Les données issues des différentes acquisitions doivent être normalisées, afin d'être comparables entre elle. Une fois la normalisation faite, on procède à une recherche de composés prometteurs ou *hits*. Ces composés, sélectionnés lors de ce criblage primaire, doivent être étudiés dans des phases subséquentes, notamment dans des expériences de dose-réponse, qui

serviront à valider l'effet observé en criblage (Inglese and Auld, 2008). De manière générale, la sélection des hits se fait en établissant une valeur seuil au-dessus de laquelle on considère qu'un composé a eu un effet significatif. Tous les composés montrant un signal supérieur à cette valeur sont donc sélectionnés pour des études complémentaires. Il est communément accepté qu'on peut attendre entre 0,01 et 0,1% de *hits* parmi les molécules testées (Woodward et al., 2006).

7.2 Criblages sur cultures primaires de neurones ou différenciés à partir d'IPSC

En épluchant la bibliographie, on remarque qu'une quantité non négligeable de criblages pharmacologiques ont été réalisés sur des cultures de neurones ces dernières années. J'ai référencé en **Tableau 5**, la liste des criblages sur neurones en culture que j'ai pu relever dans la bibliographie. Développer une stratégie de criblage en prenant comme modèle des cultures primaires de neurones peut relever d'un challenge en fonction du type de neurones et de leurs propriétés. Ces cellules sont sensibles à de nombreux facteurs propres à la culture tels que la composition du milieu, les variations de pH et de température, le format des supports utilisés en criblage, l'adhésion dans les puits de culture, etc. Certaines cultures sont plus répandues dans les études de criblages : par exemple les neurones corticaux dû à leur facilité de culture par rapport notamment aux neurones sensitifs de DRG. Une fois que les conditions de cultures sont établies, le facteur de reproductibilité des *assays* entre en jeu. En effet, l'utilisation de cellules issus d'animaux implique une certaine variabilité entre les cultures. Malgré cela, des équipes sont parvenues à réaliser des criblages pharmacologiques sur neurones primaires en utilisant des banques de molécules plus ou moins grandes (**Tableau 5**). Une autre stratégie consiste à utiliser des neurones différenciés à partir de lignées d'IPSC. Cette approche est très prometteuse d'une part car elle permet en théorie de cibler n'importe quel type cellulaire, qu'elle respecte la génétique des patients, et qu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'animaux. Cette technique permet également de travailler sur des cellules humaines, ce qui est impossible dans l'étude de nombreuses maladies et en particulier les maladies neurodégénératives où les cellules primaires affectées ne peuvent en aucun cas être samplées sur patient vivant. La principale difficulté de ces cultures est de pouvoir s'assurer de la qualité de la différenciation : rendement de cellules différenciées dans la culture et spécificité des cellules différenciées. La recherche sur les IPS de ces dernières années a permis une amélioration très rapide de ces deux composantes, et l'on voit maintenant de plus en plus de recherches utilisant des cultures très

efficacement et spécifiquement différenciées. Il sera également essentiel que la communauté scientifique s'accorde sur des protocoles communs de différenciation afin de travailler sur des bases similaires. J'ai listé en **Tableau 5** les études où ont été réalisés des criblages sur neurones différenciés à partir d'IPSC.

	Référence	Type cellulaire	Readout	Taille banque
Neurones dérivés d'IPSC	Ryan et al., 2016	Neurones génériques	Croissance axonale	80
	Boissart et al., 2013	Neurones corticaux	Différenciation et croissance	130
	Wang et al., 2017	Neurones corticaux	Niveaux protéine Tau	1280
	Wang et al., 2017	Neurones corticaux	Niveaux protéine Tau	1280
	Stacey et al., 2018	Neurones sensitifs	Calcium imaging	2700
	Sherman et Bang, 2018	Neurones génériques	Croissance axonale	3000
	Traub et al., 2017	Neurones génériques	Expression TrkC	3200
	Kaufmann et al., 2015	Neurones génériques	Activation épigénétique de Fmr1	50.000
Cultures primaires de neurones	Varkuti et al., 2020	Neurones hippocampaux souris	Phénotype mitochondrial	67
	Chen et al., 2015	Neurones corticaux de rat	Viabilité et croissance	213
	Frey et al., 2018	Neurones de DRG (4-6 DIV) de souris	Croissance axonale	480
	Lariosa-Willingham et Leonoudakis, 2018	Neurones corticaux de rat	Myélinisation	700
	Lariosa-Willingham et al., 2016	Neurones corticaux de rat	Myélinisation	727
	Rudhard et al., 2015	Neurones de DRG (4 DIV) de rat	Croissance axonale	871
	Mendes et al., 2020	Neurones hippocampaux souris	Niveaux protéine Tau	1100

Tableau 5 : Liste des criblages à moyen/haut débit sur culture de neurones relevés dans la littérature

7.3 Les criblages effectués dans le cadre de l'ataxie de Friedreich

Afin d'identifier des molécules à visée thérapeutique pour l'AF, plusieurs criblages à haut ou moyen débit ont été réalisés aussi bien en recherche privée que publique. Malheureusement, je ne pourrai discuter ici que des études effectuées par les laboratoires de recherche publique. La majorité des criblages effectués ont pour but d'identifier des composés capables d'augmenter l'expression de la frataxine, dans le contexte génétique des patients AF. Des lignées cellulaires humaines avec une construction rapportrice de l'expression de la frataxine associée au locus avec expansions de GAA ont été utilisées pour des criblages pharmacologiques (Grant et al., 2006; Li et al., 2013; Lufino et al., 2013), et ont permis d'identifier quelques composés tels que le resvératrol et la pentamidine. Une récente étude, utilisant une approche de construction sans l'expansion de GAA a montré que l'etravidine augmente la traduction de l'ARNm de la frataxine (Alfedi et al., 2019). On compte très peu de criblages ayant un *readout* différent de l'expression de la frataxine. Certains criblages utilisent

pour *readout* la prolifération des cellules : une étude de notre laboratoire sur fibroblastes transfectées avec des shRNA contre la frataxine (Calmels et al., 2009b), et sur fibroblastes de patients (Sahdeo et al., 2014). Un criblage sur levures déplétées en frataxine a évalué le potentiel d'une large banque a restaurer la fonction des mitochondries (Cotticelli et al., 2012). On remarque que ces criblages reposent entièrement sur l'utilisation de modèles ayant un faible phénotype et/ou manquant la spécificité tissulaire. Ce constat s'explique de par la complexité de culture des types cellulaires primairement affectés qui rendent compliqué le développement de stratégies de criblages à haute ou moyenne échelle. Cependant des stratégies utilisant des modèles plus poussés commencent à apparaître avec notamment un récent crible à débit moyen a été réalisé sur un modèle cardiaque de drosophile (Palandri et al., 2018b). De ce que nous savons, jamais un criblage à haut débit n'a été réalisé sur neurones sensitifs déficients en frataxine, le type cellulaire primairement affecté dans l'AF. C'est la raison pour laquelle j'ai décidé de lancer un projet de criblage sur le modèle que j'ai étudié pendant ma thèse.

8 La voie de l'AMPK

Afin de faire face à leurs besoins énergétiques et répondre à la disponibilité des nutriments, les cellules adaptent constamment leur métabolisme. Lorsque les niveaux d'ATP baissent, il est essentiel que les cellules puissent minimiser leur consommation d'énergie afin d'éviter l'épuisement de leurs ressources énergétiques. Afin de restaurer les réserves d'énergies, les cellules doivent entreprendre des réponses immédiates telles que l'augmentation de l'import des nutriments, l'activation de mécanismes alternatifs de production d'énergie ou la dégradation en nutriments de macromolécules. Les eucaryotes ont développé un système sophistiqué de détection du niveau d'ATP via le complexe de l'AMPK ou AMP-activated protein kinase. L'AMPK a la capacité de sentir la quantité d'énergie disponible dans la cellule en fixant directement les nucléotides adényliques (Crozet et al., 2014). Lors de perturbation des ratios ATP/ADP ou ATP/AMP, l'AMPK est activée par un mécanisme allostérique stimulant son activité de kinase (Gowans et al., 2013). Une fois activée, l'AMPK a pour but de reprogrammer le métabolisme de la cellule de l'anabolisme vers le catabolisme, c'est à dire inhiber les mécanismes consommateurs d'énergie pour favoriser les mécanismes en produisant. Cette reconversion s'exécute à travers le contrôle de multiples voies telles que la croissance et traduction des protéines, à travers la phosphorylation du complexe mTOR 1 (mTORC1) (Gwinn et al., 2008), le métabolisme des lipides (Watt et al., 2006), le métabolisme du glucose (Sakamoto and Holman, 2008), l'homéostasie mitochondriale (Jäger et al., 2007) et l'autophagie (Kim et al., 2011) (**Figure 28A**).

8.1 Structure de l'AMPK et activation

8.1.1 Structure

L'AMPK est un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité α catalytique et de deux sous-unités régulatrices β et γ (**Figure 28A**). La sous-unité α contient un domaine kinase et un résidu critique, Thr172, phosphorylé par une kinase en amont. La sous-unité γ permet à l'AMPK de répondre aux changements dans les ratios ATP/AMP (Hardie et al., 2012). La fixation de l'AMP, ainsi que de l'ADP dans une moindre mesure, à la sous-unité γ permet la stimulation de l'activité de l'AMPK (**Figure 28A**) (Gowans et al., 2013).

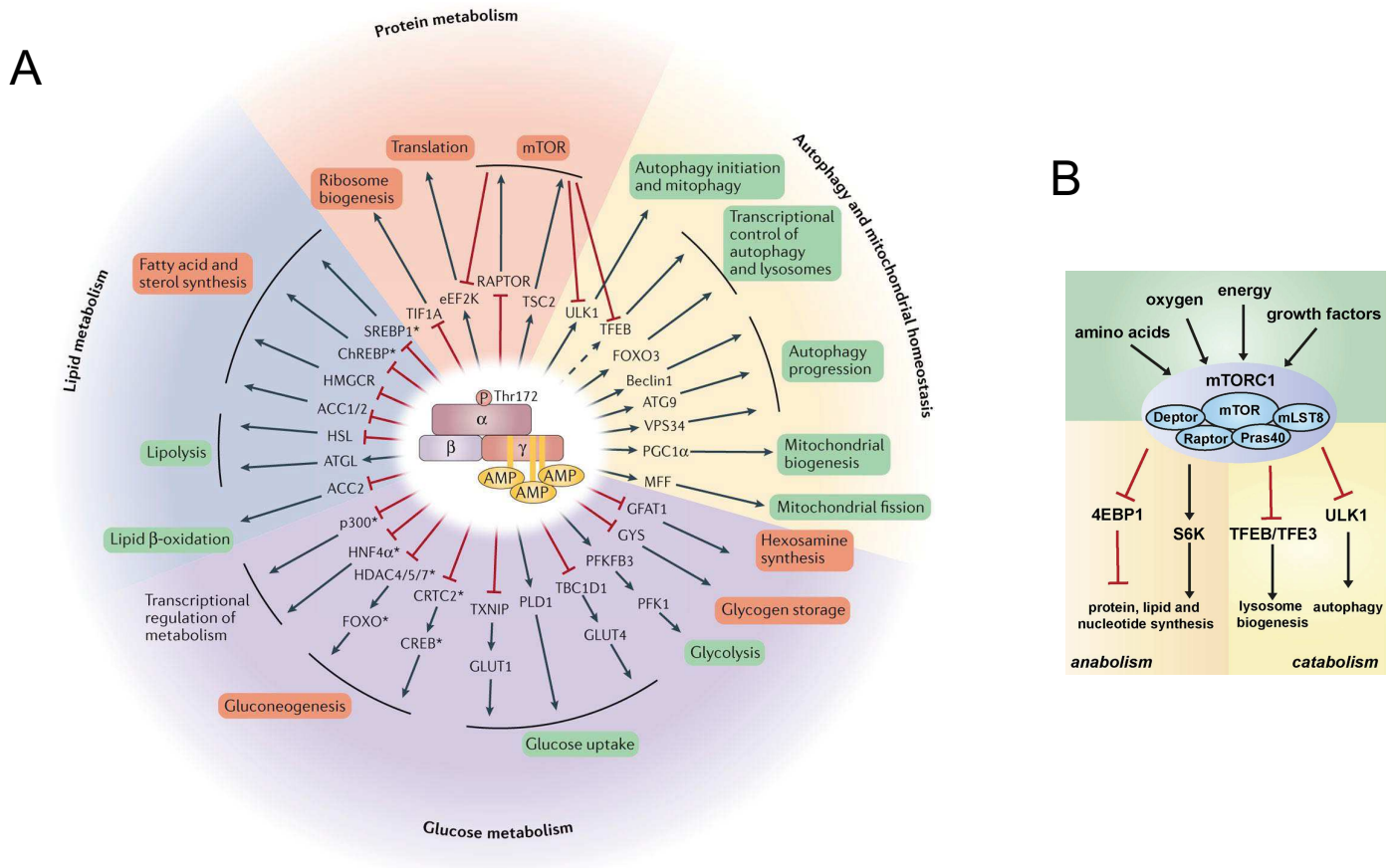


Figure 28 : Régulation du métabolisme par l'AMPK et mTORC1

(A) Une fois activée, l'AMPK phosphoryle des cibles clés du métabolisme. Les cibles directes de l'AMPK sont montrées dans le premier cercle autour de l'AMPK. Les flèches indiquent si la phosphorylation est activatrice (noires) ou inhibitrice (rouges) pour les protéines ciblées. Le cercle suivant indique le processus dans lequel chaque cible est impliquée, et la couleur du rectangle si le processus est inhibé (rouges) ou activé (verts). ChREBP, carbohydrate-responsive element-binding protein; CREB, cAMP response element-binding protein; FOXO, forkhead box protein O; HDAC, histone deacetylase; HMGCR, HMG-CoA reductase; HNF4 α , hepatocyte nuclear factor 4 α ; MFF, mitochondrial fission factor; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α ; PLD1, phospholipase D1; SREBP1, sterol regulatory element-binding protein 1; TFEB, transcription factor EB. Issu de Herzig and Shaw, 2018. (B) L'activation de mTORC1 régule plusieurs processus affectant le métabolisme des cellules. mTORC1 inhibe l'autophagie et la biogénèse lysosomale en inhibant respectivement l'activité de ULK1 et de TFEB (transcription factor EB). mTORC1 stimule la croissance cellulaire en favorisant des voies biosynthétiques telles que la synthèse des protéines, des lipides et des nucléotides, en inhibant 4EBP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1) et activant P70S6K (P70-S6 Kinase 1). Issu de Rabanal-Ruiz et al., 2017.

8.1.2 Activation

Le complexe de l'AMPK est activé principalement par une phosphorylation par une kinase située en amont, sur le résidu Thr172. La majorité de l'activation en condition de stress énergétique est réalisée par la kinase LKB1 (Liver kinase B1) (Shackelford and Shaw, 2009). Cependant, l'AMPK peut également être phosphorylée au résidu Thr172 en réponse au flux de calcium par la kinase calcium-sensible CAMKK2 (Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase Kinase 2) (Hurley et al., 2005). L'augmentation des niveaux intracellulaires de calcium activent CAMKK2 et mènent à une activation indépendante de LKB1.

8.2 Régulation du métabolisme par l'AMPK

Lors d'un stress énergétique, l'AMPK phosphoryle des facteurs clés impliqués dans de multiples voies afin de restaurer l'équilibre énergétique. L'effet de l'AMPK sur le métabolisme peut être divisé en deux catégories : l'inhibition de voies anaboliques afin de minimiser la consommation d'ATP, et la stimulation des voies cataboliques afin d'activer la génération d'ATP.

8.2.1 Inhibition des voies anaboliques

L'AMPK inhibe la synthèse des lipides et des stérols à travers la phosphorylation inhibitrice des carboxylases de l'acétyl-Coa ACC1 et ACC2 (O'Neill et al., 2014) (**Figure 28A**), essentiels à la première étape de la synthèse *de novo* des lipides, et de l'HMG-CoA réductase (HMGCR), qui catalyse l'étape limitante de la production du cholestérol (Carling et al., 1987) (**Figure 28A**). La croissance des cellules et la traduction des protéines sont des mécanismes très énergivores. L'AMPK régule donc ces voies grâce à la modulation de mTOR, un modulateur majeur de la croissance cellulaire. L'inhibition de la voie mTOR passe à travers deux mécanismes indépendants : activation de l'inhibiteur de mTOR TSC2 ou Tubérine (**Figure 28A**), et l'inhibition de la sous-unité de mTORC1, RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR) (Gwinn et al., 2008) (**Figure 28A**). La baisse d'activité de mTOR mène à une baisse de la croissance cellulaire et de la synthèse protéique, notamment à travers l'inhibition des voies P70S6K et 4EBP1 (Rabanal-Ruiz et al., 2017) (**Figure 28B**).

8.2.2 Stimulation des voies cataboliques

8.2.2.1 *Utilisation du glucose et des lipides*

Afin de restaurer les réserves d'ATP, l'AMPK stimule activement le catabolisme des macromolécules. Elle stimule par exemple l'utilisation du glucose en phosphorylant des cibles impliquées dans le trafic des transporteurs de glucose tels que GLUT1 et GLUT4 afin d'augmenter l'import de glucose dans les cellules (Wu et al., 2014). De plus, l'AMPK conduit également les cellules à utiliser leurs réserves en lipides, en stimulant des lipases telles que ATGL (adipose triglycérade lipase) afin de générer des acides gras à partir des réserves de triglycérides, qui sont ensuite importés dans les mitochondries et entrent la voie de la β -oxydation (Ahmadian et al., 2011).

8.2.2.2 *Régulation de l'autophagie et la mitophagie*

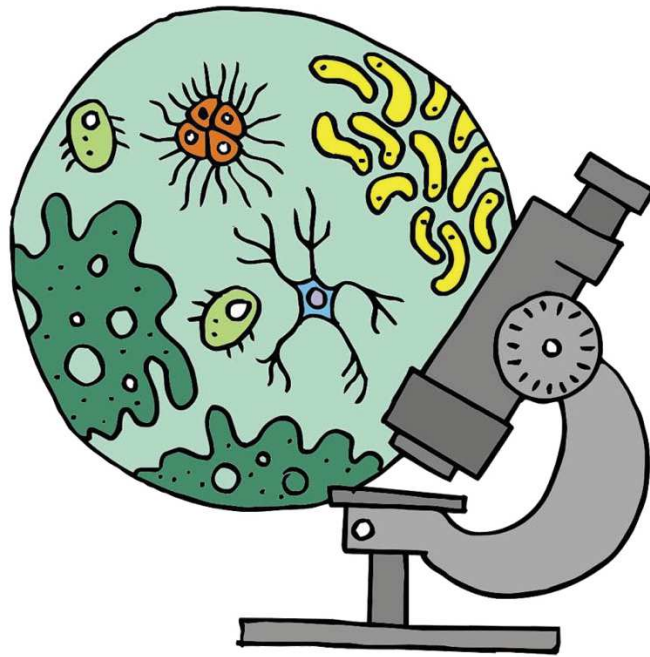
L'autophagie est un procédé par lequel les composants cellulaires ou cargos, tels que les protéines, la macromolécules, les organites et les pathogènes sont recyclés par une machinerie cellulaire spécialisée. Cette machinerie régit l'adressage des cargos à des structures membranaires appelés autophagosomes, leur fusion avec les lysosomes (autophagolysosomes) et leur dégradation (Bento et al., 2016). La machinerie de l'autophagie implique plusieurs complexes multi-protéiques et l'AMPK régule plusieurs aspects de ce mécanisme.

L'autophagie sert principalement deux fonctions distinctes : le recyclage des molécules vieillissantes ou endommagées, et la reconstitution des réserves d'énergie. Ces deux mécanismes sont similaires dans leur exécution mais diffèrent dans la manière dont ils sont initiés. Alors que le recyclage des cargos est un procédé continu de la cellule, l'induction de l'autophagie pendant des périodes de stress énergétique implique une voie régie par la perception des nutriments et contrôlée par mTORC1. Lors d'un manque de nutriments, mTORC1 est inactivé, enlevant la phosphorylation inhibitrice sur ULK1 (Ser757) (Unc-51 like autophagy activating kinase), une kinase essentielle à l'induction de l'autophagie (Kim et al., 2011). mTORC1 phosphoryle également et inhibe d'autres composants du mécanisme de l'autophagie tels que ATG14L (ou Barkor) et ATG13, une protéine interagissant avec ULK1 (Park et al., 2016; Puente et al., 2016). Quand activé, ULK1 phosphoryle plusieurs protéines impliquées dans l'exécution de l'autophagie, tels que FIP200, ATG101 (Egan et al., 2015), ATG13 (Joo et al., 2011) et Beclin-1 (Russell et al., 2013).

L'AMPK contrôle l'autophagie à diverse étapes. Premièrement, l'AMPK phosphoryle directement le régulateur amont de mTOR, TSC2, aux résidus Thr1227 et Ser1345 (Inoki et al., 2003), et la sous-unité RAPTOR de mTORC1 sur les résidus Ser722 et Ser792 (Gwinn et al., 2008). Chacune de ces phosphorylations participe à réduire l'activité de mTOR en condition de stress énergétique. L'AMPK active ULK1 en le phosphorylant sur au moins quatre résidus : Ser467, Ser555, Thr574 et Ser637 (Egan et al., 2011). L'activation de ULK1 par l'AMPK joue un rôle essentiel dans le recyclage des mitochondries, appelée mitophagie. En particulier, il a été montré que la phosphorylation de ULK1 en Ser555 régule le recrutement de ULK1 aux mitochondries pendant la mitophagie (Tian et al., 2015).

8.2.3 AMPK et biogénèse des mitochondries

La biogénèse mitochondriale a lieu en réponse d'une forte dépense énergétique afin de produire plus d'ATP. Elle se déroule via la croissance et la division des mitochondries préexistantes. Ainsi la masse mitochondriale augmente. La biogénèse des mitochondries requiert la hausse des protéines mitochondriales ainsi que de la production et le transfert des lipides, pour subvenir à l'augmentation des membranes internes et externes (Zhang and Xu, 2016). La régulation de l'AMPK sur ce mécanisme passe principalement par l'activation de PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α) (Wu et al., 1999), un régulateur majeur de la biogénèse mitochondriale. L'AMPK active PGC1 α en le phosphorylant notamment aux résidus Thr177 et Ser538 (Jäger et al., 2007).



RESULTATS

1 Objectifs du travail de thèse

A mon arrivée au laboratoire, un certain nombre d'aspects de la physiopathologie de l'AF ont été caractérisés grâce aux études notamment sur les tissus de patients, les modèles de levures déplétées en frataxine et modèles murins conditionnels (voir introduction, partie 5). Cependant, les données concernant la neurophysiopathologie sont moins claires. Notamment, les mécanismes associées à la perte de la frataxine dans les neurones proprioceptifs de DRG ne sont pas connus. En cause, la faible quantité de ces cellules au sein du DRG et leur difficulté d'accessibilité pour réaliser des analyses spécifiques. Le laboratoire a donc entrepris de générer un modèle de neurones de DRG de souris dans le but de répondre à plusieurs questions :

- Peut-on retrouver les éléments caractéristiques de l'AF dans ces cellules : perte des Fe-S, perte d'activité mitochondriale et dérégulation du métabolisme du fer, avec accumulation de fer mitochondrial ?
- Existe-il une sensibilité au stress oxydant dans ce type cellulaire ?
- Comment expliquer la sensibilité spécifique des neurones proprioceptifs à la perte de la frataxine, un gène d'expression ubiquitaire ?
- Quelles sont les voies moléculaires dérégulées suite à la déplétion en frataxine dans les neurones proprioceptifs ?

Le travail de thèse a donc pour but de caractériser le modèle développé, et répondre à ces questions.

En parallèle, le modèle sera utilisé pour développer une approche de criblage de molécules thérapeutiques.

2 Publication du chapitre « Griso and Puccio, 2020 »

2.1 Sujet traité dans la publication

Le papier présenté est « Primary Cultures of Pure Embryonic Dorsal Root Ganglia Sensory Neurons as a New Cellular Model for Friedreich's Ataxia ». Il s'agit d'un protocole détaillé des cultures primaires de neurones de DRG et l'établissement du modèle de déplétion de la frataxine dans ces cultures. Cette publication est un chapitre du livre « Trinucleotide Repeats: Methods and Protocols », édité par Guy-Franck Richard, et publié en 2020 par Humana, New York.

2.2 Publication



Primary Cultures of Pure Embryonic Dorsal Root Ganglia Sensory Neurons as a New Cellular Model for Friedreich's Ataxia

Olivier Griso and H el ene Puccio

Abstract

Peripheral neuropathies can have various origins, from genetic to acquired causes, and affect altogether a large group of people in the world. Current available therapies aim at helping the disease symptoms but not to correct or stop the development of the disease. Primary neuronal cultures represent an essential tool in the study of events related to peripheral neuropathies as they allow to isolate the affected cell types, often originating in complex tissues in which they account for only a few percentage of cells. They provide a powerful system to identifying or testing compounds with potential therapeutic effect in the treatment of those diseases. Friedreich's ataxia is an autosomal recessive neurodegenerative disorder, which is characterized by a progressive spinocerebellar and sensory ataxia. Proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia (DRG) are the primary affected cells. The disease is triggered by a mutation in the gene *FXN* which leads to a reduction of the frataxin protein. In order to study the neurophysiopathology of the disease at the cellular and molecular levels, we have established a model of primary cultures of DRG sensory neurons in which we induce the loss of the frataxin protein. With such a model we can alleviate the issues related to the complexity of DRG tissues and low amount of sensory neuron material in adult mouse. Hereby, we provide a protocol of detailed and optimized methods to obtain high yield of healthy mouse DRG sensory neuron in culture.

Key words Dorsal root ganglia, Primary cultures, Sensory neurons, Friedreich's ataxia, AAV vectors

1 Introduction

Dorsal root ganglia (DRG) sensory neuron cell cultures are an important tool for studies aiming at unveiling pathophysiological mechanisms underlying peripheral nervous system (PNS) diseases also known as peripheral neuropathies [1]. They also represent a reliable system to identify and validate new compounds with potential therapeutic effect to design treatment strategies for these diseases. The PNS includes the sensory, motor and autonomic nerves located outside the brain and spinal cord [2]. Although every component of

the PNS can be affected in peripheral neuropathies, the sensory neurons are often the primary and more severely affected sites, and the causes of peripheral neuropathies can be genetic or acquired [1]. They include diabetes associated neuropathy [3], viral infections such as human immunodeficiency virus (HIV) (such as distal symmetric polyneuropathy or DSP, antiretroviral toxic neuropathy or ATN) [4], autoimmune conditions (such as chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy or CIDP) [5], hereditary demyelinating neuropathies (such as Charcot Marie Tooth disease type 1A or CMT1A) [6], or toxic chemotherapeutic agents (following antineoplastic therapy for example) [7]. They also include genetically acquired neurodegenerative disorder such as Friedreich's ataxia.

Friedreich's ataxia (FA) is an autosomal recessive neurodegenerative disorder, characterized by a progressive spinocerebellar and sensory ataxia associating hypertrophic cardiomyopathy [8, 9]. At the neurologic levels, the primary affected sites include proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia (DRG), the spinal cord and the dentate nucleus of the cerebellum [10, 11]. The major FA-causing mutation corresponds to a GAA expansion in the first intron of the FXN gene, which leads to the reduced expression of frataxin, a mitochondrial protein involved in iron-sulfur (Fe-S) cluster biosynthesis [12]. Varying from 60 to 1700 repeats, the expansion causes a decreased transcription of the gene, most probably via locus heterochromatinization [13]. The patients express only between 5% and 30% of the normal levels [14].

The events of the physiopathology of FA are well described in heart tissue from patients [15], or cardiomyocytes from cardiac-specific mouse models [16], due to the large size of the cardiac tissue, the high number of affected cell in this tissue, giving a high quantity of material for cellular and biochemical analysis. The difficulty in studying neuronal phenotype at the cellular and molecular level is that affected cells are isolated and diluted in complex tissues comprising several cell types. DRG comprises specialized neuronal subtypes with unique molecular characteristics, including small diameter nociceptive neurons (TrkA⁺), larger diameter mechanoreceptive neurons (TrkB⁺ and/or TrkC⁺) and large proprioceptive neurons (TrkC⁺). Sensory neurons only represent 15% of the total DRG cells, the other being glial cells [2]. Molecular biology and biochemical approaches such as Western blot, qPCR and enzymatic activity measurements normally used to evaluate Fe-S deficiency, cellular iron dysregulation and mitochondrial activity impairments are not easily applicable in this context, especially due to low material quantity available in DRG neurons [17]. Therefore, data concerning FA neurophysiopathology are limited. Thus, the mechanisms underlying the neurodegeneration and in particular the tissue-specificity in FA are still unknown.

Many efforts have been made in generating partial depletion models with a reduction of frataxin levels closer to what is observed in patients. Several GAA repeat expansion-based mouse models

were generated [18, 19], as it is the causative mutation of FA [20]. However, none of them show a robust phenotype, contrarily to the clear, severe and reproducible phenotypes observed in the conditional models (full deletion) [16, 17, 21, 22]. This is mainly due to the fact that GAA repeat expansions are very unstable through cell divisions, and only 200 GAA repeats could be inserted in an attempt to reproduce the transcription decrease seen in FA patients (KIKO model, YG8R and YG22R models [18, 19]).

We have recently established a new neurologic cellular model of Friedreich’s ataxia based on mouse primary cultures of DRG sensory neurons from the conditional model that allows the full depletion of frataxin. As the full KO is lethal for any dividing cell, it has to be induced after embryonic development. In this model, frataxin deletion is induced by infecting the cells by AAV9 vectors bearing the Cre recombinase gene, allowing to excise an essential exon from the FXN gene, leading to a total frataxin deficiency (Fig. 1). The following chapter contains our protocol for mouse DRG primary cultures of pure sensory neurons. Although our model consists of full knock out following AAV vectors expression, this protocol can be applied to every mouse model including the GAA repeat expansion-based model.

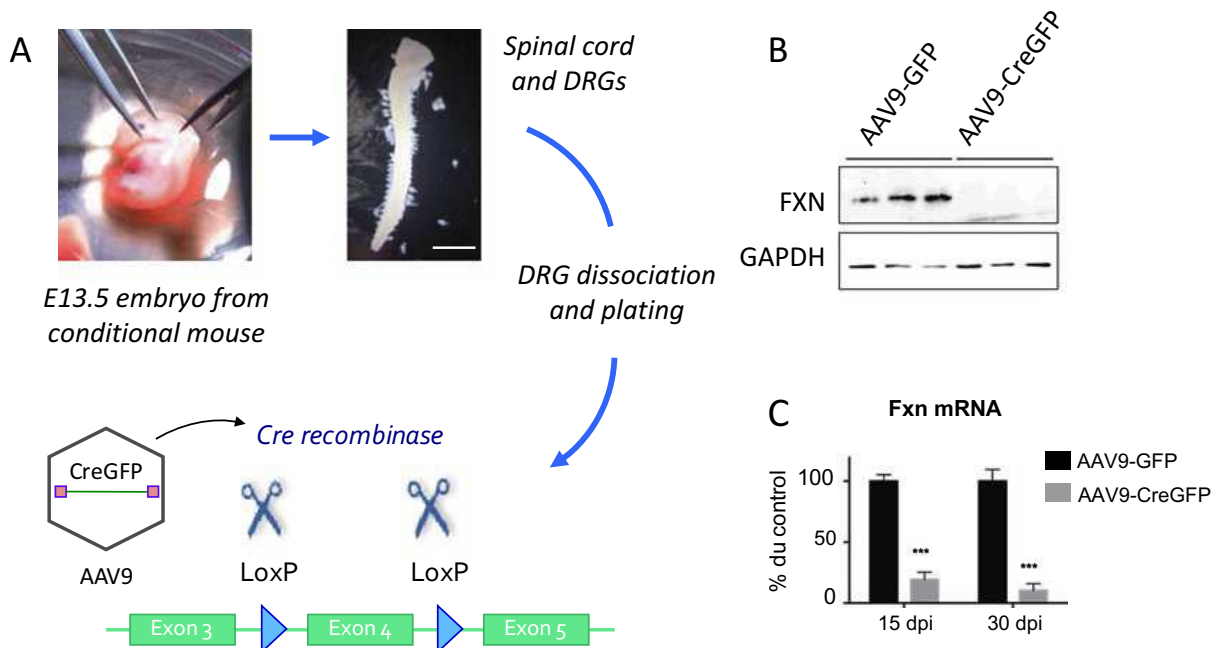


Fig. 1 DRG sensory neuron primary cultures as a model of Friedreich’s ataxia. (a) Dorsal root ganglia (DRG) are collected on E13.5 mouse embryo, dissociated, and the cell suspension it plated. Following cell attachment to the bottom of the plate, infection with an AAV9 viral vector is performed. Once the viral genome is delivered into the cell, the Cre recombinase is expressed, excising the exon 4 of the gene FXN. Western blot (b) and qPCR (c) results confirming depletion of frataxin both at the protein and the mRNA levels in cells infected with an AAV9-CreGFP vector. The reminiscent expression corresponds to noninfected cells. The AAV9-GFP infected cells correspond to the wild type (WT). *** $p < 0.001$ (student test); scalebar = 200 μ m

2 Materials

2.1 Coating of Cell Culture Systems

1. Tissue culture dish 35 × 10 mm style.
2. Multidish PS 4 well nunclon round.
3. Nunclon 4-Well × 1mL MultiDish cell culture dish.
4. 13 mm sterile coverslips.
5. Poly-L-lysine hydrobromide.
 - (a) Solution A: 0.1 mg/mL in ultrapure water.
 - (b) Solution B: 0.01 mg/mL in ultrapure water.
6. Collagen Type I.
 - (a) Solution C: 0.67 mg/mL in ultrapure water with 1/500 acetic acid dilution.
7. Laminin: 3.3 µg/mL in ultrapure water (solution D).
8. Matrigel™ HESC QUALIFIED MATRIX: 1/40 diluted in C-medium (solution E).
9. Glacial acetic acid.
10. Ammonium hydroxide.
11. Sterile gauze compresses.
12. Standard height, nunclon delta treated square BioAssay dish.
13. Parafilm® M.

2.2 Media Preparation

1. Minimum essential medium.
2. Neurobasal™-A medium, no D-glucose, no sodium pyruvate.
3. B-27™ supplement (50×), serum free.
4. Fetal Bovin serum.
5. L-Glutamine 100×.
6. D-Glucose.
7. Nerve growth factor 2.5S.
8. Penicillin/Streptomycin 100×.
9. 5-fluoro-2'-deoxyuridine.
10. Uridine.
11. C-medium: 430 mL MEM, 50 mL FBS, 5 mL P/S (100×), 5 mL L-glutamine (100×), 2 g of D-glucose in 10 mL MEM (4 g/L final), 50 nM NGF.
12. NB medium: 470 mL Neurobasal without Glucose and pyruvate, 5 mL P/S (100×), 5 mL L-glutamine (100×), 2 g of D-glucose in 10 mL MEM (4 g/L final), 50 nM NGF.
13. Antimitotic cocktail 1000×: 5 mL MEM, FUdR 12.3 mg, Uridine 12.2 mg. Dilute it to a 100× solution in MEM (solution F), aliquot and store at -80 °C.

2.3 Dissection

1. Zeiss SEMI 305 stereo microscope.
2. Leibovitz's L-15 medium.
3. Instruments for dissection of mouse embryos:
 - (a) Vannas-Tübingen spring scissors.
 - (b) Dumont #5S forceps.
 - (c) Classical instruments for mouse dissection.
4. Tissue culture dish 35 × 10 mm Style.
5. Tissue culture dish 100 × 20 mm Style.
6. Trypsin (2.5‰), no phenol red: solution G.
7. Agitating block heater.

2.4 AAV Infections

2.4.1 Purified Recombinant AAV9 Viral Vectors

The vectors are produced in the IGBMC in-house viral vector production facility. They are produced following the “helper-free” method, which is based on the adenovirus-free transient cotransfection of all elements that are required for AAV production in host cells such as HEK293 cells: an AAV2 ITR-containing plasmid carrying the gene of interest, a plasmid that carries the AAV2 Rep-Cap and a plasmid that provides the helper genes isolated from adenovirus. Before production, the gene of interest must be inserted into a pAAV vector. Commonly, the vector must bear a fluorescent reporter such as an eGFP in order to identify infected cells. The titer should not be lower than 1×10^{12} GU/mL, as the vectors have to be diluted at 9×10^9 GU/mL in the culture medium and ideally not less than 100 fold.

3 Methods

3.1 Coating of Cell Culture Dishes

3.1.1 Coating of 35 mm Petri Dishes

1. In 35 × 10 mm petri dishes, dispense 2 mL of poly-L-lysine (solution B).
2. Incubate for 30 min at room temperature (RT).
3. Aspirate the solution and replace by 2 mL of ultrapure water.
4. Subsequently, replace by 2 mL of ultrapure water.
5. Remove completely the water from the petri dish at leave it to dry under the hood, for 1.5 h at RT.
6. Dispense 2 mL of collagen (solution C).
7. Incubate for 15 min at RT.
8. Angle the dish and aspirate the collagen (*see Note 1*).
9. Close the dishes and place them in a large square dish.
10. Place a compress in the center of the large plate, dispense 1 mL of ammonium hydroxide on it and close immediately the large dish

11. Incubate for 15 min at RT.
12. Open the dish, discard the compress and open all the 35 mm dishes.
13. Leave to dry overnight (ON) at RT under the working hood.
14. The next morning, close the dishes and keep them sealed with parafilm at 4  C until use. The coated dishes can be kept up to one month in the fridge.

3.1.2 Coating of 13 mm Coverslips (Must Be Prepared the Day Before the Dissection)

1. Dispense 13 mm cover slides in 4-wells culture plate.
2. Add 350  L of poly-L-lysine (solution A). Make sure that the solution covers the whole surface of the well.
3. Incubate for 2 h at 37  C.
4. Wash twice 2 min with 500  L ultrapure water.
5. Replace by a laminin solution (solution D).
6. Incubate overnight at 37  C.
7. The next morning, replace by 350  L of Matrigel (solution E).
8. Incubate for 1 h at RT.
9. Incubate for 1 h at 37  C.
10. Replace by 350  L of C-medium until cells are ready to be plated.

3.2 Mouse Dissection and Isolation of Embryonic DRGs

The mice are sacrificed at E13.5 of embryonic development. Each step of the following protocol must be done in a sterile environment: under the hood or next to Bunsen burner.

1. Sacrifice the female.
2. Put the mouse on the back, open the womb on the median line to let appear the organs.
3. Using the forceps, pinch the uterus in the middle, where both sides are joining. Cut and take away both sides of the uterus. Pay attention not to damage the embryos within the uterin horns.
4. Put the uterus in a sterile 10 cm petri dish containing 10 mL of sterile cold L15 medium.
5. Remove the embryos from the uterus by opening it slowly on the median line, always paying attention not to touch the embryos and letting the yolk intact.
6. Isolate every embryo within their placenta, and put each one of them in a 35 mm petri dish containing 1 mL of cold L15 medium. Keep the dishes on ice.
The following steps have to be repeated for every embryo
7. Take out the embryo from the placenta.

8. Place the embryo on the side. Maintain its position with a forceps in one hand, use iris scissors with the other hand to remove the head, then cut in a vertical line in between the dorsal and the ventral part, in order to remove all the visceral organs, the limb, and the extremity of the tail.
9. Using Dumont #5 forceps in both hands, put the embryo on its dorsal part, and remove the remaining visceral organs, which should allow to expose the vertebrae.
10. Rotate the embryo horizontally, and maintain it with one forceps holding the sides of the embryo. With the other forceps, open slowly the vertebrae being careful not to cut too deep (with the risk of cutting the DRGs). Always maintain the embryo stable with the other hand. When all the vertebrae are incised, you will be able to remove them as a lid and let the spinal cord appear.
11. Rotate the embryo, with the cervical part on top. Put one forceps against the spinal cord, and the other one against the close tissues. This will allow you to stretch the tissue, and start to expose the DRGs.
12. Once you have stretched the tissues all along the spinal cord on both sides, put back the embryo on the horizontal state.
13. Softly pull out the spinal cord, while tightly maintaining the embryo down. If it does not come at once, pull it out in several small steps, in order not to damage the cord. Be careful not to go too fast, which will cause some DRG to stay inside the embryo. It is though still possible to “fish” the remaining DRGs after the spinal cord has been removed.
14. Put the spinal cord with the DRGs in a new 35 mm dish filled with 1 mL cold L15 medium.
15. Carefully detach each DRG from the spinal cords, and get rid of the remaining tissues, keeping only the DRGs in the plate.
16. With a micropipette, transfer the medium containing the DRGs in a 2 mL microtube. Be careful, the DRGs can stick to the sides of the micropipette tips. Try to make 1 tube for 10 embryos. The steps of the dissection are pictured in Fig. 2.

3.3 DRGs Primary Culture Establishment

1. Right after the dissection, centrifuge the tube containing the DRGs at $800 \times g$ for 1 min.
2. Remove the medium and replace it by 1 mL Trypsin (Solution G).
3. Incubate for 35 min at 37 °C under soft agitation (400 rpm on the block heater).
4. Under the hood, transfer the Trypsin solution containing the DRG in a 15 mL Falcon tube containing 1 mL FBS.

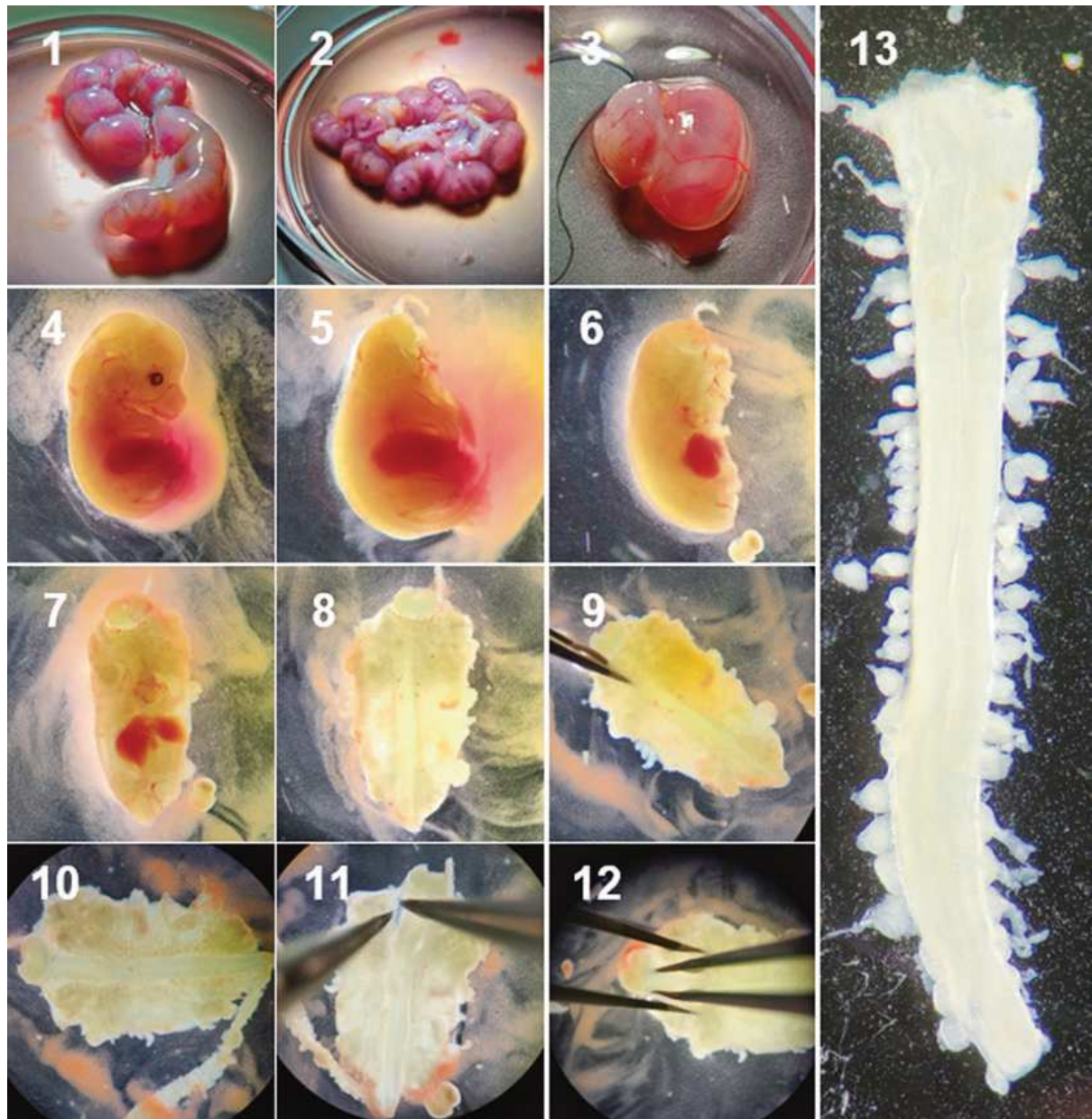


Fig. 2 Pictured steps of mouse E13.5 embryonic dorsal root ganglia dissection. After being removed from the mother, the uterus is placed in a large petri dish containing medium [1]. The uterus is opened, the embryos appear in their placenta [2] and are placed in a small petri dish containing medium [3]. The embryo is removed from its placenta, and placed on its side [4]. The head and visceral organs are successively removed [5, 6]. Embryo back on the dorsal part, the remaining viscera are removed [7]. Vertebrae are incised and removed, letting appear the spinal cord [8–10]. The tissue surrounding DRG localization is stretched, on both sides and all along the spinal cord [11]. The spinal cord is gently pulled out [12] and placed in a small petri dish containing medium [13]. The DRGs are removed from the spinal cord, and the rest of the spinal cord is removed from the dish

5. Wash the trypsin tube with 1 mL of C-medium in order to collect all the DRGs/cells in the 2 mL tube. Put this 1 mL in the 15 mL Falcon tube.
6. Centrifuge at $800 \times g$ for 10 min.
7. Remove the supernatant and add 150 μ L (volume for 10 embryos) of C-medium.
8. Very gently, triturate the pellet with a 200 μ L tip to dissociate the DRG cells.
9. In order to prevent damaging the cells, centrifuge the pellet $500 \times g$ for 10 s and transfer the supernatant containing the cells to a 50 mL Falcon tube containing 2 mL C-medium.
10. Add another 150 μ L of C-medium and continue the trituration/centrifugation steps until the pellet is dissociated. It is normal that a part of the pellet never dissociates. It contains mainly connective tissues and can be discarded.
11. Count the cells and adjust the concentration to 500,000 cells/mL.

For 35 mm petri dishes

12. With a 10 mL pipette, dispense 1 mL of the cell suspension in the precoated 35 mm petri dish (*see Note 2*).
13. Once the suspension is correctly spread in the dish, perform 2 up-and-downs to increase the uniformity of the seeding (*see Note 2*).
14. Put the dishes at 37 °C 5% CO₂.
15. After 2 h, angle the dishes to spread the medium on the whole surface of the dish.

For 13 mm coverslips

12. Remove completely the medium from the newly Matrigel-coated coverslips.
13. With the aspirator pipette on, place the coverslips in the center of the well (*see Note 3*).
14. Let it to dry for 10 min under the hood.
15. Gently dispense 100 μ L of cell suspension on the coverslip, taking care not to spread the medium outside of the slide.
16. Place the cells at 37 °C 5% CO₂.
17. 1 h 30 after, add 250 μ L of C-medium in the wells.

3.4 AAV Infections and Culture Protocol

1. On the day of plating (around 4/5 h after plating), transfer the cells in a P2 cell culture laboratory.
2. Dilute the AAV vectors in C-medium to 9×10^9 GC/mL.
3. Remove the medium from the dish, and replace it by 1 mL (300 μ L for coverslips) of diluted AAV vectors.

4. Incubate at 37 °C 5% CO₂ overnight.
5. The next morning, replace the medium by 1.5 mL (350 µL for coverslips) of C-medium + antimetabolic (solution F).
6. Two days after, replace the medium by 1.5 mL (350 µL for coverslips) of NB medium.
7. Replace the medium every 2 or 3 days by 1.5 mL/350 µL NB medium until the culture is ready to be harvested (*see* **Note 4**).

4 Notes

On a general basis, primary neurons are challenging subtypes to culture and maintain *ex vivo*, and DRG sensory neurons are among the most difficult subtypes to handle. In our lab we have developed a reproducible protocol that enables to establish homogenous and healthy DRG sensory cultures (Fig. 3). With the right hints and tips, this protocol allows any researcher to keep DRG sensory neurons in cultures from several weeks to months. Due to their excessively long processes DRG neurons organize in large and complex networks. This specificity leads to a culture structured as one single layer of connected cells. The uniformity of the collagen coating and seeding of cells are key players of the culture quality and survival.

1. Collagen coating: when the collagen is removed after 15 min incubation, the experimenter must make sure that no drop of collagen remains on the bottom of the dish. These drops lead to area of excessive collagen deposition, hence nonuniform attachments of the cells to the plate. To avoid this, the aspira-

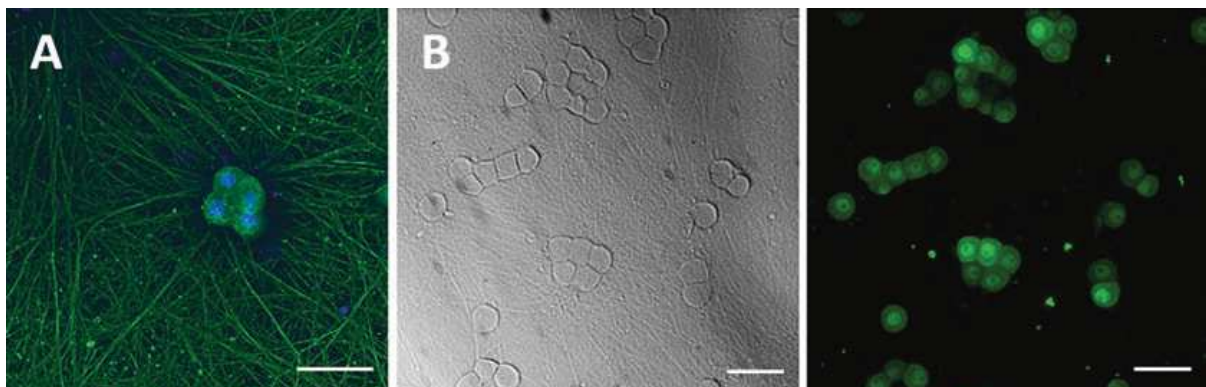


Fig. 3 DRG sensory neuron primary cultures are NF200-positive neuron culture. Primary cultures of mouse DRG sensory neurons were fixed at 15 days, and stained by immunofluorescence with primary antibody against either Neurofilament 200 kDa (NF200; ab4680, Abcam) (a) or NeuN (266004, Synaptic Systems) (b), and a fluorescent secondary against guinea pig (A11073, Molecular Probes) or chicken (703-545-155, Jackson ImmunoResearch) IgG. (c) Bright field image of culture. Every cell is positive for both NF200 and NeuN, indicating that the culture is purely neuronal, and composed of large sensory neuron cell types (NF200-positive). Scalebars = 50 µm

tion must be kept on for one second after the collagen solution was fully removed. Holding the aspiration for more than one second will make the opposite effect which is that too much collagen is removed, inducing a nonefficient coating and attachment of the cells to the plate.

2. Cell density and seeding homogenization, 35 mm petri dish: the quality of the culture almost essentially depends on the density of the cells and their correct spreading of the dish. As DRG sensory neuron are likely to organize in networks, cell bodies will aggregate in small groups (in general from 2 to 6). The cells attach to the bottom of the dish initially as single cells. After a few hours in culture, they will tend to move from their initial docking point to join surrounding cells. If cells are not evenly spread, some isolated cells will not be able to join a group which will cause them to die. In order to prevent that, the cell suspension density has to be optimized regarding the support. In this protocol we provide optimized densities for 35 mm petri dish and 13 mm coverslips (500,000 cells/mL, 1 mL or 100 μ L). In addition, when the suspension is deposited on the petri dish, the medium has to be spread on the maximal area of the dish without touching the edges and the experimenter must perform 2 or 3 up and downs. It is very important that the medium does not touch the sides of the dish. If it is the case, the suspension must be taken back and the petri dish discarded. Moreover, once the cells are spread, the plate must be placed at 37 °C within a few minutes. Hence, keeping the cells at RT for more than 15 min will cause them to aggregate in the center of the plate, which will increase the density at the center.
3. Before going on with the cell deposition, the experimenter must let the coverslip to dry and place it in the center of the well. In order to do that, the medium must be fully removed and the coverslip must be moved to the center with the aspiration pipette. This step will remove the medium from underneath the slide and hence stick it to the bottom. If the well is not completely dried and the cover in the center, the cell suspension will spread outside the coverslip causing the cells to spread on the corners of the well. This time, it is not necessary to perform up-and-downs as only 100 μ L of suspension is deposited as one step.
4. In order to keep the culture attached through the multiple medium changes, attention should be taken not to let the culture dry out. In order to prevent that, a bit of medium has to be left in the dish at every change (approximately 200 μ L, enough to cover the extremities of the culture). In addition, the medium must be gently and slowly disposed.

Acknowledgments

We thank Aur elie Eisenmann and Alain Martelli for technical assistance. This work was supported by the US Friedreich Ataxia Research Alliance (to H.P.), the Association Française pour l'Ataxie de Friedreich (to H.P.) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM grant number ECO20160736060 (to O.G.)). This study was supported by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissement d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

References

- Melli G, H oke A (2009) Dorsal root ganglia sensory neuronal cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. *Expert Opin Drug Discovery* 4:1035–1045
- Marmig ere F, Ernfors P (2007) Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci* 8:114–127
- Leininger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL (2006) Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol* 2:620–628
- Estanislao L, Carter K, McArthur J, Olney R, Simpson D, Lidoderm-HIV Neuropathy Group (2004) A randomized controlled trial of 5% lidocaine gel for HIV-associated distal symmetric polyneuropathy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37:1584–1586
- Lewis RA (2017) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Curr Opin Neurol* 30:508–512
- McGrath MC (2016) Charcot-Marie-Tooth 1A: a narrative review with clinical and anatomical perspectives. *Clin Anat* 29:547–554
- Staff NP, Grisold A, Grisold W, Windebank AJ (2017) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review. *Ann Neurol* 81:772–781
- Harding AE (1981) Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104:589–620
- Harding AE, Hewer RL (1983) The heart disease of Friedreich's Ataxia: a clinical and electrocardiographic study of 115 patients, with an analysis of serial electrocardiographic changes in 30 cases. *QJM* 52:489–502
- Koeppen AH, Mazurkiewicz JE (2013) Friedreich ataxia: neuropathology Revised. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:78–90
- Koeppen AH (2011) Friedreich's ataxia: Pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *J Neurol Sci* 303:1–12
- Beilschmidt LK, Puccio HM (2014) Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie* 100:48–60
- Saveliev A, Everett C, Sharpe T, Webster Z, Festenstein R (2003) DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* 422:909–913
- Pandolfo M (2009) Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol* 256:3–8
- Koeppen AH, Ramirez RL, Becker AB, Bjork ST, Levi S, Santambrogio P, Parsons PJ, Kruger PC, Yang KX, Feustel PJ et al (2015) The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich Ataxia. *PLoS One* 10:e0116396
- Puccio H, Simon D, Cossée M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P, 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
- Piguet F, Montigny C, de Vaucamps N, Reutenauer L, Eisenmann A, Puccio H (2018) Rapid and complete reversal of sensory ataxia by gene therapy in a novel model of Friedreich Ataxia. *Mol Ther* 26(8):1940–1952
- Miranda CJ, Santos MM, Ohshima K, Smith J, Li L, Bunting M, Cossée M, Koenig M, Sequeiros J, Kaplan J et al (2002) Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett* 512:291–297
- Al-Mahdawi S, Pinto RM, Varshney D, Lawrence L, Lowrie MB, Hughes S, Webster Z, Blake J, Cooper JM, King R et al (2006) GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* 88:580–590

20. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, 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
21. Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, Rustin P, Koenig M, Puccio H (2004) Friedreich Ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci* 24:1987–1995
22. Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, von Kleist-Retzow J-C, Wiesner RJ, Magnuson MA, Puccio H et al (2005) Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 14:3857–3864

3 Manuscrit « Frataxin depletion leads to decreased soma size and activation of AMPK metabolic pathway in DRG sensory neurons »

3.1 Sujet traité dans le manuscrit

Le manuscrit suivant présente la caractérisation du modèle de neurones de DRG déplétés en frataxine qui a été développé pour mon projet de thèse. Les résultats de cette étude montrent que le modèle reproduit les caractéristiques moléculaires et biochimiques associées à la physiopathologie de l'AF. De manière intéressante, les neurones déplétés en frataxine ne montrent pas de survie altérée, mais un défaut de croissance résultant en une baisse de la taille des soma comparé au contrôle. Il est également décrit dans cette étude que le modèle présente une activation de la voie de signalisation de l'AMPK, liée à la taille des cellules. Enfin, l'expression de la frataxine humaine (hFXN) dans les cellules a été capable de restaurer les phénotypes principaux associés au modèle. Plus particulièrement, la taille des soma corrélait avec les niveaux d'expression de hFXN.

Ce manuscrit sera soumis prochainement. Le journal de soumission n'a pas encore été choisi.

3.2 Manuscrit

Frataxin depletion leads to decreased soma size and activation of AMPK metabolic pathway in DRG sensory neurons

Olivier Griso^{1,2,3,4}, Amélie Weiss^{1,2,3,4}, Nadège Diedhiou^{1,2,3,4}, Aurélie Eisenmann^{1,2,3,4}, Ioannis Manolaras^{1,2,3,4}, Héléne Puccio^{1,2,3,4,5}.

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 67404 Illkirch, France; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1258, 67404 Illkirch, France; ³Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104, 67404 Illkirch, France; ⁴Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France; ⁵Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Institut NeuroMyoGène, 69008 Lyon, France.

Correspondence: Héléne Puccio, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch-Graffenstaden, France.

E-mail: hpuccio@igbmc.fr

Abstract

Friedreich ataxia (FA) is a rare mitochondrial disease characterized by a progressive sensory and spinocerebellar ataxia associating cardiomyopathy and increased incidence of diabetes. FA is caused by reduced levels of frataxin (FXN), an essential mitochondrial protein involved in the biosynthesis of iron-sulfur (Fe-S) clusters. The sensory ataxia results from the loss of large proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia (DRG). The specific sensitivity of DRG sensory neurons to FXN depletion as well as the molecular pathways involved remain elusive. We have generated a new cellular model of primary mouse DRG sensory neurons depleted for FXN, that recapitulates all the features of FA physiopathology. Although survival was not affected, complete FXN depletion induced growth deficits of the sensory neurons. Interestingly, our results suggest that the decreased cell size was caused by an activation of the AMPK pathway. Moreover, all phenotypes, including the grow defect, were rescued in a dose-dependent manner with exogeneous expression of human FXN. Finally, this new cellular model will be extremely helpful to identify pathways/compounds that allow to bypass frataxin.

Introduction

Friedreich's Ataxia (FA) is an early-onset neurodegenerative disease characterized by a progressive sensory and spinocerebellar ataxia associated to a hypertrophic cardiomyopathy and increased incidence of diabetes mellitus (Delatycki and Corben, 2012; Harding, 1981; Pandolfo, 2009). The sensory ataxia primarily results from the loss of the large (proprioceptive) neurons of the Dorsal Root Ganglia (DRG) (Koeppen and Mazurkiewicz, 2013; Koeppen et al., 2016; Pandolfo, 2009). Although analysis of patients necropsies revealed a specific loss of the largest DRG neurons and a general decrease of the size of cell bodies and associated fibers, it is not clear whether these observations are the results of an atrophy or hypoplasia of the neuronal tissue (Koeppen et al., 2017). The main FA-causing mutation corresponds to an expansion of GAA repeats within the first intron of the frataxin gene (*FXN*) (Campuzano et al., 1996). GAA expansion leads to decreased frataxin (*FXN*) transcription due to heterochromatinization of the locus and formation of unusual DNA structures (Gottesfeld, 2019). Patients express only 5-30% of normal *FXN* levels (Pandolfo, 2009). GAA length correlates with severity of FRDA symptoms and inversely with age of onset and *FXN* levels (De Michele et al., 1998; Long et al., 2017). *FXN* is a mitochondrial protein involved in the biogenesis of Iron-Sulfur (Fe-S) clusters, in which it acts as an activator of the cluster synthesis rate (Colin et al., 2013; Fox et al., 2015, 2019; Parent et al., 2015; Patra and Barondeau, 2019). Total loss of frataxin is embryonic lethal in mice, and fibroblast cells depleted in frataxin become senescent, most likely as a consequence of impaired cell division (Calmels et al., 2009; Cossée et al., 2000). Studies on patients tissues as well as FA cell and animals models revealed that frataxin depletion leads to loss of Fe-S synthesis, associated to mitochondrial dysfunction and iron metabolism dysregulation (Martelli et al., 2012a, 2012b; Perdomini et al., 2013; Puccio et al., 2001). An increased sensitivity to oxidative stress is also reported in several models (Delatycki and Bidichandani, 2019; Martelli et al., 2012b).

Although pathophysiology of FA at the cellular level is rather well characterized, the link between frataxin deficiency and specific proprioceptive neuron dysfunction still remain elusive. Low availability of DRG cells, and small proportions of proprioceptive neurons in this tissue have made the study of FA neurophysiopathology difficult to tackle in these cells. Animal models are well suited to study FA development and physiopathology at tissue level (Piguet et al., 2018; Puccio et al., 2001; Simon et al., 2004) and serve as tools to validate therapeutical approaches (Chiang et al., 2020; Gerard et al., 2014; Perdomini et al., 2014; Piguet et al., 2018; Salami et al., 2020; Vyas et al., 2012). A recently generated conditional mouse model with a proprioceptive-specific *FXN* depletion confirmed the involvement of these cells in the

incidence of the sensory ataxia, and was used as a tool to test an innovative gene therapy approach (Piguet et al., 2018). In order to study the effects of frataxin depletion specifically in DRG sensory neurons, cellular models offer a higher degree of resolution (Abeti et al., 2016; Mollá et al., 2017).

To study the physiopathology of DRG sensory neurons depleted for FXN, we have developed a new model based on the primary cultures of mouse DRG sensory neurons with full depletion of the frataxin gene. Phenotyping experiments revealed that the cells recapitulate the main molecular features associated with FA such as Fe-S clusters deficiency, mitochondrial activity impairments, mitochondrial iron accumulation and increased oxidative stress. Surprisingly, the neurons were able to grow and survive with a complete absence of frataxin for several weeks without severe signs of degeneration. However, DRG neurons depleted for frataxin showed a reduced soma size compared to controls. Furthermore, AMPK pathway was activated in frataxin-deficient cells, a signaling pathway likely responsible for the growth defects associated with the model. Finally, re-expression of frataxin in a dose-dependent fashion in the mutant cells through transduction with AAV9-hFXN vectors showed that DRG sensory neurons cell size depends on frataxin levels.

Material & Methods

Establishment of a mouse primary DRG sensory neurons culture, infections and treatments.

Culture. Cultures were established following our recently published protocol (Griso and Puccio, 2020). 96-well plates were coated with Poly-L-lysine (0.1 mg/mL ; P5899, Merck), laminin (3.3 ug/mL ; 23017-015, ThermoFisher Scientific) and Matrigel (1/40 ; 354277, Corning BV) following the published protocol. Cells were seeded at a density of 7500 cells/well, and incubated for 20 min at RT before transferring the plates at 37°C, 5% CO₂. All steps were performed according to the published protocol.

Infections. For AAV infections, medium was replaced by a solution of AAV diluted in NB medium at concentration of 9×10^9 vg/mL (if not indicated differently), and cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ overnight (ON). AAV enriched medium was fully replaced by fresh medium. Infections with AAV9-empty or AAV9-CreGFP was performed the day of dissection, 3 hours after seeding. Infections by AAV9-CAG-hFXN-HA (Piguet et al., 2018), was performed at DIV

7. The viral vectors were produced and purified in the IGBMC in-house viral vector production facility, following the helper-free method.

Treatments. Cells were treated either with AICAR (0.01 to 5 mM) (A9978, Sigma-Aldrich) or Rapamycin (1 to 10 nM) (R8781, Sigma-Aldrich) from DIV8 to the day of the measurement or harvest. Medium was replaced with fresh chemicals every 3 to 4 days. For glycolysis bypassing culture, conditions cells were incubated from 7 dpi in glucose-free NB (with 11966025, Gibco, as Neurobasal) with low glucose (5 mM) or galactose only (10 mM).

Immunofluorescence experiments

DRG neurons cultures were fixed for 15 minutes in 2% PFA (50980487, Fisher Scientific) diluted in Phosphate-buffered Saline with Magnesium and Calcium (PBS + Salts, PBSS) (21300074, ThermoFisher). Lumbar mouse DRG were collected on adult mouse and fixed for 1h in 4% PFA, embedded in Shandon Cryomatrix resin (6769006, ThermoFisher) and snapfrozen in isopentane chilled on dry ice. Cryosections of 8 μm were then used to perform immunofluorescence experiments. The following staining protocol was common to DRG cell culture and DRG tissue sections. Cells were permeabilized using 0.2% Triton X-100 diluted in PBSS, for 10 min. Cells were then washed three times 5 min in PBSS, and blocking was performed for 1h with a solution of 1% BSA + 5% NGS in PBS + Salts with 0.1% Tween-20 (PBSST). Cells were then incubated ON at 4°C with the primary antibodies (Table S1) diluted in 1% BSA + PBSST. Cells were then washed 3 times 5 min in PBSST, and incubated for 30 min with the secondary antibodies (1/2000) with DAPI (1/1000), diluted in 1% BSA + PBSST, for 30 min at room temperature (RT). For actin staining, Rhodamine Phalloidin (1/2000, PHDR, tebu-bio) was added to the secondary antibody solution. Cells were then washed twice 5 min in PBSST and twice 5 min in PBSS. Excess liquid was removed, and the coverslips were mounted on a polarized slide with using Aqua-Poly/Mount (18606, Polysciences), and incubated at RT for 48h in the dark. Pvalb-positive soma area of Pvalb-Cre mouse were measured using ImageJ.

Electronic Microscopy

DRG neurons cultures were fixed for 15 minutes in 2.5% PFA (50980487, Fisher Scientific) + 2.5% glutaraldehyde and sodium cacodylate 0.1M (pH = 7.2). Samples were then processed as previously described (Perdomini et al., 2014; Puccio et al., 2001).

Protein extract and Western Blots

Cells were collected and pelleted at 6000 x g for 1 min. Pellets were resuspended in RIPA Lysis Buffer and incubated in the ice for 20 minutes. Cellular membranes were pelleted for 10 min at 11.000 x g, 4°C. Supernatant was collected and protein concentration measured by Bradford Assay. Desired quantity of total protein (generally 5µg/sample/gel) was pre-stained by QuickStain Protein Labelling Kit (RPN4000, Amersham) following manufacturer's instructions (30 min incubation at RT). Proteins were then mixed with loading buffer and boiled for 5 min, loaded on polyacrylamide gels and separated by electrophoresis. Proteins were then tank-transferred on a nitrocellulose membrane. After transfer, total protein fluorescence was acquired on an Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences). Membranes were then blocked for 1h in Tris-buffered saline (TBS) + 5% BSA. Membranes were then incubated with primary antibodies (Table S2) diluted in TBS + 0.1% Tween-20 (TBST) ON at 4°C. Membranes were washed three times in TBST for 10 min at RT, then incubated with secondary antibody (1/10.000 to 1/20.000) diluted in TBST for 45 min at RT. Membranes were washed three times in TBST for 10 min at RT, and then revealed using SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34096, ThermoFisher), on the Amersham Imager 600.

SDH activity

Proteins were extracted, quantified by Bradford, and SDH activity measure performed as previously described (Puccio et al., 2001), using an amount of 10 µg of proteins per measurement. One unit defines the amount of SDH needed to generate 1.0 µmol of Dichlorophenolindophenol (DCPIP) per min (pH 7.2 ; 25°C).

Seahorse Analysis

Mitochondrial activity was performed using a Seahorse Analyser XFe96 (Agilent) and the Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (103015-100, Agilent). For this analysis, 5000 cells were seeded in each well of the compatible 96-well plates (101085-004, Agilent), and analysis was performed after 15 days in culture. Protocol was followed as manufacturer's instruction, with concentrations of the inhibitors optimized to 2 µM Oligomycin, 0.5 µM FCCP and 0.5 µM of Rotenone/Antimycin A. Mixing steps (Wave Controller 2.4) were reduced to 20 seconds to prevent detaching of the cells from the bottom of the well.

Survival, Size, Mitochondrial mass, MitoSOX and TMRM measurements

Analysis of size, mitochondrial mass and oxidative stress were acquired in cells seeded in black 96-well plates (655090, Greiner). The day of the analysis, cells were stained with

Hoechst (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 94403, Merck), Mitotracker Green FM (50 nM; M7514, ThermoFisher) and MitoSOX (2.5 μM ; M36008, ThermoFisher) or TMRM (200 nM, I34361, Invitrogen) diluted in NB culture medium, for 3h at 37°C, 5% CO₂. For oxidative treatments, cells were incubated with 10 μM H₂O₂ for 30 min at 37°C 5% CO₂ before staining. Cells were then washed twice in PBS + Salts, fixed in 2% PFA for 15 min, and washed twice with PBS + Salts. Fluorescence was then acquired on a high content reader (Thermofisher Cellomics Arrayscan XTi), and images were analyzed by the Cellomics HCS Studio software. Signal intensity, and area of every cell was acquired independently, through cell segmentation. Soma were segmented and area measured using Hoechst staining, as the soma show a reflection of the staining sufficient to be segmented. Hoechst segmentation was also used to count cells.

Mitochondrial Iron Measurement with RPA

Mitochondrial iron was measured in cells seeded in black 96-well plates (655090, Greiner), using RPA probe. The day of the analysis, cells were stained with Hoechst (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 94403, Merck), and RPA (2.5 μM ; SQX-RPA, Axxora) in NB medium for 10 min at 37°C, and washed three times in PBS + Salts. Fluorescence was then acquired on a high content reader (Thermofisher Cellomics Arrayscan XTi), and images were analyzed by the Cellomics HCS Studio software. Signal intensity of every cell was acquired independently through cell segmentation.

ATP measurements

ATP levels were measured using fluorometric (MAK190, Sigma-Aldrich), following manufacturer's instruction. Amount of total protein loaded was optimized to 10 $\mu\text{g}/\text{sample}/\text{well}$.

Reverse transcription and real time Quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from frozen DRG cultures pellets using TRIzol reagent (15596026, ThermoFisher), according to the manufacturer's protocol, and treated with DNase I (4716728001, Roche). cDNA was generated by reverse transcriptase using the SuperScript IV Kit (18091050, Invitrogen), following the manufacturer's protocol. Quantitative RT-PCR was performed using the SYBR Green I Master mix (04887352001, Roche) and Light Cycler 480 (Roche) with primers listed in Table S3. Gene expression were always normalized to GAPDH expression, and then in percent of CT.

Statistical Analyses

All data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software (La Jolla, USA). Student's t tests were used to compare group, one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test) was used to compare 3 or more groups. Two-way ANOVA with Geisser Greenhouse Correction was used to compare size combined to genotypes and classes of cell size/time points. A value of $p < 0.05$ was considered as significant. Replicates (n) were considered as biological replicates as they correspond to independent cultures issued from a pool of mouse embryos. Figures show representative results of several experiments.

Results

Frataxin-depleted DRG sensory neurons recapitulate FA molecular and cellular features

To decipher the consequences of frataxin deficiency in sensory neurons, we established a new sensory neuronal model for FA based on the primary cultures of mouse DRG sensory neurons carrying the frataxin conditional allele (Griso and Puccio, 2020). The DRG were harvested at embryonic stage E13.5 and after dissociation and seeding, the cells were infected with an AAV9-CreGFP vector (KO) or with an empty AAV vector as a control (CT) (Fig. 1A). In order to remove glial cells to obtain a neuronal culture, treatment with an anti-mitotic agent was performed (Fig. S1). Infection with the AAV9-CreGFP vector allowed excision of exon 4 of *Fxn*, resulting in the full depletion of frataxin in $>95\%$ of the cells (Fig. 1B). Immunofluorescence experiments revealed that all the neurons showed positive staining for the large neurofilament (NF200), a marker of the large sensory neurons of the DRG (mechanoreceptive and proprioceptive), as well as for parvalbumine, a marker specific to proprioceptive neurons (Fig. 1C). Additionally, all cells were positive for TrkC, a marker of both mechanoreceptive and proprioceptive neurons (Fig. S1B, C). A significant proportion of the cells were also positive for the nociceptive specific marker calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Fig. 1D). Expression of these markers was found to be stable from 7 to 25 dpi (Fig. 1) and no difference between CT and KO could be identified (Fig. 1 C-D, bottom panels; Fig. S1C). These surprising and somehow conflicting data suggest that although DRG cells are collected after neuron differentiation into the sensory subtypes (Marmigère and Ernfors, 2007), the culture conditions did not allow maintenance of exclusive differentiation characteristics, giving rise to hybrid subtypes of DRG sensory neurons, potentially incorporating characteristics from nociceptive, mechanoreceptive and proprioceptive neurons.

To characterize the frataxin-depleted sensory neurons, FA-associated phenotypes such as Fe-S biosynthesis deficits, iron metabolism dysregulation, mitochondrial activity and oxidative

stress were measured. Activity of the Fe-S enzyme Succinate Dehydrogenase (SDH) was found to be progressively decreased from 15 to 21 days post infection (dpi) reaching $49.2 \pm 5.6\%$ of the CT (Fig. 2A). In addition, a substantial decrease in mitochondrial (Fig. 2B) and cytosolic (Fig. S2A) Fe-S enzymes was observed by western blot at 21 dpi, in line with previously reported instability of the apo-proteins or complexes in the absence of Fe-S (Guillon et al., 2009; Perdomini et al., 2014). In support, mRNA levels for SDH were found to be unchanged between CT and KO cells at 21 dpi (Fig. S2B).

Mitochondrial activity was assessed in living cells through the Seahorse Biosciences® technology. Mitochondria from KO sensory neurons showed a reduced basal respiration rate and respiratory capacity compared to the CT (Fig. 2C). In conditions of impaired mitochondrial respiratory capacity, glycolysis is often activated to overcome loss of ATP production (Chaudhry and Varacallo, 2020). KO cells revealed some evidences of increased glycolysis such as acidification of the culture medium (TeSlaa and Teitell, 2014) (Fig. S3A) and increased expression of glycolysis specific genes (Fig. S3B). Inhibiting glycolysis using restrictive carbon sources culture conditions resulted in increased mitochondrial mass (Fig. 2D), most likely as a compensation for loss of mitochondrial activity. Accordingly, several mitochondrial proteins as well as transcriptional factors involved in mitochondrial biogenesis were found to be increased at the translational and/or transcriptional levels (Fig. S3C-D). At the ultrastructural level, KO cells contained giant mitochondria with abnormal structures including collapsed cristae (Figure 2E).

A direct consequence of Fe-S deficit is the dysregulation of iron metabolism through the Fe-S-dependent activation of the Iron Responsive Element (IRE)-binding Protein IRP1, (Rouault and Maio, 2017). An increase of transferrin receptor 1 (TFR1) and a decrease of ferritin light chain (FRTL) was observed in KO cells at 21 dpi (Fig. 2F). As increased mitochondrial iron content is another hallmark of the FA disease, we sought to investigate this parameter in the KO cells. Mitochondrial iron content was measured using the fluorescent mitochondrial iron indicator RPA, which signal depends on labile iron content (Petrat et al., 2002). RPA signal was found to be decreased in the KO cells at 30 dpi, indicating that labile mitochondrial iron content was increased (Fig. 2G).

Dysfunction in the mitochondrial electron transport chain is often correlated to increased generation of reactive oxygen species (ROS) (Cui et al., 2011). A variety of FA models present an increased sensitivity to oxidative stress (reviewed in Delatycki and Bidichandani, 2019). We sought to analyze this parameter in the model focusing on mitochondrial specific oxidative stress, using the MitoSOX probe. As generally described for FA, an increase in sensitivity to

exogenous stress was measured at early time point (15 dpi, Fig. 2H). At later stages, KO sensory neurons exhibited an endogenous mitochondrial oxidative stress (21 and 30 dpi, Fig. 2H). Hence, MitoSOX signal was increased by 2-fold compared to CT without additional oxidative treatment.

Altogether, these data indicate that the model recapitulates FA biochemical and cellular features, and validate its use in the investigation of new pathways affected in the absence of frataxin in DRG sensory neurons.

Frataxin depletion affects soma size without affecting survival of mouse DRG sensory neurons

In order to determine whether frataxin deficiency leads to increased cell death in the KO cells, we measured the survival of neurons through time. Interestingly, no difference was found between KO and CT, even at the latest stages of culture (Fig. 3A). Additionally, culturing the neurons in glycolysis inhibitory conditions did not significantly affect survival of the KO cells (Fig. S3E). Although cell number was not decreased, a significant difference in soma growth dynamics between KO and CT neurons was observed. From 7 to 15 dpi, both CT and KO cells showed a similar soma growth (Fig. 3B). Although CT soma continued to grow until 21 dpi, KO growth stagnated, and eventually showed a slight decrease at 30 dpi (Fig. 3B). Indeed, there was a 1.3-fold soma area difference between CT and KO at 21 dpi (CT = $865 \pm 54 \mu\text{m}^2$; KO = $658 \pm 53 \mu\text{m}^2$), and 1.5-fold difference at 30 dpi (CT = $860 \pm 20 \mu\text{m}^2$; KO = $558 \pm 21 \mu\text{m}^2$) (Fig. 3B). Analyzing cells individually revealed a decrease in frequency of large soma size cells in the total cell population. As the number of cells did not vary between KO and CT, these results are suggestive of a shift in the size of the cells rather than a specific loss of large neurons (Fig. 3C). Interestingly, in the conditional *Pvalb* mouse model, bearing a full frataxin depletion specifically in *Pvalb* expressing cells (Piguet et al., 2018), a slight but significant decrease in the soma size of *Pvalb*⁺ neurons in the DRG was observed at 9.5 weeks of age, suggesting that a size defect phenotype might be relevant *in vivo* (Fig. 3D).

AMPK pathway is activated in the model

The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway acts as a regulator of cell growth, as well as a regulator of metabolism and autophagy (Mihaylova and Shaw, 2011). AMPK senses cellular energy status to maintain energy homeostasis, and is mainly activated by decreased cellular ATP levels. Due to strong attenuation of mitochondrial activity in the model, resulting in low ATP levels (Fig. 4A), we hypothesized that AMPK pathway could play

a role in the growth defects observed in the KO neurons. Western blot analysis of AMPK α and its downstream targets revealed an overall activation of the pathway at 21 dpi in the KO neurons (Fig. 4B). Indeed, the phospho-AMPK α -Thr172 activation mark was found to be increased by 1.7-fold, when the inhibition mark phospho-AMPK α -Ser485 was decreased by 1.6-fold in KO (Fig 4B). Phosphorylation of three downstream targets of AMPK (ACC, ULK1 and Raptor) were significantly increased in the KO (Fig. 4B). In particular, autophagy regulator ULK1 phosphorylation at Serine 555 was highly increased (2.4-fold), as well as its downstream target Beclin-1 phosphorylated at Serine 15 (Fig. S4). Interestingly, chemical activation of the AMPK pathway with AICAR treatment induced a decreased soma size in CT cells while worsening the phenotype in the KO (Fig. 4C and S5A). Indeed, treatment with 0.1 and 0.5 mM AICAR reduced CT soma size to $92 \pm 1\%$ and $72 \pm 4\%$ of untreated cells, respectively, when KO were reduced to $90 \pm 2\%$ and $62 \pm 2\%$ of untreated KO cells (Fig 4.C).

AMPK mediates its activity on cell growth through suppression of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway (Kim et Guan, 2019). mTOR controls cell growth by promoting anabolic processes, such as protein, lipid and nucleotide synthesis, and suppressing catabolic processes, such as autophagy (Kim et Guan, 2019). AMPK directly phosphorylates Raptor (regulatory associated protein of mTOR), thus blocking the ability of mTORC1 to phosphorylate its downstream substrates (Mihaylova and Shaw, 2011). Phosphorylation of Raptor at Ser792 was found to be increased in the KO neurons by 1.7-fold (Fig. 4B). Given these results, we sought to investigate mTOR pathway. Phosphorylation of the mTOR downstream target P70S6K was found to be decreased on several residues (Fig. 4D). Indeed, phosphorylation was decreased by 1.3-fold at residue Threonine 389 and 421, and by 1.6-fold at residue Serine 371, suggesting an inhibition of the mTOR/S6K axis (Fig. 4D). Chemical inhibition of mTOR pathway was achieved through Rapamycin treatment and was sufficient to decrease soma size of CT cells and to worsen the phenotype in the KO (Fig 4E). Indeed, treatment with 1 and 10 nM of rapamycin reduced CT soma size to $90 \pm 3\%$ and $83 \pm 2\%$ of untreated cells, respectively, when KO were reduced to $84 \pm 4\%$ and $80 \pm 2\%$ (Fig 4.E).

DRG sensory neurons soma size correlates with frataxin levels

In order to control frataxin levels in KO cells, DRG neurons were transduced with increasing concentrations of an AAV vector expressing HA-tagged human frataxin (AAV9-CAG-hFXN-HA). Anti-HA staining revealed that frataxin expression increased in a dose-dependent manner (Fig. 5A-B). Interestingly, the FA-phenotype (Fe-S deficits (Fig. 5B),

mitochondrial oxidative stress (Fig. 5C) and mitochondrial health as measured by TMRM staining (Fig. 5D)) were gradually rescued with increasing frataxin expression. Furthermore, activation of the AMPK and mTOR pathways were also gradually prevented (Fig. 5E). Furthermore, increasing frataxin levels in KO cells was able to rescue the soma size deficits in a dose dependent manner (Fig. 5F). Interestingly, expression of hFXN in CT neurons also increased soma size (Fig. 5F). Altogether, these results show a correlation between frataxin levels, FA-related phenotypes, AMPK/mTOR activation and the size of DRG sensory neurons. These data contribute to demonstrate a very interesting link between frataxin levels and growth of DRG sensory neurons, which will be of great importance in understanding the mechanisms of the development of FA and variability between patients depending the severity of the mutation.

Discussion

Our study has led to the development of a new neuronal model of Friedreich's Ataxia by establishing primary cultures of mouse DRG sensory neurons with a complete removal of frataxin expression. Frataxin-deficient sensory neurons showed clear and reproducible phenotypes recapitulating many of the FA-specific features. Indeed, KO neurons had an early and progressive Fe-S synthesis deficit, dysregulation of iron metabolism with mitochondrial iron accumulation and a marked mitochondrial phenotype: decreased mitochondrial activity, increased mitochondrial mass and oxidative stress. These observations bring evidence that FXN depletion induces similar dysregulations to what is already known in other cell types such as cardiomyocytes (Al-Mahdawi et al., 2006; Chandran et al., 2017; Puccio et al., 2001). By this study we bring a clear evidence that full FXN depletion does primarily induce a deficit of Fe-S synthesis followed by a late mitochondrial iron accumulation in the DRG sensory neurons. This study also revealed that KO neurons not only show a sensitivity to oxidative stress but also have an endogenous oxidative stress at the mitochondrial level. These data echoes to results described in DRG sensory neurons from a GAA-based FA mouse model (Mollá et al., 2017). Mitochondrial mass was also increased although we have no real evidence to determine if KO cells increase their living mitochondrial pool to compensate for loss of activity, or have a difficulty to clear defective mitochondria through mitophagy.

Defects of mitochondrial activity drove the cells to rely on glycolysis pathway to compensate for energy production. Interestingly, DRG sensory neurons were able to survive with a complete lack of frataxin for several weeks, even when depriving the cells from glucose

as the main energy source. These results reveal that frataxin expression is not essential for DRG sensory neurons survival in the time scale used in our study. These data are in agreement with a recent study that showed in a conditional mouse (*Pvalb* cKO) that proprioceptive neurons were surviving full FXN depletion *in vivo*, contrasting with Purkinje cells which were more sensitive to frataxin loss (Piguet et al., 2018). Our results bring a clear evidence of the contrast that exists between mitotic and post-mitotic cells regarding frataxin essentiality. Although difficult to translate to human, a potential resistance of proprioceptive neurons to FXN depletion would be a key component in the development of therapeutic approaches targeting the sensory neuropathy. Indeed, this could mean that a flexibility exists between the beginning of the ataxia and the loss of the neurons, that would offer a window of action for the treatment to act and prevent the degeneration of these cells.

Our study also demonstrates that mouse DRG sensory neurons have a growth deficit when cultured in the absence of FXN. Indeed, KO cells soma showed an inability to develop at a size similar to that of the control. As a secondary effect, KO cells started to shrink, a phenotype that might be attributed to an eventual slow degeneration of the cells. Interestingly, the growth deficit directly correlates with the levels of FXN expression, as expression of hFXN rescued KO soma size in a dose-dependent manner, although no mechanistic connection could be established during our study. This is, to our knowledge, the first report of a decreased cell size in DRG sensory neurons in conditions of FXN depletion. Although difficult to apply to human, our results reinforce the hypothesis of a developmental component in FA. It is possible that proprioceptive neurons growing with reduced levels of FXN would have difficulties to reach a size suitable for proper function, as these cells are the largest of the DRG. When extrapolated to FXN levels correlation, our results could help understanding the genotype to phenotype correlation observed in patients, being that the most severe phenotypes are associated to the lowest levels of FXN expression. The hypothesis would be that the lower the levels of frataxin, the more difficult it would be for proprioceptive neurons to reach the required size and function normally.

Through our study, we were able to link FXN depletion with the signaling pathway of the AMP-activated protein kinase (AMPK), a regulator of cell growth, metabolism and autophagy. Our data showed clear evidences of AMPK pathway activation in the KO cells that were rescued by expression of hFXN. Chemical activation of AMPK signaling was sufficient to induce a growth defect in the CT cells. Accordingly, signaling of AMPK downstream target mTOR was reduced in KO cells, and chemical inactivation of mTOR activity was sufficient to reproduce a soma growth deficit in the control. Together, these data suggest that AMPK

signaling plays a role in the determination of neuron soma size. Our study did not allow to establish a direct link between FXN depletion and AMPK activation, and it is likely that several components act in a synergistic way to induce this regulation. Indeed, AMPK is often activated in conditions of low metabolism in order to activate catabolic processes rather than anabolic energy consuming pathways (Mihaylova and Shaw, 2011). In particular, AMPK activation can lead not only to activation of autophagy, but also to mitochondrial biogenesis, glucose uptake, glycolysis and fatty acid oxidation (Mihaylova and Shaw, 2011). Low ATP availability in KO cells could be sufficient to trigger AMPK activation, which would result in the increased mitochondrial mass and glycolysis observed in the KO. AMPK was also shown to be activated in conditions of oxidative stress (reviewed in Wu et al., 2014), which could also be the case in our model.

One of the weaknesses of the model is the hybrid nature of the sensory neurons in culture. Clearly, the culture conditions are not optimal to maintain the proper differentiation state of mature DRG cells. It would be of interest in the future to explore other culture conditions to obtain cultures that are more physiological, such as using a combination of different neurotrophic factors, co-culturing with glial cells or performing organotypic cultures to maintain architecture of the DRG and help keep the specification of the cells. A second weakness is that we are working with a full depletion of frataxin in order to increase disease progression and expose clearly frataxin-deficient phenotypes in a time scale suitable for primary cell culture, rather than low levels of frataxin as it occurs in patient. An alternative model rescuing these two weaknesses would be the use of DRG sensory neurons models derived from patients induced pluripotent stem cells (iPSC). A recently published study presented a new model of that kind that recapitulates DRG neurons specification and patient-associated partial frataxin depletion (Dionisi et al., 2020). Indeed, this study presented the generation of DRG cultures comprising the three subtypes of sensory neurons with well-defined specification.

One strength of this model is the reproducibility of the FA-related phenotypes and clear dynamics between CT and KO. Combined with the ability of the model to be cultured in medium scale culture systems such as 96-well plates, this model would be a suitable platform to perform medium to high content screening of therapeutic compounds. In particular, due to the high resistance of DRG neurons to full FXN depletion, it would be possible to investigate molecules for their ability to bypass FXN activity. Finding a compound that would be able to replace frataxin activity counts among the most promising therapeutic strategies that have to be developed to cure Friedreich's Ataxia.

Acknowledgments

We thank Anne Maglott-Roth, Laurence Reutenauer and Alain Martelli for technical assistance. We thank Nadia Messaddeq from the IGBMC imaging platform for EM analysis and Pascale Koebbel (IGBMC molecular biology platform) for vector production. This work was supported by the US Friedreich Ataxia Research Alliance (to H.P.), the Association Française pour l'Ataxie de Friedreich (to H.P.) (to O.G) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM grant number ECO20160736060 (to O.G.)). This study was supported by the grant ANR-10-LABX-0030- INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissement d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

Author contributions

Conceptualization, O.G., H.P.; Methodology, O.G., H.P.; Investigation, O.G., A.W., N.V., A.E., I.M.; Writing O.G., H.P.; Funding Acquisition, O.G., H.P.; Supervision, H.P.

References

- Abeti, R., Parkinson, M.H., Hargreaves, I.P., Angelova, P.R., Sandi, C., Pook, M.A., Giunti, P., and Abramov, A.Y. (2016). "Mitochondrial energy imbalance and lipid peroxidation cause cell death in Friedreich's ataxia." *Cell Death Dis* 7, e2237.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J.M., King, R., et al. (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* 88, 580–590.
- Calmels, N., Schmucker, S., Wattenhofer-Donzé, M., Martelli, A., Vaucamps, N., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Bouton, C., Koenig, M., and Puccio, H. (2009). The First Cellular Models Based on Frataxin Missense Mutations That Reproduce Spontaneously the Defects Associated with Friedreich Ataxia. *PLoS One* 4.
- 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.
- Chandran, V., Gao, K., Swarup, V., Versano, R., Dong, H., Jordan, M.C., and Geschwind, D.H. (2017). Inducible and reversible phenotypes in a novel mouse model of Friedreich's Ataxia. *ELife* 6.
- Chaudhry, R., and Varacallo, M. (2020). Biochemistry, Glycolysis. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Chiang, S., Huang, M.L.H., and Richardson, D.R. (2020). Treatment of Dilated Cardiomyopathy in a Mouse Model of Friedreich's Ataxia using N-acetylcysteine and Identification of Alterations in MicroRNA Expression that Could be Involved in its Pathogenesis. *Pharmacol. Res.* 104994.

- Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.-M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., and Ollagnier de Choudens, S. (2013). Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo Fe₄S₄ Cluster Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 733–740.
- Cossée, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dollé, P., and Koenig, M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1219–1226.
- Cui, H., Kong, Y., and Zhang, H. (2011). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Journal of Signal Transduction* *2012*, 646354.
- De Michele, G., Filla, A., Criscuolo, C., Scarano, V., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., and Coccozza, S. (1998). Determinants of onset age in Friedreich's ataxia. *J. Neurol.* *245*, 166–168.
- Delatycki, M.B., and Bidichandani, S.I. (2019). Friedreich ataxia- pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiol. Dis.* *132*, 104606.
- Delatycki, M.B., and Corben, L.A. (2012). Clinical Features of Friedreich Ataxia. *J Child Neurol* *27*, 1133–1137.
- Dionisi, C., Rai, M., Chazalon, M., Schiffmann, S.N., and Pandolfo, M. (2020). Primary proprioceptive neurons from human induced pluripotent stem cells: a cell model for afferent ataxias. *Sci Rep* *10*, 7752.
- Fox, N.G., Das, D., Chakrabarti, M., Lindahl, P.A., and Barondeau, D.P. (2015). Frataxin Accelerates [2Fe-2S] Cluster Formation on the Human Fe-S Assembly Complex. *Biochemistry* *54*, 3880–3889.
- Fox, N.G., Yu, X., Feng, X., Bailey, H.J., Martelli, A., Nabhan, J.F., Strain-Damerell, C., Bulawa, C., Yue, W.W., and Han, S. (2019). Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nat Commun* *10*, 1–8.
- Gerard, C., Xiao, X., Filali, M., Coulombe, Z., Arsenaault, M., Couet, J., Li, J., Drolet, M.-C., Chapdelaine, P., Chikh, A., et al. (2014). An AAV9 coding for frataxin clearly improved the symptoms and prolonged the life of Friedreich ataxia mouse models. *Mol Ther Methods Clin Dev* *1*, 14044.
- Gottesfeld, J.M. (2019). Molecular Mechanisms and Therapeutics for the GAA·TTC Expansion Disease Friedreich Ataxia. *Neurotherapeutics* *16*, 1032–1049.
- Griso, O., and Puccio, H. (2020). Primary Cultures of Pure Embryonic Dorsal Root Ganglia Sensory Neurons as a New Cellular Model for Friedreich's Ataxia. In *Trinucleotide Repeats: Methods and Protocols*, G.-F. Richard, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 241–253.
- Guillon, B., Bulteau, A.-L., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Friguet, B., Puccio, H., Drapier, J.-C., and Bouton, C. (2009). Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins. *FEBS J.* *276*, 1036–1047.

- Harding, A.E. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104, 589–620.
- Koeppen, A.H., and Mazurkiewicz, J.E. (2013). Friedreich Ataxia: Neuropathology Revised. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 72, 78–90.
- Koeppen, A.H., Ramirez, R.L., Becker, A.B., and Mazurkiewicz, J.E. (2016). Dorsal root ganglia in Friedreich ataxia: satellite cell proliferation and inflammation. *Acta Neuropathol Commun* 4, 46.
- Koeppen, A.H., Becker, A.B., Qian, J., and Feustel, P.J. (2017). Friedreich Ataxia: Hypoplasia of Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 76, 101–108.
- Long, A., Napierala, J.S., Polak, U., Hauser, L., Koeppen, A.H., Lynch, D.R., and Napierala, M. (2017). Somatic instability of the expanded GAA repeats in Friedreich's ataxia. *PLoS ONE* 12, e0189990.
- Marmigère, F., and Ernfors, P. (2007). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 114–127.
- Martelli, A., Friedman, L.S., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Perlman, S.L., Lynch, D.R., Fedosov, K., Schulz, J.B., Pandolfo, M., and Puccio, H. (2012a). 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.
- Martelli, A., Napierala, M., and Puccio, H. (2012b). Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis Model Mech* 5, 165–176.
- Mihaylova, M.M., and Shaw, R.J. (2011). The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat Cell Biol* 13, 1016–1023.
- Mollá, B., Muñoz-Lasso, D.C., Riveiro, F., Bolinches-Amorós, A., Pallardó, F.V., Fernandez-Vilata, A., de la Iglesia-Vaya, M., Palau, F., and Gonzalez-Cabo, P. (2017). Reversible Axonal Dystrophy by Calcium Modulation in Frataxin-Deficient Sensory Neurons of YG8R Mice. *Front Mol Neurosci* 10, 264.
- Pandolfo, M. (2009). Friedreich ataxia: The clinical picture. *J Neurol* 256, 3–8.
- Parent, A., Elduque, X., Cornu, D., Belot, L., Caer, J.-P.L., Grandas, A., Toledano, M.B., and D'Autréaux, B. (2015). Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nature Communications* 6, ncomms6686.
- Patra, S., and Barondeau, D.P. (2019). Mechanism of activation of the human cysteine desulfurase complex by frataxin. *PNAS* 116, 19421–19430.
- Perdomini, M., Hick, A., Puccio, H., and Pook, M.A. (2013). Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *J. Neurochem.* 126 Suppl 1, 65–79.

- Perdomini, M., Belbellaa, B., Monassier, L., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Cartier, N., Crystal, R.G., Aubourg, P., and Puccio, H. (2014). Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat. Med.* 20, 542–547.
- Petrat, F., Weisheit, D., Lensen, M., de Groot, H., Sustmann, R., and Rauen, U. (2002). Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem. J.* 362, 137–147.
- Piguet, F., Montigny, C. de, Vaucamps, N., Reutenauer, L., Eisenmann, A., and Puccio, H. (2018). Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia. *Molecular Therapy* 0.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27, 181–186.
- Rouault, T.A., and Maio, N. (2017). Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* 292, 12744–12753.
- Salami, C., Jackson, K., Jose, C.L., Alyass, L., Cisse, G.-I., De, B.P., Stiles, K., Chiuchiolo, M.J., Sondhi, D., Crystal, R.G., et al. (2020). Stress-induced Mouse Model of the Cardiac Manifestations of Friedreich's Ataxia Corrected by AAV-mediated Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.*
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2004). Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia. *J. Neurosci.* 24, 1987–1995.
- TeSlaa, T., and Teitell, M.A. (2014). Techniques to Monitor Glycolysis. *Methods Enzymol* 542, 91–114.
- Vyas, P.M., Tomamichel, W.J., Pride, P.M., Babbey, C.M., Wang, Q., Mercier, J., Martin, E.M., and Payne, R.M. (2012). A TAT-Frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum Mol Genet* 21, 1230–1247.
- Wu, S.-B., Wu, Y.-T., Wu, T.-P., and Wei, Y.-H. (2014). Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1331–1344.

Figures

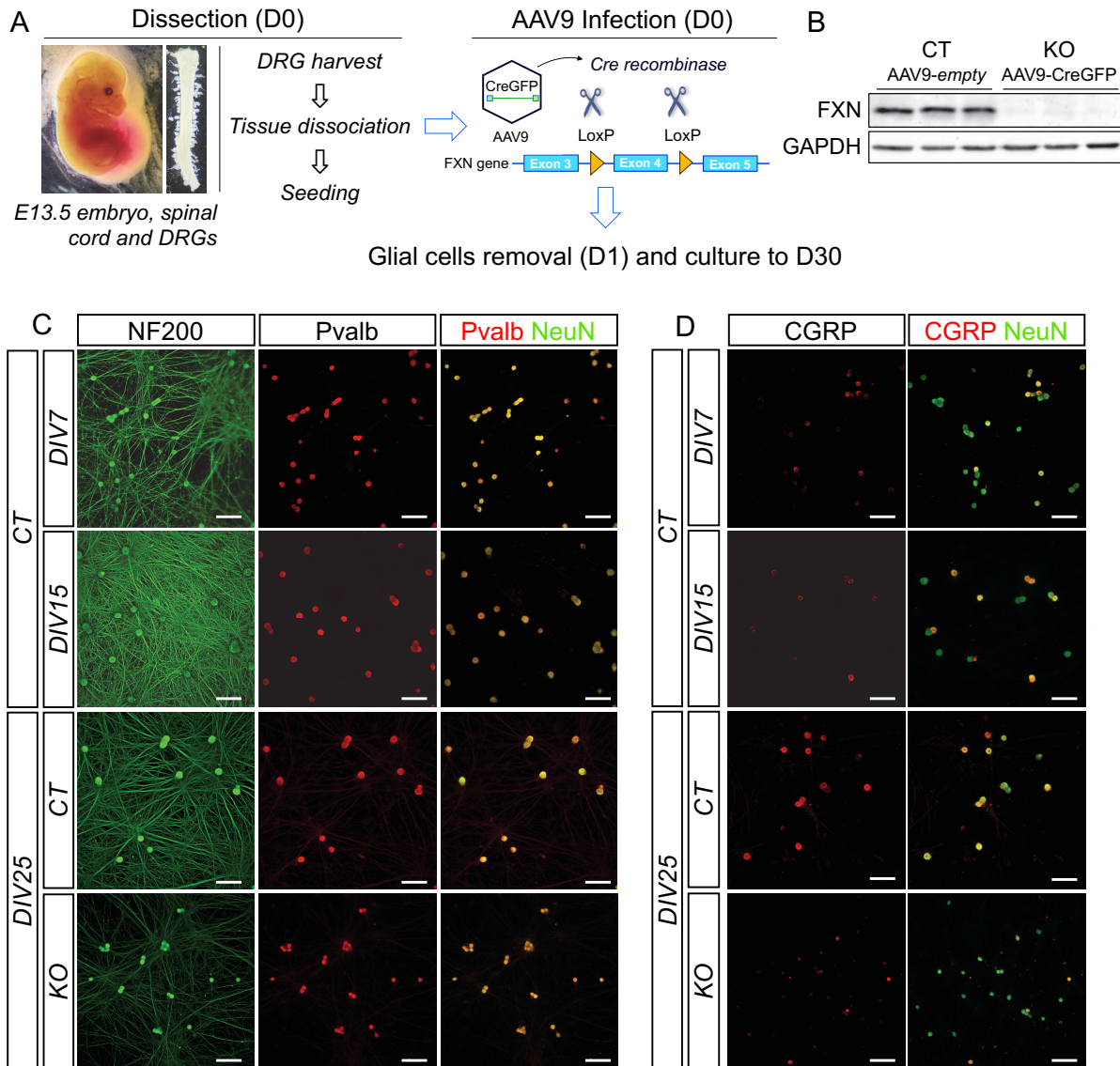


Figure 1: Establishment of a DRG sensory neurons model depleted for frataxin

(A) Summary steps of DRG sensory neuron model establishment. Dorsal Root Ganglia (DRG) are collected from E13.5 mouse embryos, enzymatically digested and cells are plated. On the same day, seeded cells are infected with an AAV9-CreGFP to perform *Fxn* exon 4 excision and total inhibition of frataxin expression. The cells are then treated with antimetabolic to remove glial cells from the culture. (B) Frataxin levels are fully depleted in knock out (KO) cells. (C, D) Control (CT) cells are stained at 7, 15 or 25 days post infection (dpi) by immunofluorescence with antibodies against neurofilament heavy (NF200, C), parvalbumine (Pvalb, C), calcitonin gene related peptide (CGRP, D) and NeuN. At 25 dpi, staining between CT and KO cells are compared. Scale bars: 100 μ m.

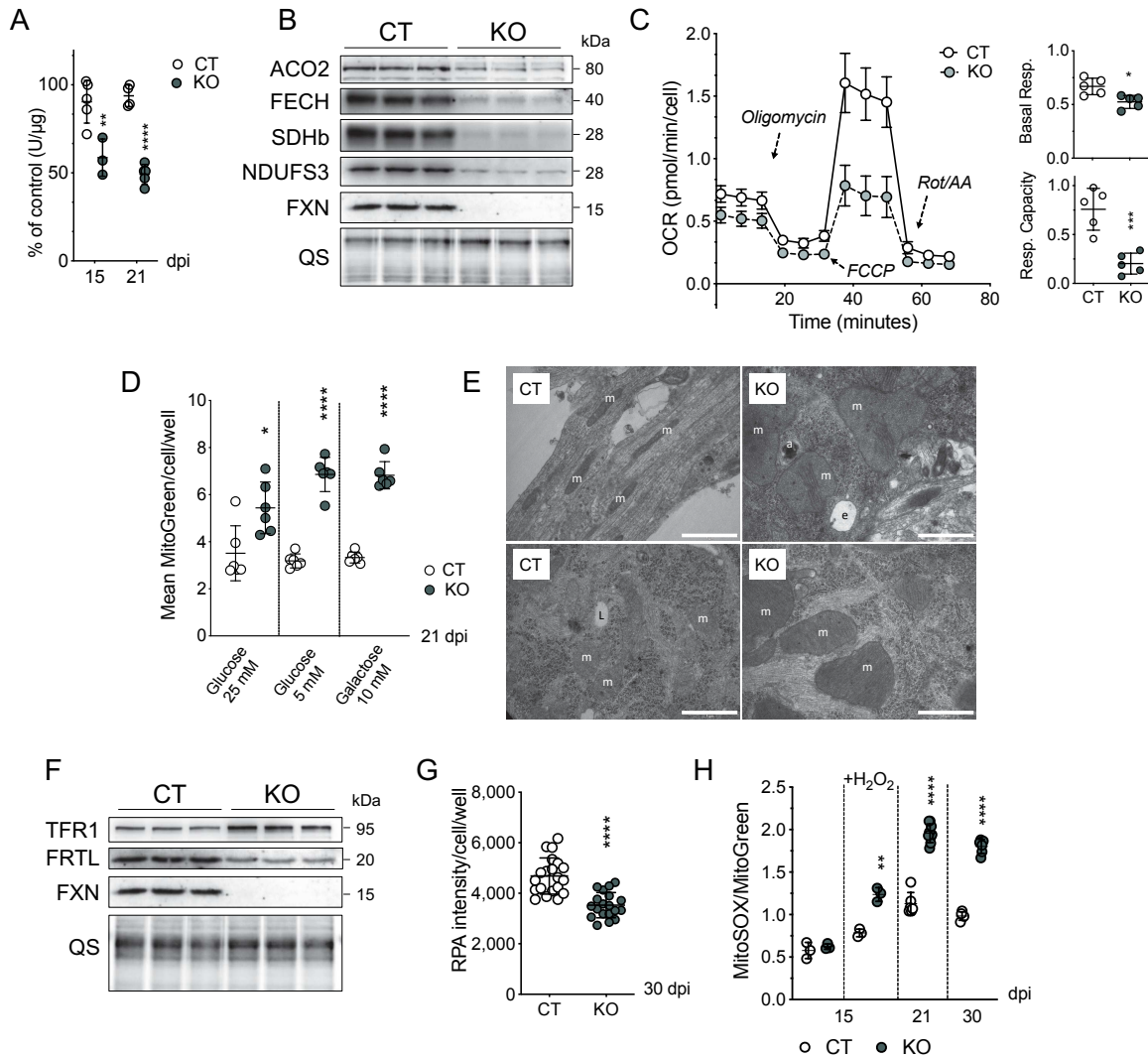


Figure 2: The model recapitulates FA-associated biochemical and cellular features.

(A) Succinate Dehydrogenase (SDH) enzymatic activity is acquired by spectrophotometry, at 15 and 21 dpi. n = 3-5. (B) Protein levels of mitochondrial Fe-S enzymes in the absence of frataxin at 21 dpi. ACO2 = Aconitase; FECH = ferrochelatase; SDHb = Succinate Dehydrogenase B (Complex II); NDUFS3 = Complex I; FXN = frataxin (C) Mitochondrial respiration measured by Seahorse® through measure of Oxygen Consumption Rate (OCR) following addition of different inhibitors. The FCCP treatment reveals mitochondrial maximal respiration which is markedly impaired in FXN depleted DRG sensory neurons. Right panels indicate quantifications of basal respiration and respiration capacity. Rot/AA = Rotenone/Antimycin A. n = 5 (D) Total mitochondrial mass measured at 21 dpi by Mitotracker Green FM. Dots indicate averaged RFU (Relative Fluorescence Units) values from every cell of one well (96-well plates, about 300 cells/well). Cells were treated with glycolysis inhibitory conditions from 7 dpi (5 mM glucose, 10 mM galactose). (E) Analysis by electron microscopy of DRG cells from CT and KO. m, mitochondria; e, endosome; a, autophagosome; L, lipids. Scale bars: 1 μ m. (F) Protein levels of iron metabolism markers TFR1 and FRTL in the absence of frataxin at 21 dpi. TFR1 = transferrin receptor 1; FRTL = ferritin light

chain (G) Mitochondrial iron measured at 30 dpi by RPA (RPA signal is quenched by labile iron pool). $n = 20$ wells. Dots indicate averaged FRU values from every cell of one well (96-well plates, about 300 cells/well). (H) Mitochondrial oxidative stress assessed by MitoSOX. MitoSOX fluorescence was acquired at 15, 21 and 30 dpi in DRG neurons, and normalized to Mitotracker Green FM. Data at 15 dpi show H_2O_2 treated samples ($10 \mu M$) as well as non-treated. Dots indicate averaged MitoSOX/MitoGreen ratios from every cell of one well (96-well plates, about 300 cells/well). (B, F) QS = QuickStain, indicates a snapshot from QuickStain staining (total protein levels). QS images show representative staining. (A, C, D, G, H) $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ (Student t-test). Error bars indicate SD.

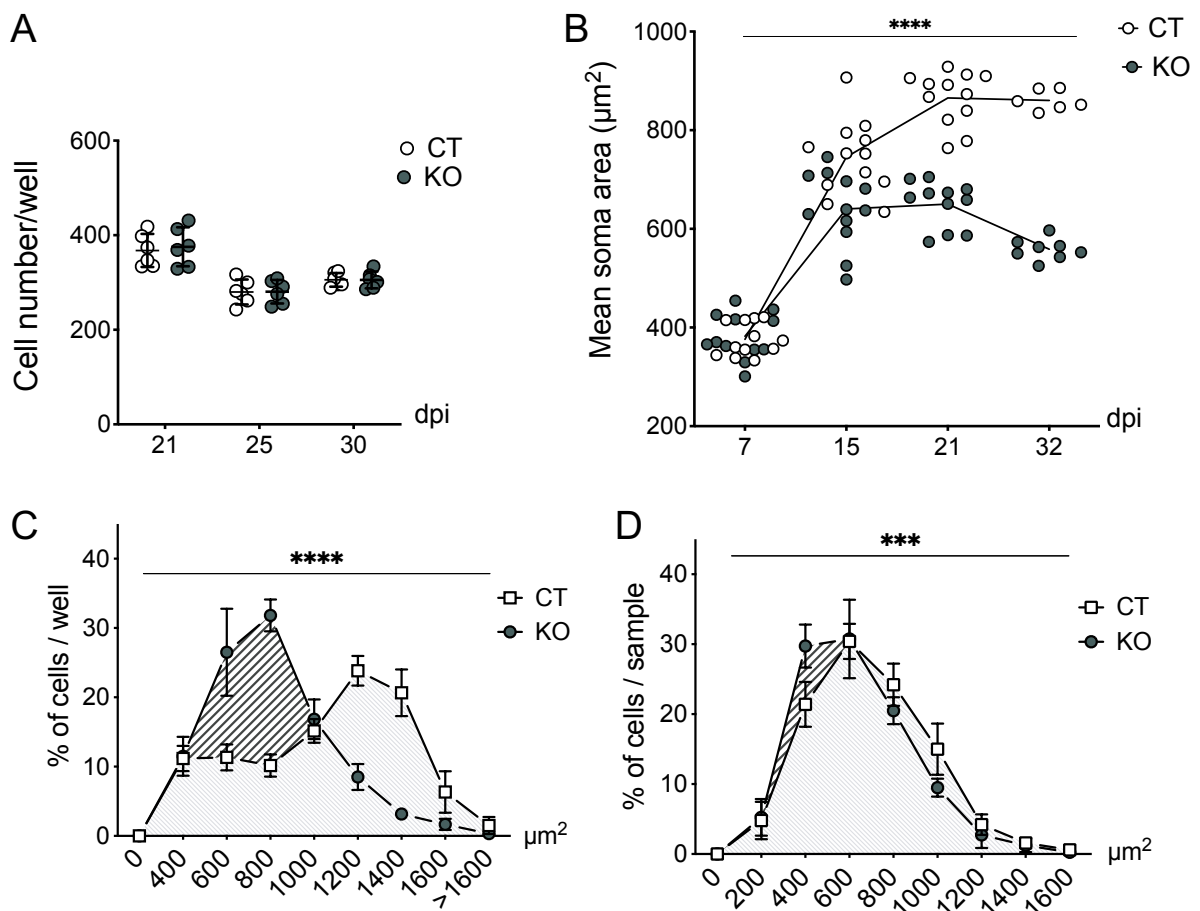


Figure 3: DRG sensory neurons show similar survival but decreased soma size in the absence of frataxin

(A) Cell viability by counting the number of cells in a well from a 96-well plate, at 21, 25 and 30 dpi. $n = 6$ wells (B) DRG neuron soma area measured in 96-well plates at different time points. Dots indicate averaged areas from every cell of one well (96-well plates, about 300 cells/well). $n = 8-10$ wells. (C) Cells ranked by soma areas and frequency of each group calculated (% of cells between N and $N-1$ size value). $n = 6$ wells (about 300 cells/well). (D) Soma area distribution of Pvalb+ cells of lumbar DRG from 9.5 weeks old Pvalb-Cre mice. (B, C, D) Two-way ANOVA with Geisser Greenhouse Correction $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$. Error bars indicate SD.

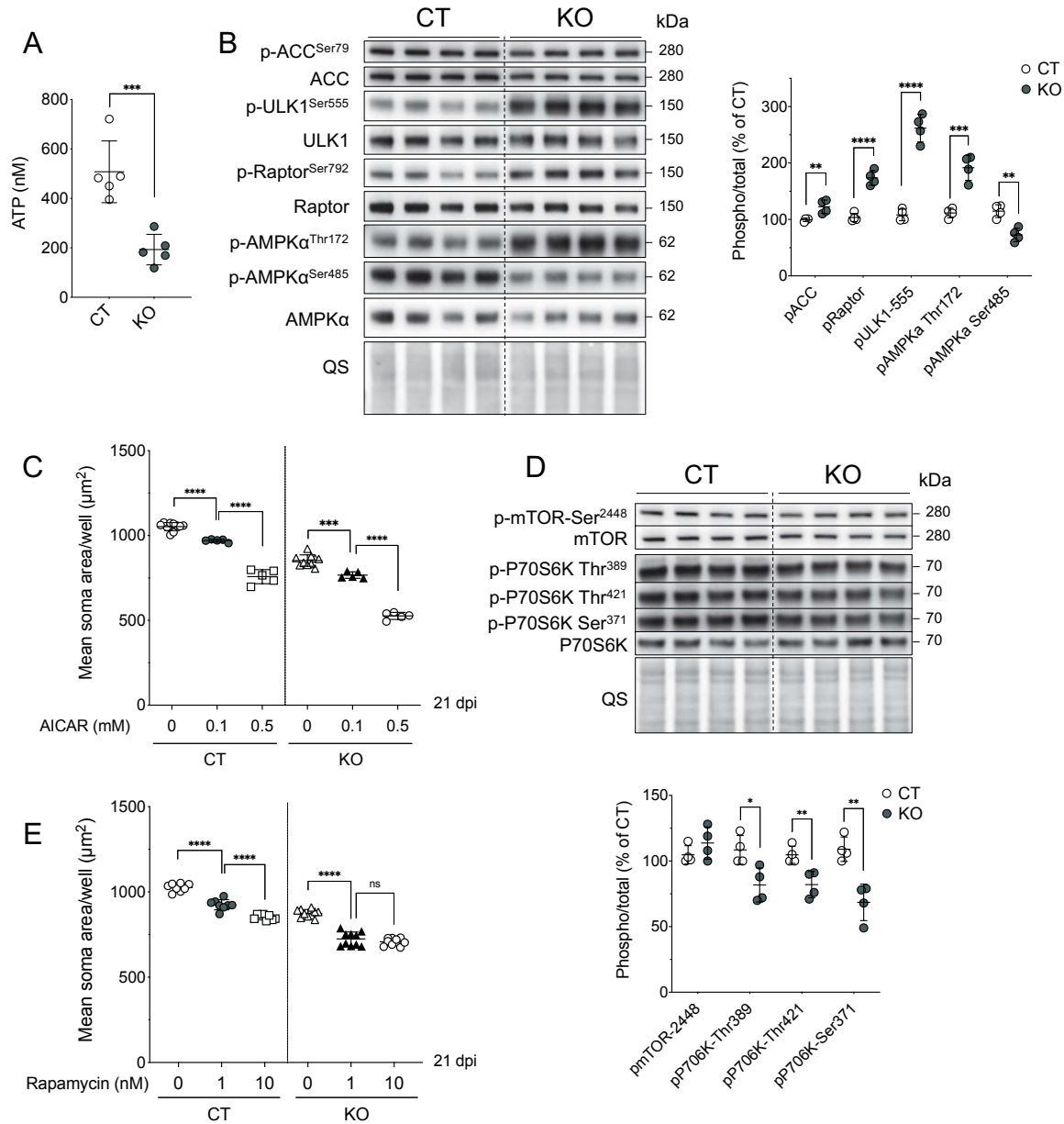


Figure 4: AMPK/mTOR pathways play a role in the growth of DRG sensory neurons

(A) ATP levels of CT and KO neurons at 30 dpi (concentration in measure well in nM). (B) Western Blot of phosphorylated and total proteins of AMPK pathway. Right panel indicates quantification of the Western Blot. QS staining used as a loading control for quantification. (C) CT and KO cells treated for 14 days with 0.01, 0.1 or 0.5 mM of AICAR, and soma area measured at 21 days. n = 5-10 wells (about 300 cells/well). (D) Western Blot of phosphorylated and total proteins of mTOR pathway. Bottom panel indicates quantification of the Western Blot. QS staining used as a loading control for quantification. (E) CT and KO cells treated for 14 days with 1 or 10 nM of rapamycin, and soma area measured at 21 days. n = 8-10 wells (about 300 cells/well). (B, D) QS = QuickStain, indicates a snapshot from QuickStain staining (total protein levels). QS images show representative staining. (A, B, D) Student t-test, (C, E) One-way ANOVA followed by Tukey for multiple comparison. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Error bars indicate SD.

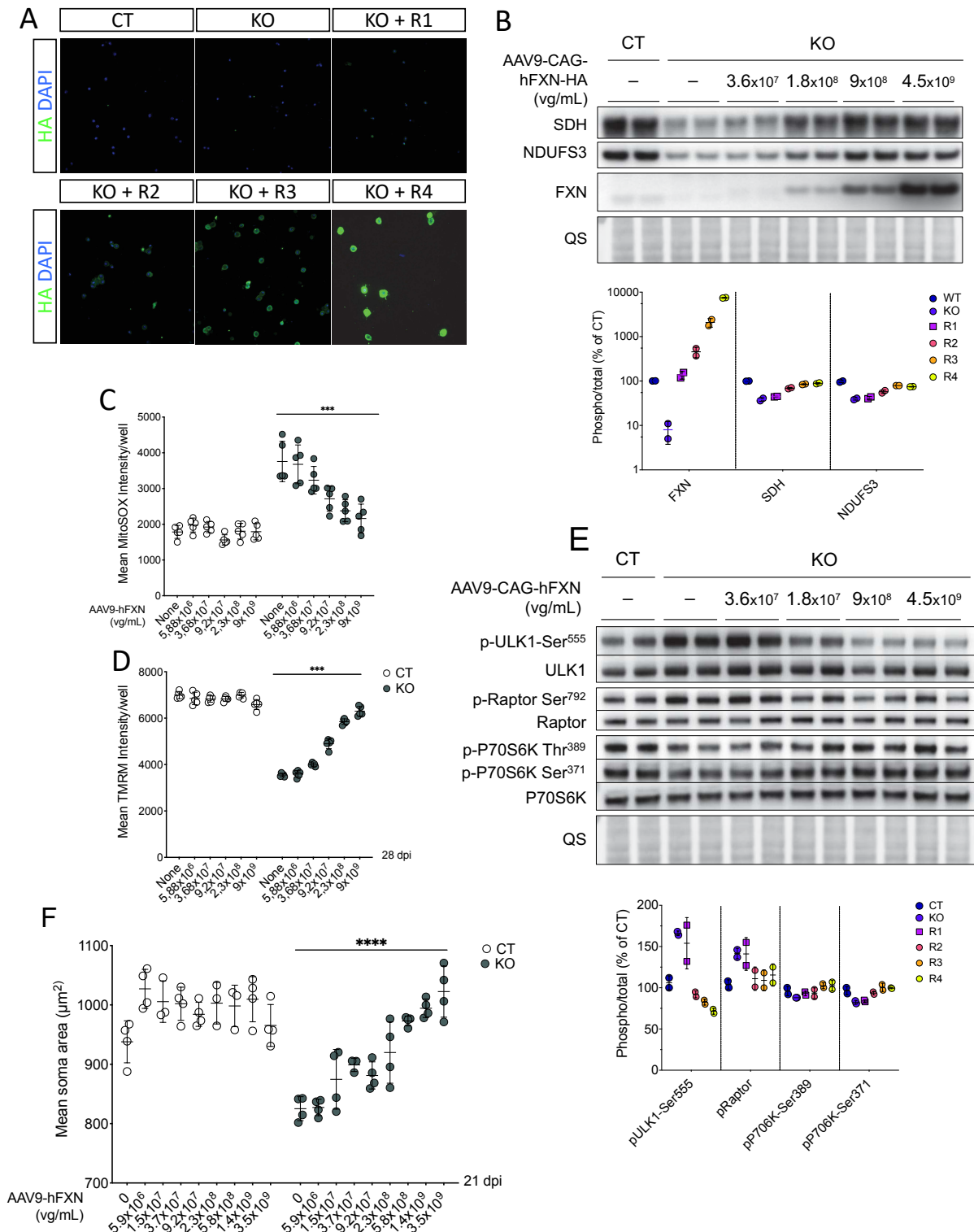


Figure 5: Dose-dependent control of KO phenotypes through hFXN expression

(A) Immunohistochemistry for HA-hFXN. R indicates Rescue by hFXN-HA. R1 = 3.6×10^7 vg/mL ; R2 = 1.8×10^6 vg/mL ; R3 = 9×10^8 vg/mL ; R4 = 4.5×10^9 vg/mL of AAV9-CAG-hFXN-HA. (B) Western Blot for Fe-S enzymes SDH and NDUFS3 following expression of hFXN-HA. Note, anti-FXN antibody (clone 4F9) has an extensively higher affinity for hFXN than mouse FXN (mFXN).

Bottom panel indicates quantification of the Western Blot. QS staining used as a loading control for quantification. (C) MitoSOX signal following increase in frataxin expression. (D) Mitochondrial health measured by TMRM, following increase in frataxin expression. (C, D). Dots indicate averaged RFU from every cell of one well (96-well plates, about 300 cells/well). n = 4 wells. (E) Western Blot of phosphorylated and total proteins of AMPK and mTOR downstream targets, following increase in frataxin expression. Bottom panel indicates quantification of the Western Blot. QS staining used as a loading control for quantification. (F) DRG neuron soma area measured in 96-well plates at 21 dpi, following increase in frataxin expression. Dots indicate averaged areas from every cell of one well (96-well plates, about 300 cells/well). n = 4 wells. (B, F) QS = QuickStain, indicates a snapshot from QuickStain staining (total protein levels). QS images show representative staining. (C, D, F) Two-way ANOVA with Geisser Greenhouse Correction ***p<0.001; ****p<0.0001. Error bars indicate SD.

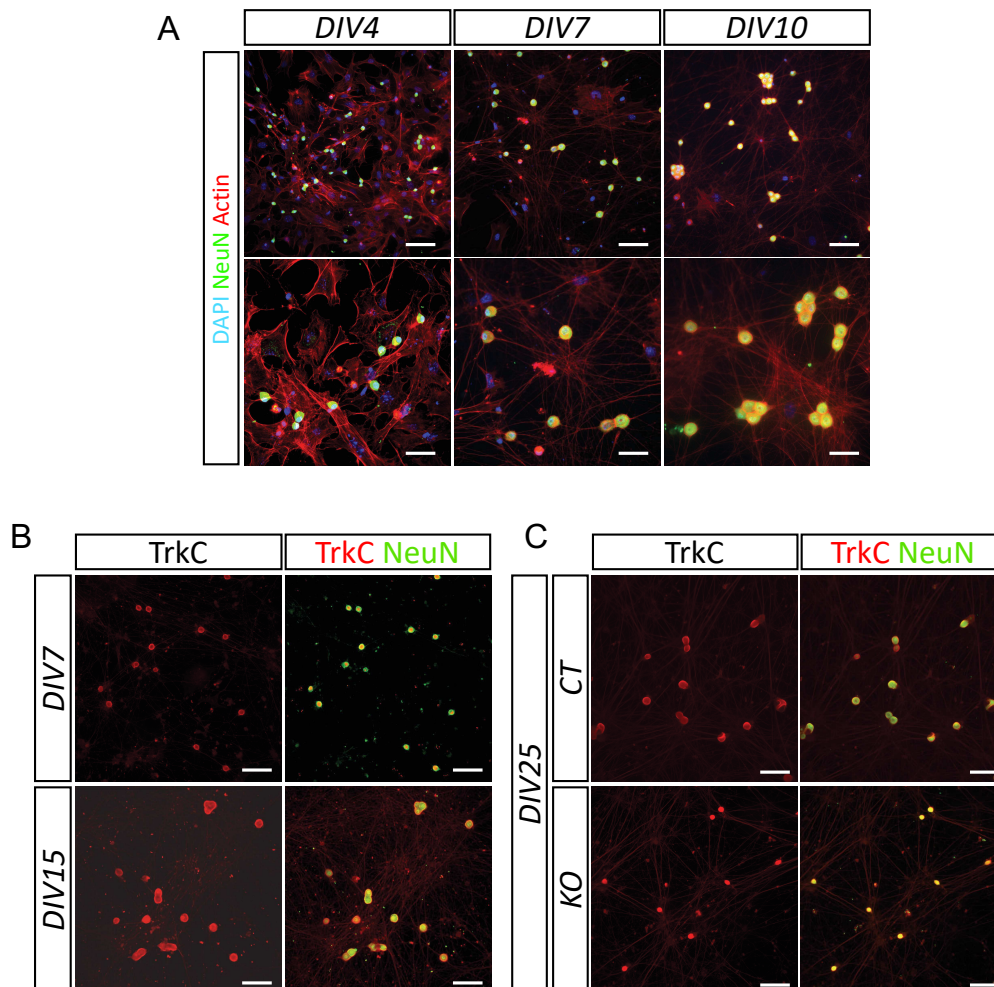


Figure S1

(A) Staining of actin (Phalloidin) and NeuN at 4, 7 and 10 DIV in CT cells. Glial cells are removed from the culture following antimitotic agent treatment. (B) CT cells stained at 7, 15 or 25 days post infection (dpi) by immunofluorescence with antibodies against TrkC and NeuN. At 25 dpi, staining between CT and KO cells are compared. Scale bars: 100 μ m.

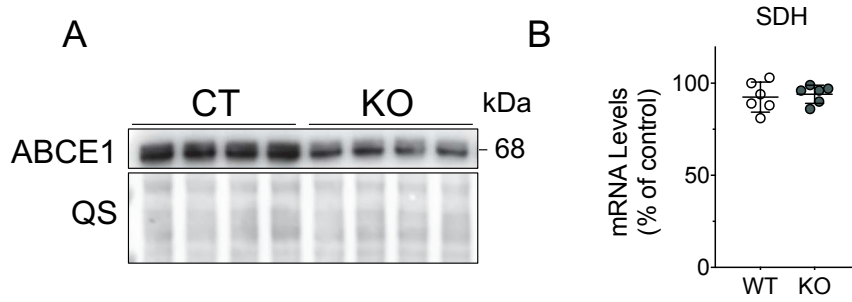


Figure S2

(A) Western Blot for ABCE1 cytosolic Fe-S protein at 21 dpi. (B) mRNA levels by RT-qPCR of SDH at 21 dpi. QS = QuickStain, indicates a snapshot from QuickStain staining (total protein levels). QS image show representative staining. Error bars indicate SD.

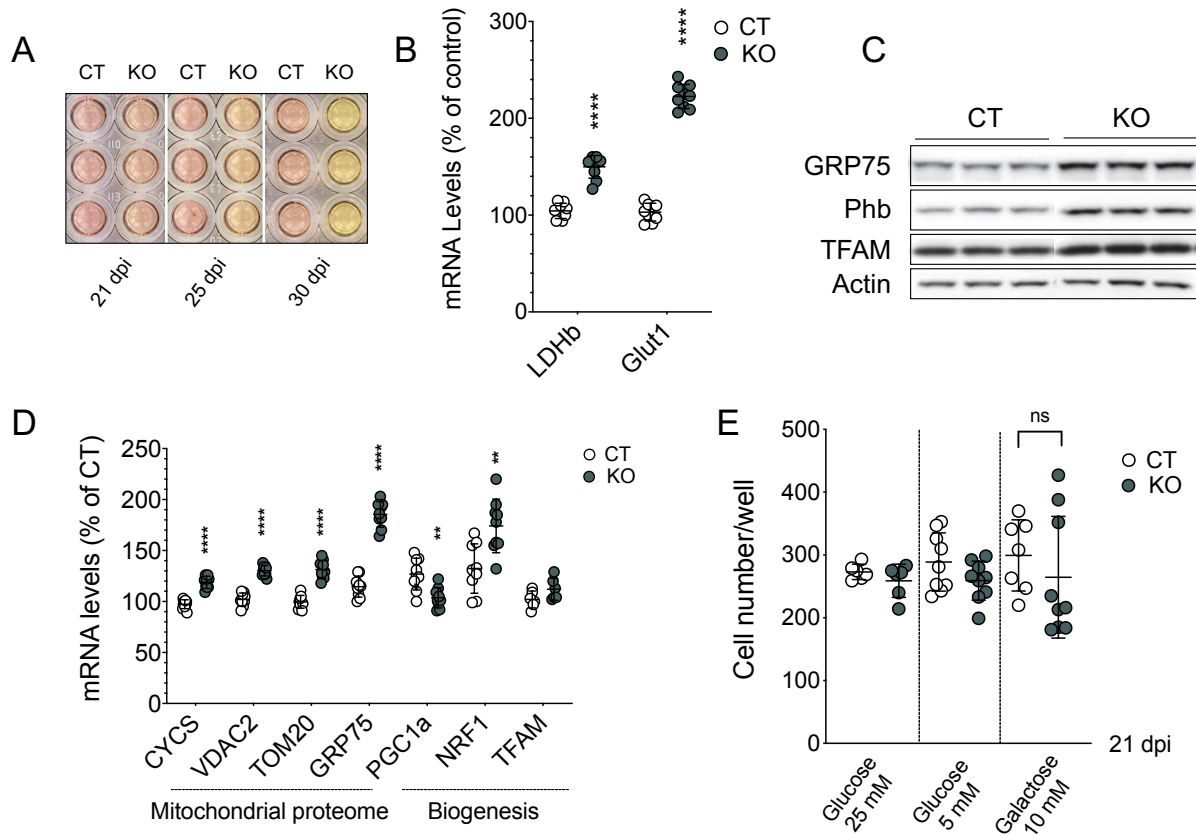


Figure S3

(A) Color of DRG neuron culture media in CT and KO neurons at 21, 25 and 30 dpi. (B) mRNA levels by RT-qPCR of Lactate Dehydrogenase B (LDHb) and Glucose transporter 1 (Glut1) at 21 dpi. n = 9. (C) Western Blot of mitochondrial markers Glucose-regulated protein 75 (GRP75), Prohibitin (Phb) and Transcription Factor A Mitochondrial (TFAM) at 30 dpi. Actin was used as a loading control. (D) mRNA levels by RT-qPCR of genes from mitochondrial proteome and mitochondrial biogenesis (CYCS = Cytochrome C, somatic; VDAC2 = Voltage Dependent Anion Channel 2; TOM20 = Translocase of Outer Membrane 20 kDa; PGC1 α = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; NRF1 = Nuclear Respiratory Factor 1). (E) Total mitochondrial mass measured at 21 dpi by Mitotracker Green FM. Dots indicate averaged RFU (relative fluorescence units) values from every cell of one well (96-well plates, about 300 cells/well). Cells were treated with glycolysis inhibitory conditions from 7 dpi (5 mM glucose, 10 mM galactose). (B, D, E) Student t-test. ns = non-significant; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. Error bars indicate SD.

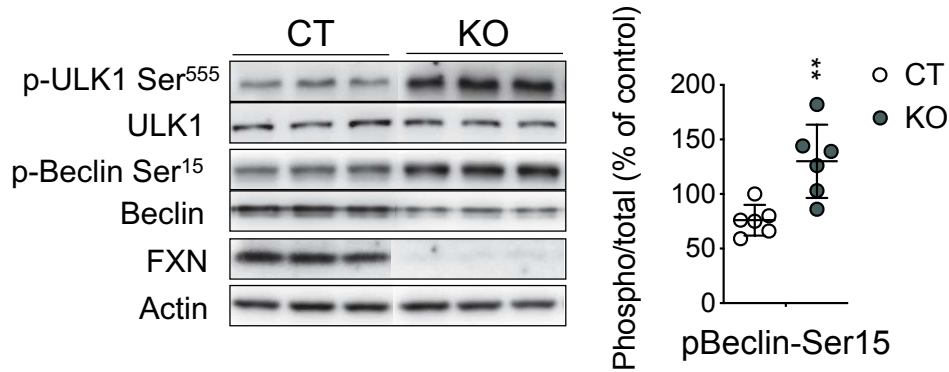


Figure S4

(A) Western Blot of ULK1, Beclin and phosphorylated residues at Serine 555 and Serine 15, respectively. Right panel shows quantification of phospho-Beclin Ser15 relative to total Beclin. Actin was used as a loading control for quantifications. Student t-test. ** $p < 0.01$. Error bars indicate SD.

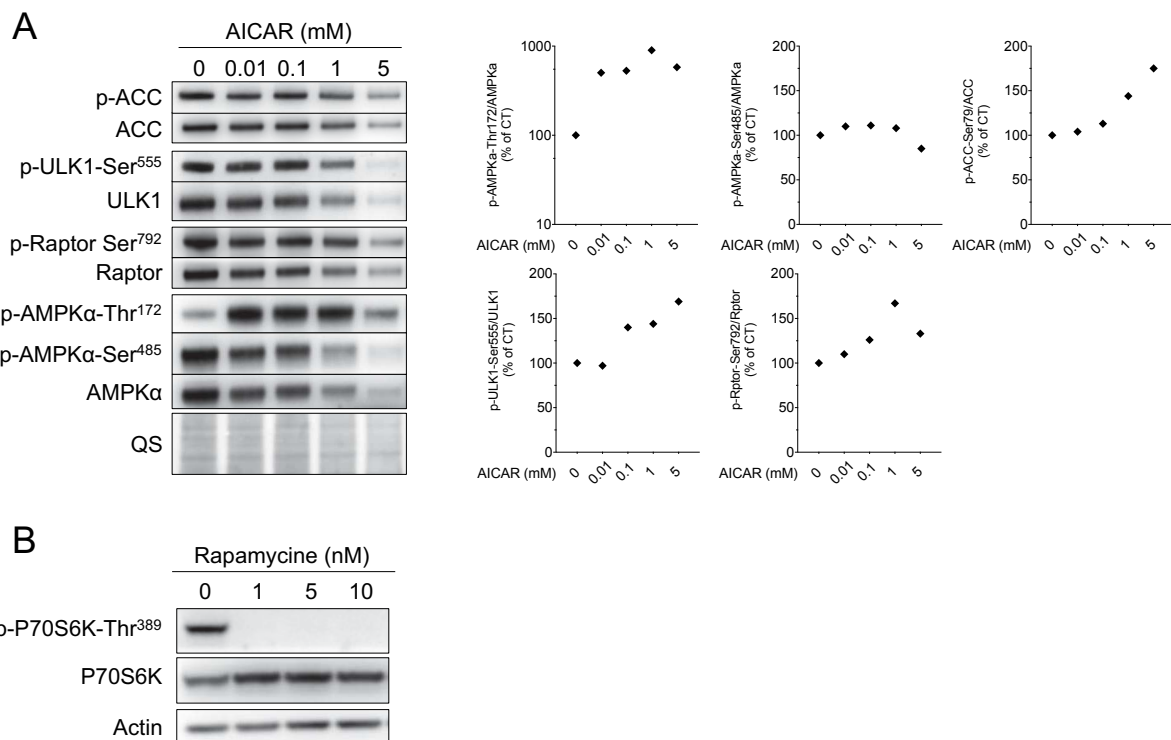


Figure S5

(A) Western Blot of phosphorylated and total proteins of AMPK pathway at 21 dpi following 96h treatment with different concentrations of AICAR. Right panel indicates quantification of the Western Blot. QS staining was used as a loading control for quantifications. (B) Western Blot of phosphorylated and total proteins of mTOR pathway, following 96h treatment with different concentrations of rapamycin. Actin was used as a loading control.

Antibody	Reference	Dilution
CGRP	24112, Immunostar	1/1000
HA	ab130275, Abcam	1/1000
NeuN	266 004, Synaptic Systems	1/500
NF200	ab4680, Abcam	1/1000
Pvalb	PV 27, Swant	1/2000
TrkC	AF1404, R&D Systems	1/500

Table S1 : List of antibodies used in immunofluorescence experiments

Antibody	Reference	Dilution
ABCE1	ab32270, Abcam	1/1000
ACC	3676, CST	1/2000
ACO2	R2377-IGBMC, Home made	1/2000
Actin	3700, CST	1/1000
AMPKa	5831, CST	1/2000
Beclin	3495, CST	1/1000
FECH	R2381-IGBMC, Home made	1/2000
FRTL	ab69090, Abcam	1/1000
FXN	Clone 4F9, Home made	1/5000
GRP75	sc-133137, SCBT	1/1000
mTOR	2983, CST	1/1000
NDUFS3	439200, Invitrogen	1/2000
p-ACC-Ser79	11818, CST	1/2000
p-AMPKa-Ser485	4185, CST	1/1000
p-AMPKa-Thr172	50081, CST	1/1000
p-Beclin-Ser15	13825, CST	1/1000
p-mTOR-Ser2448	5536, CST	1/1000
p-P70S6K-Ser371	9208, CST	1/500
p-P70S6K-Thr389	9234, CST	1/500
p-P70S6K-Thr421	9204, CST	1/1000
p-Raptor-Ser792	2083, CST	1/1000
p-ULK1-Ser555	5869, CST	1/1000
P70S6K	9202, CST	1/2000
Phb	ab28172, Abcam	1/1000
Raptor	2280, CST	1/1000
SDH	ab14714, Abcam	1/2000
TFAM	ab131607, Abcam	1/1000
TFR1	ab84036, Abcam	1/2000
ULK1	8054, CST	1/1000

Table S2 : List of antibodies used in Western blot experiments

Gene	Fd-Primer	Rv-Primer
<i>CYCS</i>	GAACGTTTCGTGGTGTGACC	CCCAGGTGATGCCTTTGTTCT
<i>GAPDH</i>	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	CTGTAGCCAAATTCGTTGTC
<i>GLUT1</i>	TACGGGGTCTTAAGTGCGTC	CGGCCCGTCACCTTCTTG
<i>GRP75</i>	GACAAGGATGCCCAAGGTTTC	GGTAAAGACGCCTCCCAGAG
<i>LDHB</i>	TGGTGGACAGTGCCTATGAAG	CATTGAGGATGCACGGGAGA
<i>NRF1</i>	ATGTCCGCACAGAAGAGCAA	TGTACCAACCTGGATGAGCG
<i>PGC1A</i>	GCAGGTCTGAACGAAACTGAC	CTTGCTCTTGGTGGAAAGCAG
<i>SDHb</i>	TGGTGGAAACGGAGACAAGTA	TGGCAGCGGTAGACAGAGAA
<i>TFAM</i>	ATAGGCACCGTATTGCGTGA	AGTTTTGCATCTGGGTGTTTAGC
<i>TOM20</i>	TGGGCTTTCCAAGTTACCTGA	TGGTCCACACCCTTCTCGTA
<i>VDAC2</i>	CTGTGTACCGGTATGCCAC	GAAAATTCCACACCGCTGCAT

Table S3 : List of primers used in RT-qPCR experiments

4 Résultats complémentaires du projet

4.1 Étude du rôle du métabolisme de l'acide lipoïque dans la taille des neurones du modèle

Comme discuté en introduction, le métabolisme de l'acide lipoïque (LA) est impacté dans l'AF, dû à la présence d'une enzyme à Fe-S (LIAS) au sein la chaîne de biosynthèse du LA chez les mammifères. L'activité de LIAS peut être évaluée indirectement par Western Blot en utilisant un anticorps contre l'acide lipoïque, et en comparant avec les niveaux totaux des protéines, indépendamment de la présence de LA. Dans les neurones sensitifs de DRG de souris en culture, l'absence de frataxine impacte fortement le chargement du LA aux protéines acceptrices, probablement à cause d'une baisse de Fe-S sur LIAS (**Figure 29**). Par ailleurs, nous voyons aussi une forte diminution de la LIAS. De par le rôle essentiel de ces enzymes dans le métabolisme énergétique et notamment dans le catabolisme des acides aminés (glycine, acides aminés branchés, lysine), j'ai émis l'hypothèse que le déficit en LA pourrait jouer un rôle important dans la diminution de la croissance des cellules KO. J'ai donc cherché à mettre en place des outils moléculaires me permettant de traiter cette hypothèse. L'enjeu était de réussir à établir un modèle dans lequel il était possible de réactiver le chargement du LA afin d'étudier l'impact de cette voie sur la croissance des cellules du modèle.

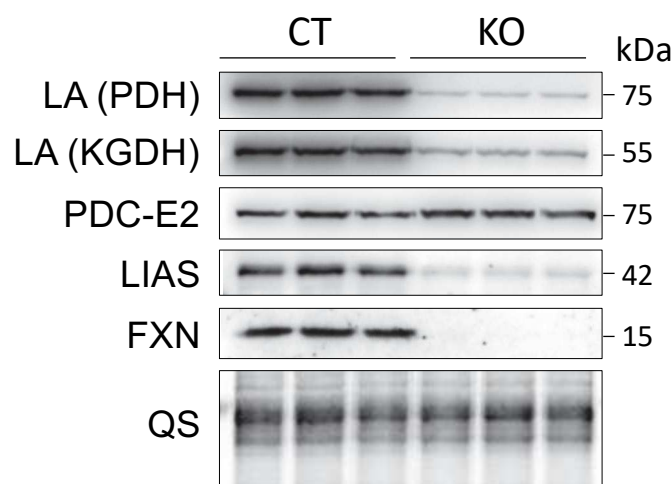


Figure 29 : Biosynthèse de l'acide lipoïque dans les neurones sensitifs

Analyse par Western blot des niveaux de l'acide lipoïque lié aux sous unités E2 de PDH et KGDH, PDC-E2 (totale), ainsi que de LIAS à 21 dpi, en présence ou en absence de frataxine dans les

neurones sensitifs de DRG. QS = QuickStain, marque les protéines totales et est utilisé comme contrôle de chargement. L'image montrée ici est représentative pour l'ensemble des protéines.

4.1.1 Métabolisme des acides aminés en rapport avec LA dans le modèle

La mesure de la Glycine et des acides aminés branchés (BCAA) dans le modèle m'a permis de mettre en évidence leur augmentation, en accord avec des mesures réalisées dans les cardiomyocytes de souris délétés en frataxine (modèle *MCK-Cre-FXN^{L3/L-}*) (travail non publié de Brahim Belbellaa, ancien postdoc du laboratoire). En effet, à 30 dpi, on remarque que les niveaux de ces acides aminés sont augmentés dans les neurones KO par rapport au WT (**Figure 30A**), pouvant indiquer d'un défaut de leur dégradation et d'une baisse d'activité des enzymes à LA. Par ailleurs, les niveaux protéiques de deux gènes associés au métabolisme des acides aminés sont augmentés en absence en frataxine (**Figure 30B**). Ces deux gènes font partie du métabolisme de synthèse *de novo* de la sérine. L'hypothèse est que la glycine s'accumulant car ne pouvant plus être utilisée par le GCS, est convertie en sérine par le mécanisme de synthèse *de novo* de la sérine.

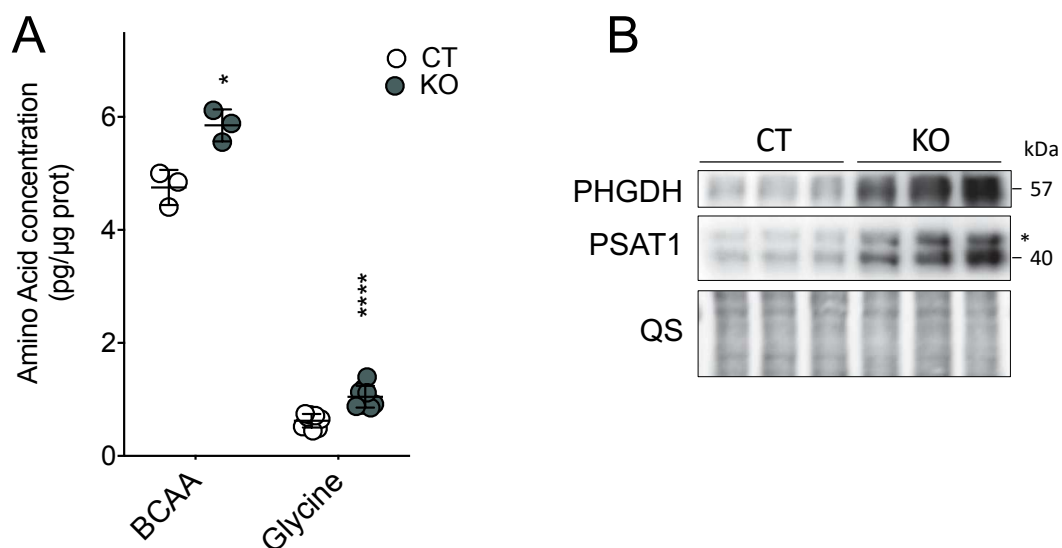


Figure 30 : Métabolisme des acides aminés dans le modèle

(A) Mesure des acides aminés branchés (BCAA) (n = 3) et de la Glycine (n = 9) en présence (CT) ou absence de frataxine (KO), à 30 dpi. (B) Niveaux protéiques (30 dpi) de PSAT1 et PHGDH (biosynthèse *de novo* de la sérine) * = bande aspécifique. (A) BCAA, n = 3 ; Glycine, n = 9. *p<0,05 **** p<0.0001, student t-test. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

4.1.2 Développement et test du système mtLplA

Chez les eucaryotes, il n'est pas décrit de mécanisme d'assimilation du LA environnemental (voir introduction). Un traitement au LA exogène ne permettrait donc pas de restaurer le chargement aux protéines réceptrices. J'ai donc développé un plasmide (pAAV-mtLplA) me permettant d'exprimer la protéine bactérienne LplA (responsable de la capacité d'assimilation de LA exogène chez les bactéries), et de l'adresser aux mitochondries (**Figure 31A**). En parallèle, une construction similaire exprimant un mutant catalytique de LplA, mtLplA-S221P a également été développée (**Figure 31A**). Le mutant catalytique est issue d'une étude décrivant une réduction de 2 à 10% d'activité de l'enzyme en présence de la mutation (Hermes and Cronan, 2009). Après expression transitoire dans des HEK, deux bandes dont les tailles correspondent au précurseur mtLplA ainsi qu'à une version clivée, sont détectées par western blot avec un anticorps contre la LplA, suggérant un bon import dans les mitochondries (**Figure 31B**).

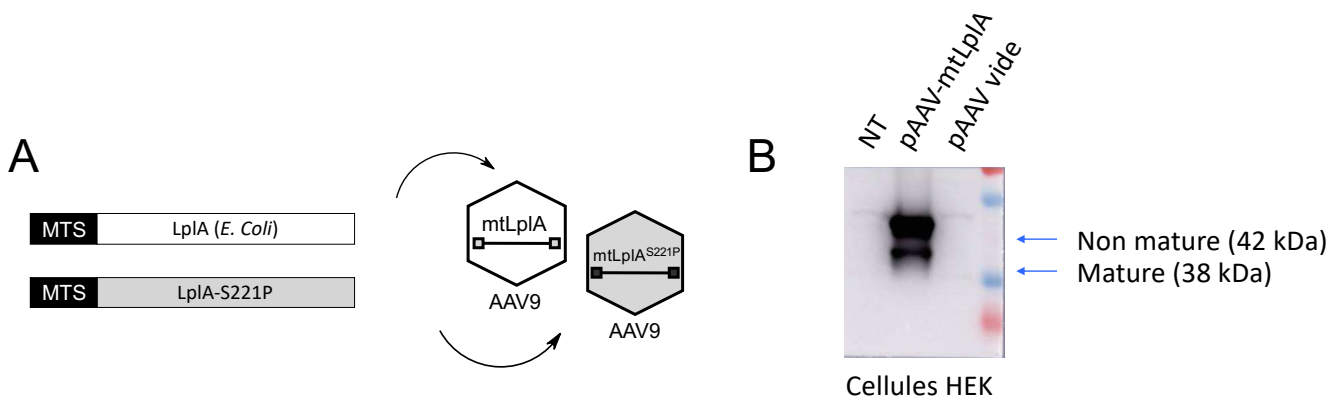


Figure 31 : Description et expression du système mtLplA

(A) Schématisation des constructions utilisées dans le système. MTS = Mitochondrial Targeting Sequence. (B) Détection de l'expression de la mtLplA après transfection transitoire dans des cellules HEK par western blot avec un anticorps anti-LplA. NT = non transfecté.

En collaboration avec Valentine Mosbach, postdoc dans l'équipe, j'ai d'abord testé la transfection du plasmide dans un modèle AF de fibroblastes présentant un déficit en chargement du LA (clone ID3, Calmels et al., 2009b). L'expression de mtLplA permet d'augmenter sensiblement le chargement en LA sur la PDH et KGDH, et cela sans ajout de LA exogène (**Figure 32**). Cela s'explique par la possibilité que le sérum (composition connue incomplète) contienne du LA en basal. Le mutant LplA-S221P ne permet pas cette augmentation (**Figure 32**). On remarque étonnamment une augmentation du chargement du LA en présence d'un

traitement en LA unique (100 μ M), suggérant qu'un mécanisme d'assimilation du LA pourrait exister dans ces cellules, bien que moins efficace que l'activité de LplA.

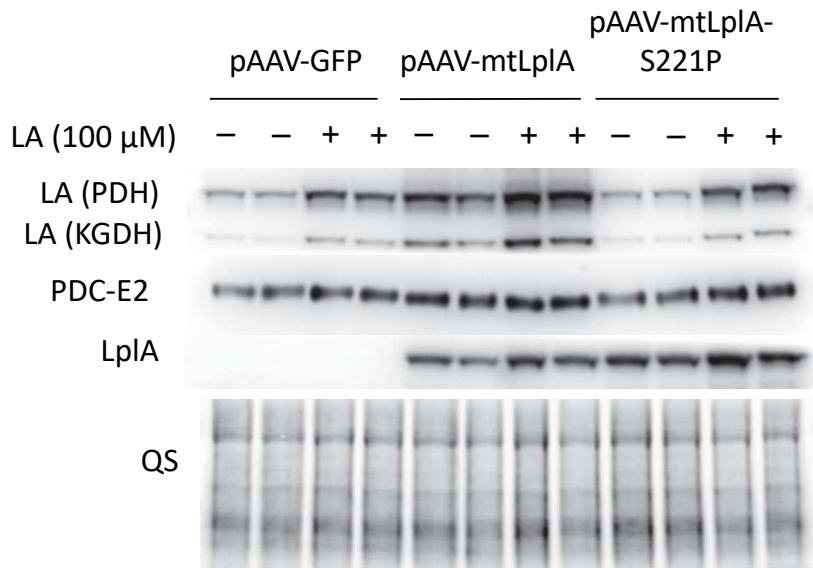


Figure 32 : Test du système mtLplA dans des fibroblastes de souris

Des fibroblastes de souris (clones ID3) exprimant une version mutée de la frataxine (I154F) (Calmels et al., 2009), ont été transfectés par un vecteur pAAV-GFP (contrôle), pAAV-mtLplA ou pAAV-mtLplA-S221P en combinaison avec un traitement à l'acide lipoïque (LA). Les niveaux de LA, de PDC-E2, ainsi que de LplA sont mesurés.

Après production des vecteurs AAV9-mtLplA et AAV9-mtLplA-S221P, j'ai pu tester le fonctionnement du système dans le modèle de neurones de DRG. Pour toutes les expériences réalisées en utilisant ce système dans les neurones, le principe sera le même : les cellules sont infectées à 7 dpi par les vecteurs AAV9-mtLplA ou AAV9-mtLplA-S221P (avant début des phénotypes), et le traitement à l'acide lipoïque commence à 8 dpi et est maintenu sur toute la durée de la culture. L'expression de mtLplA et de sa version mutée ne sont pas toxiques aux neurones (**Figure 33A**). L'expression de mtLplA permet de restaurer complètement le chargement du LA aux niveaux du KO à partir de 10 μ M (**Figure 33B**). Sans ajout de LA, la restauration est nette mais toujours partielle. Cela est dû à la présence de LA dans le milieu de culture (4,5 nM final). En revanche, le mutant LplA-S221P ne permet pas une inhibition totale de l'activité en présence de 10 ou 100 μ M de LA. En effet, cette mutation ne permet qu'une réduction partielle de l'activité de LplA-S221P, expliquant pourquoi le chargement du LA est aussi efficacement effectué avec le mutant à haute concentrations en LA.

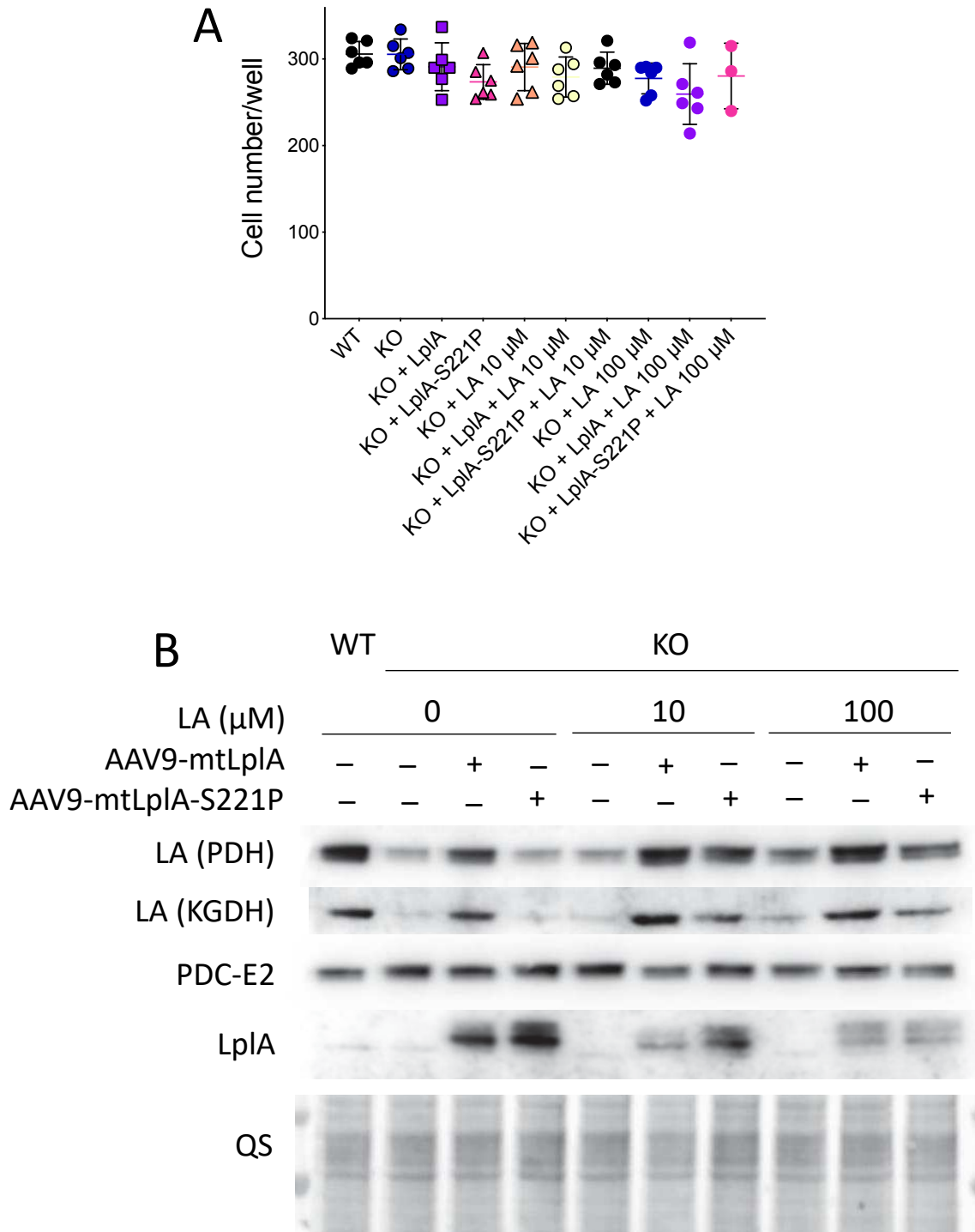


Figure 33 : Test du système mtLpIA dans les cultures de neurones de DRG

Les neurones de DRG WT ou KO en culture ont été infectés à 7 dpi par un vecteur AAV9-mtLpIA ou AAV9-mtLpIA-S221P en combinaison avec un traitement au LA. (A) Évaluation de la survie à 29 dpi. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. (B) Les niveaux de LA, de PDC-E2, ainsi que de LpIA sont mesurés par Western Blot.

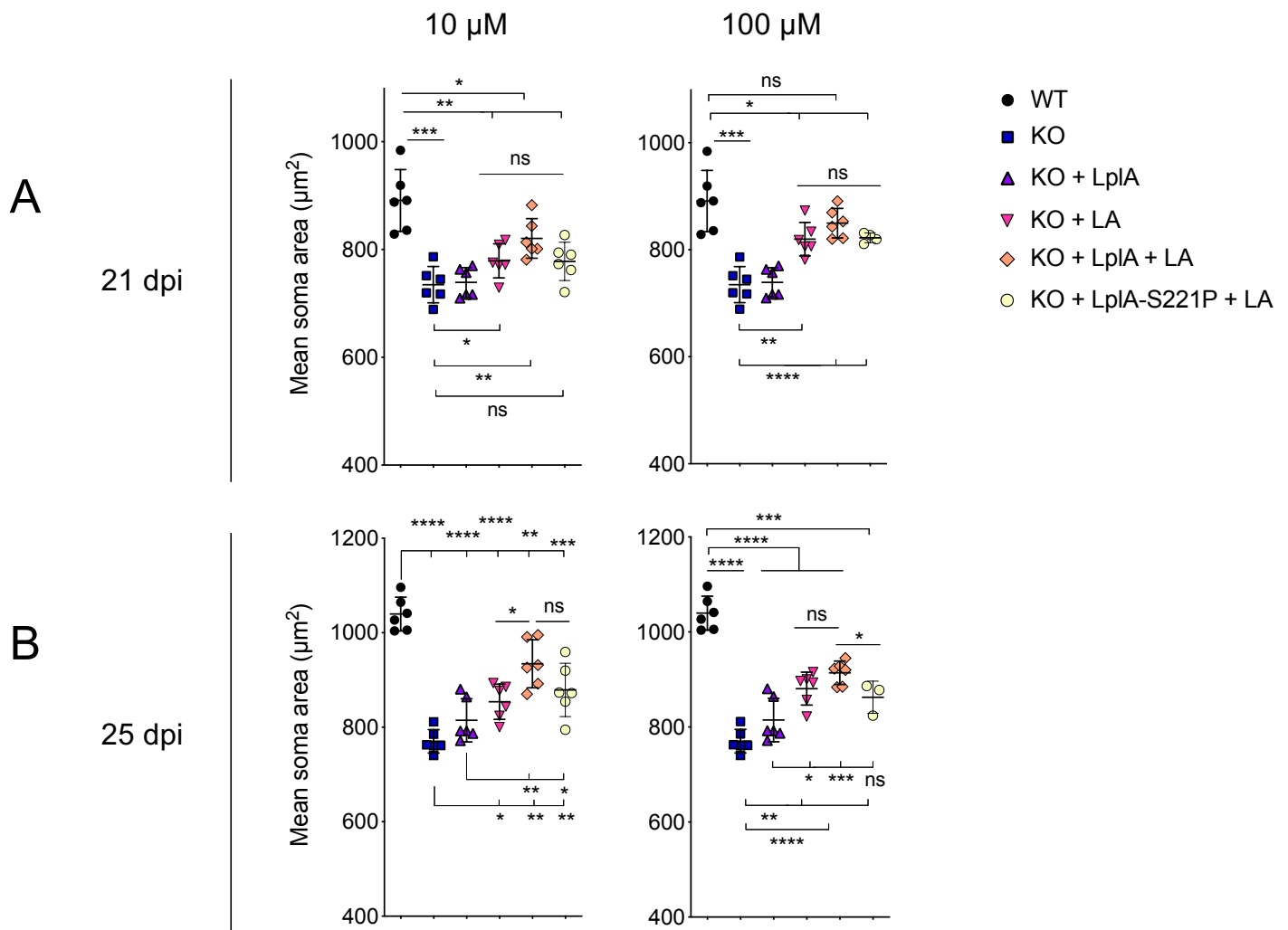


Figure 34 : Mesure de la taille du soma des neurones en présence du système mtLplA

L'aire des soma des neurones de DRG du système est mesurée à 21 ou 25 dpi. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs de toutes les cellules d'un puits d'une plaque 96 puits (environ 200-300 cellules). One-way ANOVA, suivi de comparaisons multiples par Tukey. ns = non significatif * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$. $n = 6$. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

4.1.3 Etude de l'impact de l'expression de mtLplA sur la taille des cellules

Après avoir validé l'efficacité de l'enzyme mtLplA à restaurer le chargement de l'acide lipoïque dans les neurones KO, j'ai cherché à explorer mon hypothèse : ce système permet-il de restaurer la taille des neurones ? A 21 dpi, l'expression de mtLplA avec 10 μM de LA restaure partiellement la taille des neurones KO (**Figure 34A**, panneau de gauche). Combiné à 100 μM de LA, la taille des neurones est similaire à celle du WT (**Figure 34A**, panneau de droite). De manière surprenante, le traitement LA 100 μM corrige à lui seul la moyenne de la

taille des soma (**Figure 34A**, panneau de droite). Un effet plus léger mais significatif est également observé à 10 μM , où les cellules uniquement traitées au LA ou en combinaison avec la mtLplA-S221P sont plus petites qu'en mtLplA + LA, mais plus larges que dans le KO (**Figure 34A**, panneau de gauche). Ceci est plus évident lorsqu'on décompose les résultats en données cellule par cellule (**Figure 35A, C**). En effet, on remarque que la condition mtLplA + LA améliore la présence des cellules les plus grandes ($>1200 \mu\text{m}^2$), tandis que le LA seul augmente la moyenne de la taille des cellules, mais en jouant plus sur les cellules moyennes ($800\text{-}1200 \mu\text{m}^2$) (**Figure 35**). A 25 dpi, les dynamiques entre les conditions sont conservées (**Figure 34B et 35B, D**). Néanmoins, la restauration de la taille est moins nette, démontrant potentiellement un effet limitant dans le temps.

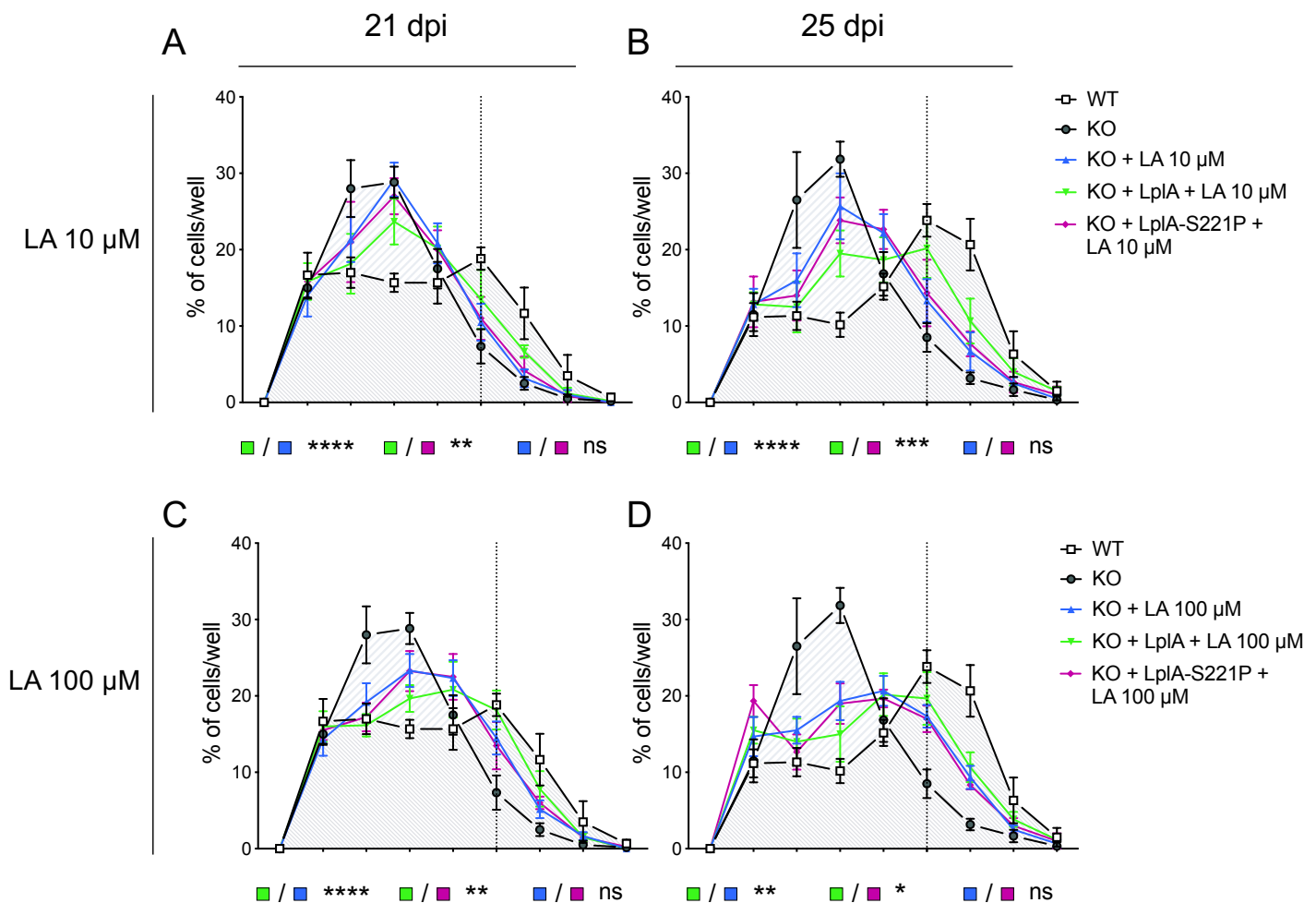


Figure 35 : Distribution des cellules selon leur taille après expression de mtLplA et traitement au LA à 21 dpi et 25 dpi

Les données issues de l'expérience présentée en Figure 6 sont détaillées afin de classer les cellules en fonction de leur taille. Chaque valeur correspond au pourcentage de cellules à 21 (A, C) ou 25 dpi (B, D) comprises entre les tailles du point à l'abscisse et du point précédent. Les valeurs du contrôle et du KO sont les mêmes à 21 dpi entre 10 μ M (A) et 100 μ M (B) et à 25 dpi entre 10 μ M (C) et 100 μ M (D). Les valeurs correspondent à la moyenne de 6 puits d'une plaque 96 puits (environ 200-300 cellules). Two-way ANOVA. ns = non significatif * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$. $n = 6$. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

Globalement ces expériences ne permettent pas de conclure si le chargement de LA sur les enzymes cibles est responsable du déficit de taille des neurones. Bien qu'il y ait un effet positif, il ne semble pas qu'il y ait de corrélation directe. En support de cette observation, la condition mtLplA seule, qui est capable de restaurer en partie le chargement de LA sur les enzymes cibles (**Figure 33B**), ne montre aucune tendance amélioratrice quant à la taille des cellules. Néanmoins un effet très intéressant de l'acide lipoïque seul et à fortes concentrations a pu être mis en évidence, et doit être étudié plus en profondeur.

4.1.4 Recherche d'un lien entre acide lipoïque et restauration de la taille

Afin de comprendre les raisons pour lesquelles les différents traitements évoqués précédemment permettent une restauration de la taille des cellules, plusieurs paramètres ont été étudiés en utilisant le système.

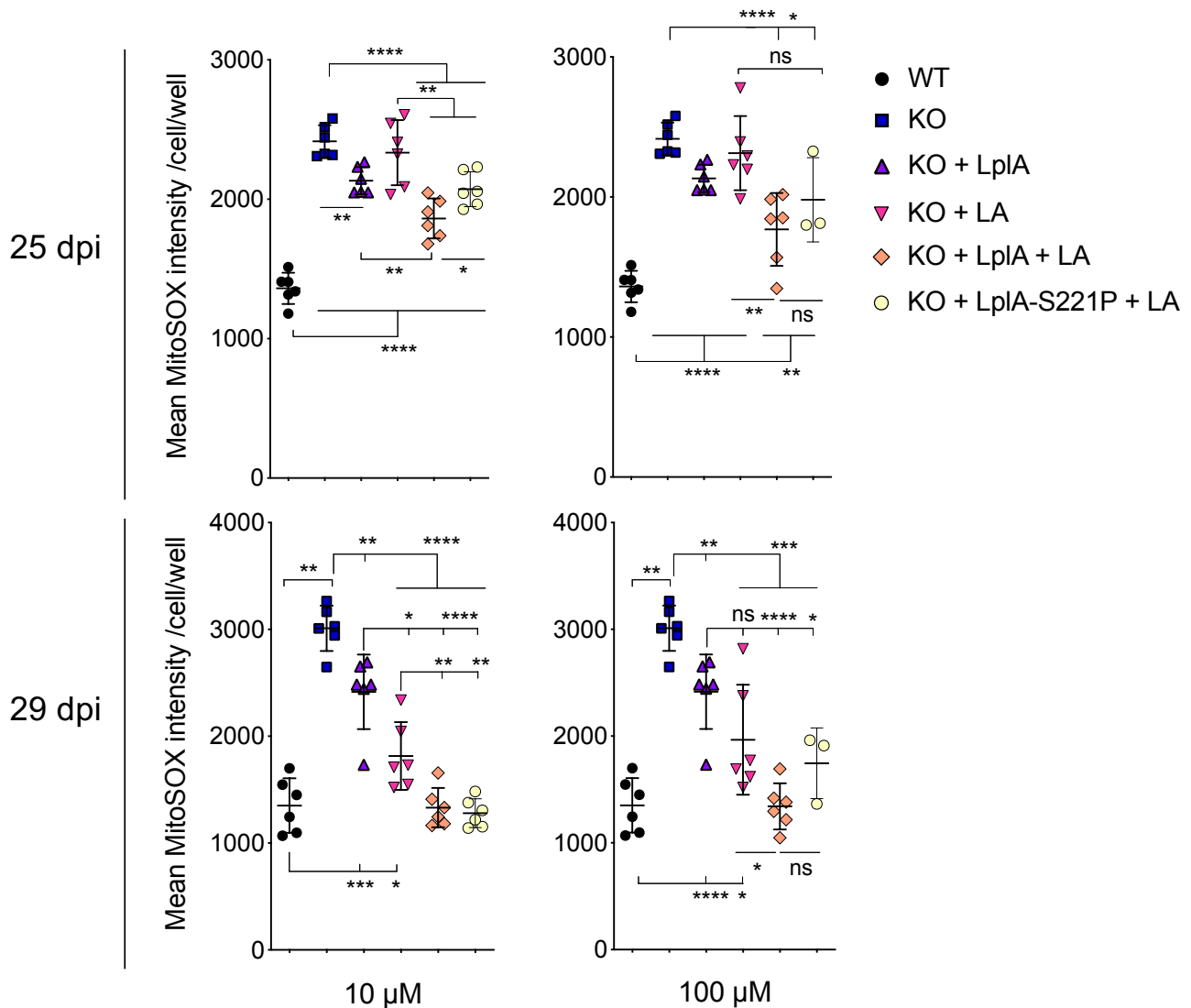


Figure 36 : Mesure du stress oxydant mitochondrial après expression de mtLplA et traitement au LA

Le stress oxydant mitochondrial (MitoSOX) est mesuré à 21 ou 25 dpi. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs de toutes les cellules d'un puits d'une plaque 96 puits (environ 200-300 cellules). One-way ANOVA, suivi de comparaisons multiples par Tukey. ns = non significatif * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$. $n = 6$. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

4.1.4.1 Impact sur le stress oxydant mitochondrial

Afin d'étudier l'état du stress oxydant mitochondrial en présence du système mtLplA combiné ou non au LA, les mêmes conditions ont été utilisées. L'étude de ce paramètre est intéressante car l'acide lipoïque est connu pour être un fort antioxydant. On peut observer que la différence entre WT et KO est respectée par rapport aux résultats obtenus précédemment (voir manuscrit), et est progressivement augmentée de 25 à 29 dpi (**Figure 36**). A 25 dpi, seules

les conditions pour lesquelles mtLplA est exprimée permettent une *rescue* du signal MitoSOX. Par cette première observation plusieurs réponses sont apportées : il semble que la perte de taille des cellules ne dépende pas du stress oxydant mitochondrial, et la *rescue* de la taille apportée par LA seul ne semble pas passer par une baisse du stress oxydant mitochondrial. En revanche, ces résultats suggèrent que le stress corrèle directement avec le chargement du LA aux enzymes cibles. En effet, l'expression seule de LplA permet un sauvetage primaire du stress, plus fort en combinant avec LA à 10 ou 100 μM . Concernant le mutant catalytique, on semble observer un effet intermédiaire pouvant témoigner d'une activité catalytique fortement affectée mais non éteinte. A 29 dpi, l'effet apporté par l'expression de mtLplA est conservé, à la différence que l'effet de sauvetage est bien meilleur, avec aucune différence significative avec le CT lorsque la mtLplA est exprimée en présence de LA. Il est difficile de tirer de conclusion quand à ces observations, qui nécessitent un renouvellement de l'expérience afin d'être confirmées, puisque seule une expérience biologique a été effectuée. Concernant le traitement unique LA, on observe cette fois ci un sauvetage significatif du stress oxydant à 29 dpi, qui pourrait être attribué à une exposition prolongée à ses propriétés antioxydantes.

4.1.4.2 Impact sur le métabolisme des acides aminés

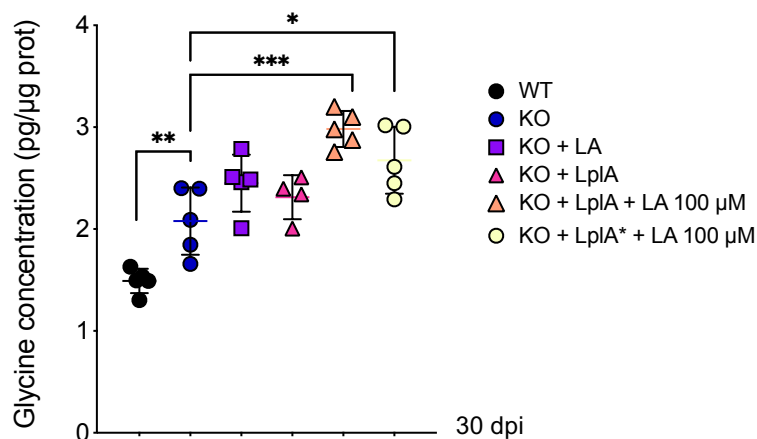


Figure 37 : Mesure des niveaux de glycine après expression de mtLplA et traitement au LA

Mesure de la glycine à 30 dpi. One-way ANOVA, suivi de comparaisons multiples par Tukey. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. $n = 5$ Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

Il est nécessaire de vérifier que la restauration du chargement des enzymes à LA permet bien de compléter les déficits du métabolisme des acides aminés. D'une part pour valider l'utilisation du système, et d'autre part pour comprendre si les déficits de taille sont liés à ce

métabolisme. J'ai donc mesuré les niveaux de glycine dans toutes les conditions du système, à 30 dpi (**Figure 37**). La différence entre WT et KO est conservée bien que les niveaux absolus de glycine diffèrent des données obtenues précédemment (**Figure 30A**). Étonnamment, aucune des conditions ne permet un sauvetage même partiel de la dégradation de la glycine. Au contraire, il semble que les niveaux de glycine sont accentués en présence de mtLplA combinée au LA (**Figure 37**). Ces résultats peuvent avoir plusieurs explications. Premièrement, il est possible que la restauration du chargement de LA sur la protéine H (ou GCSH, voir introduction) ne soit pas aussi efficace que pour les enzymes PDH et KGDH, étant les seules que je suis en mesure de mesurer par Western Blot. En effet, je n'ai pas réussi à observer de bandes aux poids moléculaires des autres enzymes à LA, en utilisant l'anticorps contre LA. Ensuite, il est possible que l'effet du système soit limitant dans le temps et qu'une réparation du mécanisme de dégradation des acides aminés ne puissent être détectée à des temps aussi tardifs que 30 dpi. Il est également envisageable que le kit utilisé pour la mesure de la glycine n'offre pas la sensibilité nécessaire pour détecter l'effet recherché. Enfin, il n'est pas exclu que l'augmentation de glycine observée tire son explication dans des mécanismes alternatifs qui viendraient masquer l'effet seul de mtLplA que j'ai cherché à mettre en évidence. Quoi qu'il en soit, cette expérience ne permet pas de valider l'efficacité du système à restaurer la dégradation de la glycine, et devra faire l'objet de mesures plus précises telles qu'une mesure de glycine, BCAA et de la lysine par spectrométrie de masse ainsi que d'un suivi dans le temps.

Cependant on remarque que les niveaux protéiques des deux gènes présentés plus tôt comme marqueurs du métabolisme de la sérine chez l'AF, PSAT1 et PHGDH, sont partiellement restaurés en présence LplA associée ou non au LA (**Figure 38**). Ces observations suggèrent malgré tout que le système possède une certaine efficacité dans la restauration des enzymes à LA associées au métabolisme des acides aminés.

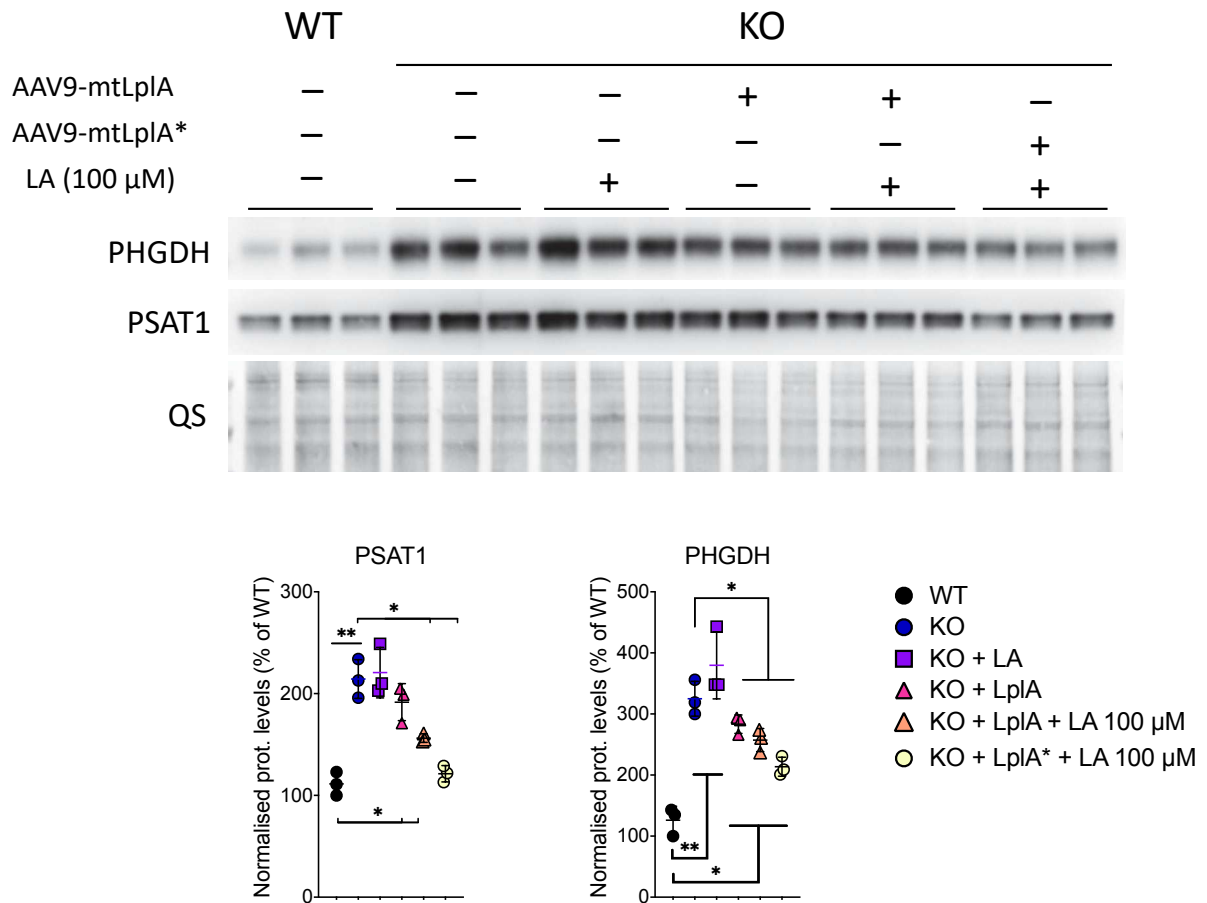


Figure 38 : Mesure des niveaux de PHGDH et PSAT1 après expression de mtLplA et traitement au LA

Analyse par Western Blot des niveaux de PSAT1 et PHGDH. Le marquage QuickStain (QS) est utilisé pour la quantification. Les niveaux dans chaque condition sont exprimés en pourcentage de la moyenne des contrôles. One-way ANOVA, suivi de comparaisons multiples par Tukey. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. $n = 3$. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

4.1.4.3 Impact sur la production d'ATP

La mesure de l'ATP en présence du système LplA +/- LA a plusieurs intérêts. Tout d'abord, en regard des données concernant l'activation de l'AMPK dans le modèle (voir manuscrit), il est logique de penser que le déficit en taille corrèle avec le manque d'ATP dans les neurones. Il est donc important de savoir si la *rescue* de la taille décrite précédemment passe à travers le rétablissement de la production d'énergie. Quelques soient les conditions, nous voyons aucune évidence d'un quelconque effet sur la production de l'ATP (**Figure 39**). Ce résultat peut suggérer de manière intéressante que la *rescue* de la taille observée précédemment ne passe pas par le rétablissement de la production d'énergie. Une nouvelle fois, il est possible

que regarder ce paramètre à 30 dpi masque un effet plus évident à des temps inférieurs. Cette expérience devra donc être répétée en respectant un suivi temporel.

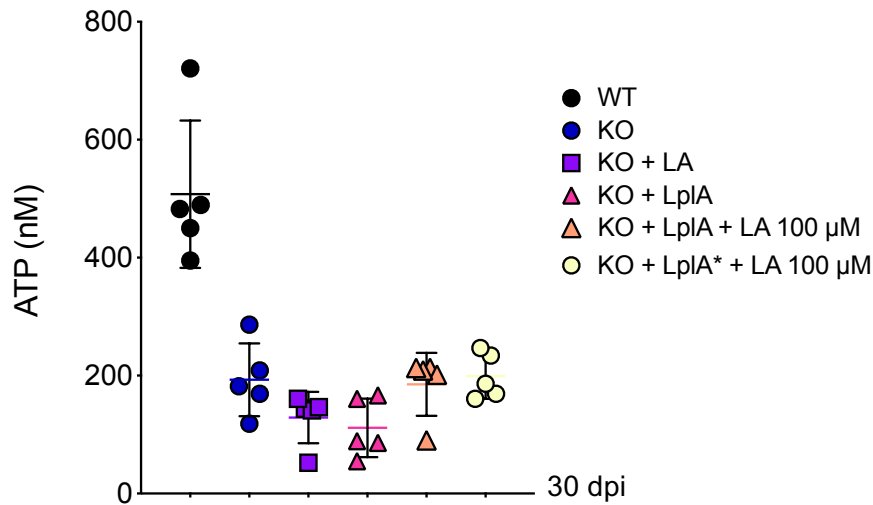


Figure 39 : Mesure des niveaux d'ATP après expression de mtLplA et traitement au LA

Mesure de l'ATP à 30 dpi.

4.1.4.4 Impact sur la voie de l'AMPK

Les niveaux protéiques des différentes marques de phosphorylation des cibles de l'AMPK en présence du système mtLplA ont été mesurées (**Figure 40**). Ces données montrent que l'expression de mtLplA seule ou associée au LA permettent de restaurer les niveaux des marques à ceux du WT. Une tendance similaire bien que plus légère est observée pour le traitement à 100 μM de LA seul. L'exploration de cette voie plus en détail en présence du système devrait permettre de comprendre si le rétablissement de la taille mesuré passe par l'AMPK.

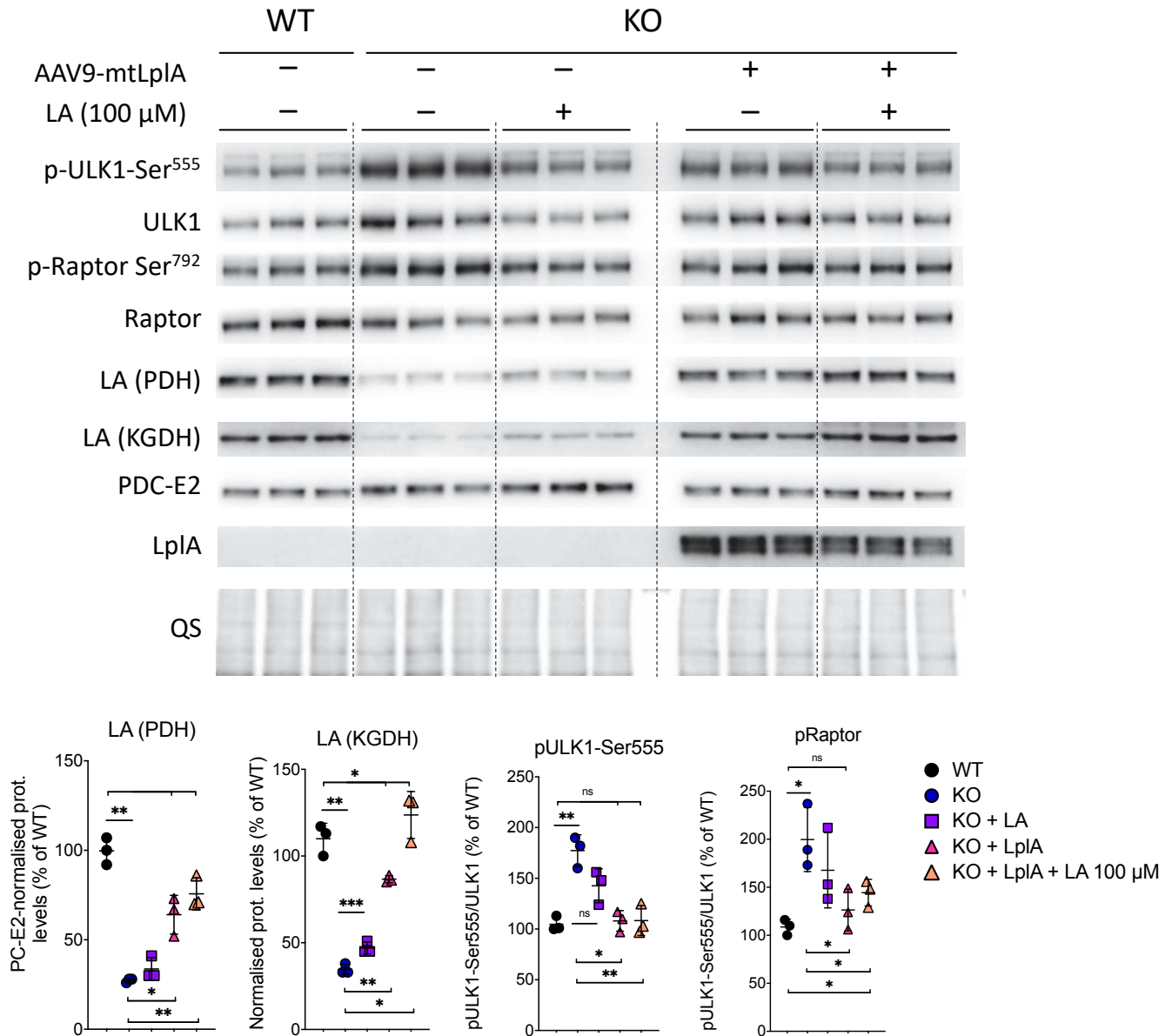


Figure 40 : Quantification des niveaux protéiques des phosphorylations des cibles de l'AMPK après expression de mtLplA et traitement au LA

Analyse par Western Blot. Les niveaux des résidus phosphorylés ont été normalisés par rapport aux niveaux des protéines totales correspondantes, puis sur les niveaux protéiques totaux (QS), et exprimés en pourcentage d'un des contrôles. One-way ANOVA, suivi de comparaisons multiples par Tukey. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. $n = 3$. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

4.1.4.5 Impact sur la voie de mTOR

Afin de déterminer si la *rescue* de la taille passe par une activation de mTOR, les cellules en présence du système LplA +/- LA ont été traitées à la rapamycine (**Figure 41**), les cellules

voient leur taille diminuées dans toutes les conditions. Cependant, la *rescue* est totalement inhibée et toutes les conditions du système trouvent une taille du soma identique à celle du KO seul. Ces résultats pointent vers une *rescue* mTOR dépendante. En effet, si la *rescue* était totalement indépendante de la voie mTOR, des dynamiques devraient, après traitement à la rapamycine, être conservées entre le KO et les conditions LplA + LA ou LA 100 μ M, ce qui n'est pas le cas.

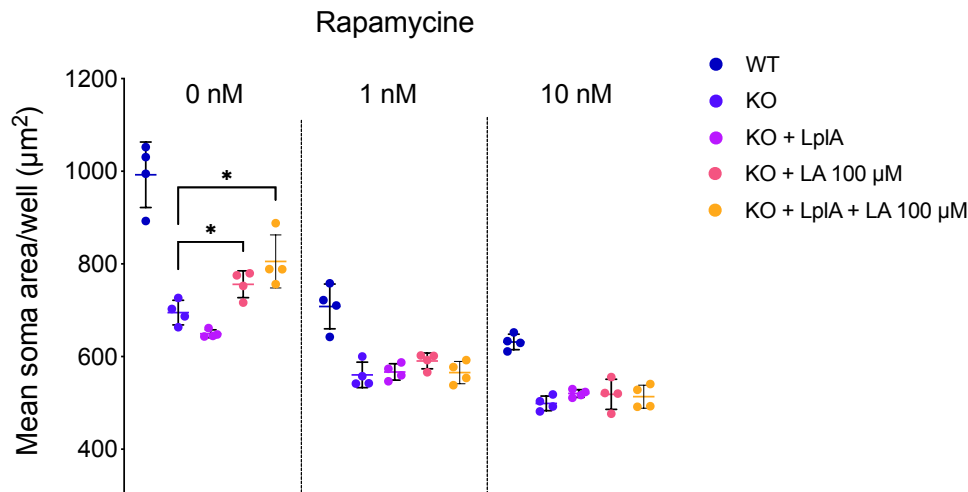


Figure 41 : Mesure de la taille des cellules en présence du système mtLplA, après inhibition de la voie mTOR/P70S6K

Les neurones de DRG WT ou KO en culture ont été infectés à 7 dpi par un vecteur AAV9-mtLplA en combinaison avec un traitement au LA. Les cellules ont été traitées à la rapamycine à partir de 8 dpi et sur toute la durée de la culture. L'aire des soma a été mesurée à 25 dpi. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs de toutes les cellules d'un puits d'une plaque 96 puits (environ 200-300 cellules). One-way ANOVA, suivi de comparaisons multiples par Tukey. $n = 4$ * $p < 0.05$. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

4.1.5 Développement d'un système alternatif à interférence à ARN

Afin de pouvoir investiguer par un autre moyen l'implication du métabolisme de l'acide lipoïque dans le déficit de taille observé chez les neurones sensitifs déficient en frataxine, j'ai généré un vecteur permettant l'expression de shRNA dirigés contre le gène LIAS (pAAV-shLIAS-930), et ainsi reproduire dans des cellules WT, une inhibition spécifique de la voie de synthèse de l'acide lipoïque. L'infection avec l'AAV9-shLIAS-930 diminue fortement l'expression de LIAS et la présence de LA sur PDH et KGDH (**Figure 42A**) démontrant que

l'on reproduit bien le déficit de biosynthèse de l'acide lipoïque, de façon plus forte que dans le KO. J'ai ensuite procédé à la mesure du soma des cellules après une infection avec AAV9-shLIAS-930 (**Figure 42B**). On peut observer que le shLIAS provoque une baisse de la taille des cellules intermédiaire à celui du KO. Ces observations montrent que l'activité de LIAS n'est responsable qu'en partie du déficit de taille observé dans le modèle.

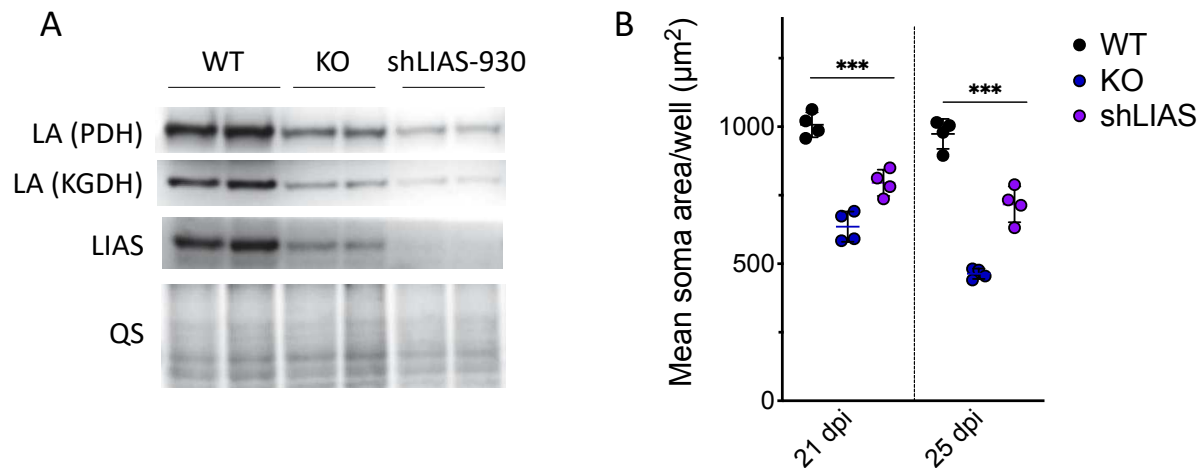


Figure 42 : Test des shLIAS-930 et impact sur la taille des cellules

Neurones de DRG en culture WT, KO ou infectés à 2 DIV par un vecteur AAV9-shLIAS-930. (A) Analyse par Western blot des niveaux de l'acide lipoïque lié aux sous unités E2 de PDH et KGDH, PDC-E2 (totale), ainsi que de LIAS à 21 dpi. QS = QuickStain, marque les protéines totales et est utilisé comme contrôle de chargement. (B) Mesure de la taille des cellules à 21 dpi chez le WT, KO ou WT avec shLIAS-930. Chaque point correspond à une moyenne de 150 cellules. Un test ANOVA (Kruskal-Wallis) a été réalisé. *** $p < 0,001$. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

4.1.6 Impact de l'Acide lipoïque sur les centres Fe-S

De manière intéressante, le traitement de 100 μM est capable d'augmenter légèrement les niveaux de la protéine NDFUS3 (**Figure 43**). Ces résultats font écho à la légère augmentation du chargement du LA mesurée sur PDH et KGDH en présence de LA à 100 μM (**Figure 33B et 40**). Il est possible que la capacité antioxydante de LA puisse être à l'origine d'une stabilisation des centres Fe-S dans les neurones (voir discussion).

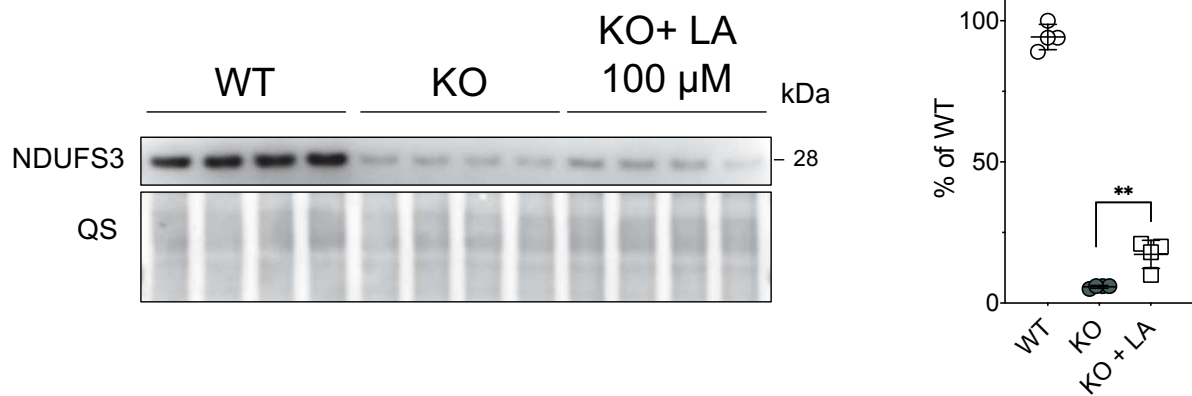


Figure 43 : Stabilisation des centres Fe-S en présence de LA

Analyse par western blot des niveaux de NDUFS3 dans les cultures de neurones à 21 dpi après traitement du KO avec 100 μ M de LA. QS = QuickStain, marque les protéines totales et est utilisé comme contrôle de chargement. * $p < 0,01$ one-way ANOVA.

4.2 P62 et Autophagie

L'autophagie fait l'objet de plusieurs investigations dans le cadre de l'ataxie de Friedreich. En effet, des études sur des différents modèles relatent de variations de l'autophagie associée à la perte de la frataxine (revu en introduction). Cependant, il n'existe pas de consensus entre les différents modèles à l'heure actuelle. Certains résultats prônent une activation de l'autophagie après déplétion en frataxine, quand d'autres semblent indiquer la présence d'un blocage du flux autophagique, traduit par l'accumulation de vésicules d'autophagie visibles en analysant l'ultrastructure des cellules en microscopie électronique, ou bien par l'augmentation de clusters marqués par différents récepteurs de l'autophagie ou protéines cargo. Ces protéines marquent les cargos intracellulaires destinés à être dégradés, afin qu'ils soient reconnus et pris en charge par l'autophagosome (Hamacher-Brady and Brady, 2016). L'accumulation de ces protéines au niveau protéique peut être le signe d'un blocage du processus de l'autophagie, tout comme d'une activation (Klionsky et al., 2016). Il n'est donc pas simple de faire un lien direct entre les niveaux de ces protéines et un éventuel blocage, car une baisse de niveau peut également traduire d'une activation de l'autophagie, dans la situation où plus de cargos sont dégradés. Il d'ailleurs également possible que l'autophagie soit activée sans qu'une fluctuation des niveaux de ces protéines soient relevée sous des conditions normales. L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie est couramment utilisée pour évaluer l'état du flux autophagique indirectement par le niveau des protéines cargos (Klionsky et al., 2016). La protéine 1 du séquestosome (SQSTM1), connue également sous le nom de P62, a pour fonction de fixer l'ubiquitine aux cargos destinés à l'autophagosome (Hamacher-Brady and Brady, 2016). Ses niveaux sont augmentés dans plusieurs modèles de l'AF.

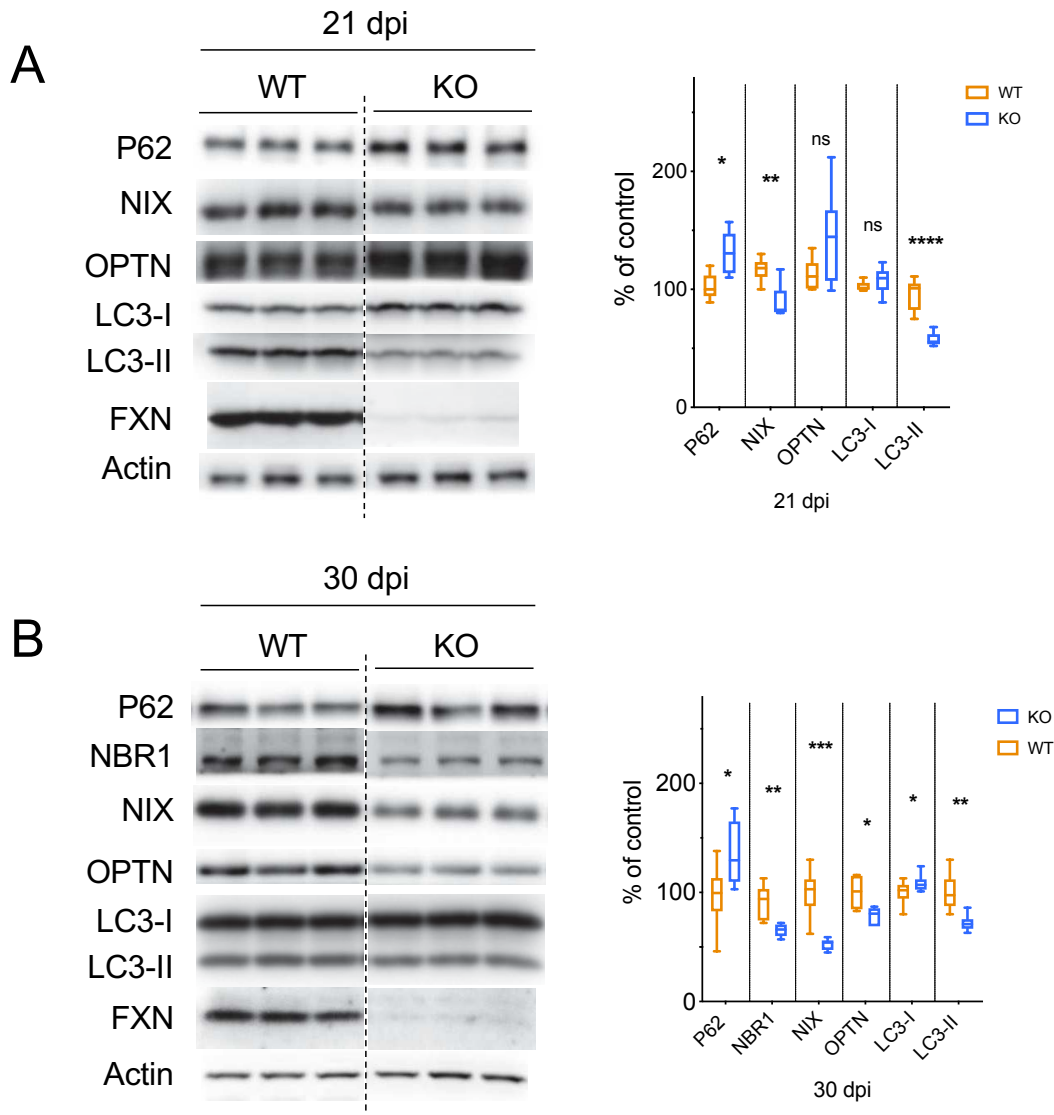


Figure 44 : Récepteurs de l'autophagie et autophagosome à 21 dpi et 30 dpi

Niveaux protéiques de P62, NIX, OPTN, LC3 I et II à 21 dpi (A) ou P62, NBR1, NIX, OPTN, LC3 I et II à 30 dpi (B), en présence ou en absence de frataxine dans les neurones sensitifs de DRG. Les niveaux protéiques sont normalisés sur les niveaux d'actine, et exprimés en pourcentage d'un des contrôles. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$ ns = non significatif, student t-test. n = 6.

Dans notre modèle de neurones de DRG déplétés en frataxine, les niveaux protéiques de P62 est augmentée par rapport au contrôle dès 21 dpi (**Figure 44A**). De manière intéressante, le niveau d'autres protéines cargo telles que NBR1, NIX ou OPTN est inférieur dans les cellules KO à 30 dpi (**Figure 44B**). En corrélation, les niveaux du marqueur de l'autophagosome LC3-II sont diminués dans le KO à 21 et 30 dpi (**Figure 44A et B**). En observant les vésicules P62-positives à 21 dpi par immunofluorescence, on ne remarque pas de différence globale de leur taille ni de leur nombre en absence de frataxine (**Figure 45A**). De manière intéressante on

observe à 30 dpi une relocalisation nucléaire de P62 pour la majorité des cellules KO, alors que ce phénotype est complètement absent chez les cellules WT (**Figure 45A et B**).

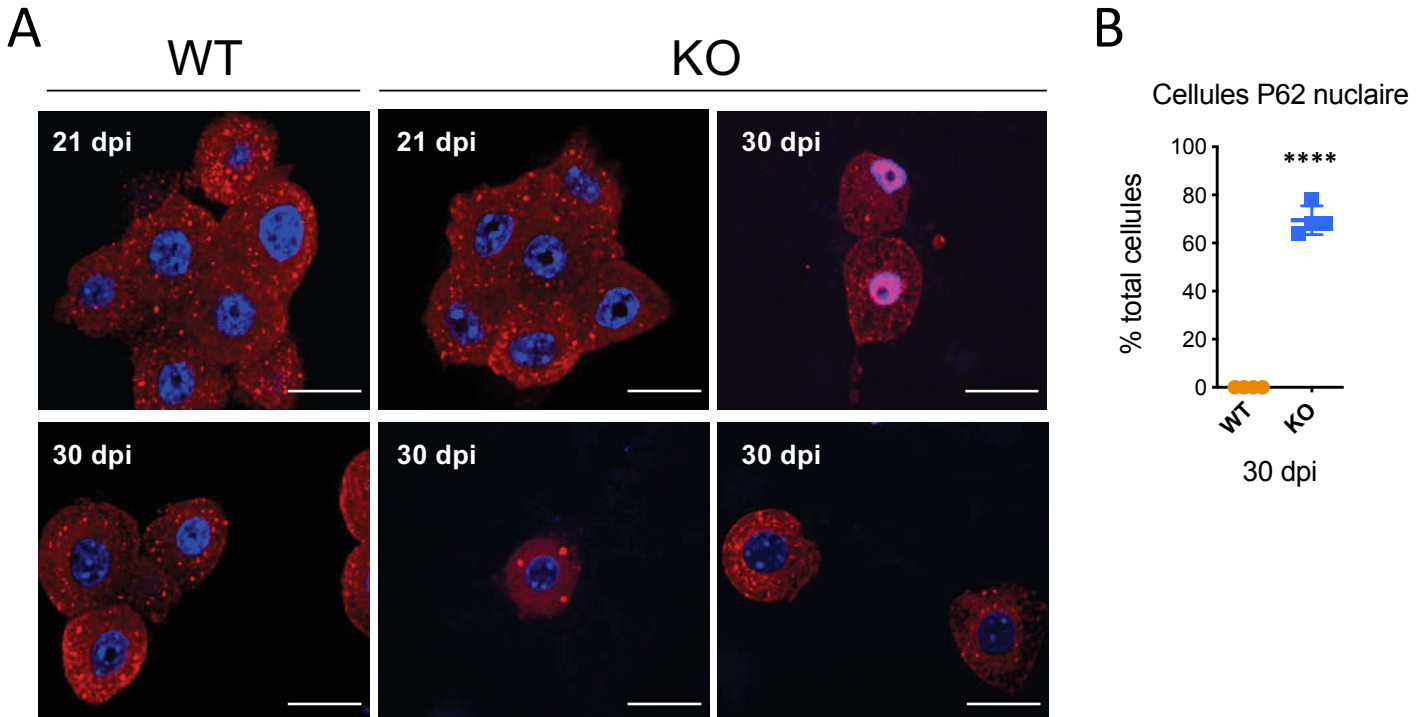


Figure 45 : Vésicules P62-positives entre WT et KO

(A) Marquage de P62 par immunofluorescence à 21 ou 30 dpi, sur des cellules WT ou KO. L'image en haut à droite donne l'exemple de cellules présentant une translocation nucléaire de P62. Barres d'échelle 30 μ m. (B) Quantification des cellules présentant une translocation de P62 dans le noyau, n = 4 expériences, 100 cellules/expérience. ****p < 0.0001, student t-test.

Cette relocalisation semble être activée dans les cellules les plus affectées par la perte de frataxine. L'activation artificielle de l'autophagie par traitement à la torine (inhibiteur de mTORC1) ne permet pas d'augmenter globalement les niveaux de P62 et de LC3-II (**Figure 46**), ni la taille des vésicules P62-positives (**Figure 47**), bien qu'une quantification fine soit nécessaire pour confirmer ces observations. Ces résultats semblent indiquer que l'autophagie associée à P62 ne montre pas de blocage sévère. En support de ces résultats, les données de microscopie électronique ne montrent pas un enrichissement en vacuoles d'autophagie en absence de frataxine dans ce modèle (**Figure 48**). Afin de déterminer si l'augmentation de P62 traduit d'une augmentation de l'autophagie, il est nécessaire de bloquer l'autophagie chimiquement. Une activation de l'autophagie se traduit alors par l'augmentation des niveaux des protéines cargo et de leurs vésicules associés, due à l'accumulation de cargos non dégradés

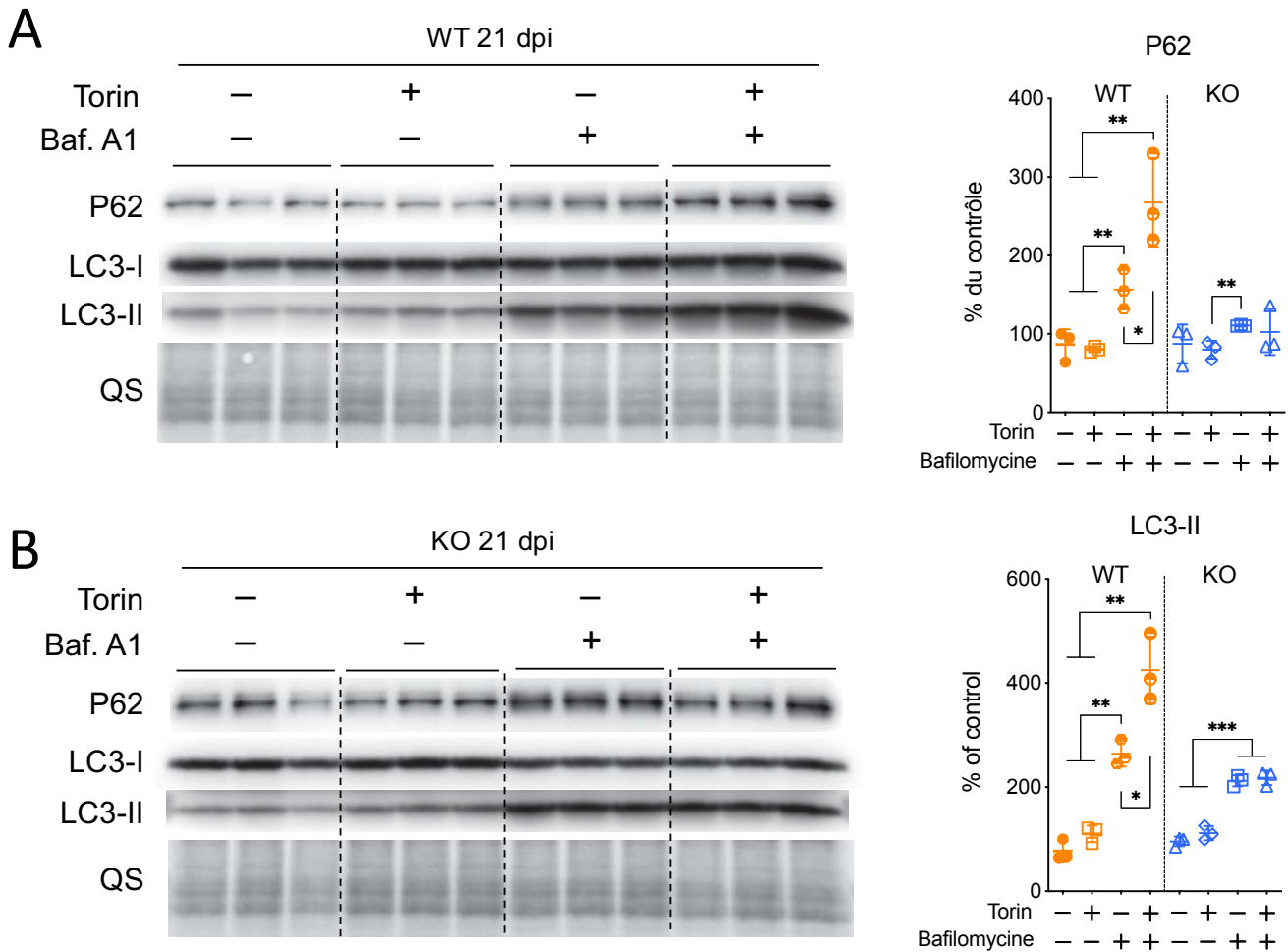


Figure 46 : Niveaux de LC3-II et P62 après blocage de l'autophagie

Niveaux protéiques et quantifications de P62, LC3 I et II à 30 dpi, à 21 dpi, après traitement à la Bafilomycine A1 et/ou Torine 1, sur des cellules WT (A) ou KO (B). Les niveaux protéiques sont normalisés sur les protéiques totaux (QuickStain), et exprimés en pourcentage d'un des contrôles * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, student t-test. $n = 3$.

(Klionsky et al., 2016). Lorsqu'on traite les cellules à la bafilomycine, on observe une augmentation générale du nombre de vésicules P62-positives sans augmentation de leur taille (**Figure 47**). La comparaison entre WT et KO ne montre pas de différence, ce qui est le cas également au niveaux protéiques (**Figure 46**). Activer l'autophagie conjointement à un blocage, permet de révéler s'il existe une différence basale des niveaux d'autophagie. Si l'autophagie est déjà recrutée à son maximum en basal, les niveaux des protéines cargos et de LC3-II ne devraient pas augmenter en présence de l'activateur. En immunofluorescence, l'expérience ne nous a pas permis de mettre en évidence une augmentation subséquente de l'autophagie que ce soit pour le WT ou le KO (**Figure 47**). Quand on regarde les niveaux de P62 et de LC3-II par

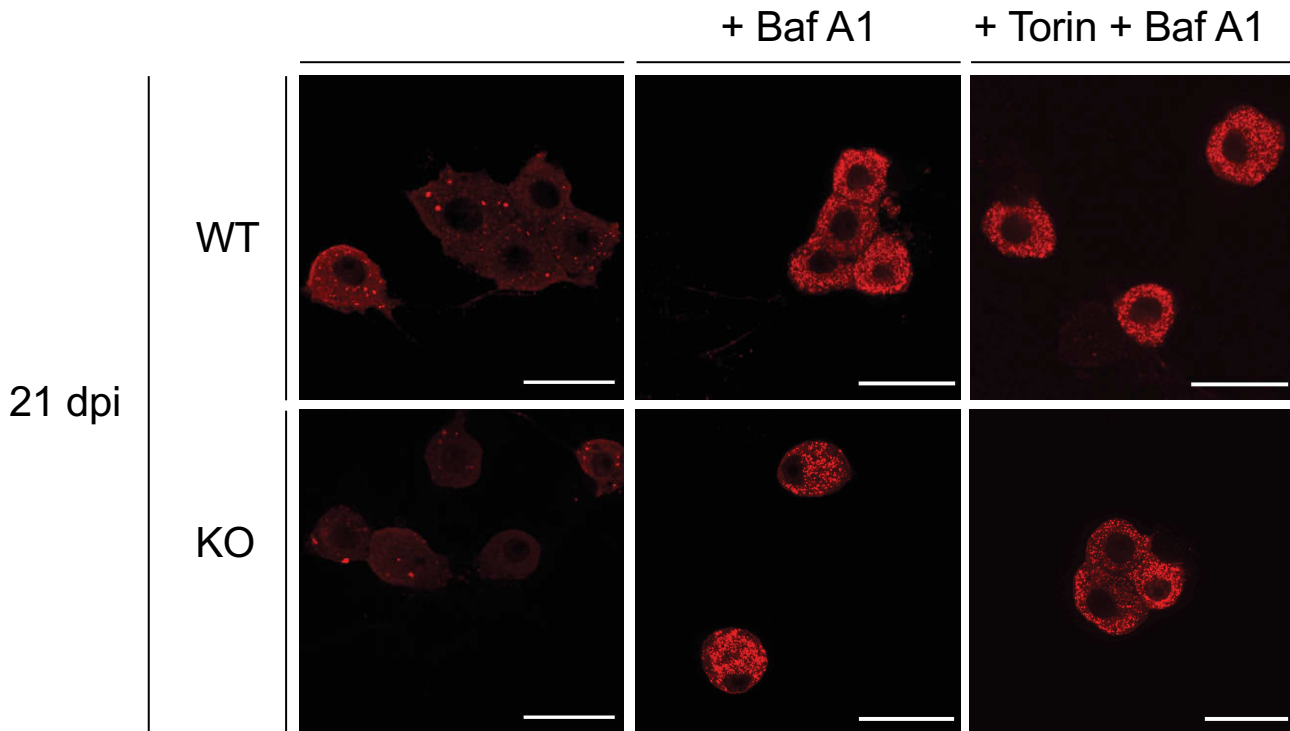


Figure 47 : Vésicules P62-positives après blocage de l'autophagie

(A) Marquage de P62 par immunofluorescence à 21 dpi, sans (panneaux de gauche) ou avec traitement à la Torine seule, Bafilomycine A1 seule ou associée à la Torine 1 (panneau de droite). Barres d'échelle 50 μ m.

Western Blot, on remarque qu'ils sont augmentés dans le WT par rapport au blocage seul (**Figure 46**). Chez les cellules KO les niveaux ne varient pas entre les deux conditions (**Figure 46**). Ces observations, en lien avec les niveaux diminués des autres protéines cargos dans les conditions basales, suggèrent que le flux autophagique est globalement augmenté et est à son maximum à l'état basal dans le KO. Afin d'investiguer cette éventuelle sur-activation, les niveaux des protéines régulatrices de l'autophagie ont été évalués. Suite à une phosphorylation par l'AMPK, la protéine ULK1 active à son tour Beclin-1 en la phosphorylant, activant ainsi l'initiation de l'autophagie (Kim et al., 2011). On remarque que les niveaux de p-ULK1 Ser555 ainsi que de p-Beclin-1 Ser15 sont augmentés dans le KO (**Figure 49**), concordant avec une activation de l'autophagie dans l'ensemble, probablement par le biais de l'AMPK.

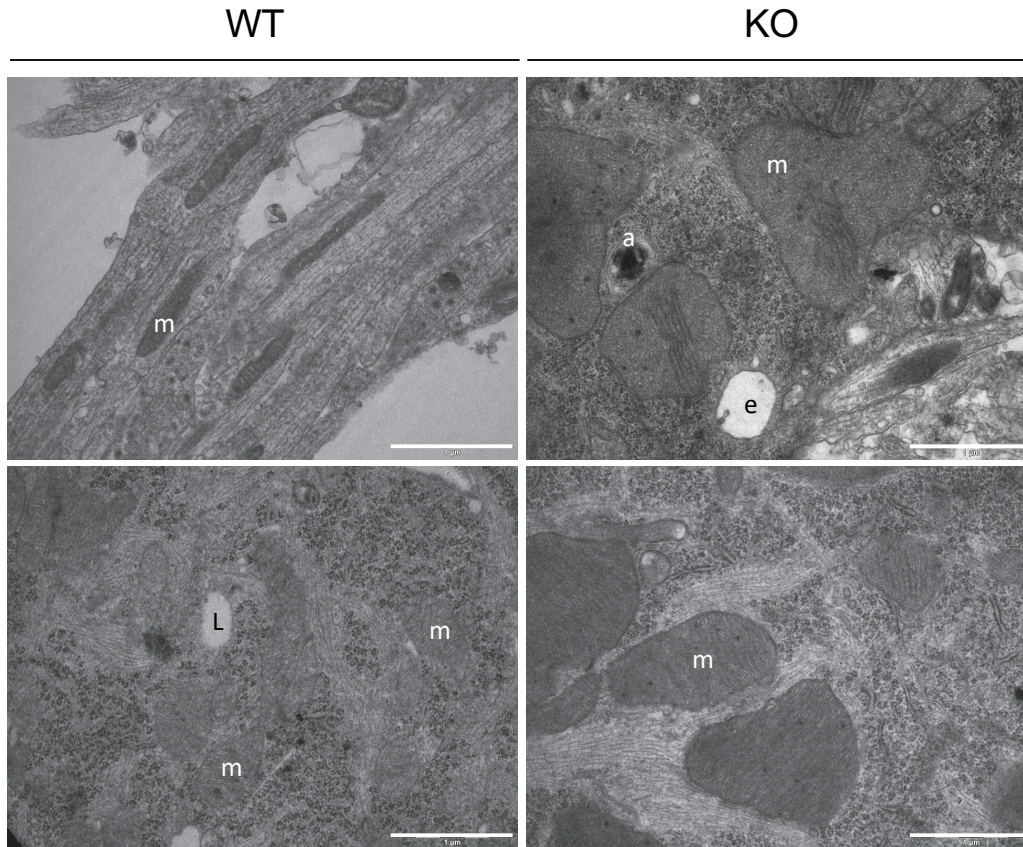


Figure 48 : Ultrastructure des neurones de DRG

L'ultrastructure des neurones de DRG est visualisée par microscopie électronique. m = mitochondrie, e = endosome, a = autophagosome, L = lipides ; Barres d'échelle 1 μm.

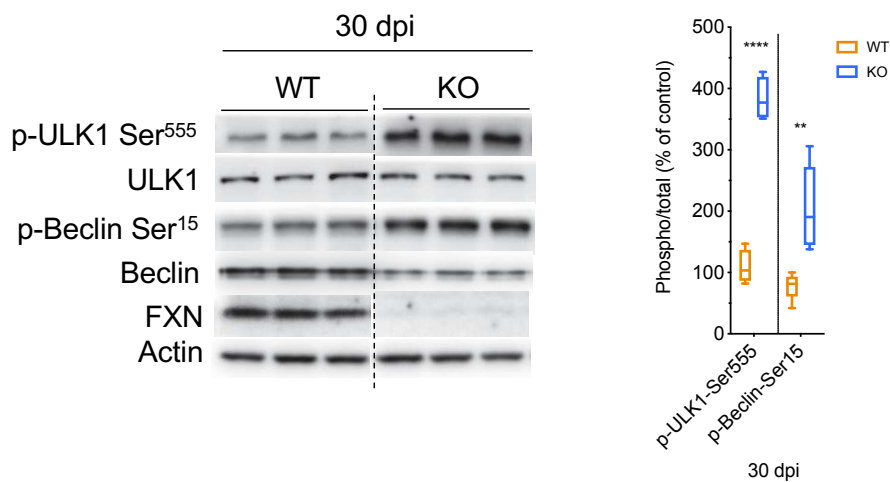


Figure 49 : Activation de l'autophagie par ULK1 à 30 dpi

Niveaux protéiques de ULK1, phospho-ULK1 Ser555, Beclin et phospho-Beclin Ser15 à 30 dpi, en présence ou en absence de frataxine dans les neurones sensitifs de DRG. Les niveaux protéiques sont normalisés sur les niveaux d'actine, et exprimés en pourcentage d'un des contrôles. **p<0,01 ****p<0,0001, student t-test.

Étant donné le profil atypique de P62 en comparaison des autres protéines cargos, on peut se demander si l'autophagie est réellement responsable de l'augmentation des niveaux de P62. Le rôle de P62 n'est pas exclusif à l'autophagie, et son expression intervient souvent dans la réponse des cellules à divers stress (Sánchez-Martín et al., 2019). L'augmentation de l'expression de P62 dans le modèle au niveau transcriptionnel évoque une activation de P62 associée au stress plutôt qu'à un blocage de l'autophagie (**Figure 50**). Son expression est contrôlée par différents activateurs de transcription tels que NRF2 (réponse au stress oxydant), ATF4/CHOP (manque de nutriments et réponse aux protéines mal repliées ou UPR) et NFκB (inflammation) (Sánchez-Martín et al., 2019), qui sont trois facteurs régulant des mécanismes décrits dans certains modèles de l'AF. L'expression de NRF2, ATF4 et CHOP (**Figure 50A**) et les niveaux transcriptionnels (**Figure 50B**) et traductionnels (**Figure 50C**) de certaines de leurs cibles sont augmentés dans le KO, suggérant une activation des mécanismes qui leurs sont associés. En revanche, l'expression de NFκB ne varie pas (**Figure 50A**). L'activation de ces facteurs de transcriptions et de leurs cibles semble pencher pour une augmentation de P62 associé au stress, qu'il soit dû au stress oxydant ou à une déprivation en nutriments.

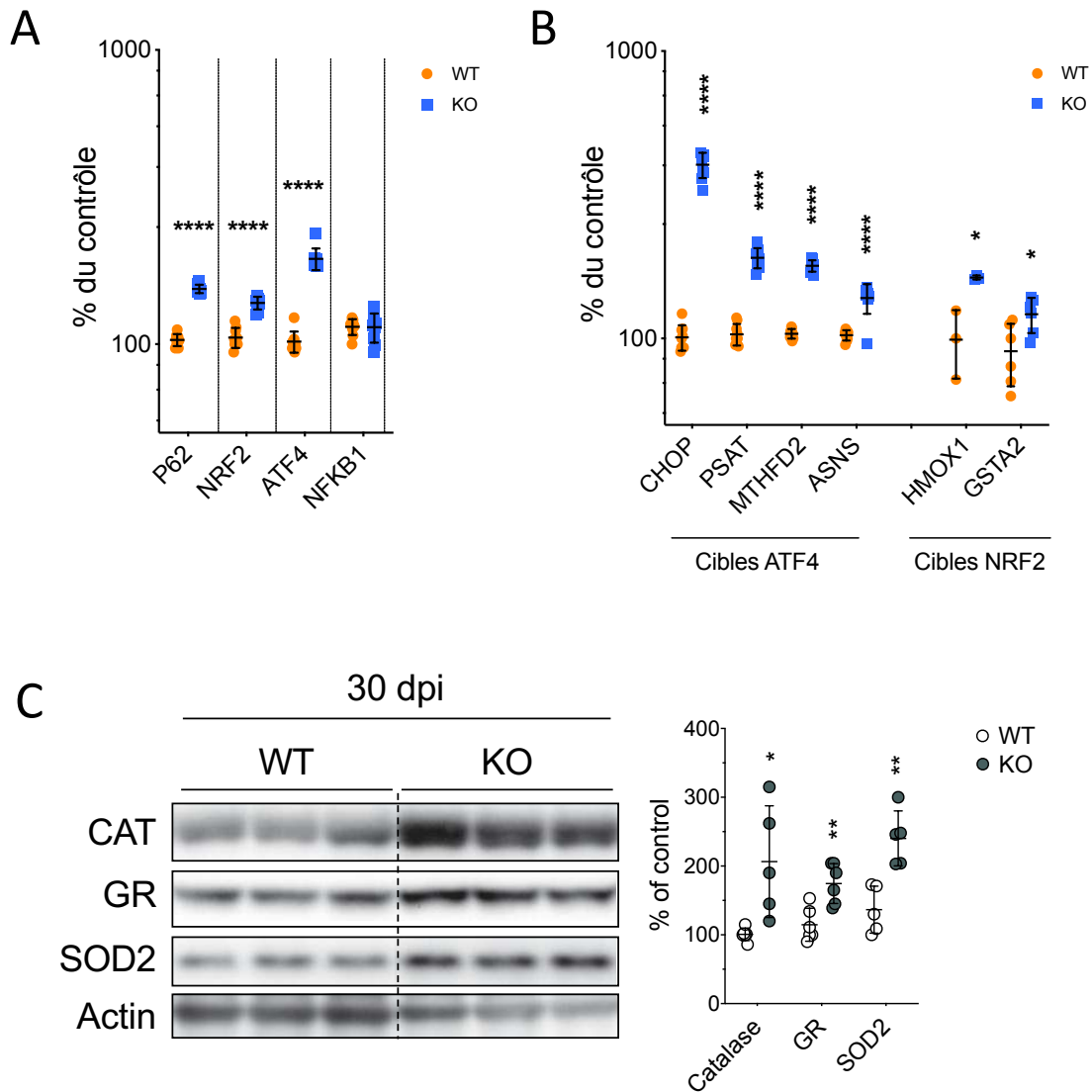


Figure 50 : Niveaux transcriptionnels et traductionnels de gènes du stress associés à P62

Niveaux d'expression de P62, des facteurs de transcription NRF2, ATF4 et NFkB (A) ainsi que certaines cibles de ATF4 et NRF2 (B) à 21 dpi par RT-qPCR, et normalisés sur l'expression de la GAPDH, puis exprimés en pourcentage de l'un des contrôles. (C) Analyse par Western Blot des niveaux protéiques de cibles de NRF2. CAT, Catalase ; GR, Glutahtione Réductase ; SOD2, Superoxyde Dismutase 2. Les niveaux sont normalisés sur l'Actine et exprimés en pourcentage de la moyenne des contrôles. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **** $p < 0.0001$, student t-test. (A-B) $n = 3-9$. (C) $n = 6$

4.3 Développement d'une approche de criblage pharmacologique

4.3.1 Avant-propos

Comme discuté en Introduction, nous n'avons pu relever de criblage pharmacologique pour l'AF développés sur des modèles de neurones sensitifs de DRG dans la littérature. Tester l'efficacité de molécules thérapeutiques directement dans ce type cellulaire pourrait permettre d'augmenter les chances d'isoler celles ayant une activité dans ces cellules, principalement affectées dans l'AF. De plus, notre modèle constitue le premier système cellulaire à ce jour permettant une délétion totale de la frataxine sans perte de viabilité. Ce paramètre est très important car jusqu'à maintenant, tous les modèles cellulaires en absence complète de frataxine ne sont pas viables, dû à l'importance de la frataxine pour la division des cellules. L'intérêt est donc de pouvoir identifier des molécules permettant de remplacer ou *bypasser* l'activité de la frataxine. Pour ces raisons, et pour le défi du challenge, j'ai décidé de développer une approche de criblage pharmacologique sur le modèle que nous avons développé.

4.3.2 Mise au point des conditions de culture

La première étape du projet était de mettre au point les conditions de cultures optimales pour permettre la culture et le maintien pendant plusieurs semaines des neurones sensitifs dans des supports de culture compatibles avec un criblage moyen débit : plaques 96 ou 384 puits. Le principal problème de ces cultures est l'accumulation des cellules à la périphérie du puits créant ainsi un anneau de cellules qui s'élargit avec le temps et provoque le décollement progressif de la culture (**Figure 51**). Plusieurs facteurs peuvent conduire à la formation de cet anneau. Le premier est la disposition des cellules en périphérie du puits dès l'étape de *seeding*. Cela est provoqué quand les cellules sont incubées à 37°C directement après avoir déposé les cellules dans les puits. Les mouvements de convection provoqués par le réchauffement du milieu induisent des courants au sein du puits conduisant les cellules à se déposer à la périphérie du puits. Afin de palier à ce problème et permettre un ensemencement uniforme sur toute la surface de puits, les cellules doivent être incubées à température ambiante (20 min) avant d'être transférées dans l'incubateur. La deuxième raison est le revêtement ou *coating* des plaques de cultures. Plusieurs conditions ont été testées afin de permettre une culture stable au fil des semaines et empêcher le décollement des cellules (**Figure 51**). La troisième raison, la densité

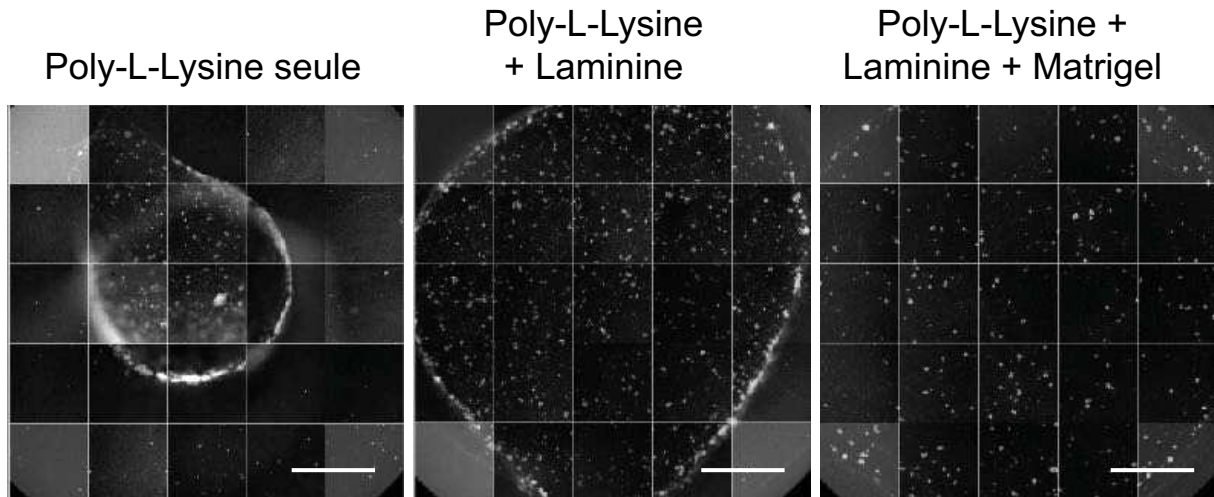


Figure 51 : Comportement des cultures en 96 puits en fonction du coating des plaques (DIV 20)

Marquage des cultures au Hoechst en plaque 96 puits, acquisition sur le lecteur high-content. Compilation des 25 champs d'un puits 96 puits par Cellomics HCS Studio. Barres d'échelle : 1 mm.

de *seeding* des cellules, est celle qui nous a été la plus difficile de contrôler. Le choix de la densité est déterminant car une densité trop importante provoque également la formation de l'anneau et le décollement des cultures (**Figure 52**). En effet, les cellules ont tendance à migrer pour se rapprocher les unes des autres au cours du temps. Lorsque les cellules sont trop denses, elles vont avoir tendance à s'accumuler en périphérie où elles sont le plus proche initialement. Un effet domino s'ensuit attirant toujours plus de cellules dans l'anneau en formation. De manière intéressante, si on augmente la quantité totale de cellules par puit, la densité des cellules au milieu du puit reste similaire, mais l'épaisseur de l'anneau augmente.

Il est donc nécessaire de pouvoir compter les cellules avec précision après la dissection. Cependant, un degré de variabilité est inévitable et provient de deux paramètres : la viabilité des cellules au moment du *seeding*, et la proportion de cellules gliales dans la suspension cellulaire. La viabilité peut être estimée par FACS, ou grâce un compteur automatique type Countess II (ThermoFisher) (**Figure 53**). L'utilisation du compteur est préférée car plus rapide. Nous avons donc choisi de se baser sur un comptage du nombre de cellules viables plutôt que du nombre total de cellules. Nous avons pensé que la proportion de cellules gliales pourrait être estimée en regardant le profil des cellules en FACS ou sur le compteur de cellules, mais nous avons vu que les cellules segmentent en un seul *cluster* de cellules, et non en plusieurs populations (**Figure 53A**). Nous avons donc essayé de séparer les cellules sur gradient de phase, afin d'isoler les neurones et pouvoir augmenter notre contrôle de la densité finale en neurones

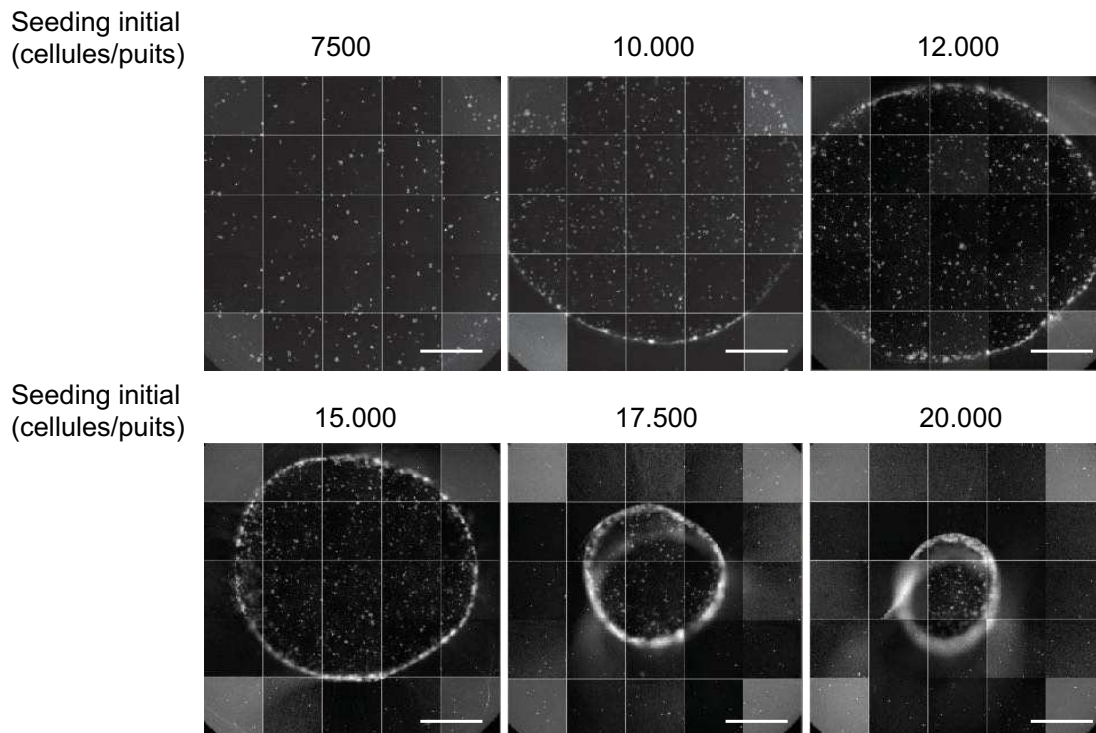


Figure 52: Comportement des cultures en 96 puits en fonction de la densité cellulaire (DIV 15)

Marquage des cultures au Hoechst en plaque 96 puits, acquisition sur le lecteur high-content. Compilation des 25 champs d'un puits 96 puits par Cellomics HCS Studio. La formation de l'anneau de cellules corrèle avec la densité cellulaire. Barres d'échelle : 1 mm.

dans le puits. Malheureusement, les protocoles d'isolation testés (gradients de Percoll ou BSA) se sont révélés toxiques pour les cellules, qui meurent dans les jours suivant le *seeding* (**Figure 54**).

La solution choisie pour répondre à ces contraintes a été de d'établir une fourchette de densités auxquelles les cultures sont stables, correspondant à 6000-9000 cellules par puits. Ainsi, en se plaçant à 7500 cellules par puits, on réduit le risque d'obtenir des cultures trop ou pas assez denses, malgré la variabilité entre les dissections.

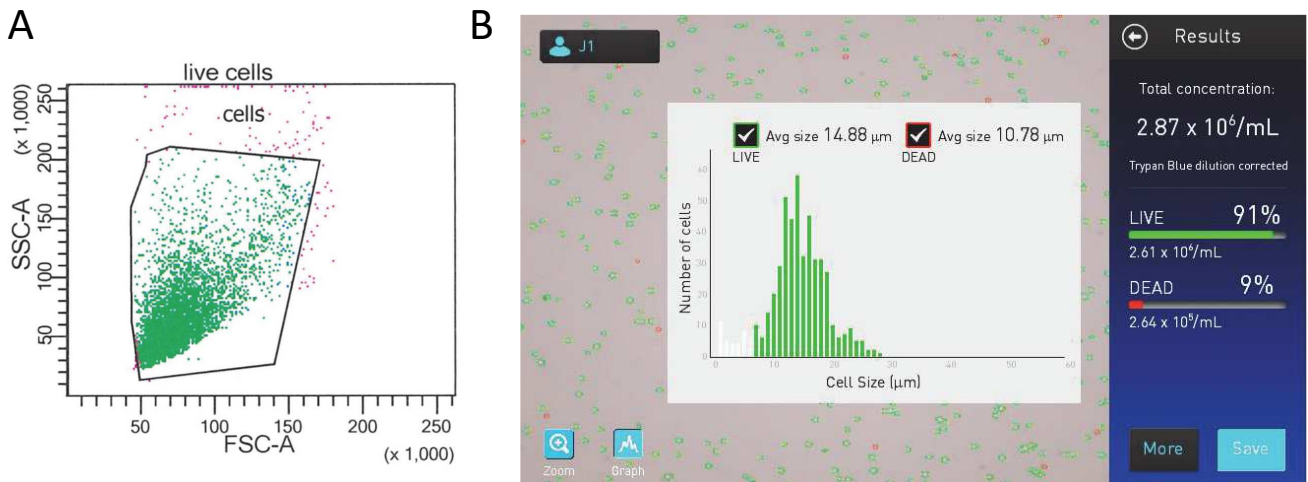


Figure 53: Profil morphométrique et viabilité de la suspension cellulaire

(A) Analyse par FACS de la morphologie des cellules, après digestion des DRG disséqués. Profil de dispersion latérale (SSC = side scatter, dépend de l'homogénéité optique des cellules) en fonction de la dispersion frontale (FSC = forward scatter, dépend de la taille) des cellules. (B) Taille et viabilité des cellules de la suspension, mesurée par le Countess II (capture d'écran logiciel).

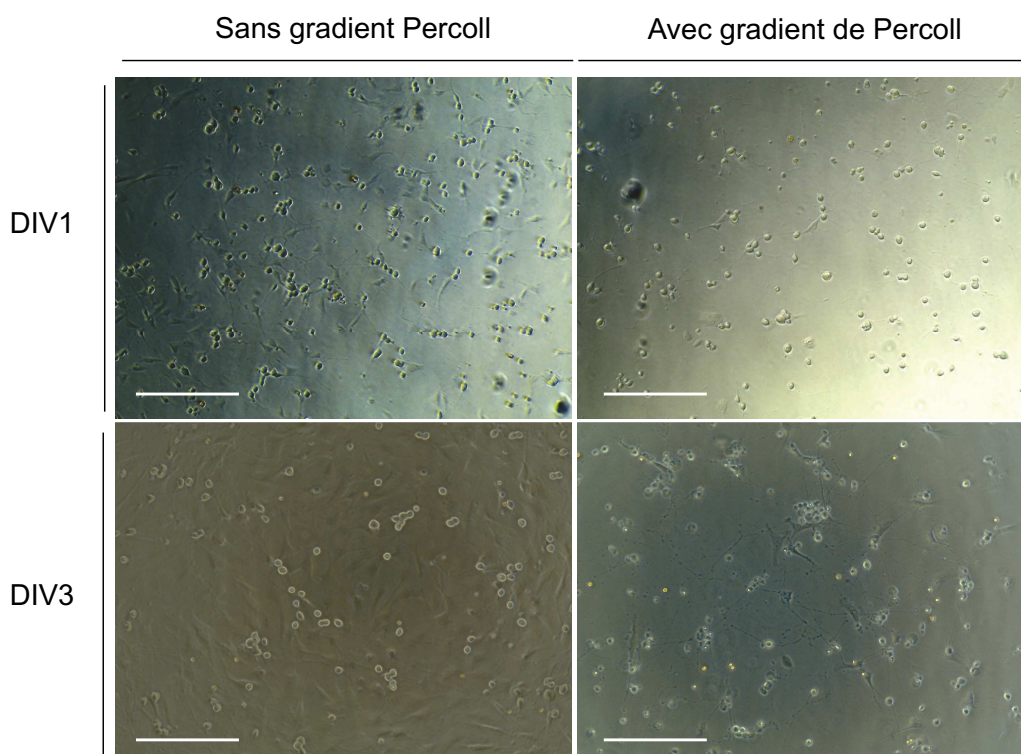


Figure 54: Essai d'isolation des neurones par gradient de Percoll

Photos des cultures de neurones de DRG au jour 1 et 3 *in vitro* (DIV), avec ou sans isolation des neurones par gradient de Percoll. Barres d'échelle : 100 μ m.

4.3.3 Développement du *readout*

Pour ce projet, nous avons choisi une stratégie de criblage à haut contenu en utilisant l'imagerie par fluorescence comme essai. Cette stratégie nous permet d'évaluer plusieurs paramètres en parallèles en utilisant des sondes fluorescentes de plusieurs couleurs. En bleu, nous avons le Hoechst, marqueur nucléaire nous permettant à la fois de segmenter le noyau des cellules, ainsi que leurs corps cellulaires (**Figure 55**). En vert, nous avons le Mitotracker Green FM (MTG), seule sonde permettant de marquer la masse mitochondriale totale (indépendamment de leur état de santé). En rouge, nous avons le choix entre plusieurs sondes, toutes permettant d'évaluer des caractéristiques AF-spécifiques : le Tetramethylrhodamine, Methyl Ester (TMRM) (Potentiel de membrane de la mitochondrie, donc indicatif de l'activité mitochondriale), le MitoSOX (MTS, stress oxydant mitochondrial) et le Rhodamine B-[(1,10-phenanthroline-5-yl)-aminocarbonyl]benzyl ester (RPA) (fer mitochondrial). De plus, nous avons également essayé une sonde indicatrice du stress oxydant cytoplasmique et émettant dans l'infrarouge, le CellROX.

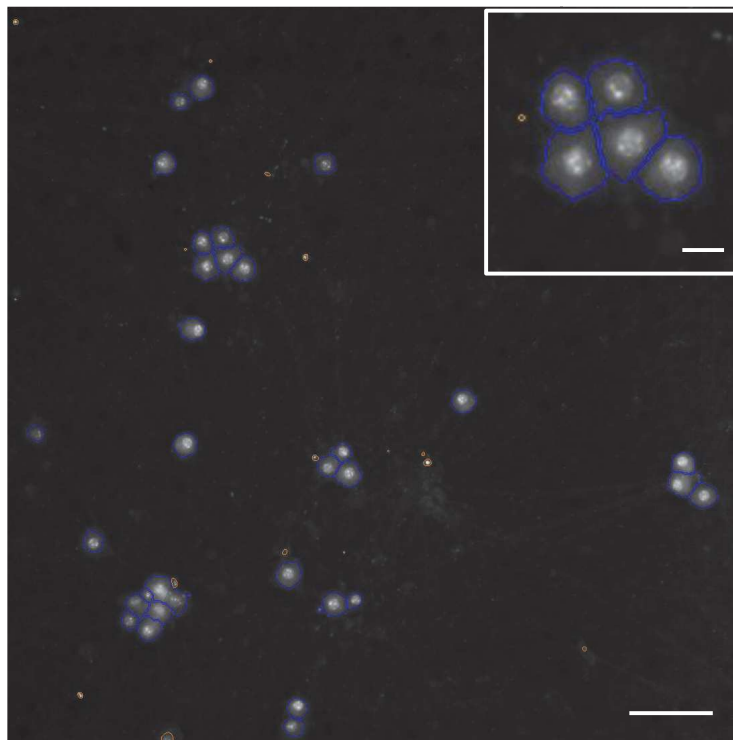


Figure 55: Segmentation du corps cellulaire grâce au Hoechst

Marquage des cultures au Hoechst en plaque 96 puits, acquisition sur le lecteur high-content. Les corps cellulaires sont segmentés par le logiciel Cellomics HCS Studio. Barre d'échelle = 100 μm ; 20 μm (encart).

Afin d'acquérir le signal, un anneau ou *collar* est automatiquement dessiné autour du noyau de chaque cellule (**Figure 56**). Seul le signal provenant de cet anneau est considéré dans la mesure, afin d'éliminer tout biais lié à la taille des cellules. La segmentation des cellules, l'acquisition des signaux dans les différentes longueurs d'ondes et l'analyse des intensités sont réalisées de manière automatique grâce à un lecteur high-content (ThermoFisher Cellomics Arrayscan XTi) et au logiciel Cellomics HCS Studio, disponibles à la plateforme de criblage de l'IGBMC.

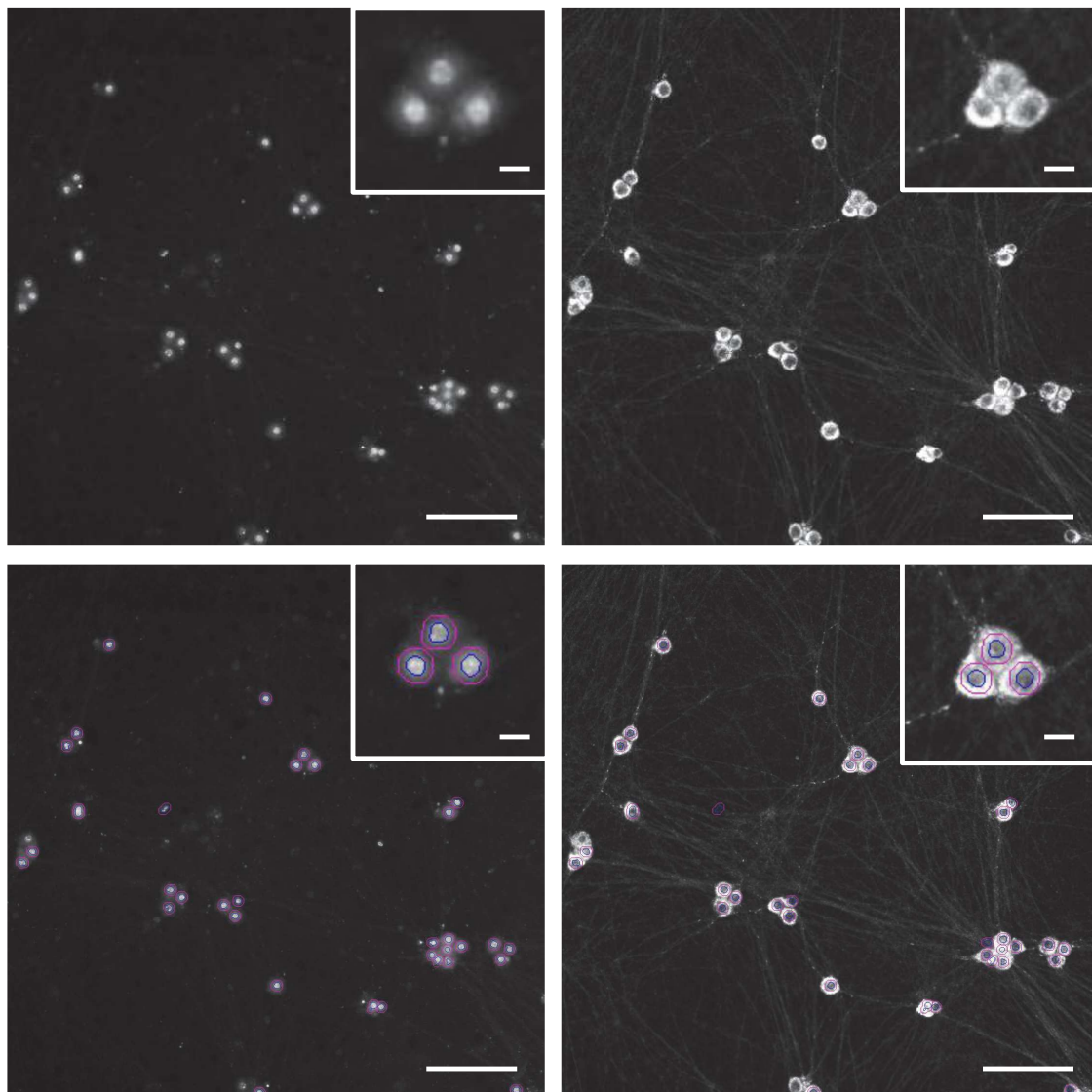


Figure 56 : Segmentation des noyaux et création d'un anneau ou *collar* (exemple du TMRM)

Marquage au Hoechst (panneaux de gauche) et TMRM (panneaux de droite), Les noyaux sont segmentés et un anneau est créé, zone dans laquelle l'intensité de la fluorescence sera mesurée (panneaux du bas). Barre d'échelle = 150 μm ; 20 μm (encart).

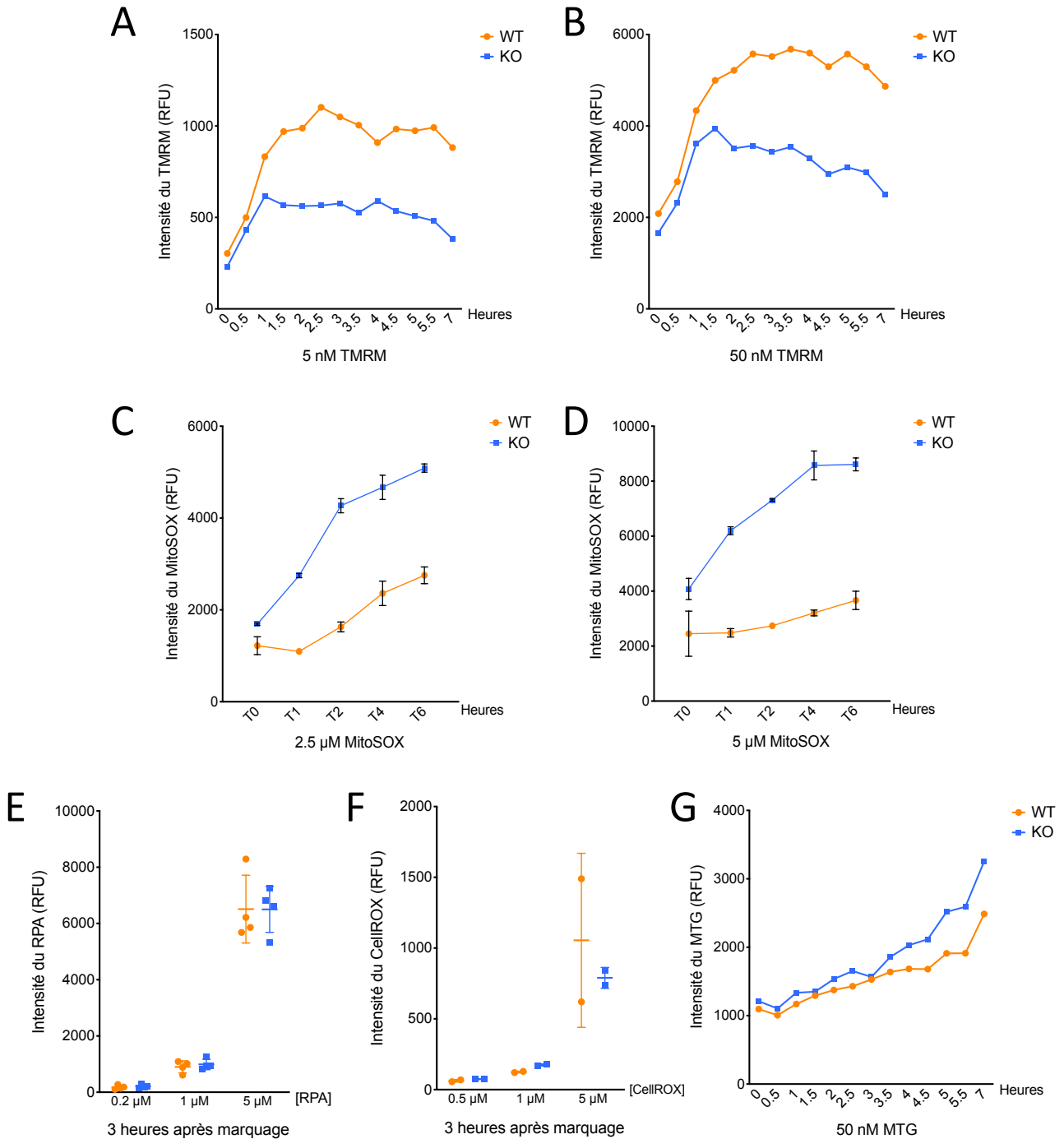


Figure 57: Évaluation de cinq différentes sondes fluorescentes

Suivi dans le temps de l'évolution de l'intensité du TMRM (A, B) et du MitoSOX (C, D) à deux concentrations. Les cellules sont incubées dans du milieu de culture après avoir rincé chaque sonde. (E) Test du RPA (fer mitochondrial) et du CellROX (F) (stress oxydant cytosolique) comme potentiel readouts. Plusieurs concentrations sont testées, en application d'une durée de trois heures d'incubation après marquage. (G) Suivi dans le temps de l'évolution de l'intensité du MTG. Les expériences sont réalisées à 21 dpi. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

Chacune des sondes précédemment citées a été testée selon sa capacité à différencier le contrôle du KO, à différentes concentrations et après différents temps de marquage (et à différents temps de culture). En effet, nous avons remarqué pour le TMRM, le MTS et le MTG que le signal met plusieurs heures à se stabiliser (**Figure 57**). Dans le cas du TMRM comme du MTS, il faut attendre un minimum de 1h afin d'observer la différence entre le contrôle et le KO. Pour le MTG, c'est moins clair, étant donné la faible différence entre les deux conditions au temps choisi. Le RPA et le CellROX ne donnent aucune différence entre WT et KO au temps choisi, et n'ont donc pas été retenus. En revanche le TMRM et le MTS, donnent tous deux des différences intéressantes et ont donc été retenus pour l'optimisation des conditions en vue d'augmenter les *Z' factors*. Toutefois, émettant tous deux dans le orange/rouge, ils ne peuvent être combinés.

4.3.4 Contrôle positif, facteurs *Z'* et puissance des *readouts*

Un élément essentiel au développement d'un *readout* est la possibilité d'utiliser un contrôle positif, qui doit permettre de rétablir partiellement ou totalement les phénotypes, afin de pouvoir valider que nous sommes en mesure de détecter l'effet d'un *hit*. Il est souvent complexe de mettre au point un contrôle positif quand on est à la recherche de toute molécule permettant de résoudre les phénotypes étudiés. Nous avons choisi d'utiliser la surexpression de la frataxine humaine hFXN, en infectant nos cultures à 7 dpi avec un AAV9-CAG-hFXN-HA, déjà utilisé par le passé dans le développement préclinique de thérapie génique au sein du laboratoire (Perdomini et al., 2014; Piguet et al., 2018). Ce système a déjà été présenté dans le manuscrit (voir **Figure 5** du manuscrit). La surexpression de hFXN permet pour chaque *readout* (taille, TMRM et MTS) de corriger la différence entre contrôle et KO de manière dose dépendante (**Figure 58**). Ces expériences permettent de valider que les essais développés peuvent détecter un sauvetage des phénotypes.

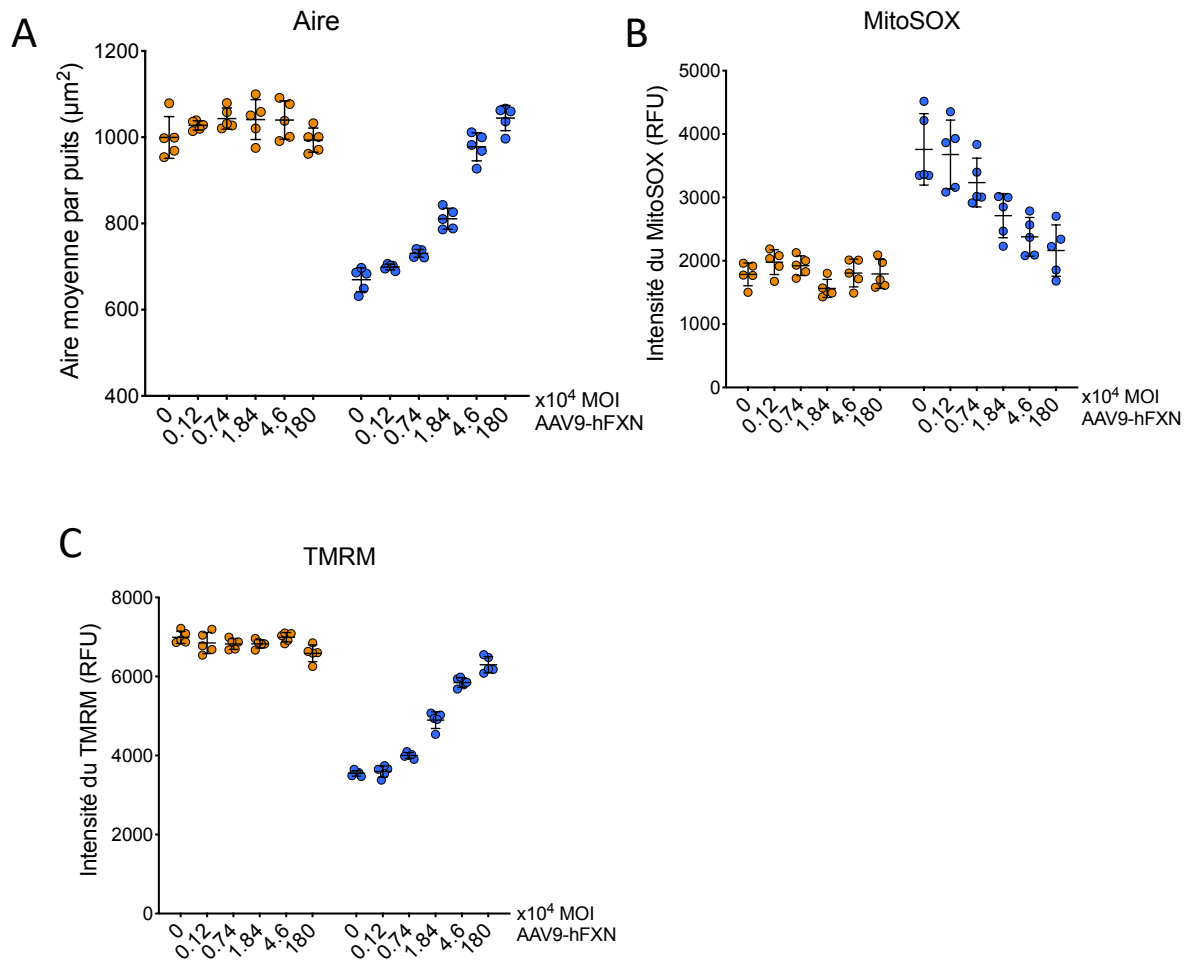


Figure 58 : Rescue des phénotypes par hFXN

Mesure de l'aire du soma (A), du MitoSOX (B) et du TMRM (C) dans des neurones de DRG infectés par des concentrations croissantes de vecteur AAV9-CAG-hFXN-HA. MOI = Multiplicity Of Infection (nombre de génomes viraux par cellule). Les barres d'erreur indiquent l'écart type. $n = 4$.

Afin de déterminer la reproductibilité de notre essai, nous avons procédé au calcul de l'indicateur de confiance Z' . Cet indicateur doit être compris entre 0.5 et 1 afin de garantir le pouvoir de l'essai à évaluer l'effet d'une molécule sur l'amélioration des paramètres analysés lors du criblage. Nous avons donc calculé Z' concernant les 3 *readouts* sélectionnés à ce stade, à savoir l'aire du soma, l'activité mitochondriale par TMRM et le stress oxydant mitochondrial par MitoSOX. Deux méthodes de quantification sont comparées, et seront complémentaires lors du criblage. Une approche « globale » en considérant la moyenne de toutes les cellules (panneaux de gauche, **Figure 59**), ou une approche cellule par cellule, où les cellules sont classées selon leur taille ou intensité de fluorescence des différentes sondes. Le pourcentage de cellules présentes dans les différentes classes est ensuite calculé. Les classes pour lesquelles la

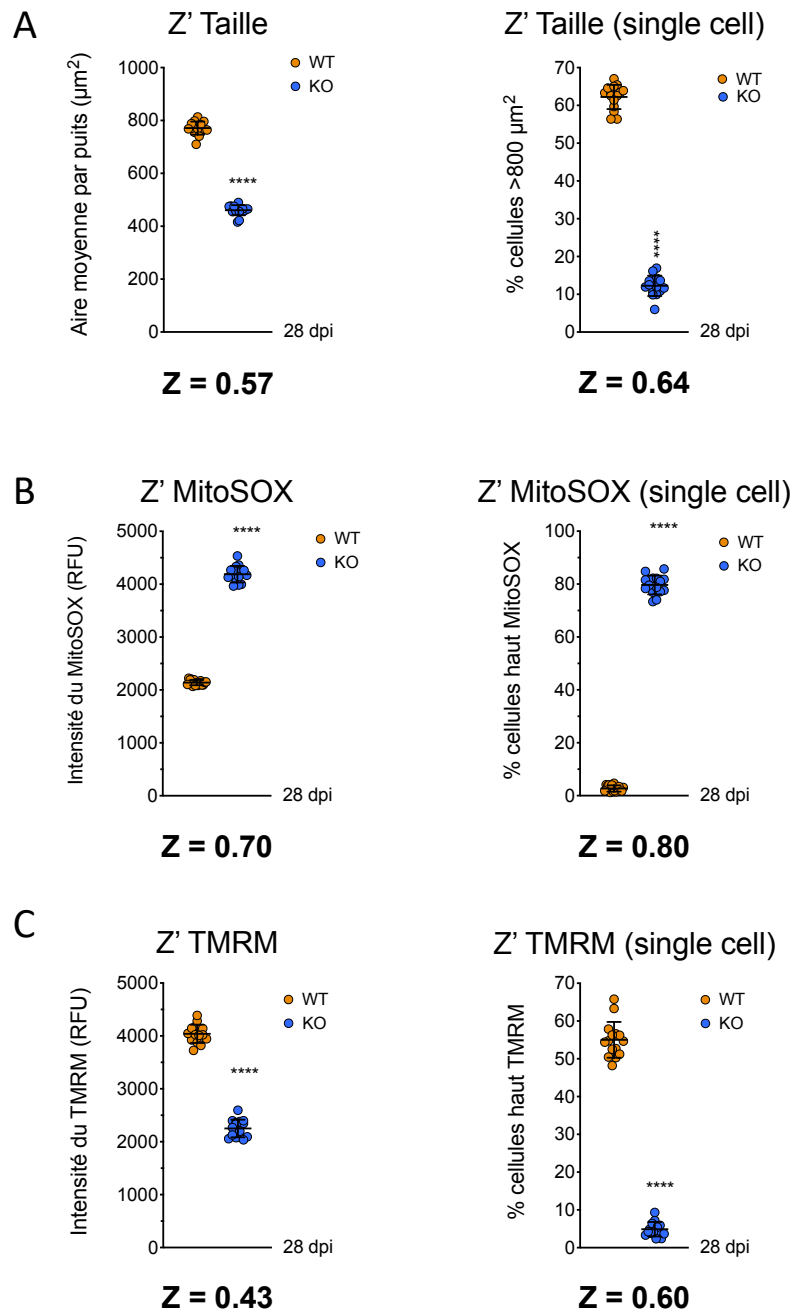


Figure 59 : Calcul des facteurs Z'

Calcul des facteurs Z' pour la taille du soma (A), le Mitosox (B) ainsi que le TMRM (C), basé sur l'analyse des différences entre 15 puits WT et 15 puits KO. Les panneaux de gauche indiquent les moyennes d'aire ou signal par puits. Les panneaux de droite correspondent à l'analyse cellule par cellule : les cellules sont classées en fonction de leur aire ou signal, et les pourcentages de cellules dans chaque classe est comparé. Sont montrées ici les classes pour lesquelles la résolution entre le WT et le KO est la meilleure, sans que l'un ou l'autre ne présente de valeur nulle. **** $p < 0.0001$ (Student t-test). $n = 15$. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

résolution entre WT et KO est la meilleure, sans toutefois avoir de valeurs nulles sont présentées (panneaux de droite, **Figure 59**). De manière générale, l'approche cellule par cellule permet d'augmenter la différence entre WT et KO car elle ne prend en compte soit que les cellules les plus affectées (pour le MTS), soit les cellules les plus saines (TMRM et taille). Elle ne peut en aucun cas remplacer l'approche globale car il est possible qu'elle omette une *rescue* faible mais significative. Les deux approches doivent donc se compléter. Les deux approches permettent d'obtenir des Z' supérieurs à 0.5 concernant la taille et le MTS (**Figure 59**). Pour le TMRM, seule l'approche par cellule le permet.

Enfin, il est nécessaire de calculer la « puissance » de chaque *readout*, c'est à dire la sensibilité de l'essai à pouvoir détecter une *rescue* des phénotypes, pour un nombre donné de réplicats. Les résultats, présentés en **Tableau 6**, indiquent qu'avec 3 réplicats (nombre choisi pour le criblage), les *readouts* taille et MitoSOX peuvent détecter une *rescue* de 20% minimum, contre 30% minimum pour le TMRM. Globalement, ces résultats sont très satisfaisant.

% de Rescue	Puissance pour 3 réplicats		
	MitoSOX	TMRM	Taille
10%	0,4	0,27	0,38
15%	0,66	0,46	0,63
20%	0,86	0,66	0,83
30%	0,99	0,91	0,98
40%	0,99	0,99	0,99
50%	0,99	0,99	0,99

Tableau 6 : Calcul de puissances pour 3 réplicats

Calcul des puissances par le logiciel G*Power. Une valeur au-dessus de 0,8 (vert) signifie que le nombre de réplicats est suffisant pour attester de la marge de *rescue* associée.

4.3.5 Choix des *readouts*

Le TMRM et le MTS ayant des spectres d'émission se chevauchant, il est nécessaire de choisir entre les deux. En regard des résultats de calcul de Z' et de puissance, le MTS semble être plus reproductible et plus sensible que le TMRM, même si les valeurs obtenues en TMRM sont également satisfaisantes. Un élément clé nous a cependant permis de faire notre choix : le TMRM doit impérativement être lu sur cellules vivantes, contrairement au MTS, qui peut être lu sur cellules vivantes comme fixées. Travailler sur cellules fixées est essentiel dans un

criblage car cela permet d'avoir un contrôle très précis des *timings*, et ne pas être perturbé par le temps d'acquisition des différentes plaques. Toutes les plaques peuvent être fixées le jour choisi, et la lecture étalée sur plusieurs jours voire plusieurs semaines. Nous avons donc préféré poursuivre avec le MTS pour le criblage, en gardant le TMRM comme *readout* secondaire, dans le cadre de l'étape de validation des *hits*.

4.3.6 Pilote

4.3.6.1 Présentation

Pour le pilote, 54 drogues ont été sélectionnées de la banque Selleckchem-Prestwick de 1443 composés *FDA-approved* qui sera utilisée pour le criblage. Ces drogues ont été sélectionnées par prédiction d'un effet potentiel basé sur la littérature ou les résultats sur le modèle.

Ces 54 molécules comprennent :

- 16 molécules agissant sur les voies de l'AMPK, mTOR, Akt (proteïn kinase B) et MAPK (Mitogen-activated protein kinase)
- 4 activateurs/inhibiteurs de l'autophagie
- 8 antioxydants or activateurs de NRF2
- 10 molécules agissant dans les métabolismes des acides aminés et du folate
- 4 molécules agissant dans l'inflammation
- 11 molécules à effet divers : neuro-protecteurs, stabilisateurs du cytosquelette, promoteurs de la biosynthèse de l'hème et chélateurs de fer.
- Acide lipoïque (100 μ M)

Pour les 54 drogues, une seule plaque source ou « mère » est nécessaire. Une plaque source correspond à 3 plaques filles, correspondant à 3 réplicats pour chaque drogue. Chaque plaque est composée de 60 puits utilisables car un effet de bord significatif a été relevé. 3 puits sont utilisés pour les cellules KO non traitées, et 3 puits pour le contrôle non traité. La présence de ces 6 puits sur chaque plaque est requise notamment pour normaliser les phénotypes entre les plaques tout au long du criblage. Les 54 puits restants seront donc utilisés pour les drogues. Deux concentrations de chaque drogue seront testées : 0.5 et 2.5 μ M, donnant 6 plaques au total pour le pilote.

Les cellules sont cultivées en présence des drogues à partir de 7 dpi, âge auquel le sérum et les agents anti-mitotiques sont complètement absents du milieu de culture. A 25 dpi, les plaques sont marquées au MitoSOX, Hoechst et Mitotracker Green, fixées, et lues sur le Thermofisher Cellomics Arrayscan XTi.

4.3.6.2 Essais

Au total trois essais de pilote ont été entrepris, qui se sont tous soldés par un échec. Le premier pilote a été lancé trop tôt, avant d'avoir complètement réussi à maîtriser le comptage des cellules au *seeding*. Il en a résulté une densité inhabituellement trop élevée, qui a causé des décollements aléatoires des cellules sur toutes les plaques. Cet échec nous a permis de nous rendre compte que nous devons être capables de maîtriser parfaitement nos comptages. Nous sommes donc passés sur un compteur automatique en tenant compte de la viabilité des cellules. Après avoir mis au point ces comptages, nous avons entrepris de lancer un nouveau pilote. Cependant à la même période, le stock de facteurs NGF a été renouvelé. Ayant commandé l'aliquot précédent 3 ans auparavant, le même numéro de lot n'était plus disponible. Nous nous sommes rendus compte, trop tard, que le nouveau lot ne convenait pas du tout, car les cellules restaient petites dans le contrôle comme dans le KO, et nous observions beaucoup de mort cellulaire. Il nous aura fallu de nombreuses semaines pour mettre en évidence qu'il s'agissait bien du NGF, et tester un nouveau lot. Arrivés en février 2020, nous étions prêts à relancer un pilote mais nous avons dû repousser à cause de la crise sanitaire du Covid-19. Après la crise, il nous a fallu 1 mois pour avoir de nouveau des cultures, et nous avons immédiatement relancé un pilote, en juin 2020. Hélas, la malchance fut une nouvelle fois à nos côtés. En effet l'incubateur du robot a subi 3 coupures de courant sur la durée de la culture. Avec aucun système de sauvetage fonctionnel, les cellules ont passé en tout trois week-ends à température ambiante et à mauvaises concentrations en CO₂. Ajouté à cela, nous suspectons une erreur dans la préparation des plaques de drogues qui ont provoqué une concentration trop importante en DMSO dans le milieu de culture. Finalement arrivés fin juin nous aurions pu relancer un pilote mais une rupture de stock sur la Poly-L-lysine, essentielle au coating des plaques, nous a empêché de relancer des cultures. Poursuivant mon travail de thèse en qualité de postdoc pendant les trois mois suivant ma soutenance, le pilote sera relancé, suivi du criblage.

Matériel et Méthodes

Dans cette section sont détaillés les protocoles utilisés pour les expériences ne figurant pas dans le manuscrit « Frataxin depletion leads to decreased soma size and activation of AMPK metabolic pathway in DRG sensory neurons ».

Infections

Infections par les vecteurs AAV9-CAG-hFXN-HA, AAV9-mtLplA et AAV9-mtLplA-S221P est réalisée à 7 DIV. Infection par les vecteurs pAAV9-shLIAS-930 est réalisée à 2 DIV.

Test de mise en culture avec gradient Percoll

Lors du protocole de mise en culture (voir Griso and Puccio, 2020), la suspension cellulaire obtenue après trituration mécanique est centrifugée 5 min à 800 x g. Le culot est resuspendu dans 12 mL d'une solution de Percoll à une densité finale de 1,05, dilué dans du tampon HBSS (14025092, ThermoFisher). Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 20 minutes à 800 x g. Le culot est repris dans 5 mL de tampon HBSS et les cellules sont centrifugées 10 min à 800 x g. Les cellules sont ensuite reprises dans 500 µL de milieu C-média (voir papier) et comptées avant ensemencement.

Traitements Autophagie

Les cellules sont traitées pendant 8h avec 1 µM de Torine 1 (4247/10, R&D systems), ou 100 nM Bafilomycine A1 (B1793, Sigma) ou en combinaison. Les cellules sont ensuite récoltées ou fixées selon l'expérience.

Clonages

pAAV-mtLplA et pAAV-mtLplA-S221P

Le cDNA complet du gene bactérien LplA a été obtenu à partir d'ADN de la souche *E. Coli* TOP10, en utilisant des oligonucléotides spécifiques (Fd : 5'-CACATTGCGCAAGAAATGCC3' ; Rv : 5'ATGTCCACATTACGCCTGCT3'). La séquence d'adressage mitochondrial (MTS) (issue de COXIV murin) a été rajoutée en 5' du fragment PCR, et le fragment PCR final a été cloné dans un vecteur pAAV-CMB (Stratagene), donnant le vecteur pAAV-mtLplA. La mutation catalytique LplA-S221P (Hermes and Cronan,

2009) a été obtenue en utilisant des oligonucléotides spécifiques (Fd : 5'ATGTCCACATTACGCCTGCT3' ; Rv : 3'TTTTCGCCCATTATGGCGAGCGCGTGGAAGCGGAAATCATCCCCCGAACAA 5') à partir du vecteur pAAV-mtLplA, donnant le vecteur pAAV-mtLplA-S221P.

pAAV-shLIAS-930

Les shRNA spécifiques de LIAS ont été designés en utilisant l'outil RNAi Designer de ThermoFisher.

Name	spacer	Sens	Boucle	Antisens
shLIAS-930	tgttt	GGTCCAGCCTGATGTTGTTTC	ttcaagaga	GAAACAACATCAGGCTGGACC
	aaaaa	GGTCCAGCCTGATGTTGTTTC	tctctttaa	GAAACAACATCAGGCTGGACC

Les shRNA ont ensuite été clonés dans un vecteur pENTR1A (Invitrogen Life Technologies) modifié contenant le promoteur U6. Les shRNA ont ensuite été sous-clonés dans les vecteurs pAAV contenant une cassette CMV-eGFP et des séquences spécifiques AAV2 en utilisant la technologie Gateway.

Transfection des fibroblastes murins et cellules HEK

Les cellules ont été seedées à raison de 50.000 cellules par puits d'une plaque 6 puits, puis transfectées le lendemain sur 48h en utilisant le protocole classique de la Lipofectamine 2000 (11668027, ThermoFisher), et en utilisant 2 µg d'ADN total par puits d'une plaque 6 puits.

Mesures de la Glycine et des BCAA

Les niveaux de glycine et des acides amines branches (BCAA) ont été analysés en utilisant des kits fluorométriques (Glycine ab211100, Abcam) ou colorimétriques (BCAA, ab83374), en suivant les intructions du fabricant. La quantité de protéines totale utilisée par mesure a été optimisée à 7,5 µg/échantillon/puits pour la glycine et 15 µg/échantillon/puits pour les BCAA

Marquage CellROX

Le protocole de marquage du CellROX est exactement le même que pour le MitoSOX (voir manuscrit), en utilisant 1 ou 5 μM de CellROX (C10422, Fisher Scientific) en remplacement du MitoSOX.

Anticorps	Référence	Dilution
CAT	ab1877, Abcam	1/10.000
FXN	Clone 4F9, Home made	1/5000
GR	sc-133245, SCBT	1/1000
LA	437695, Calbiochem	1/5000
LC3	NB100-2220, Novus Biological	1/10.000
LIAS	ab96302, Abcam	1/1000
LplA	orb51462, Biorbyt	1/1000
NBR1	9891S, CST	1/1000
NIX	12396S, CST	1/1000
OPTN	10837-1-AP, Proteintech	1/2000
P62	H00008878-M01, Abnova	1/1000
PDC-E2	sc-271352, SCBT	1/2000
PHGDH	HPA021241, Sigma	1/1000
PSAT1	PA5-22124, Fisher Scientific	1/1000
SOD2	sc-137254, SCBT	1/1000

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en Western Blot

Gène	Fd-Primer	Rv-Primer
P62	AGCCAGAGGAACAGATGGAG	GGGAGATGTGGGTATAGGGC
NRF2	TGCTCGGACTAGCCATTGCC	AGCTCATAGTCCTTCTGTGCGCTGA
ATF4	GGCCAAGCACTTGAAACCTC	TCCTCCTTGCCGGTGTCTGA
NFKB1	AACTATGTGGGGCCTGCAAA	GTTTGCAAAGCCAACCACCA
CHOP	CCAGAATAACAGCCGGAACC	ATCCTCATACCAGGCTTCCA
PSAT1	ACTACAAAAGTGCAGGCTGGG	TTGATCCATTCCAGGACCAT
MTHFD2	TGA AGA GCG AGA AGT GCT GA	GAA TGC TCC CTG GTG AGG TA
ASNS	CGA CCA AAA GAA GCC TTC AG	CCA CTT GGG CAT CCA GTA AT
HMOX1	AGTTCAAACAGCTCTATCGTGCTC	CTCTGACGAAGTGACGCCAT
GSTA2	TACATCGCCACCAAATATGACC	TGCCCAATCATTTTCAGTCAGA

Tableau 8 : Liste des oligonucléotides utilisés en qPCR



DISCUSSION

1 Discussion et perspectives complémentaires au manuscrit « Frataxin depletion leads to decreased soma size and activation of AMPK metabolic pathway in DRG sensory neurons »

1.1 Discussion et perspectives directes :

La majorité des résultats présentés dans le manuscrit « DRG model » a déjà été discutée dans le papier. J'insisterai ici sur certains points non développés dans le manuscrit et apporterai les perspectives directes et futures du projet.

La caractérisation des neurones sensitifs de DRG déplétés en frataxine a été l'occasion de mettre en lumière un défaut de taille des cellules dans le modèle. Les résultats obtenus suggèrent qu'une activation de la voie de l'AMPK et une inhibition concomitante de la voie mTOR sont responsables de cette différence de taille. Afin de confirmer cette hypothèse, une série d'expériences devra être réalisée. Il est notamment nécessaire de poursuivre la modulation de la voie de l'AMPK et en observer le résultat sur la taille des cellules. Comme démontré, l'activation de l'AMPK, tout comme l'inhibition de mTOR, suffit à réduire la taille chez le contrôle et augmenter le phénotype chez le KO. Cela est une bonne indication que ce mécanisme peut être responsable d'un défaut de taille dans ces cellules. En revanche, il ne constitue pas la preuve qu'il s'agisse bien du mécanisme causal dans le cas de la perte de frataxine. Pour prouver cela, il faudra d'abord reproduire le résultat en utilisant un autre activateur de l'AMPK tel que le Compound 991 (AOB8150, Aobious). Ensuite, il faudra réaliser les expériences réciproques à ce qui a déjà été fait. Est-ce qu'une inhibition spécifique de l'AMPK et/ou une activation de mTOR permet de rétablir la taille des neurones KO ? L'inhibition de l'AMPK peut être réalisée en utilisant des composés chimiques tels que la Dorsomorphine/Compound C. Cependant, cette molécule n'est pas exclusivement spécifique de l'AMPK et inhibe l'activité de plusieurs autres kinases dans la cellule (Dasgupta and Seibel, 2018). En effet, en l'ayant testé sur les cellules, j'ai remarqué une grande toxicité sans inhibition de l'AMPK (résultats non montrés). Une stratégie alternative et plus spécifique de l'AMPK constitue une inhibition de l'expression de la sous-unité alpha de l'AMPK par ARN à interférence (Hill et al., 2016; Tangeman et al., 2012). Ayant déjà travaillé avec des shRNA dans mon modèle et en regard de la forte transductibilité de ces cellules par les AAV, cette stratégie sera choisie. Toutefois, il est possible que l'inhibition de l'AMPK affecte grandement la survie du KO, si ce mécanisme constitue la voie principale de maintien du métabolisme dans

ces cellules. Concernant l'activation de mTOR, trois activateurs ont pour le moment été testés sans parvenir à une activation efficace de mTOR dans le modèle (résultats non présentés) : l'insuline, IGF-1 et le MHY1485. En discutant lors de rencontres scientifiques, certains chercheurs m'ont suggéré que le manque de cellules gliales dans mes cultures rendait probablement difficile l'activation de mTOR dans les neurones sensitifs ; une piste à explorer. Toutefois, un essai avec un autre activateur, la leucine, sera envisagé.

Moduler la voie de signalisation de l'AMPK sera également l'occasion de comprendre quels sont les autres phénotypes du modèle causés par l'activation de l'AMPK. En particulier, il sera intéressant de savoir si l'activation de l'AMPK est à l'origine de l'augmentation de la masse mitochondriale que l'on observe chez le KO. Si cette augmentation est perdue lors de l'inhibition de l'AMPK, cela suggérerait d'une part que l'AMPK en est responsable, et d'autre part que cette augmentation de masse correspond bien à une activation de la biogénèse mitochondriale plutôt qu'à un défaut de dégradation. Lors de ces investigations, des techniques de quantification des mitochondries plus précises devront être développées telles que la quantification des génomes mitochondriaux (mtDNA/gDNA). L'AMPK stimule également l'activation de la glycolyse en augmentant notamment l'import de glucose dans les cellules (Herzig and Shaw, 2018). L'activation de la glycolyse dans le modèle devra d'abord être mesurée plus précisément grâce à la technologie Seahorse ou en dosant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH). Il est possible que l'activation de l'AMPK que je détecte dans le modèle soit entièrement due aux besoins d'activation de la glycolyse chez le KO. Il est donc primordial de vérifier également que l'on conserve cette activation dans des conditions de culture glycolyse-restrictives telles que la culture en milieu galactose strict ou faible glucose.

Cette étude a aussi été l'occasion de démontrer un degré de réciprocity entre niveaux de frataxine et taille des cellules. Si ces résultats venaient à être confirmés, il s'agirait d'une avancée majeure dans la compréhension du développement de l'AF et en particulier dans la corrélation génotype/phénotype observée chez les patients. Pour ces raisons, il est nécessaire de poursuivre les investigations et de les démontrer dans plusieurs systèmes. En premier, il est primordial de vérifier mes observations *in vivo*, en mesurant la taille des neurones positifs à la Parvalbumine dans le modèle Pvalb-Cre, à des temps inférieurs à ceux présentés dans le manuscrit. En effet, en lien avec une hypothèse développementale dans l'AF, il faut mesurer la taille de ces cellules avant ou au tout début de l'apparition de l'ataxie sensitive chez ces souris. Pour cela je reproduirai l'expérience chez des souris de 5.5 à 7.5 semaines (Piguet et al., 2018). Afin de poursuivre les études de corrélation entre taille et expression de la frataxine, les résultats obtenus grâce aux vecteurs AAV9-CAG-hFXN-HA devront être reproduits en utilisant la

frataxine recombinante TAT-FXN. Comme expliqué dans l'introduction, il s'agit d'une frataxine synthétique associée à un système d'acheminement unique vers les mitochondries (TAT, Trans-Activator of Transcription) (Vyas et al., 2012). Une version améliorée est actuellement en essai clinique (phase I) (NCT04176991) sous le nom de CTI-1601. Cette molécule sera testée dans les cellules du modèle à des concentrations croissantes, et la taille des soma sera mesurée. Un autre moyen d'aborder cette question, et de prouver son implication dans le contexte génétique de l'AF, est d'utiliser des cultures de neurones de DRG dérivés de patients. En effet, ces dernières années les protocoles de différenciation de cellules IPS de patients en neurones de DRG se sont améliorés et on commence à voir des modèles pertinents apparaître (Dionisi et al., 2020). Dans le cadre d'une collaboration avec Chiara Dionisi, étudiante dans le laboratoire du Prof. Massimo Pandolfo, et responsable du développement de ce modèle, la taille des cellules dans les neurones proprioceptifs issus d'IPS de patients sera mesurée. Cette moyenne de taille pourra ensuite être corrélée avec la largeur de l'expansion GAA présente dans les différentes lignées de cellules.

Une méthode ultime de vérification de l'hypothèse de défaut de taille chez les patients, et la corrélation avec les niveaux de frataxine serait de pouvoir mesurer la taille des neurones du DRG tout au long de la vie des patients, par des techniques telles que l'imagerie à résonance magnétique (IRM). Il n'est à l'heure actuelle pas encore possible d'atteindre les niveaux de résolution nécessaires pour des mesures si fines. En effet seules les données concernant les DRG en entiers sont mesurables par IRM (revu dans Haberberger et al., 2019).

1.2 Perspectives à plus long terme

Comme discuté dans le manuscrit, un des points faibles de ce modèle est son manque de spécification des différents types de neurones sensitifs. Plus précisément, je n'ai pas été en mesure de déterminer la nature exacte des cellules de les cultures. Les cellules sont récupérées chez l'embryon à un stade du développement post-différenciation des cellules du DRG (Marmigère and Ernfors, 2007). Cependant, il est très probable que l'utilisation d'un facteur neurotrophique unique, le NGF, sur toute la durée de la culture, perturbe le maintien de ces sous-types dans le temps. En revanche, la présence de marqueurs de larges neurones tels que NF200, Pvalb et TrkC suggèrent tout de même que les cellules du modèle possèdent certaines caractéristiques propres à celles des larges neurones de DRG. Cependant, ce défaut nous empêche pour le moment de réaliser des expériences de transcriptomique spécifiques telles que

du *single cell RNA seq*, qui nous seraient pourtant essentielles à la compréhension des mécanismes impliqués dans une sensibilité spécifique des neurones proprioceptifs à la perte de la frataxine. L'une des perspectives à long terme serait donc de mettre au point des conditions de culture, et notamment la composition du milieu en facteurs neurotrophiques, propices au maintien de la différenciation des cellules de DRG. Notamment, il sera nécessaire d'utiliser les facteurs NT3 et BDNF, essentiels au développement des sous-types de neurones sensitifs (Dionisi et al., 2020; Marmigère and Ernfors, 2007).

L'un des forces de ce modèle est son phénotype marqué et sa reproductibilité. De plus, il est facilement transductible par les AAV. Ces caractéristiques en font une plateforme idéale pour valider des cibles génétiques identifiées dans d'autres modèles plus physiologiques. En particulier, un *single cell RNA seq* a été réalisé dans notre laboratoire (Diana Munoz, ancienne postdoc du laboratoire) dans le but d'identifier des profils d'expressions spécifiques de chaque sous-type de neurones de DRG et en particulier dans les neurones proprioceptifs en absence ou en présence de frataxine. L'un des projets d'une nouvelle doctorante du laboratoire, Deepika Chellapandi en collaboration avec Marie Paschaki (Maître de conférence à l'INMG), sera de valider les gènes identifiés dans cette expérience en inhibant notamment leur expression dans mon modèle par shRNA et observer si les cellules en sont plus ou moins sensibles à la perte de frataxine.

L'un des aspects marquants de cette étude est la survie des neurones en absence de frataxine. Malgré un métabolisme fortement diminué, une production d'énergie fortement altérée, les neurones parviennent à maintenir un métabolisme suffisant pour survivre. Les cellules doivent donc passer par des réajustements métaboliques majeurs pour faire face à ce déficit énergétique. Notamment, les neurones sans frataxine ne semblent pas sévèrement affectés par l'inhibition de la glycolyse en condition de galactose strictes. Même si certains réajustements passent probablement par l'augmentation du *pool* mitochondrial, il doit exister des mécanismes compensatoires efficaces et essentiels à leur survie. Même s'il n'est pour l'instant pas possible d'entreprendre des expériences de transcriptomique telles que le *Single Cell*, il resterait en revanche intéressant de comparer les profils d'expression des cellules en conditions de divers stress métaboliques, afin d'identifier quels sont les mécanismes compensatoires qui sont responsables de la survie de ces cellules en absence de frataxine. En effet, en identifiant ces mécanismes, on pourrait imaginer une stratégie thérapeutique visant à les favoriser dans les cellules de patients.

2 Discussion et perspectives, partie « métabolisme de l'acide lipoïque dans la taille des neurones du modèle »

Le but de ce projet était de comprendre les mécanismes responsables de la baisse de taille observée dans les neurones de DRG en absence de frataxine. La perte de frataxine engendre des bouleversements métaboliques dans de nombreuses voies. En cause primaire, les enzymes à Fe-S sont réparties dans des mécanismes touchant toute la cellule. L'activité de l'une de ces enzymes, LIAS, est à elle seule un point limitant dans le maintien de cinq voies majeures de la production d'énergie et du métabolisme des acides aminés : dégradation de la glycine, des acides aminés branchés (BCAA), de la lysine, production de l'acétyl-CoA et fonctionnement du Cycle de Krebs. Toutes ces voies nécessitent l'utilisation de l'acide lipoïque (LA) pour fonctionner, et LIAS est une enzyme essentielle au mécanisme de sa biosynthèse. La perte d'activité de LIAS joue donc un rôle majeur dans les dérèglements métaboliques associés à l'AF.

Un défaut de production de LA peut-être induit par des mutations dans LIAS ou d'autres enzymes de la voie de biosynthèse, et est à l'origine de nombreux syndromes chez l'humain. La physiopathologie de ce défaut peut être soit liée à la perte d'énergie engendrée par les déficiences d'activités de PDH et α -KGDH, mais aussi à l'accumulation de métabolites neurotoxiques issus des défauts de dégradation des acides aminés (Mayr et al., 2014). C'est le cas notamment de la maladie du sirop d'érable (MSUD, maple syrup urine disease) et de la hyperglycémie sans cétose (NKH, nonketotic hyperglycinemia), causées par une élévation des niveaux de leucine et de glycine, respectivement (Baker et al., 2014; Burrage et al., 2014; Harty et al., 2008; Mayr et al., 2011; Perry et al., 1975; Schadewaldt and Wendel, 1997).

J'ai émis l'hypothèse que la déficience de l'enzyme LIAS pourrait jouer un rôle majeur dans les défauts de tailles observés dans les neurones de DRG déficients en frataxine. J'ai donc développé un système me permettant de contourner la synthèse *de novo* de LA, et donc l'activité de LIAS, en utilisant la capacité des bactéries à utiliser le LA environnemental, quand le synthétiser n'est pas possible. Ce système est simple car il nécessite l'expression d'une seule protéine, la Lipoyl Ligase A ou LplA, associée à une supplémentation en LA. Seule une étude rapporte l'utilisation de cette protéine dans un système non bactérien, où son expression chez la levure a rétabli la survie de souches de levures déplétées de l'octanoyltransferase Lip2 (LIPT2) ou de l'amidotransferase Lip3 (LIPT1). A ma connaissance, aucune étude ne rapporte l'utilisation de LplA pour compléter la fonction de LIAS (Lip5 chez la levure) et dans un modèle mammifère. En combinant LplA à un signal d'adressage mitochondrial (MTS), et en

l'exprimant dans les neurones de DRG déficient en frataxine, il était en théorie possible de rétablir le chargement du LA sur les enzymes réceptrices sans avoir besoin de LIAS.

Le premier résultat a été de montrer que LplA associée à un MTS (mtLplA) pouvait être importée dans les mitochondries et être active dans des cellules mammifères. La détection de LplA par Western Blot montre deux bandes de tailles correspondantes aux versions matures et clivées de mtLplA, suggérant un import de LplA dans les mitochondries. Cependant des techniques de purification de mitochondries par centrifugation différentielle ou d'immunofluorescence pourrait être réalisées pour le démontrer. J'ai pu montrer que cette protéine était active à la fois dans des fibroblastes et des neurones de DRG de souris. L'expression de LplA a pu restaurer le chargement du LA sur PDH et KGDH. L'activité était d'autant plus amplifiée quand les cellules étaient supplémentées par des concentrations croissantes de LA. La spécificité de l'activité de LplA a été démontrée en exprimant le mutant catalytique LplA-S221P, qui a montré une capacité inférieure à restaurer le chargement de LA. De manière intéressante, un traitement unique à l'acide lipoïque a également montré une capacité, bien que faible, à augmenter le chargement. L'existence d'un *LA Salvage Pathway* à proprement parler chez les mammifères n'a pas encore été prouvée à ce jour, bien qu'il existe une enzyme montrant une homologie de 30% avec LplA. Cette enzyme, appelée LIPT1, joue le rôle d'amidotransférase et ne catalyse qu'une des deux étapes réalisées par LplA : le transfert du LA fixé sur l'AMP vers les enzymes de destination. Cependant quelques études rapportent l'existence d'un *Salvage pathway* primaire et spécifique de certaines enzymes réceptrices. Les chercheurs rapportent l'existence d'un mécanisme faisant intervenir l'enzyme ACSM1 (lipoate-activating enzyme Ac-CoA synthetase medium-chain family member 1) et LIPT1 afin de lier le LA exogène de manière spécifique sur PDH et KGDH (Paredes et al., 2018; Walden et al., 2008). Cependant, une autre équipe de chercheurs souligne qu'il est peu probable que la réaction puisse avoir lieu *in vivo* notamment car ACSM1 peut seulement utiliser des stéréoisomères non naturels de l'acide lipoïque, et que cette protéine utilise le GTP plutôt que l'ATP, rendant la formation d'un complexe lipoyl-AMP avec l'enzyme peu probable (Bailey et al., 2018; Fujiwara et al., 2001). Difficile donc de pouvoir interpréter mes observations à ce stade. Cependant, un de mes derniers résultats de thèse a montré qu'un traitement de LA montrait une tendance à restaurer une partie des niveaux des enzymes à Fe-S SDH et NDUFS3. L'explication de ce phénomène pourrait se trouver dans les propriétés anti-oxydantes de LA. En effet il est connu que le stress oxydant peut déstabiliser les centres Fe-S (Vernis et al., 2017). On peut donc supposer que des traitements antioxydants puissent indirectement empêcher de déstabiliser les clusters. L'amélioration du chargement pourrait alors passer à travers la

restauration partielle de l'activité de LIAS, dû à la stabilisation de son cluster, plutôt que par liaison du LA supplémenté.

Les résultats de mon étude ont montré que l'expression de LplA pouvait limiter la perte de taille des neurones de DRG, seulement lorsqu'elle était associée à une supplémentation en LA. Notamment, ce traitement était efficace dans le maintien des cellules les plus larges. En revanche, l'effet s'estompe dans le temps et l'écart avec le contrôle se creuse. De manière très intéressante, j'ai pu remarquer que la majorité de cet effet semble être à attribuer à l'acide lipoïque lui-même. En effet, le traitement LA seul, ou combiné avec LplA-S221P a montré une amélioration de la taille significative et proche, bien qu'inférieure, de celle de la LplA. A ce stade il semble donc probable que l'effet positif observé sur la taille des neurones passe à travers deux composantes : le traitement LA et l'activité de LplA. L'enjeu était ensuite de comprendre quelles sont les raisons d'un tel effet. L'acide lipoïque est connu pour être un puissant antioxydant (Solomonson and DeBerardinis, 2018). En regard des résultats concernant le stress oxydant dans le modèle, l'idée d'un effet du LA passant par une protection contre le stress oxydant semble plausible. Je n'ai pas eu l'occasion d'étudier l'effet de LA sur le stress oxydant général de la cellule, car je me suis concentré sur le stress oxydant mitochondrial lors de ma thèse. Les résultats des expériences ont montré que le traitement LA permettait d'améliorer le stress chez le KO, mais uniquement à des temps où l'amélioration de la taille des cellules n'était plus aussi marquée. En revanche, en combinant avec LplA, le stress semble corrigé antérieurement et à des niveaux similaires à ceux du contrôle. Si confirmés (cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois), les résultats montreraient d'une part que le stress oxydant mitochondrial n'est pas à l'origine du déficit de taille observé dans le modèle, et d'autre part que ce paramètre est partiellement ou entièrement dû aux défauts engendrés par la perte du métabolisme du LA. Des expériences complémentaires devront être réalisées afin d'apporter des réponses à ces hypothèses. D'une part, il est nécessaire de mesurer le stress oxydant général dans les cellules et d'étudier l'impact de l'acide lipoïque combiné ou non à LplA sur ce phénotype. Pour cela, il existe des sondes fluorescentes dédiées telles que le CellROX, que j'ai eu l'occasion de tester dans le développement du projet de criblage. L'utilisation du DHR123, une sonde déjà utilisée par notre laboratoire (Calmels et al., 2009) pourra également être envisagée. Une sélection d'antioxydants, tels que le N-Acétyl-Cystéine, devra également être testée dans sa capacité à restaurer la taille des cellules, afin de déterminer si l'effet observé est bien lié au stress ou à l'acide lipoïque spécifiquement. Il s'agira ensuite d'établir un lien entre les antioxydants et la croissance des neurones.

Outre l'effet neuro-protecteur rapportés des antioxydants (Enogieru et al., 2018; Gugliandolo et al., 2017; Han et al., 2018; Miller et al., 2019), certains d'entre eux sont connus pour moduler la voie de signalisation de l'AMPK. C'est notamment le cas du resvératrol (Diaz-Gerevini et al., 2016; Li et al., 2018; Sajish and Schimmel, 2015), un polyphénol du raisin ayant déjà montré un effet bénéfique dans un essai clinique de l'ataxie de Friedreich (Yiu et al., 2015), ainsi que sur des modèles murins d'autres ataxies (Ghorbani et al., 2018; Wu et al., 2017). Concernant le LA, les résultats des études ne convergent pas tous vers les mêmes observations : certaines lui associent des propriétés activatrices (Kim et al., 2018; Wang et al., 2017), et d'autres inhibitrices (Qiu et al., 2018; Zhou and Cheng, 2019). Durant mes travaux de thèse, j'ai pu mettre en évidence un lien entre l'activation de l'AMPK et la taille des neurones. En effet, activer chimiquement l'AMPK permettait de reproduire une perte de taille chez le contrôle et augmenter le phénotype des KO. En ayant connaissance de ces données, il est nécessaire de comprendre si le sauvetage de la taille par l'acide lipoïque combiné ou non à LplA passe par la modulation de l'AMPK. J'ai pu relever que l'expression de LplA seule ou associée au LA permet de diminuer l'activation de l'AMPK observée chez le KO. Ce n'était pas le cas du traitement LA seul. Ces résultats pourraient conforter l'hypothèse que chacun des traitements agit de façon différente, mais doivent faire l'objet de plus amples investigations. Notamment, il sera nécessaire d'activer l'AMPK en présence du système. Si cette activation abolit totalement l'effet positif de l'une ou l'autre des conditions, alors ceci indiquerait la spécificité de l'AMPK dans le mécanisme de sauvetage de la taille. L'effet du traitement dont l'action ne passe pas par l'AMPK devrait être moins affecté par l'activation de l'AMPK. Une expérience apparentée a déjà été réalisée, en bloquant la voie mTOR grâce à la rapamycine. Dans cette expérience, le traitement à la rapamycine a suffi à complètement abolir l'effet de LplA et/ou LA sur la taille des cellules. Cela suggère que la voie mTOR est requise pour l'action de sauvetage de la taille. Ces résultats devront être reproduits et notamment en utilisant d'autres inhibiteurs de la voie mTOR.

Afin de pouvoir continuer à investiguer ces questions en utilisant le système, il me faudra confirmer que l'activité de LplA permette bien le rétablissement de la fonction des enzymes utilisant le LA comme cofacteur. Outre la mesure des niveaux de LA sur les protéines PDH et KGDH, il sera nécessaire de mesurer leurs activités enzymatiques, tout comme celles des autres enzymes à LA, telles que BCKDH (dégradation des BCAA) ou GCSH (clivage de la glycine). Il s'agira également de déterminer si les mécanismes en aval de ces enzymes sont restaurés. En particulier, une mesure fine des niveaux de l'ensemble des acides aminés pris en charge par ces enzymes devra être réalisée par spectrométrie de masse. Une analyse similaire dans les

cardiomyocytes des souris MCK-Cre a déjà été réalisée dans notre équipe, en collaboration avec la plateforme de spectrométrie du CHRU de Strasbourg (travaux non publiés de Brahim Belbellaa). Un suivi dans le temps des niveaux des acides aminés devra être envisagé. En effet, les mesures de glycine que j'ai effectuées à des temps poussés de culture (30 dpi) n'a pu mettre en évidence un rétablissement des niveaux de glycine par LplA. Si l'ensemble de ces expériences permettent de valider l'activité de LplA sur toutes les voies utilisant du LA, il faudra ensuite déterminer la concentration d'acide lipoïque minimale nécessaire au fonctionnement de LplA pour induire une amélioration de la taille des cellules. En effet, toutes mes expériences utilisent du LA à 10 ou 100 μM , des concentrations auxquelles le LA seul permet d'améliorer la taille. Il me faut isoler l'activité de LplA afin de pouvoir identifier les voies spécifiquement modulées après rétablissement du chargement de LA aux enzymes. Pour cela, un gradient de LA (de 0 à 10 μM) sera utilisé en combinaison avec LplA en mesurant la taille des cellules.

Afin d'ajouter une autre façon de démontrer un lien entre perte d'activité de LIAS et taille des cellules, j'ai développé un shRNA dirigé contre LIAS (shLIAS-930) dans le but de reproduire seulement une des branches de l'AF, étant la perte d'activité de LIAS. L'expression du shLIAS-930 a été capable d'inhiber l'expression de LIAS, réduisant fortement l'activité de synthèse du LA. La mesure de la taille des neurones a révélé un phénotype intermédiaire entre le contrôle et le KO. Ces résultats en accord avec les précédents, prônent l'hypothèse que les défauts de taille sont partiellement plutôt que totalement liés à l'activité de LIAS. Cependant, des expériences complémentaires devront être réalisées. Par exemple, il serait utile d'utiliser plusieurs shRNA d'efficacités différentes afin de contrôler plus finement l'expression de LIAS. Un moyen alternatif et complémentaire serait d'exprimer à plusieurs niveaux un ARN messager codant pour LIAS et portant des mutations silencieuses empêchant sa dégradation par les shLIAS.

Le développement du système LplA m'est très utile dans le cadre de mon projet afin d'étudier l'impact de l'acide lipoïque sur la taille des neurones. Mais il s'agit également d'un système innovant qui peut être utile à de nombreuses thématiques de la recherche sur l'AF. Son utilisation permet d'isoler deux grandes parties de l'AF : d'un côté la perte des Fe-S, d'un autre la perte spécifique de l'acide lipoïque. Il peut donc être utilisé dans la recherche de nouveaux mécanismes de la physiopathologie de l'AF afin de valider de quelle grande sous-partie ils sont issus. Par exemple Valentine Mosbach, postdoc de notre laboratoire, travaille sur des lignées de fibroblastes de souris totalement déplétés en frataxine, mais possédant une mutation dans la protéine échafaud ISCU permettant la survie des cellules tout en montrant des caractéristiques

moléculaires typiques de l'AF (résultats non publiés). L'hypothèse est qu'une activité résiduelle des Fe-S est suffisamment améliorée par la mutation sur ISCU et permet le fonctionnement des mécanismes les plus essentiels à la division et survie des cellules. Elle projette d'établir des lignées de fibroblastes de souris exprimant stablement la LplA afin d'alléger la cellule en besoin de Fe-S pour la synthèse du LA, et observer si la redistribution des clusters au sein de la cellule en est affectée.

Les résultats très encourageants concernant la capacité de l'acide lipoïque à restaurer la taille des cellules, et probablement le stress oxydant, mettent en lumière un potentiel aspect thérapeutique de cette molécule pour traiter l'AF. L'acide lipoïque est déjà mis à l'étude pour sa capacité à améliorer la survie des neurones dans plusieurs neuropathologies. En cause, son effet neuro-protecteur, antioxydant et sa capacité à passer la barrière hémato-encéphalique, de par ses propriétés chimiques qui le rendent à la fois hydro- et liposolubles (Packer et al., 1997; Salehi et al., 2019). Cette caractéristique fait également de lui un antioxydant « universel » car il peut agir à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules (Salehi et al., 2019). L'utilisation de l'acide lipoïque a par exemple amélioré le phénotype neuro-cognitif de patients atteints de schizophrénie (Sanders et al., 2017), et amélioré la capacité de marche de malades de la sclérose en plaques (Loy et al., 2018). Un traitement au LA a également permis d'améliorer la mémoire et l'apprentissage d'un modèle de souris de la maladie d'Alzheimer (Quinn et al., 2007). Outre ses capacités de neuro-protection, le LA est connu pour sa capacité à augmenter l'import de sucre dans des tissus sensibles à l'insuline mais aussi insulino-résistants (Eason et al., 2002; Ghibu et al., 2009). Cette propriété en fait un candidat intéressant dans le traitement de complications du diabète telles que la neuropathie diabétique. Un traitement au LA s'est montré efficace dans la réduction des symptômes neuropathiques et le contrôle des niveaux de triglycérides dans plusieurs études cliniques (Agathos et al., 2018; Garcia-Alcala et al., 2015; Sun et al., 2017; Ziegler et al., 2016). L'acide lipoïque est également un chélateur de métaux lourds (Gorąca et al., 2011). De plus, une étude montre qu'un traitement au LA augmente l'expression de la frataxine dans des cultures de neurones de DRG de rat, sans toutefois apporter de lien mécanistique (Melli et al., 2008).

Pour toutes ces raisons, associées à mes résultats, il est intéressant de se poser la question quant à un éventuel potentiel thérapeutique du LA chez l'AF. Cependant, certains aspects de la pharmacocinétique de cette molécule pourraient freiner son utilisation à haute concentrations. En effet, il a été montré que l'acide lipoïque avait une biodisponibilité réduite à 30% quand ingéré, de par notamment une dégradation hépatique, une solubilité réduite et une instabilité de la molécule dans l'estomac (Salehi et al., 2019). Par conséquent, des formulations améliorées

pouvant augmenter l'absorption du LA sont à l'étude, et devraient éventuellement permettre d'améliorer sa biodisponibilité et donc son activité thérapeutique (Salehi et al., 2019). Il serait toutefois intéressant de réaliser une étude préclinique dans le cadre de l'AF, en utilisant par exemple le modèle Pvalb-Cre, qui est celui reproduisant le mieux le développement de l'ataxie sensitive associée à l'AF. Il serait intéressant de voir si une supplémentation chronique en acide lipoïque serait capable d'améliorer les phénotypes neurologiques tels que l'ataxie sensitive de ces souris.

3 Discussion et perspectives, partie « Autophagie et P62 »

Les investigations sur l'autophagie dans le modèle ont été réalisées dans le but de répondre à deux observations relevées dans les modèles de l'AF, pointant ensemble un blocage du flux autophagique : augmentation des niveaux du récepteur de l'autophagie P62 (ou SQSTM1) et présence de vacuoles d'autophagies dans les cellules de certains modèles, en particulier dans les DRG des souris Prp-Cre (Simon et al., 2004). Ayant également observé une augmentation des niveaux de P62 dans le modèle, j'ai cherché à mettre en évidence si cette augmentation était en lien avec un blocage du flux autophagique dans les neurones de DRG en absence de frataxine. Les résultats des expériences que j'ai réalisées n'ont pas pu mettre en évidence de blocage important de l'autophagie en relation avec P62. Notamment je n'ai pas pu relever de vacuoles d'autophagie chez le KO par microscopie électronique, ni mesurer une accumulation accrue de P62 et LC3-II lors de l'activation de l'autophagie, montrant que le flux autophagique est correctement géré dans le contrôle comme dans le KO. Les résultats montrent cependant une activation générale de l'autophagie dans le KO pouvant être attribuée à l'activation de la voie de l'AMPK, caractérisée plus amplement dans le reste de mon projet de thèse.

Afin de pouvoir conclure sur l'état du flux autophagique dans le modèle, des expériences complémentaires sont nécessaires. Notamment, il est primordial de confirmer les résultats obtenus par les traitements d'activation et/ou inhibition de l'autophagie, en utilisant d'autres récepteurs de l'autophagie. Il est possible que P62 ne soit dans ces cellules, pas le récepteur principalement utilisé dans le marquage des cargos destinés à l'autophagosome. Il s'agira donc de reproduire ces expériences en marquant les cellules aux autres marqueurs tels que OPTN, NBR1 ou NIX. Les traitements d'activation n'ont dans l'ensemble pas montré une activation

très accrue de l'autophagie. Il serait intéressant d'essayer d'autres molécules ainsi que de réaliser une cinétique plus précise des étapes suivant le traitement. L'autophagie étant un mécanisme dynamique, il est possible que les temps choisis pour mes expériences ne permettent pas de mettre en lumière des dérégulations fines de l'autophagie dans le modèle. Les résultats obtenus devront également faire l'objet de quantifications fines.

J'ai pu mettre en évidence une translocation nucléaire et tardive de P62 dans la majorité des cellules KO, sans toutefois pouvoir relever de mécanisme généralisé sur cette observation dans la littérature. Des inclusions intranucléaires ont cependant été relevées dans le cervelet et l'hippocampe de patients atteints de maladies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la dégénérescence lobaire frontotemporale (DLFT) liées à C9ORF72 (Al-Sarraj et al., 2011). La translocation de P62 dans le modèle semble concerner les neurones les plus affectés, et pourrait simplement résulter d'un artefact de marquage dû à une résorption des noyaux.

L'expression de P62 est augmentée dans le modèle également au niveau transcriptionnel, évoquant une augmentation des niveaux de P62 associée au stress plutôt qu'à un blocage de l'autophagie. En effet, l'expression de P62 est contrôlée par divers facteurs de transcription dont l'expression des cibles sont également augmentées dans le modèle : NRF2 et ATF4 (Sánchez-Martín et al., 2019). NRF2 régule l'expression de gènes de la réponse cellulaire au stress oxydant tels que la superoxyde dismutase-2 (SOD2), la catalase (CAT), glutathione réductase (GR) et hème oxygénase-1 (HMOX-1) (Nguyen et al., 2009). Certaines de ces cibles sont augmentées dans le modèle aux niveaux transcriptionnels (HMOX-1) et traductionnels (SOD2, Catalase, GR), démontrant une activation de NRF2. ATF4 un facteur de transcription activé en conditions de manque en nutriments et dans la réponse aux protéines mal repliées ou UPR. Certaines cibles de ATF4 sont également activées dans le modèles aux niveaux transcriptionnels (CHOP, PSAT1, MTHFD2, ASNS) et traductionnel (PSAT1), montrant une activation de ATF4. Ces observations suggèrent fortement que l'expression de P62 est augmentée par des mécanismes similaires à l'ensemble de ces gènes. Cependant, des expériences pourraient venir confirmer ce postulat. Par exemple, il est possible de réaliser une immuno-précipitation de la chromatine associée à NRF2 ou ATF4 et mesurer les niveaux des séquences de P62 retrouvées associées dans le contrôle et le KO.

Les résultats de la caractérisation du modèle montrent une augmentation de la masse mitochondriale de manière générale. Il n'est pas clair à ce jour s'il s'agit d'une augmentation de la masse mitochondriale active, ou d'un défaut d'élimination des mitochondries, et donc un défaut du mécanisme de mitophagie. Les données de microscopie électronique apportent

quelques indices : la taille des mitochondries est largement augmentée dans le KO, sans toutefois relever de mitochondries entourées de double membrane synonyme d'un adressage à l'autophagosome. S'agit-il d'un défaut de recrutement et de formation de l'autophagosome ? S'agit-il d'un défaut de fission des mitochondries ? Ou la masse des mitochondries est-elle augmentée afin de subvenir aux besoins énergétiques de la cellule ? L'ensemble de ces questions devra être traité dans la suite du projet. La question de l'autophagie spécifique des mitochondries, ou mitophagie, est une question qui initialement devait être traitée dans mon projet. Mais j'ai choisi de me concentrer sur d'autres mécanismes affectés dans le modèle tels que les défauts de taille des neurones KO, ce pourquoi je n'ai pas poursuivi l'étude de la mitophagie. Les données initiales montraient une augmentation des niveaux de PINK1, une kinase mitochondriale dont l'accumulation constitue une des premières étapes de l'initiation de la mitophagie par PINK1/Parkin (Grenier et al., 2013). Cependant, je n'ai pas été en mesure de reproduire ces résultats, en cause probablement le caractère dynamique de ce mécanisme. L'utilisation de traitements induisant la mitophagie est alors préconisée afin de mettre en lumière des blocages tels qu'ils ont été réalisés dans mon modèle pour étudier l'autophagie dans son ensemble. Je propose d'étudier le blocage de la mitophagie dans le modèle en utilisant une sonde fluorescente dont la couleur change en fonction du pH (Mitophagy Detection Kit, MD01, Dojindo). Cette sonde permet de quantifier la part des mitochondries « libres » et les mitochondries adressées à dégradation, au sein des lysosomes, où le pH est plus acide et permet la conversion de la longueur d'émission de la sonde. Une part augmentée de signal lysosomique dans le KO indiquerait soit un blocage de la mitophagie, soit une activation de la mitophagie au-delà de la capacité du flux mitophagique des cellules. Activer la mitophagie grâce par exemple à un agent découplant tel que le FCCP, devrait permettre de trancher : si l'activation n'augmente pas le nombre de mitochondries lysosomales, alors le flux n'est pas saturé et peut augmenter son taux de dégradation. En revanche en cas de saturation du système, ou blocage, l'activation de la mitophagie devrait induire une accumulation de mitochondries lysosomales.

4 Discussion et perspectives, partie « Développement d'une approche de criblage pharmacologique »

La dernière partie de mon projet de thèse a été de mettre au point une stratégie de criblage de molécules pharmacologiques sur le modèle de neurones de DRG déficients en frataxine. Développer une approche de criblage n'est pas compatible avec tous les types de systèmes. Bien souvent, l'approche *in vitro* est préférée car hautement reproductible et miniaturisable. Cette approche peut s'adapter à des criblages de très haut débit et est la plus utilisée par les industries pharmaceutiques. En seconde position, on retrouve les lignées de cellules immortalisées : faciles à cultiver et disponibles en quantités illimitées, elles offrent également la possibilité de réaliser des criblages de haut débit. Enfin, des systèmes plus complexes tels que les cultures primaires ou les petits organismes (drosophile, poisson zèbre) peuvent servir à faire des criblages de petit à moyen débit lorsqu'ils offrent une reproductibilité suffisante et qu'un essai compatible avec l'automatisation peut être développé. En constatant le phénotype marqué du modèle de neurones de DRG, j'ai imaginé développer une stratégie pour pouvoir y cribler des molécules thérapeutiques. Cela avait plusieurs intérêts puisqu'une telle stratégie n'a jamais, à ma connaissance, été développée pour l'AF, et que la communauté scientifique manque d'un système adéquat, sur le type cellulaire principalement affecté dans l'AF, et offrant la possibilité de tester des molécules ayant une activité remplaçant celle de la frataxine. En effet, les cellules du modèle montrent une forte résistance à la déplétion totale de frataxine, et jusqu'à maintenant, le seul moyen de tester un remplacement de la frataxine dans un système cellulaire était de prendre comme readout le maintien de la division cellulaire après délétion de *FXN*.

4.1 Développement initial

4.1.1 Protocole de culture

Les étapes de développement du criblage ont été réalisées en étroite collaboration avec la plateforme de criblage de l'IGBMC, et en particulier avec Amélie Weiss, ingénieure de la plateforme. Le premier enjeu a été de mettre au point des conditions pour maintenir les neurones du modèle en culture dans des plaques compatibles avec le criblage. Non seulement les neurones doivent pouvoir s'attacher correctement au fond des puits, être répartis de manière uniforme mais également rester stables tout au long de la culture. Dans le cas de ce modèle, la

culture doit pouvoir perdurer pendant 3 à 4 semaines afin de laisser le phénotype se développer jusqu'à l'acquisition. Je suis parvenu à mettre au point un protocole de culture adéquat en ajustant plusieurs paramètres tels que le revêtement des puits, la technique de « seeding » et la densité des cellules. Dans mon cas, la densité nécessaire s'est révélée assez faible : 7500 cellules « seedées » pour 200 à 300 neurones finaux après 21 jours de culture, ce qui a été la raison principale de mon choix de travailler avec des plaques 96 puits. En effet, en 384 puits le nombre final de neurones, inférieur à 50, n'est pas suffisant pour atteindre une puissance statistique satisfaisante. Cette faible densité apporte toutefois l'avantage de pouvoir réduire le nombre d'animaux utilisés pour le criblage, ce qui est en général une des limitations des cultures primaires.

4.1.2 Développement des essais

Après avoir mis au point le protocole de culture, s'en est suivi le développement d'un essai automatisé par imagerie. Parmi les phénotypes les plus marqués de mon modèle, quatre étaient compatibles avec de l'imagerie à haut contenu : la taille, le stress oxydant, l'activité mitochondriale et le fer mitochondrial. En choisissant un marquage avec des sondes fluorescentes, j'avais la possibilité de mesurer un phénotype du modèle par un protocole simple et peu coûteux, en comparaison avec des expériences d'immunofluorescence. Si des sondes avaient des spectres d'émission non chevauchants, il était possible de combiner la mesure de plusieurs phénotypes. Des quatre, seules trois montraient une différence de dynamique suffisamment marquée entre le contrôle et le KO, ce pourquoi la mesure du fer mitochondrial comme readout primaire a été écartée. Trois essais ont donc été développés : mesure de la taille, de l'activité mitochondriale par TMRM et du stress oxydant mitochondrial par MitoSOX. En parallèle, l'ajout d'un marqueur mitochondrial vert et indépendant de l'activité des mitochondries est utilisé pour la normalisation par la masse mitochondriale. Plusieurs paramètres ont été optimisés afin d'obtenir un essai assez reproductible et observant les meilleures dynamiques entre contrôle et KO : concentration des sondes, temps de marquage, âge des cellules au moment du marquage. Les phénotypes étant assez marqués dans le modèle, nous avons principalement dû travailler sur la reproductibilité de l'essai, notamment en automatisant le protocole. Il s'agissait d'augmenter au maximum le nombre de tâches effectuées par le robot de la plateforme, afin de réduire la variabilité induite par le manipulateur. Quasiment toutes les tâches ont pu être effectuées par la machine outre la dissection et le seeding des plaques. Les coatings, incubation des cellules, infections, changement des milieux, marquages et lectures des plaques sont entièrement réalisés par la machine. Cela nous a permis

d'atteindre une reproductibilité suffisante pour obtenir les indices de confiance Z' requis. Ayant validé l'utilisation à la fois du TMRM et du MitoSOX, nous avons finalement décidé d'écarter l'utilisation du TMRM qui nécessite une lecture sur cellules vivantes.

4.2 Difficultés

Alors que le développement initial du projet s'est dans l'ensemble bien déroulé, nous sommes ensuite heurtés à de nombreuses difficultés qui ont remis plusieurs fois en question le projet, notamment à cause de pilotes échoués. Trois pilotes, trois échecs pour trois raisons distinctes. Sur le premier pilote nous avons été victimes de contaminations, et nous avons réalisé que notre façon de compter les cellules au seeding n'était pas assez précise. Sur le deuxième, le lot défectueux de facteurs de croissance. Sur le troisième pilote, c'est une combinaison de différents facteurs, avec notamment coupures de courant des incubateurs de la plateforme et erreurs dans la préparation des solutions de drogues. Autant de raisons qui nous ont forcé à nous adapter, à identifier l'origine des problèmes et les corriger. Je n'ai donc pas été en mesure de finalement valider l'utilisation de la stratégie de criblage avant la fin de la thèse. Mais ces échecs ont notamment permis d'identifier des problèmes qui nous étaient encore inconnus, et qu'il était nécessaire de savoir contourner pour pouvoir poursuivre avec plus de confiance. Cela nous a aussi prouvé la difficulté de travailler avec des cellules aussi complexes sur ce type d'expériences. En cause primaire la durée des cultures. Chaque expérience dure près d'un mois. Pourtant chaque semaine des cellules sont disponibles et doivent servir à lancer des nouvelles cultures sans avoir eu les résultats des expériences lancées la semaine précédente, ce qui complique beaucoup la tâche. Ensuite, il existe une variabilité naturelle entre les dissections qu'il nous est impossible de contrôler et que l'on doit prendre en compte dans notre stratégie. Par exemple, d'une expérience à une autre, on peut avoir des variations dans les valeurs absolues d'aire ou de stress oxydant. Cependant, les ratios entre contrôle et KO sont toujours respectés. Afin de pouvoir constamment corriger cette variabilité, un groupe de contrôles et de KO sont présent sur chaque plaque de culture, nous permettant de systématiquement normaliser les mesures.

4.3 Perspectives directes

Malgré les difficultés que nous avons rencontrées, et pour avoir généré une grande quantité de plaques tout au long de ma thèse, notamment dans la caractérisation du modèle, je

suis convaincu que le système fonctionne et qu'il ne s'agit que de corriger les dernières erreurs pour enfin être prêts à démarrer. Il faudra dès que possible relancer un pilote, afin d'amener la preuve de la faisabilité du criblage, et choisir la concentration des drogues. Afin de gagner du temps, le pilote se fera sur une plaque de drogues issue de la banque finale du criblage, dans laquelle l'une des drogues, s'étant révélée particulièrement toxique lors des derniers pilotes, sera remplacée par 100 μM d'acide lipoïque, qui génère un effet positif déjà caractérisé. Cela nous servira de contrôle positif. Une fois ce pilote réalisé, il s'agira de démarrer le criblage de la banque entière. Il s'agit d'une collection de 1443 molécules approuvées par la FDA et distribuée par Selleckchem. Nous avons choisi cette banque car elle est déjà disponible à l'IGBMC et nous servira de banque « preuve de concept ». En plaçant 54 drogues par plaque, il nous faut compter au minimum 27 plaques « mère » soit 81 plaques au total en comptant 3 réplicats. En théorie, nous avons besoin d'une dizaine de souris gestantes au minimum pour deux mois de manipulation. En fonction du retard pris, il faudra certainement rallonger ce délai de quelques semaines voire quelques mois.

Après le criblage, devra être réalisée la validation des composés ayant été sélectionnés pour leur effet positif sur la taille ou le stress oxydant. Les validations seront réalisées à 4 concentrations qui restent à déterminer. La validation primaire comprendra une seconde mesure de la taille et du stress oxydant, suivie de la mesure de l'activité mitochondriale par TMRM. Les drogues passant cette seconde validation seront évaluées sur leur activité concernant la biosynthèse des Fe-S (Western Blot et activité SDH), le métabolisme du fer (RPA) et l'activité des mitochondries mesurée par Seahorse.

4.4 Perspectives à long terme

Dans la mesure où le criblage serait un succès, j'ai pour souhait que la technique puisse être accessible aux compagnies pharmaceutiques désirant cribler dans des cellules de DRG des petites à moyennes banques de molécules pré-sélectionnées sur leur potentielle capacité à *bypasser* la frataxine. Le système développé pourrait également avoir des applications pour la recherche fondamentale sur l'AF. La possibilité de pouvoir cultiver des cellules sans frataxine dans un système reproductible est un outil qui peut se révéler fondamental dans la mise en place d'un criblage génétique de l'AF dans les neurones de DRG. Notamment, la haute capacité de transduction des neurones de DRG par les AAV rend possible une inactivation d'une grande quantité de gènes par shRNA ou CRISPR/Cas9, afin d'identifier de nouvelles cibles génétiques impliquées dans l'AF.

Outre des applications à l'AF, les conditions de culture que j'ai mises en place pourraient être appliquées à la mise en place de criblage pour d'autres neuropathies périphériques. C'est le cas par exemple des neuropathies diabétiques. Ces neuropathies affectent environ 60% des patients diabétiques et sont majoritairement caractérisées par des polyneuropathies sensitives (Leininger et al., 2006). Elles représentent les complications tardives les plus communes des patients atteints du diabète de type I : près de la totalité des patients en développement (Vinik et al., 1992). Les neuropathies sensitives sont également les complications neurologiques les plus communes associées à une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), affectant un tiers des patients (Estanislao et al., 2004). Elles peuvent être le résultat secondaire de l'infection au VIH, tout comme être causées par l'utilisation d'agent antirétroviraux, en particulier les inhibiteurs de reverse transcriptase (Dalakas, 2001). D'autres manifestations de neuropathies périphériques peuvent être causées par des agents utilisés en chimiothérapie, tels que le taxol et le cisplatine (Chaudhry et al., 1994). Elles se caractérisent principalement par la dégénérescence axonale des fibres sensitive distantes ou sensorimotrices (Peltier and Russell, 2002). L'ensemble de ces manifestations cliniques touchent les neurones sensitifs, ce pourquoi l'utilisation de techniques de criblage sur ce type cellulaire pourrait être utile dans la découverte de molécules d'intérêt thérapeutique.

5 Conclusion générale

En arrivant au laboratoire du Dr. Hélène Puccio en septembre 2015, l'équipe venait tout juste de mettre au point le protocole de culture des neurones de DRG, et optimisé les conditions de transduction par les AAV9-CreGFP, afin d'obtenir une délétion efficace du gène de la frataxine. Mon projet initial était de caractériser le modèle en regardant les phénotypes typiques de l'AF tout en développant la culture de ces cellules dans des puces microfluidiques afin de mesurer le transport des mitochondries dans les axones. L'hypothèse était que les neurones proprioceptifs étant parmi les plus longs du corps, un défaut de transport des mitochondries associé à une forte réduction de leur activité pourrait expliquer la sensibilité spécifique de ces cellules à la perte de frataxine. Nous avons mis au point ces conditions de culture avec Alain Martelli, alors postdoc dans l'équipe, mais il était impossible de les maintenir plus de 10 jours sur les puces. A cet âge, aucune différence entre contrôle et KO ne pouvait être relevée. J'ai compris plus tard que les cellules ne montrent encore aucun phénotype à 10 jours de culture. Abandonnant l'idée de poursuivre les cultures sur puce microfluidique, j'ai démarré ma thèse, en septembre 2016, avec pour objectif d'identifier les mécanismes spécifiques de la dégénérescence des neurones proprioceptifs en absence de frataxine. Quatre ans plus tard cet objectif n'est pas atteint, mais j'ai eu l'occasion de mettre en lumière de nombreuses autres caractéristiques de ces cellules. J'ai notamment pu démontrer que les neurones sensitifs de DRG développent toutes les caractéristiques typiques de la physiopathologie de cellules totalement déplétées en frataxine : perte des Fe-S, augmentation du fer mitochondrial et baisse de l'activité des mitochondries. De plus j'ai identifié de nouvelles caractéristiques telles qu'un stress oxydant mitochondrial marqué et progressive, une augmentation de la masse mitochondriale et une taille du soma réduite, le tout étant probablement lié à l'activation de l'AMPK, et dépendant de l'expression de la frataxine. De plus, j'ai pu démontrer que ces cellules montrent une forte résistance à la perte totale de frataxine, un résultat apportant beaucoup d'espoir quant au développement d'approches thérapeutiques, et la possibilité d'un jour pouvoir peut être inverser une part de la progression des symptômes chez les patients.

Tout au long de ma thèse j'ai eu la chance de pouvoir réaliser de nombreuses expériences différentes, parfois m'écartant trop de la question centrale du projet, et donc au dépens de l'avancée générale du projet. Cependant, cette diversité m'a permis d'acquérir beaucoup d'expérience et dans divers domaines. J'ai eu la chance de pouvoir voir se réaliser un projet qui me tenait à cœur depuis le début de ma thèse : le développement d'un criblage de molécules thérapeutiques sur le modèle.

Références

- Abeti, R., Uzun, E., Renganathan, I., Honda, T., Pook, M.A., and Giunti, P. (2015). Targeting lipid peroxidation and mitochondrial imbalance in Friedreich's ataxia. *Pharmacological Research* 99, 344–350.
- Abeti, R., Parkinson, M.H., Hargreaves, I.P., Angelova, P.R., Sandi, C., Pook, M.A., Giunti, P., and Abramov, A.Y. (2016). “Mitochondrial energy imbalance and lipid peroxidation cause cell death in Friedreich's ataxia.” *Cell Death Dis* 7, e2237.
- 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.
- Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A.S., Martin, S., and Pastore, A. (2002). A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet* 11, 1865–1877.
- Agathos, E., Tentolouris, A., Eleftheriadou, I., Katsaouni, P., Nemtzas, I., Petrou, A., Papanikolaou, C., and Tentolouris, N. (2018). Effect of α -lipoic acid on symptoms and quality of life in patients with painful diabetic neuropathy. *J Int Med Res* 46, 1779–1790.
- Ahmadian, M., Abbott, M.J., Tang, T., Hudak, C.S.S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M.K., Lee, H.-Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., et al. (2011). Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab* 13, 739–748.
- Ajit Bolar, N., Vanlander, A.V., Wilbrecht, C., Van der Aa, N., Smet, J., De Paepe, B., Vandeweyer, G., Kooy, F., Eyskens, F., De Letter, E., et al. (2013). Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy. *Hum Mol Genet* 22, 2590–2602.
- Akbar, U., and Ashizawa, T. (2015). Ataxia. *Neurol Clin* 33, 225–248.
- Alfedi, G., Luffarelli, R., Condò, I., Pedini, G., Mannucci, L., Massaro, D.S., Benini, M., Toschi, N., Alaimo, G., Panarello, L., et al. (2019). Drug repositioning screening identifies etravirine as a potential therapeutic for friedreich's ataxia. *Mov. Disord.* 34, 323–334.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Ruddle, P., Carroll, C., Webster, Z., and Pook, M. (2004). GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics* 84, 301–310.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J.M., King, R., et al. (2006a). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* 88, 580–590.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J.M., King, R., et al. (2006b). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* 88, 580–590.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Ismail, O., Varshney, D., Lymperi, S., Sandi, C., Trabzuni, D., and Pook, M. (2008). The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum. Mol. Genet.* 17, 735–746.

- Al-Mahdawi, S., Sandi, C., Pinto, R.M., and Pook, M.A. (2013). Friedreich Ataxia Patient Tissues Exhibit Increased 5-Hydroxymethylcytosine Modification and Decreased CTCF Binding at the FXN Locus. *PLOS ONE* 8, e74956.
- Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A., and Craig, E.A. (2004). Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep.* 5, 1096–1101.
- Al-Sarraj, S., King, A., Troakes, C., Smith, B., Maekawa, S., Bodi, I., Rogelj, B., Al-Chalabi, A., Hortobágyi, T., and Shaw, C.E. (2011). p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS. *Acta Neuropathol.* 122, 691–702.
- Alshawaf, A.J., Viventi, S., Qiu, W., D’Abaco, G., Nayagam, B., Erlichster, M., Chana, G., Everall, I., Ivanusic, J., Skafidas, E., et al. (2018). Phenotypic and Functional Characterization of Peripheral Sensory Neurons derived from Human Embryonic Stem Cells. *Sci Rep* 8.
- Anderson, P.R., Kirby, K., Hilliker, A.J., and Phillips, J.P. (2005). RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3397–3405.
- Anderson, P.R., Kirby, K., Orr, W.C., Hilliker, A.J., and Phillips, J.P. (2008). Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich’s ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 611–616.
- Anheim, M. (2011). [Autosomal recessive cerebellar ataxias]. *Rev. Neurol. (Paris)* 167, 372–384.
- Anheim, M., Tranchant, C., and Koenig, M. (2012a). The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N. Engl. J. Med.* 366, 636–646.
- Anheim, M., Mariani, L.-L., Calvas, P., Cheuret, E., Zagnoli, F., Odent, S., Seguela, C., Marelli, C., Fritsch, M., Delaunoy, J.-P., et al. (2012b). Exonic Deletions of FXN and Early-Onset Friedreich Ataxia. *Archives of Neurology* 69, 912–916.
- Anjomani Virmouni, S., Sandi, C., Al-Mahdawi, S., and Pook, M.A. (2014). Cellular, molecular and functional characterisation of YAC transgenic mouse models of Friedreich ataxia. *PLoS ONE* 9, e107416.
- Ashburn, T.T., and Thor, K.B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3, 673–683.
- Ashizawa, T., and Xia, G. (2016). Ataxia. *Continuum (Minneapolis)* 22, 1208–1226.
- Austin, S., and St-Pierre, J. (2012). PGC1 α and mitochondrial metabolism – emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* 125, 4963–4971.
- 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.
- Bailey, P.S.J., Hiltunen, J.K., Dieckmann, C.L., Kastaniotis, A.J., and Nathan, J.A. (2018). Different opinion on the reported role of Poldip2 and ACSM1 in a mammalian lipoic acid salvage pathway controlling HIF-1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E7458–E7459.
- Baker, P.R., Friederich, M.W., Swanson, M.A., Shaikh, T., Bhattacharya, K., Scharer, G.H., Aicher, J., Creadon-Swindell, G., Geiger, E., MacLean, K.N., et al. (2014). Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5. *Brain* 137, 366–379.

- Barthelme, D., Scheele, U., Dinkelaker, S., Janoschka, A., Macmillan, F., Albers, S.-V., Driessen, A.J.M., Stagni, M.S., Bill, E., Meyer-Klaucke, W., et al. (2007). Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *J. Biol. Chem.* *282*, 14598–14607.
- Bedekovics, T., Gajdos, G.B., Kispal, G., and Isaya, G. (2007). Partial conservation of functions between eukaryotic frataxin and the *Escherichia coli* frataxin homolog CyaY. *FEMS Yeast Res.* *7*, 1276–1284.
- Beilschmidt, L.K., and Puccio, H.M. (2014). Mammalian Fe–S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie* *100*, 48–60.
- Beilschmidt, L.K., Ollagnier de Choudens, S., Fournier, M., Sanakis, I., Hograindleur, M.-A., Clémancey, M., Blondin, G., Schmucker, S., Eisenmann, A., Weiss, A., et al. (2017). ISCA1 is essential for mitochondrial Fe4S4 biogenesis in vivo. *Nat Commun* *8*, 15124.
- Beinert, H., Kennedy, M.C., and Stout, C.D. (1996). Aconitase as Iron–Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem. Rev.* *96*, 2335–2374.
- Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R., and Bishop, D.F. (2000). Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* *96*, 3256–3264.
- Belbellaa, B., Reutenauer, L., Monassier, L., and Puccio, H. (2019). Correction of half the cardiomyocytes fully rescue Friedreich ataxia mitochondrial cardiomyopathy through cell-autonomous mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* *28*, 1274–1285.
- Benini, M., Fortuni, S., Condò, I., Alfedì, G., Malisan, F., Toschi, N., Serio, D., Massaro, D.S., Arcuri, G., Testi, R., et al. (2017). E3 Ligase RNF126 Directly Ubiquitinates Frataxin, Promoting Its Degradation: Identification of a Potential Therapeutic Target for Friedreich Ataxia. *Cell Reports* *18*, 2007–2017.
- Ben-Shimon, L., Paul, V.D., David-Kadoch, G., Volpe, M., Stümpfig, M., Bill, E., Mühlenhoff, U., Lill, R., and Ben-Aroya, S. (2018). Fe-S cluster coordination of the chromokinesin KIF4A alters its subcellular localization during mitosis. *J. Cell. Sci.* *131*.
- Bento, C.F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2016). Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.* *85*, 685–713.
- Bento-Abreu, A., Jager, G., Swinnen, B., Rué, L., Hendrickx, S., Jones, A., Staats, K.A., Taes, I., Eykens, C., Nonneman, A., et al. (2018). Elongator subunit 3 (ELP3) modifies ALS through tRNA modification. *Hum. Mol. Genet.* *27*, 1276–1289.
- Biase, I.D., Chutake, Y.K., Rindler, P.M., and Bidichandani, S.I. (2009). Epigenetic Silencing in Friedreich Ataxia Is Associated with Depletion of CTCF (CCCTC-Binding Factor) and Antisense Transcription. *PLOS ONE* *4*, e7914.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T., and Patel, P.I. (1998). The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 111–121.
- Bird, M.J., Needham, K., Frazier, A.E., van Rooijen, J., Leung, J., Hough, S., Denham, M., Thornton, M.E., Parish, C.L., Nayagam, B.A., et al. (2014). Functional characterization of Friedreich ataxia iPSC-derived neuronal progenitors and their integration in the adult brain. *PLoS ONE* *9*, e101718.

- Boddaert, N., Le Quan Sang, K.H., Rötig, 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.
- Boesch, S., Sturm, B., Hering, S., Goldenberg, H., Poewe, W., and Scheiber-Mojdehkar, B. (2007). Friedreich's ataxia: clinical pilot trial with recombinant human erythropoietin. *Ann. Neurol.* *62*, 521–524.
- Bolinches-Amorós, A., Mollá, B., Pla-Martín, D., Palau, F., and González-Cabo, P. (2014). Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Frontiers in Cellular Neuroscience* *8*.
- Bolotta, A., Abruzzo, P.M., Baldassarro, V.A., Ghezzi, A., Scotlandi, K., Marini, M., and Zucchini, C. (2019). New Insights into the Hfeidin-Ferroportin Axis and Iron Homeostasis in iPSC-Derived Cardiomyocytes from Friedreich's Ataxia Patient. *Oxid Med Cell Longev* *2019*, 7623023.
- Boniecki, M.T., Freibert, S.A., Mühlenhoff, U., Lill, R., and Cygler, M. (2017). Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nature Communications* *8*, 1287.
- Bradley, J.L., Blake, J.C., Chamberlain, S., Thomas, P.K., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. (2000). Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 275–282.
- Bridwell-Rabb, J., Iannuzzi, C., Pastore, A., and Barondeau, D.P. (2012). Effector role reversal during evolution: the case of frataxin in Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry* *51*, 2506–2514.
- Britti, E., Delaspre, F., Feldman, A., Osborne, M., Greif, H., Tamarit, J., and Ros, J. (2018). Frataxin-deficient neurons and mice models of Friedreich ataxia are improved by TAT-MTSCs-FXN treatment. *J. Cell. Mol. Med.* *22*, 834–848.
- Bürk, K. (2017). Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias* *4*.
- Bürk, K., Schulz, S.R., and Schulz, J.B. (2013). Monitoring progression in Friedreich ataxia (FRDA): the use of clinical scales. *J. Neurochem.* *126 Suppl 1*, 118–124.
- Burnett, R., Melander, C., Puckett, J.W., Son, L.S., Wells, R.D., Dervan, P.B., and Gottesfeld, J.M. (2006). 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.
- Burrage, L.C., Nagamani, S.C.S., Campeau, P.M., and Lee, B.H. (2014). Branched-chain amino acid metabolism: from rare Mendelian diseases to more common disorders. *Hum. Mol. Genet.* *23*, R1-8.
- Cai, K., Tonelli, M., Frederick, R.O., and Markley, J.L. (2017). Human Mitochondrial Ferredoxin 1 (FDX1) and Ferredoxin 2 (FDX2) Both Bind Cysteine Desulfurase and Donate Electrons for Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *Biochemistry* *56*, 487–499.
- Cai, K., Frederick, R.O., Tonelli, M., and Markley, J.L. (2018). Interactions of iron-bound frataxin with ISCU and ferredoxin on the cysteine desulfurase complex leading to Fe-S cluster assembly. *J Inorg Biochem* *183*, 107–116.
- Calap-Quintana, P., Soriano, S., Llorens, J.V., Al-Ramahi, I., Botas, J., Moltó, M.D., and Martínez-Sebastián, M.J. (2015). TORC1 Inhibition by Rapamycin Promotes Antioxidant Defences in a *Drosophila* Model of Friedreich's Ataxia. *PLoS ONE* *10*, e0132376.
- Calmels, N., Schmucker, S., Wattenhofer-Donzé, M., Martelli, A., Vaucamps, N., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Bouton, C., Koenig, M., and Puccio, H. (2009a). The First Cellular Models Based on

Frataxin Missense Mutations That Reproduce Spontaneously the Defects Associated with Friedreich Ataxia. *PLoS One* 4.

Calmels, N., Seznec, H., Villa, P., Reutenauer, L., Hibert, M., Haiech, J., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2009b). Limitations in a frataxin knockdown cell model for Friedreich ataxia in a high-throughput drug screen. *BMC Neurology* 9, 46.

Cameron, J.M., Janer, A., Levandovskiy, V., Mackay, N., Rouault, T.A., Tong, W.-H., Ogilvie, I., Shoubridge, E.A., and Robinson, B.H. (2011). Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 486–495.

Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. *Science* 271, 1423–1427.

Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Fauchoux, B., Trouillas, P., et al. (1997). Frataxin is Reduced in Friedreich Ataxia Patients and is Associated with Mitochondrial Membranes. *Human Molecular Genetics* 6, 1771–1780.

Carling, D., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters* 223 2, 217–222.

Carroll, W.M., Kriss, A., Baraitser, M., Barrett, G., and Halliday, A.M. (1980). The incidence and nature of visual pathway involvement in Friedreich's ataxia. A clinical and visual evoked potential study of 22 patients. *Brain* 103, 413–434.

Castaldo, I., Pinelli, M., Monticelli, A., Acquaviva, F., Giacchetti, M., Filla, A., Sacchetti, S., Keller, S., Avvedimento, V.E., Chiariotti, L., et al. (2008). DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J. Med. Genet.* 45, 808–812.

Castro, I.H., Pignataro, M.F., Sewell, K.E., Espeche, L.D., Herrera, M.G., Noguera, M.E., Dain, L., Nadra, A.D., Aran, M., Smal, C., et al. (2019). Frataxin Structure and Function. *Subcell. Biochem.* 93, 393–438.

Chamberlain, S., Shaw, J., Rowland, A., Wallis, J., South, S., Nakamura, Y., Gabain, A. von, Farrall, M., and Williamson, R. (1988). Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature* 334, 248–250.

Chan, P.K., Torres, R., Yandim, C., Law, P.P., Khadayate, S., Mauri, M., Grosan, C., Chapman-Rothe, N., Giunti, P., Pook, M., et al. (2013). Heterochromatinization induced by GAA-repeat hyperexpansion in Friedreich's ataxia can be reduced upon HDAC inhibition by vitamin B3. *Hum Mol Genet* 22, 2662–2675.

Chandran, V., Gao, K., Swarup, V., Versano, R., Dong, H., Jordan, M.C., and Geschwind, D.H. (2017). Inducible and reversible phenotypes in a novel mouse model of Friedreich's Ataxia. *ELife* 6.

Chaudhry, V., Rowinsky, E.K., Sartorius, S.E., Donehower, R.C., and Cornblath, D.R. (1994). Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies. *Ann. Neurol.* 35, 304–311.

Chen, K., Lin, G., Haelterman, N.A., Ho, T.S.-Y., Li, T., Li, Z., Duraine, L., Graham, B.H., Jaiswal, M., Yamamoto, S., et al. (2016a). Loss of Frataxin induces iron toxicity, sphingolipid synthesis, and Pdk1/Mef2 activation, leading to neurodegeneration. *Elife* 5.

- Chen, K., Ho, T.S.-Y., Lin, G., Tan, K.L., Rasband, M.N., and Bellen, H.J. (2016b). Loss of Frataxin activates the iron/sphingolipid/PDK1/Mef2 pathway in mammals. *Elife* 5.
- Chua-On, D., Proungvitaya, T., Techasen, A., Limpai boon, T., Roytrakul, S., Wongkham, S., Wongkham, C., Somintara, O., Sungkhamanon, S., and Proungvitaya, S. (2016). High expression of apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3 (AIFM3) in human cholangiocarcinoma. *Tumour Biol.* 37, 13659–13667.
- Clark, E., Butler, J.S., Isaacs, C.J., Napierala, M., and Lynch, D.R. (2017). Selected missense mutations impair frataxin processing in Friedreich ataxia. *Ann Clin Transl Neurol* 4, 575–584.
- Clark, E., Strawser, C., Schadt, K., and Lynch, D.R. (2019). Identification of a novel missense mutation in Friedreich's ataxia -FXNW168R. *Ann Clin Transl Neurol* 6, 812–816.
- Cnop, M., Igoillo-Esteve, M., Rai, M., Begu, A., Serroukh, Y., Depondt, C., Musuaya, A.E., Marhfour, I., Ladrière, L., Moles Lopez, X., et al. (2012). Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Ann. Neurol.* 72, 971–982.
- Codazzi, F., Hu, A., Rai, M., Donatello, S., Salerno Scarzella, F., Mangiameli, E., Pelizzoni, I., Grohovaz, F., and Pandolfo, M. (2016). Friedreich ataxia-induced pluripotent stem cell-derived neurons show a cellular phenotype that is corrected by a benzamide HDAC inhibitor. *Hum. Mol. Genet.* 25, 4847–4855.
- Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J.-M., Gambarelli, S., Zeppieri, L., Birck, C., Page, A., Puccio, H., and Ollagnier de Choudens, S. (2013). Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo Fe4S4 Cluster Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 733–740.
- Cook, J.D., Bencze, K.Z., Jankovic, A.D., Crater, A.K., Busch, C.N., Bradley, P.B., Stemmler, A.J., Spaller, M.R., and Stemmler, T.L. (2006). Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein. *Biochemistry* 45, 7767–7777.
- Coppola, G., Marmolino, D., Lu, D., Wang, Q., Cnop, M., Rai, M., Acquaviva, F., Coccozza, S., Pandolfo, M., and Geschwind, D.H. (2009). Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPAR γ pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 18, 2452–2461.
- Corben, L.A., Kashuk, S.R., Akhlaghi, H., Jamadar, S., Delatycki, M.B., Fielding, J., Johnson, B., Georgiou-Karistianis, N., and Egan, G.F. (2014). Myelin paucity of the superior cerebellar peduncle in individuals with Friedreich ataxia: an MRI magnetization transfer imaging study. *J. Neurol. Sci.* 343, 138–143.
- Correia, A.R., Pastore, C., Adinolfi, S., Pastore, A., and Gomes, C.M. (2008). Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *FEBS Journal* 275, 3680–3690.
- Cortopassi, G., Danielson, S., Alemi, M., Zhan, S.S., Tong, W., Carelli, V., Martinuzzi, A., Marzuki, S., Majamaa, K., and Wong, A. (2006). Mitochondrial disease activates transcripts of the unfolded protein response and cell cycle and inhibits vesicular secretion and oligodendrocyte-specific transcripts. *Mitochondrion* 6, 161–175.
- Cossée, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J.L., and Koenig, M. (1997). Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7452–7457.
- Cossée, M., Dürr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschütter, A., et al. (1999). Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.* 45, 200–206.

- Cossée, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dollé, P., and Koenig, M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1219–1226.
- Costabile, T., Capretti, V., Abate, F., Liguori, A., Paciello, F., Pane, C., De Rosa, A., Peluso, S., De Michele, G., Filla, A., et al. (2018). Emotion Recognition and Psychological Comorbidity in Friedreich's Ataxia. *Cerebellum* *17*, 336–345.
- Cotticelli, M.G., Rasmussen, L., Kushner, N.L., McKellip, S., Sosa, M.I., Manouvakhova, A., Feng, S., White, E.L., Maddry, J.A., Heemskerk, J., et al. (2012). Primary and Secondary Drug Screening Assays for Friedreich Ataxia. *J Biomol Screen* *17*, 303–313.
- Cotticelli, M.G., Crabbe, A.M., Wilson, R.B., and Shchepinov, M.S. (2013). Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biol* *1*, 398–404.
- Cotticelli, M.G., Xia, S., Lin, D., Lee, T., Terrab, L., Wipf, P., Hury, D.M., and Wilson, R.B. (2019). Ferroptosis as a Novel Therapeutic Target for Friedreich's Ataxia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *369*, 47–54.
- Craig, E.A., and Marszalek, J. (2002). A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. *Cell. Mol. Life Sci.* *59*, 1658–1665.
- Crombie, D.E., Van Bergen, N., Davidson, K.C., Anjomani Virmouni, S., Mckelvie, P.A., Chrysostomou, V., Conquest, A., Corben, L.A., Pook, M.A., Kulkarni, T., et al. (2015). Characterization of the retinal pigment epithelium in Friedreich ataxia. *Biochem Biophys Rep* *4*, 141–147.
- Crombie, D.E., Curl, C.L., Raaijmakers, A.J., Sivakumaran, P., Kulkarni, T., Wong, R.C., Minami, I., Evans-Galea, M.V., Lim, S.Y., Delbridge, L., et al. (2017). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes display electrophysiological abnormalities and calcium handling deficiency. *Aging (Albany NY)* *9*, 1440–1452.
- Cronan, J.E. (2014). Biotin and Lipoic Acid: Synthesis, Attachment, and Regulation. *EcoSal Plus* *6*.
- Crouse, B.R., Sellers, V.M., Finnegan, M.G., Dailey, H.A., and Johnson, M.K. (1996). Site-Directed Mutagenesis and Spectroscopic Characterization of Human Ferrochelatase: Identification of Residues Coordinating the [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry* *35*, 16222–16229.
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C.A., and Baena-González, E. (2014). Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Front Plant Sci* *5*, 190.
- Czuba-Wojnilowicz, E., Viventi, S., Howden, S.E., Maksour, S., Hulme, A.E., Cortez-Jugo, C., Dottori, M., and Caruso, F. (2020). Particle-mediated delivery of frataxin plasmid to a human sensory neuronal model of Friedreich's ataxia. *Biomater Sci.*
- Daher, R., Mansouri, A., Martelli, A., Bayart, S., Manceau, H., Callebaut, I., Moulouel, B., Gouya, L., Puy, H., Kannengiesser, C., et al. (2019). GLRX5 mutations impair heme biosynthetic enzymes ALA synthase 2 and ferrochelatase in Human congenital sideroblastic anemia. *Mol. Genet. Metab.* *128*, 342–351.
- Dalakas, M.C. (2001). Peripheral neuropathy and antiretroviral drugs. *J. Peripher. Nerv. Syst.* *6*, 14–20.
- Dasgupta, B., and Seibel, W. (2018). Compound C/Dorsomorphin: Its Use and Misuse as an AMPK Inhibitor. *Methods Mol. Biol.* *1732*, 195–202.

- De Biase, I., Rasmussen, A., Monticelli, A., Al-Mahdawi, S., Pook, M., Coccozza, S., and Bidichandani, S.I. (2007a). Somatic instability of the expanded GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia progresses throughout life. *Genomics* *90*, 1–5.
- De Biase, I., Rasmussen, A., Endres, D., Al-Mahdawi, S., Monticelli, A., Coccozza, S., Pook, M., and Bidichandani, S.I. (2007b). Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich's ataxia patients. *Ann. Neurol.* *61*, 55–60.
- De Michele, G., Filla, A., Criscuolo, C., Scarano, V., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., and Coccozza, S. (1998). Determinants of onset age in Friedreich's ataxia. *J. Neurol.* *245*, 166–168.
- Delatycki, M.B., and Corben, L.A. (2012). Clinical Features of Friedreich Ataxia. *J Child Neurol* *27*, 1133–1137.
- Delatycki, M.B., Knight, M., Koenig, M., Cossée, M., Williamson, R., and Forrest, S.M. (1999). G130V, a common FRDA point mutation, appears to have arisen from a common founder. *Hum. Genet.* *105*, 343–346.
- Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y.I., Ristow, M., and Shoelson, S.E. (2000). Crystal structure of human frataxin. *J. Biol. Chem.* *275*, 30753–30756.
- Di Donato, S., Gellera, C., and Mariotti, C. (2001). The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias. II. Autosomal recessive ataxias. *Neurol. Sci.* *22*, 219–228.
- Diaz-Gerevini, G.T., Repposi, G., Dain, A., Tarres, M.C., Das, U.N., and Eynard, A.R. (2016). Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition* *32*, 174–178.
- Ding, H., and Clark, R.J. (2004). Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochemical Journal* *379*, 433–440.
- Dionisi, C., Rai, M., Chazalon, M., Schiffmann, S.N., and Pandolfo, M. (2019). Induced pluripotent stem cell-derived primary proprioceptive neurons as Friedreich ataxia cell model. *BioRxiv* 829358.
- Dionisi, C., Rai, M., Chazalon, M., Schiffmann, S.N., and Pandolfo, M. (2020). Primary proprioceptive neurons from human induced pluripotent stem cells: a cell model for afferent ataxias. *Sci Rep* *10*, 7752.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* *149*, 1060–1072.
- D'Oria, V., Petrini, S., Travaglini, L., Priori, C., Piermarini, E., Petrillo, S., Carletti, B., Bertini, E., and Piemonte, F. (2013). Frataxin Deficiency Leads to Reduced Expression and Impaired Translocation of NF-E2-Related Factor (Nrf2) in Cultured Motor Neurons. *International Journal of Molecular Sciences* *14*, 7853–7865.
- Du, J., Zhou, Y., Li, Y., Xia, J., Chen, Y., Chen, S., Wang, X., Sun, W., Wang, T., Ren, X., et al. (2020). Identification of Frataxin as a regulator of ferroptosis. *Redox Biol* *32*, 101483.
- Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J., and Lutz, T. (2002). A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2635–2643.
- Dürr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J.L., Brice, A., and Koenig, M. (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1169–1175.

- Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E.A., and Marszalek, J. (2004). Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *J. Biol. Chem.* *279*, 29167–29174.
- Eason, R.C., Archer, H.E., Akhtar, S., and Bailey, C.J. (2002). Lipoic acid increases glucose uptake by skeletal muscles of obese-diabetic ob/ob mice. *Diabetes Obes Metab* *4*, 29–35.
- Edenharter, O., Schneuwly, S., and Navarro, J.A. (2018). Mitofusin-Dependent ER Stress Triggers Glial Dysfunction and Nervous System Degeneration in a Drosophila Model of Friedreich's Ataxia. *Front. Mol. Neurosci.* *11*.
- Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., et al. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* *331*, 456–461.
- Egan, D.F., Chun, M.G.H., Vamos, M., Zou, H., Rong, J., Miller, C.J., Lou, H.J., Raveendra-Panickar, D., Yang, C.-C., Sheffler, D.J., et al. (2015). Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol. Cell* *59*, 285–297.
- Elgin, S.C.R., and Grewal, S.I.S. (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Curr. Biol.* *13*, R895-898.
- El-Osta, A., and Wolffe, A.P. (2000). DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression: basic biochemistry to human development and disease. | Semantic Scholar. *Gene Expr.* *9*, 63–75.
- Emond, M., Lepage, G., Vanasse, M., and Pandolfo, M. (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* *55*, 1752–1753.
- Enogieru, A.B., Haylett, W., Hiss, D.C., Bardien, S., and Ekpo, O.E. (2018). Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxid Med Cell Longev* *2018*, 6241017.
- Estanislao, L., Carter, K., McArthur, J., Olney, R., Simpson, D., and Lidoderm-HIV Neuropathy Group (2004). A randomized controlled trial of 5% lidocaine gel for HIV-associated distal symmetric polyneuropathy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *37*, 1584–1586.
- Evans-Galea, M.V., Carrodus, N., Rowley, S.M., Corben, L.A., Tai, G., Saffery, R., Galati, J.C., Wong, N.C., Craig, J.M., Lynch, D.R., et al. (2012). FXN methylation predicts expression and clinical outcome in Friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* *71*, 487–497.
- Faggianelli, N., Puglisi, R., Veneziano, L., Romano, S., Frontali, M., Vannocci, T., Fortuni, S., Testi, R., and Pastore, A. (2015). Analyzing the Effects of a G137V Mutation in the FXN Gene. *Front Mol Neurosci* *8*.
- Fearon, C., Lonergan, R., Ferguson, D., Byrne, S., Bradley, D., Langan, Y., and Redmond, J. (2020). Very-late-onset Friedreich's ataxia: diagnosis in a kindred with late-onset cerebellar ataxia. *Pract Neurol* *20*, 55–58.
- Ferrer-Cortès, X., Font, A., Bujan, N., Navarro-Sastre, A., Matalonga, L., Arranz, J.A., Riudor, E., del Toro, M., Garcia-Cazorla, A., Campistol, J., et al. (2013). Protein expression profiles in patients carrying NFU1 mutations. Contribution to the pathophysiology of the disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* *36*, 841–847.
- Filla, A., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G., and Coccozza, S. (1996). The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* *59*, 554–560.

- Folker, J., Murdoch, B., Cahill, L., Delatycki, M., Corben, L., and Vogel, A. (2010). Dysarthria in Friedreich's ataxia: a perceptual analysis. *Folia Phoniatr Logop* 62, 97–103.
- Fortuna, F., Barboni, P., Liguori, R., Valentino, M.L., Savini, G., Gellera, C., Mariotti, C., Rizzo, G., Tonon, C., Manners, D., et al. (2009). Visual system involvement in patients with Friedreich's ataxia. *Brain* 132, 116–123.
- Foury, F., and Cazzalini, O. (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Letters* 411, 373–377.
- Foury, F., Pastore, A., and Trincal, M. (2007). Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe-S cluster assembly. *EMBO Rep.* 8, 194–199.
- Fox, N.G., Das, D., Chakrabarti, M., Lindahl, P.A., and Barondeau, D.P. (2015). Frataxin Accelerates [2Fe-2S] Cluster Formation on the Human Fe-S Assembly Complex. *Biochemistry* 54, 3880–3889.
- Fox, N.G., Yu, X., Feng, X., Bailey, H.J., Martelli, A., Nabhan, J.F., Strain-Damerell, C., Bulawa, C., Yue, W.W., and Han, S. (2019). Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nat Commun* 10, 1–8.
- Friedreich, N. (1863). Ueber degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Archiv f. pathol. Anat.* 26, 391–419.
- Fujita, R., Agid, Y., Trouillas, P., Seck, A., Tommasi-Davenas, C., Driesel, A.J., Olek, K., Grzeschik, K.H., Nakamura, Y., Mandel, J.L., et al. (1989). Confirmation of linkage of Friedreich ataxia to chromosome 9 and identification of a new closely linked marker. *Genomics* 4, 110–111.
- Fujiwara, K., Takeuchi, S., Okamura-Ikeda, K., and Motokawa, Y. (2001). Purification, characterization, and cDNA cloning of lipoate-activating enzyme from bovine liver. *J. Biol. Chem.* 276, 28819–28823.
- Fuss, J.O., Tsai, C.-L., Ishida, J.P., and Tainer, J.A. (2015). Emerging critical roles of Fe-S clusters in DNA replication and repair. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1253–1271.
- Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A.M., Twesten, R.D., Owen, W.G., and Isaya, G. (2002). Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* 41, 6798–6804.
- Galea, C.A., Huq, A., Lockhart, P.J., Tai, G., Corben, L.A., Yiu, E.M., Gurrin, L.C., Lynch, D.R., Gelbard, S., Durr, A., et al. (2016). Compound heterozygous FXN mutations and clinical outcome in friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* 79, 485–495.
- Garcia-Alcala, H., Santos Vichido, C.I., Islas Macedo, S., Genestier-Tamborero, C.N., Minutti-Palacios, M., Hiraes Tamez, O., García, C., and Ziegler, D. (2015). Treatment with α -Lipoic Acid over 16 Weeks in Type 2 Diabetic Patients with Symptomatic Polyneuropathy Who Responded to Initial 4-Week High-Dose Loading (Hindawi).
- García-Giménez, J.L., Gimeno, A., Gonzalez-Cabo, P., Dasí, F., Bolinches-Amorós, A., Mollá, B., Palau, F., and Pallardó, F.V. (2011). Differential expression of PGC-1 α and metabolic sensors suggest age-dependent induction of mitochondrial biogenesis in Friedreich ataxia fibroblasts. *PLoS ONE* 6, e20666.
- Gari, K., León Ortiz, A.M., Borel, V., Flynn, H., Skehel, J.M., and Boulton, S.J. (2012). MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science* 337, 243–245.
- Gellera, C., Castellotti, B., Mariotti, C., Mineri, R., Seveso, V., Didonato, S., and Taroni, F. (2007). Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics* 8, 289–299.

- Gelling, C., Dawes, I.W., Richhardt, N., Lill, R., and Mühlhoff, U. (2008). Mitochondrial Iba57p Is Required for Fe/S Cluster Formation on Aconitase and Activation of Radical SAM Enzymes. *Mol Cell Biol* 28, 1851–1861.
- Georges, P., Boza-Moran, M.-G., Gide, J., Pêche, G.A., Forêt, B., Bayot, A., Rustin, P., Peschanski, M., Martinat, C., and Aubry, L. (2019). Induced pluripotent stem cells-derived neurons from patients with Friedreich ataxia exhibit differential sensitivity to resveratrol and nicotinamide. *Sci Rep* 9, 14568.
- Gerard, C., Xiao, X., Filali, M., Coulombe, Z., Arsenault, M., Couet, J., Li, J., Drolet, M.-C., Chapdelaine, P., Chikh, A., et al. (2014). An AAV9 coding for frataxin clearly improved the symptoms and prolonged the life of Friedreich ataxia mouse models. *Mol Ther Methods Clin Dev* 1, 14044.
- Gerber, J., Mühlhoff, U., and Lill, R. (2003). An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* 4, 906–911.
- Gervason, S., Larkem, D., Mansour, A.B., Botzanowski, T., Müller, C.S., Pecqueur, L., Le Pavec, G., Delaunay-Moisan, A., Brun, O., Agramunt, J., et al. (2019). Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nat Commun* 10, 3566.
- Ghibu, S., Richard, C., Vergely, C., Zeller, M., Cottin, Y., and Rochette, L. (2009). Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 54, 391–398.
- Ghorbani, Z., Farahani, R.M., Aliaghaei, A., Khodaghali, F., Meftahi, G.H., Danyali, S., Abdollahifar, M.A., Daftari, M., Boroujeni, M.E., and Sadeghi, Y. (2018). Resveratrol Protects Purkinje Neurons and Restores Muscle Activity in Rat Model of Cerebellar Ataxia. *J. Mol. Neurosci.* 65, 35–42.
- Giraudet, F., Charles, P., Mom, T., Boespflug-Tanguy, O., Dürr, A., Deltenre, P., and Avan, P. (2018). Rapid exhaustion of auditory neural conduction in a prototypical mitochondrial disease, Friedreich ataxia. *Clin Neurophysiol* 129, 1121–1129.
- Goraça, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., and Skibska, B. (2011). Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep* 63, 849–858.
- Goto, S., and Hirano, A. (1990). Immunohistochemical evidence for the selective involvement of dorsal root fibres in Friedreich's ataxia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 16, 365–370.
- Gottesfeld, J.M. (2019). Molecular Mechanisms and Therapeutics for the GAA·TTC Expansion Disease Friedreich Ataxia. *Neurotherapeutics* 16, 1032–1049.
- Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A., and Hardie, D.G. (2013). AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab.* 18, 556–566.
- Grabczyk, E., and Usdin, K. (2000a). Alleviating transcript insufficiency caused by Friedreich's ataxia triplet repeats. *Nucleic Acids Res.* 28, 4930–4937.
- Grabczyk, E., and Usdin, K. (2000b). The GAA·TTC triplet repeat expanded in Friedreich's ataxia impedes transcription elongation by T7 RNA polymerase in a length and supercoil dependent manner. *Nucleic Acids Res* 28, 2815–2822.
- Grant, L., Sun, J., Xu, H., Subramony, S.H., Chaires, J.B., and Hebert, M.D. (2006). Rational selection of small molecules that increase transcription through the GAA repeats found in Friedreich's ataxia. *FEBS Lett.* 580, 5399–5405.

- Green, D.E., Morris, T.W., Green, J., Cronan, J.E., and Guest, J.R. (1995). Purification and properties of the lipote protein ligase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* *309* (Pt 3), 853–862.
- Greene, E., Mahishi, L., Entezam, A., Kumari, D., and Usdin, K. (2007). Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res.* *35*, 3383–3390.
- Grenier, K., McLelland, G.-L., and Fon, E. (2013). Parkin- and PINK1-Dependent Mitophagy in Neurons: Will the Real Pathway Please Stand Up? *Frontiers in Neurology* *4*, 100.
- Groh, M., Lufino, M.M.P., Wade-Martins, R., and Gromak, N. (2014). R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in Friedreich ataxia and fragile X syndrome. *PLoS Genet.* *10*, e1004318.
- Gugliandolo, A., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2017). Role of Vitamin E in the Treatment of Alzheimer’s Disease: Evidence from Animal Models. *Int J Mol Sci* *18*.
- Guillon, B., Bulteau, A.-L., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Friguet, B., Puccio, H., Drapier, J.-C., and Bouton, C. (2009). Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins. *FEBS J.* *276*, 1036–1047.
- Guo, L., Wang, Q., Weng, L., Hauser, L.A., Strawser, C.J., Mesaros, C., Lynch, D.R., and Blair, I.A. (2018). Characterization of a new N-terminally acetylated extra-mitochondrial isoform of frataxin in human erythrocytes. *Sci Rep* *8*, 17043–17043.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* *30*, 214–226.
- Haberberger, R.V., Barry, C., Dominguez, N., and Matusica, D. (2019). Human Dorsal Root Ganglia. *Front Cell Neurosci* *13*.
- Hall, R.E., Henriksson, K.G., Lewis, S.F., Haller, R.G., and Kennaway, N.G. (1993). Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins. *J Clin Invest* *92*, 2660–2666.
- Hamacher-Brady, A., and Brady, N.R. (2016). Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 775–795.
- Han, Q.-Q., Shen, T.-T., Wang, F., Wu, P.-F., and Chen, J.-G. (2018). Preventive and Therapeutic Potential of Vitamin C in Mental Disorders. *Curr Med Sci* *38*, 1–10.
- Hanauer, A., Chery, M., Fujita, R., Driesel, A.J., Gilgenkrantz, S., and Mandel, J.L. (1990). The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am J Hum Genet* *46*, 133–137.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 251–262.
- Harding, A.E. (1981). Friedreich’s ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* *104*, 589–620.
- Harty, S., King, M.D., McCoy, B., Costigan, D., and Treacy, E.P. (2008). Sensory-motor polyneuropathy occurring in variant maple syrup urine disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* *31 Suppl 2*, S209–211.

- Heimer, G., Kerätär, J.M., Riley, L.G., Balasubramaniam, S., Eyal, E., Pietikäinen, L.P., Hiltunen, J.K., Marek-Yagel, D., Hamada, J., Gregory, A., et al. (2016). MECP2 Mutations Cause Childhood-Onset Dystonia and Optic Atrophy, a Mitochondrial Fatty Acid Synthesis Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* *99*, 1229–1244.
- Herman, D., Jenssen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S.L., and Gottesfeld, J.M. (2006a). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.* *2*, 551–558.
- Herman, D., Jenssen, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S.L., and Gottesfeld, J.M. (2006b). Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol* *2*, 551–558.
- Hermes, F.A.M., and Cronan, J.E. (2009). Scavenging of Cytosolic Octanoic Acid by Mutant LplA Lipoate Ligases Allows Growth of Escherichia coli Strains Lacking the LipB Octanoyltransferase of Lipoic Acid Synthesis. *J Bacteriol* *191*, 6796–6803.
- Herrera, M.G., Pignataro, M.F., Noguera, M.E., Cruz, K.M., and Santos, J. (2018). Rescuing the Rescuer: On the Protein Complex between the Human Mitochondrial Acyl Carrier Protein and ISD11. *ACS Chem. Biol.* *13*, 1455–1462.
- Herzig, S., and Shaw, R.J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *19*, 121–135.
- Hick, A., Wattenhofer-Donzé, M., Chintawar, S., Tropel, P., Simard, J.P., Vaucamps, N., Gall, D., Lambot, L., André, C., Reutenauer, L., et al. (2013). Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech* *6*, 608–621.
- Hill, K., Yuan, H., Wang, X., and Sha, S.-H. (2016). Noise-Induced Loss of Hair Cells and Cochlear Synaptopathy Are Mediated by the Activation of AMPK. *J. Neurosci.* *36*, 7497–7510.
- Hoff, K.G., Cupp-Vickery, J.R., and Vickery, L.E. (2003). Contributions of the LPPVK motif of the iron-sulfur template protein IscU to interactions with the Hsc66-Hsc20 chaperone system. *J. Biol. Chem.* *278*, 37582–37589.
- Huang, M.L.-H., Sivagurunathan, S., Ting, S., Jansson, P.J., Austin, C.J.D., Kelly, M., Semsarian, C., Zhang, D., and Richardson, D.R. (2013). 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.
- Hughes, J.T., Brownell, B., and Hower, R.L. (1968). The peripheral sensory pathway in friedreich's ataxia. An examination by light and electron microscopy of the posterior nerve roots, posterior root ganglia, and peripheral sensory nerves in cases of friedreich's ataxia. *Brain* *91*, 803–818.
- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J. Biol. Chem.* *280*, 29060–29066.
- Huynen, M.A., Snel, B., Bork, P., and Gibson, T.J. (2001). The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2463–2468.
- Iannuzzi, C., Adinolfi, S., Howes, B.D., Garcia-Serres, R., Clémancey, M., Latour, J.-M., Smulevich, G., and Pastore, A. (2011). The role of CyaY in iron sulfur cluster assembly on the E. coli IscU scaffold protein. *PLoS ONE* *6*, e21992.

- Igoillo-Esteve, M., Gurgul-Convey, E., Hu, A., Romagueira Bichara Dos Santos, L., Abdulkarim, B., Chintawar, S., Marselli, L., Marchetti, P., Jonas, J.-C., Eizirik, D.L., et al. (2015). Unveiling a common mechanism of apoptosis in β -cells and neurons in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 2274–2286.
- Inglese, J., and Auld, D.S. (2008). High Throughput Screening (HTS) Techniques: Applications in Chemical Biology. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, (American Cancer Society), pp. 1–15.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Inoue, K., Hirano, A., and Hasson, J. (1979). Friedreich's ataxia selectively involves the large neurons of the dorsal root ganglia. *Trans Am Neurol Assoc* *104*, 75–76.
- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 12017–12022.
- Jain, R., Vanamee, E.S., Dzikovski, B.G., Buku, A., Johnson, R.E., Prakash, L., Prakash, S., and Aggarwal, A.K. (2014). An iron-sulfur cluster in the polymerase domain of yeast DNA polymerase ϵ . *J. Mol. Biol.* *426*, 301–308.
- Jasoliya, M.J., McMackin, M.Z., Henderson, C.K., Perlman, S.L., and Cortopassi, G.A. (2017). Frataxin deficiency impairs mitochondrial biogenesis in cells, mice and humans. *Hum Mol Genet* *26*, 2627–2633.
- Jauslin, M.L., Meier, T., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P. (2003). Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J.* *17*, 1972–1974.
- Jitpimolmard, S., Small, J., King, R.H., Geddes, J., Misra, P., McLaughlin, J., Muddle, J.R., Cole, M., Harding, A.E., and Thomas, P.K. (1993). The sensory neuropathy of Friedreich's ataxia: an autopsy study of a case with prolonged survival. *Acta Neuropathol.* *86*, 29–35.
- Joo, J.H., Dorsey, F.C., Joshi, A., Hennessy-Walters, K.M., Rose, K.L., McCastlain, K., Zhang, J., Iyengar, R., Jung, C.H., Suen, D.-F., et al. (2011). Hsp90-Cdc37 Chaperone Complex Regulates Ulk1- and Atg13-Mediated Mitophagy. *Molecular Cell* *43*, 572–585.
- Kaptain, S., Downey, W.E., Tang, C., Philpott, C., Haile, D., Orloff, D.G., Harford, J.B., Rouault, T.A., and Klausner, R.D. (1991). A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 10109–10113.
- Katsu-Jiménez, Y., Loría, F., Corona, J.C., and Díaz-Nido, J. (2016). Gene Transfer of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Prevents Neurodegeneration Triggered by FXN Deficiency. *Mol. Ther.* *24*, 877–889.
- Keage, M.J., Delatycki, M.B., Gupta, I., Corben, L.A., and Vogel, A.P. (2017). Dysphagia in Friedreich Ataxia. *Dysphagia* *32*, 626–635.
- Kehrer, J.P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* *149*, 43–50.
- Kemp, K., Dey, R., Cook, A., Scolding, N., and Wilkins, A. (2017). Mesenchymal Stem Cell-Derived Factors Restore Function to Human Frataxin-Deficient Cells. *Cerebellum* *16*, 840–851.
- Kemp, K.C., Cook, A.J., Redondo, J., Kurian, K.M., Scolding, N.J., and Wilkins, A. (2016). Purkinje cell injury, structural plasticity and fusion in patients with Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol Commun* *4*.

- Kilkenny, M.L., Longo, M.A., Perera, R.L., and Pellegrini, L. (2013). Structures of human primase reveal design of nucleotide elongation site and mode of Pol α tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 15961–15966.
- Kim, E., Napierala, M., and Dent, S.Y.R. (2011a). Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Res.* *39*, 8366–8377.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011b). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- Kim, J.H., Frederick, R.O., Reinen, N.M., Troupis, A.T., and Markley, J.L. (2013). [2Fe-2S]-ferredoxin binds directly to cysteine desulfurase and supplies an electron for iron-sulfur cluster assembly but is displaced by the scaffold protein or bacterial frataxin. *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 8117–8120.
- Kim, Y.S., Kim, M., Choi, M.Y., Lee, D.H., Roh, G.S., Kim, H.J., Kang, S.S., Cho, G.J., Hong, E.-K., and Choi, W.S. (2018). Alpha-lipoic acid reduces retinal cell death in diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *503*, 1307–1314.
- Klausner, R.D., Rouault, T.A., and Harford, J.B. (1993). Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* *72*, 19–28.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Arozena, A.A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*.
- Koeppen, A.H. (2011). Friedreich's ataxia: Pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *Journal of the Neurological Sciences* *303*, 1–12.
- Koeppen, A.H. (2013). Nikolaus Friedreich and degenerative atrophy of the dorsal columns of the spinal cord. *J. Neurochem.* *126 Suppl 1*, 4–10.
- Koeppen, A.H., and Mazurkiewicz, J.E. (2013). Friedreich Ataxia: Neuropathology Revised. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* *72*, 78–90.
- Koeppen, A.H., Michael, S.C., Knutson, M.D., Haile, D.J., Qian, J., Levi, S., Santambrogio, P., Garrick, M.D., and Lamarche, J.B. (2007). The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: the role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol* *114*, 163–173.
- Koeppen, A.H., Morral, J.A., Davis, A.N., Qian, J., Petrocine, S.V., Knutson, M.D., Gibson, W.M., Cusack, M.J., and Li, D. (2009). The dorsal root ganglion in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol.* *118*, 763–776.
- Koeppen, A.H., Ramirez, R.L., Becker, A.B., and Mazurkiewicz, J.E. (2016). Dorsal root ganglia in Friedreich ataxia: satellite cell proliferation and inflammation. *Acta Neuropathol Commun* *4*, 46.
- Koeppen, A.H., Becker, A.B., Qian, J., and Feustel, P.J. (2017a). Friedreich Ataxia: Hypoplasia of Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *76*, 101–108.
- Koeppen, A.H., Becker, A.B., Qian, J., Gelman, B.B., and Mazurkiewicz, J.E. (2017b). Friedreich Ataxia: Developmental Failure of the Dorsal Root Entry Zone. *J Neuropathol Exp Neurol* *76*, 969–977.
- Kofman, A.E., McGraw, M.R., and Payne, C.J. (2012). Rapamycin increases oxidative stress response gene expression in adult stem cells. *Aging (Albany NY)* *4*, 279–289.

- Konstam, M.A., Kramer, D.G., Patel, A.R., Maron, M.S., and Udelson, J.E. (2011). Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* 4, 98–108.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dollé, P., Cazzalini, O., and Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* 16, 345–351.
- Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E.A., Altun, G., Laurent, L.C., Loring, J.F., Napierala, M., and Gottesfeld, J.M. (2010). Friedreich's Ataxia Induced Pluripotent Stem Cells Model Intergenerational GAA·TTC Triplet Repeat Instability. *Cell Stem Cell* 7, 631–637.
- Lai, J.-I., Nachun, D., Petrosyan, L., Throesch, B., Campau, E., Gao, F., Baldwin, K.K., Coppola, G., Gottesfeld, J.M., and Soragni, E. (2019). Transcriptional profiling of isogenic Friedreich ataxia neurons and effect of an HDAC inhibitor on disease signatures. *J. Biol. Chem.* 294, 1846–1859.
- Lamarche, J., Luneau, C., and Lemieux, B. (1982). Ultrastructural observations on spinal ganglion biopsies in Friedreich's ataxia: a preliminary report. *Can J Neurol Sci* 9, 137–139.
- Lamarche, J.B., Côté, M., and Lemieux, B. (1980). The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can J Neurol Sci* 7, 389–396.
- Lane, D.J.R., and Richardson, D.R. (2010). Frataxin, a molecule of mystery: trading stability for function in its iron-binding site. *Biochem. J.* 426, e1-3.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., and Lill, R. (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1050–1055.
- Larsson, L.-E., Linderholm, H., Müller, R., Ringqvist, T., and Sörnäs, R. (1964). Hereditary metabolic myopathy with paroxysmal myoglobinuria due to abnormal glycolysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 27, 361–380.
- Lebigot, E., Gaignard, P., Dorboz, I., Slama, A., Rio, M., de Lonlay, P., Héron, 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.
- Lederman, L. (2007). High-content screening. *BioTechniques* 43, 25, 27, 29.
- Lefevre, S., Sliwa, D., Auchère, F., Brossas, C., Ruckenstuhl, C., Boggetto, N., Lesuisse, E., Madeo, F., Camadro, J.-M., and Santos, R. (2012). The yeast metacaspase is implicated in oxidative stress response in frataxin-deficient cells. *FEBS Letters* 586, 143–148.
- Leininger, G.M., Edwards, J.L., Lipshaw, M.J., and Feldman, E.L. (2006). Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 620–628.
- Li, D.S., Ohshima, K., Jiralerspong, S., Bojanowski, M.W., and Pandolfo, M. (1999). Knock-out of the *cyaY* gene in *Escherichia coli* does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Lett.* 456, 13–16.
- Li, J., Rozwadowska, N., Clark, A., Fil, D., Napierala, J.S., and Napierala, M. (2019). Excision of the expanded GAA repeats corrects cardiomyopathy phenotypes of iPSC-derived Friedreich's ataxia cardiomyocytes. *Stem Cell Res* 40, 101529.
- Li, K., Besse, E.K., Ha, D., Kovtunovych, G., and Rouault, T.A. (2008). Iron-dependent regulation of frataxin expression: implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2265–2273.

- Li, L., Voullaire, L., Sandi, C., Pook, M.A., Ioannou, P.A., Delatycki, M.B., and Sarsero, J.P. (2013). Pharmacological Screening Using an FXN-EGFP Cellular Genomic Reporter Assay for the Therapy of Friedreich Ataxia. *PLoS One* 8.
- Li, L., Matsui, M., and Corey, D.R. (2016). Activating frataxin expression by repeat-targeted nucleic acids. *Nat Commun* 7, 10606.
- Li, L., Shen, X., Liu, Z., Norrbom, M., Prakash, T.P., O'Reilly, D., Sharma, V.K., Damha, M.J., Watts, J.K., Rigo, F., et al. (2018a). Activation of Frataxin Protein Expression by Antisense Oligonucleotides Targeting the Mutant Expanded Repeat. *Nucleic Acid Ther* 28, 23–33.
- Li, Y., Polak, U., Bhalla, A.D., Rozwadowska, N., Butler, J.S., Lynch, D.R., Dent, S.Y.R., and Napierala, M. (2015). Excision of Expanded GAA Repeats Alleviates the Molecular Phenotype of Friedreich's Ataxia. *Mol Ther* 23, 1055–1065.
- Li, Y.-R., Li, S., and Lin, C.-C. (2018b). Effect of resveratrol and pterostilbene on aging and longevity. *Biofactors* 44, 69–82.
- Libri, V., Yandim, C., Athanasopoulos, S., Loyse, N., Natisvili, T., Law, P.P., Chan, P.K., Mohammad, T., Mauri, M., Tam, K.T., et al. (2014). Epigenetic and neurological effects and safety of high-dose nicotinamide in patients with Friedreich's ataxia: an exploratory, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 384, 504–513.
- Lill, R. (2009). Function and biogenesis of iron–sulphur proteins. *Nature* 460, 831–838.
- Lin, H., Magrane, J., Rattelle, A., Stepanova, A., Galkin, A., Clark, E.M., Dong, Y.N., Halawani, S.M., and Lynch, D.R. (2017). Early cerebellar deficits in mitochondrial biogenesis and respiratory chain complexes in the KIKO mouse model of Friedreich ataxia. *Dis Model Mech* 10, 1343–1352.
- Liu, J., Verma, P.J., Evans-Galea, M.V., Delatycki, M.B., Michalska, A., Leung, J., Crombie, D., Sarsero, J.P., Williamson, R., Dottori, M., et al. (2011). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev* 7, 703–713.
- Llorens, J.V., Navarro, J.A., Martínez-Sebastián, M.J., Baylies, M.K., Schneuwly, S., Botella, J.A., and Moltó, M.D. (2007). Causative role of oxidative stress in a *Drosophila* model of Friedreich ataxia. *FASEB J.* 21, 333–344.
- Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M., and Barras, F. (2003). Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.* 278, 38352–38359.
- Long, A., Napierala, J.S., Polak, U., Hauser, L., Koeppen, A.H., Lynch, D.R., and Napierala, M. (2017). Somatic instability of the expanded GAA repeats in Friedreich's ataxia. *PLoS ONE* 12, e0189990.
- Lopes, D.M., Denk, F., and McMahon, S.B. (2017). The Molecular Fingerprint of Dorsal Root and Trigeminal Ganglion Neurons. *Front Mol Neurosci* 10, 304–304.
- Loría, F., and Díaz-Nido, J. (2015). Frataxin knockdown in human astrocytes triggers cell death and the release of factors that cause neuronal toxicity. *Neurobiol. Dis.* 76, 1–12.
- Loy, B.D., Fling, B.W., Horak, F.B., Bourdette, D.N., and Spain, R.I. (2018). Effects of lipoic acid on walking performance, gait, and balance in secondary progressive multiple sclerosis. *Complement Ther Med* 41, 169–174.
- Lu, C., and Cortopassi, G. (2007). Frataxin knockdown causes loss of cytoplasmic iron-sulfur cluster functions, redox alterations and induction of heme transcripts. *Arch. Biochem. Biophys.* 457, 111–122.

- Lufino, M.M.P., Silva, A.M., Németh, A.H., Alegre-Abarrategui, J., Russell, A.J., and Wade-Martins, R. (2013). A GAA repeat expansion reporter model of Friedreich's ataxia recapitulates the genomic context and allows rapid screening of therapeutic compounds. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5173–5187.
- Lynch, D.R., Perlman, S.L., and Meier, T. (2010). A Phase 3, Double-blind, Placebo-Controlled Trial of Idebenone in Friedreich Ataxia. *Arch Neurol* 67, 941–947.
- Lynch, D.R., Farmer, J., Hauser, L., Blair, I.A., Wang, Q.Q., Mesaros, C., Snyder, N., Boesch, S., Chin, M., Delatycki, M.B., et al. (2019a). Safety, pharmacodynamics, and potential benefit of omaveloxone in Friedreich ataxia. *Ann Clin Transl Neurol* 6, 15–26.
- Lynch, D.R., Hauser, L., McCormick, A., Wells, M., Dong, Y.N., McCormack, S., Schadt, K., Perlman, S., Subramony, S.H., Mathews, K.D., et al. (2019b). Randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon- γ 1b in Friedreich Ataxia. *Ann Clin Transl Neurol* 6, 546–553.
- Mariotti, C., Fancellu, R., Caldarazzo, S., Nanetti, L., Di Bella, D., Plumari, M., Lauria, G., Cappellini, M.D., Duca, L., Solari, A., et al. (2012). Erythropoietin in Friedreich ataxia: no effect on frataxin in a randomized controlled trial. *Mov. Disord.* 27, 446–449.
- Marmigère, F., and Ernfors, P. (2007). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 114–127.
- Marmolino, D., Manto, M., Acquaviva, F., Vergara, P., Ravella, A., Monticelli, A., and Pandolfo, M. (2010). PGC-1 α Down-Regulation Affects the Antioxidant Response in Friedreich's Ataxia. *PLoS One* 5.
- Marobbio, C.M.T., Pisano, I., Porcelli, V., Lasorsa, F.M., and Palmieri, L. (2012). Rapamycin reduces oxidative stress in frataxin-deficient yeast cells. *Mitochondrion* 12, 156–161.
- Martelli, A., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe–S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum Mol Genet* 16, 2651–2658.
- Martelli, A., Schmucker, S., Reutenauer, L., Mathieu, J.R.R., Peyssonnaud, C., Karim, Z., Puy, H., Galy, B., Hentze, M.W., and Puccio, H. (2015). Iron regulatory protein 1 sustains mitochondrial iron loading and function in frataxin deficiency. *Cell Metab.* 21, 311–323.
- Mayr, J.A., Zimmermann, F.A., Fauth, C., Bergheim, C., Meierhofer, D., Radmayr, D., Zschocke, J., Koch, J., and Sperl, W. (2011). Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 792–797.
- Mayr, J.A., Feichtinger, R.G., Tort, F., Ribes, A., and Sperl, W. (2014). Lipoic acid biosynthesis defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 553–563.
- McMackin, M.Z., Henderson, C.K., and Cortopassi, G.A. (2017). Neurobehavioral deficits in the KIKO mouse model of Friedreich's ataxia. *Behavioural Brain Research* 316, 183–188.
- Meier, T., and Buyse, G. (2009). Idebenone: An emerging therapy for Friedreich ataxia. *J Neurol* 256, 25.
- Meier, T., Perlman, S.L., Rummey, C., Coppard, N.J., and Lynch, D.R. (2012). Assessment of neurological efficacy of idebenone in pediatric patients with Friedreich's ataxia: data from a 6-month controlled study followed by a 12-month open-label extension study. *Journal of Neurology* 259, 284–291.

- Melber, A., Na, U., Vashisht, A., Weiler, B.D., Lill, R., Wohlschlegel, J.A., and Winge, D.R. (2016). Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. *Elife* 5.
- Melli, G., Taiana, M., Camozzi, F., Triolo, D., Podini, P., Quattrini, A., Taroni, F., and Lauria, G. (2008). Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp. Neurol.* 214, 276–284.
- Mikaeili, H., Sandi, M., Bayot, A., Al-Mahdawi, S., and Pook, M.A. (2018). FAST-1 antisense RNA epigenetically alters FXN expression. *Sci Rep* 8, 17217.
- Miller, E.D., Dziedzic, A., Saluk-Bijak, J., and Bijak, M. (2019). A Review of Various Antioxidant Compounds and their Potential Utility as Complementary Therapy in Multiple Sclerosis. *Nutrients* 11.
- Miller, J.L., Rai, M., Frigon, N.L., Pandolfo, M., Punnonen, J., and Spencer, J.R. (2017). Erythropoietin and small molecule agonists of the tissue-protective erythropoietin receptor increase FXN expression in neuronal cells in vitro and in Fxn-deficient KIKO mice in vivo. *Neuropharmacology* 123, 34–45.
- Miller, J.R., Busby, R.W., Jordan, S.W., Cheek, J., Henshaw, T.F., Ashley, G.W., Broderick, J.B., Cronan, John E., and Marletta, M.A. (2000). Escherichia coli LipA Is a Lipoyl Synthase: In Vitro Biosynthesis of Lipoylated Pyruvate Dehydrogenase Complex from Octanoyl-Acyl Carrier Protein. *Biochemistry* 39, 15166–15178.
- Miranda, C.J., Santos, M.M., Ohshima, K., Smith, J., Li, L., Bunting, M., Cossée, M., Koenig, M., Sequeiros, J., Kaplan, J., et al. (2002). Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett.* 512, 291–297.
- Miyabe, I., Kunkel, T.A., and Carr, A.M. (2011). The major roles of DNA polymerases epsilon and delta at the eukaryotic replication fork are evolutionarily conserved. *PLoS Genet.* 7, e1002407.
- Mochel, F., Knight, M.A., Tong, W.-H., Hernandez, D., Ayyad, K., Taivassalo, T., Andersen, P.M., Singleton, A., Rouault, T.A., Fischbeck, K.H., et al. (2008). Splice Mutation in the Iron-Sulfur Cluster Scaffold Protein ISCU Causes Myopathy with Exercise Intolerance. *The American Journal of Human Genetics* 82, 652–660.
- Mollá, B., Riveiro, F., Bolinches-Amorós, A., Muñoz-Lasso, D.C., Palau, F., and González-Cabo, P. (2016). Two different pathogenic mechanisms, dying-back axonal neuropathy and pancreatic senescence, are present in the YG8R mouse model of Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech* 9, 647–657.
- Mollá, B., Muñoz-Lasso, D.C., Riveiro, F., Bolinches-Amorós, A., Pallardó, F.V., Fernandez-Vilata, A., de la Iglesia-Vaya, M., Palau, F., and Gonzalez-Cabo, P. (2017). Reversible Axonal Dystrophy by Calcium Modulation in Frataxin-Deficient Sensory Neurons of YG8R Mice. *Front Mol Neurosci* 10, 264.
- Montermini, L., Richter, A., Morgan, K., Justice, C.M., Julien, D., Castellotti, B., Mercier, J., Poirier, J., Capozzoli, F., Bouchard, J.P., et al. (1997). Phenotypic variability in Friedreich ataxia: role of the associated GAA triplet repeat expansion. *Ann. Neurol.* 41, 675–682.
- Morral, J.A., Davis, A.N., Qian, J., Gelman, B.B., and Koeppen, A.H. (2010). Pathology and pathogenesis of sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol.* 120, 97–108.
- Morris, T.W., Reed, K.E., and Cronan, J.E. (1994). Identification of the gene encoding lipoate-protein ligase A of Escherichia coli. Molecular cloning and characterization of the lplA gene and gene product. *J. Biol. Chem.* 269, 16091–16100.
- Morris, T.W., Reed, K.E., and Cronan, J.E. (1995). Lipoic acid metabolism in Escherichia coli: the lplA and lipB genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *J. Bacteriol.* 177, 1–10.

- Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., and Lill, R. (2002). The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2025–2036.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* *22*, 4815–4825.
- Mühlenhoff, U., Richter, N., Pines, O., Pierik, A.J., and Lill, R. (2017). Specialized function of yeast Isa1 and Isa2 proteins in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins. *J. Biol. Chem.* *292*, 17979.
- Mundwiler, A., and Shakkottai, V.G. (2018). Autosomal-dominant cerebellar ataxias. *Handb Clin Neurol* *147*, 173–185.
- Musco, G., Stier, G., Kolmerer, B., Adinolfi, S., Martin, S., Frenkiel, T., Gibson, T., and Pastore, A. (2000). Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin. *Structure* *8*, 695–707.
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* *45*, 593–605.
- Nabhan, J.F., Wood, K.M., Rao, V.P., Morin, J., Bhamidipaty, S., LaBranche, T.P., Gooch, R.L., Bozal, F., Bulawa, C.E., and Guild, B.C. (2016). Intrathecal delivery of frataxin mRNA encapsulated in lipid nanoparticles to dorsal root ganglia as a potential therapeutic for Friedreich's ataxia. *Sci Rep* *6*, 1–10.
- Nachun, D., Gao, F., Isaacs, C., Strawser, C., Yang, Z., Dokuru, D., Van Berlo, V., Sears, R., Farmer, J., Perlman, S., et al. (2018). Peripheral blood gene expression reveals an inflammatory transcriptomic signature in Friedreich's ataxia patients. *Hum. Mol. Genet.* *27*, 2965–2977.
- Napoli, E., Morin, D., Bernhardt, R., Buckpitt, A., and Cortopassi, G. (2007). Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendrogloma cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1772*, 773–780.
- Navarro, J.A., Ohmann, E., Sanchez, D., Botella, J.A., Liebisch, G., Moltó, M.D., Ganfornina, M.D., Schmitz, G., and Schneuwly, S. (2010). Altered lipid metabolism in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 2828–2840.
- Navarro-Sastre, A., Tort, F., Stehling, O., Uzarska, M.A., Arranz, J.A., Del Toro, M., Labayru, M.T., Landa, J., Font, A., Garcia-Villoria, J., et al. (2011). A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am. J. Hum. Genet.* *89*, 656–667.
- Netz, D.J.A., Stith, C.M., Stümpfig, M., Köpf, G., Vogel, D., Genau, H.M., Stodola, J.L., Lill, R., Burgers, P.M.J., and Pierik, A.J. (2011). Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 125–132.
- Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Stümpfig, M., Bill, E., Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Walden, W.E., and Lill, R. (2012). A bridging [4Fe-4S] cluster and nucleotide binding are essential for function of the Cfd1-Nbp35 complex as a scaffold in iron-sulfur protein maturation. *J. Biol. Chem.* *287*, 12365–12378.
- Netz, D.J.A., Mascarenhas, J., Stehling, O., Pierik, A.J., and Lill, R. (2014). Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends Cell Biol.* *24*, 303–312.
- Nguyen, T., Nioi, P., and Pickett, C.B. (2009). The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J Biol Chem* *284*, 13291–13295.

- Nieto, A., Correia, R., de Nóbrega, E., Montón, F., Hess, S., and Barroso, J. (2012). Cognition in Friedreich ataxia. *Cerebellum* *11*, 834–844.
- Nordin, A., Larsson, E., Thornell, L.-E., and Holmberg, M. (2011). Tissue-specific splicing of ISCU results in a skeletal muscle phenotype in myopathy with lactic acidosis, while complete loss of ISCU results in early embryonic death in mice. *Hum Genet* *129*, 371–378.
- Noval, S., Contreras, I., Sanz-Gallego, I., Manrique, R.K., and Arpa, J. (2012). Ophthalmic features of Friedreich ataxia. *Eye (Lond)* *26*, 315–320.
- Obis, È., Irazusta, V., Sanchís, D., Ros, J., and Tamarit, J. (2014). Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets mitochondria and lipid metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* *73*, 21–33.
- Ohlmeyer, M., and Zhou, M.-M. (2010). Integration of small-molecule discovery in academic biomedical research. *Mt. Sinai J. Med.* *77*, 350–357.
- Ohshima, K., Montermini, L., Wells, R.D., and Pandolfo, M. (1998). Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J. Biol. Chem.* *273*, 14588–14595.
- Olsson, A., Lind, L., Thornell, L.-E., and Holmberg, M. (2008). Myopathy with lactic acidosis is linked to chromosome 12q23.3-24.11 and caused by an intron mutation in the ISCU gene resulting in a splicing defect. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1666–1672.
- O'Neill, H.M., Lally, J.S., Galic, S., Thomas, M., Azizi, P.D., Fullerton, M.D., Smith, B.K., Pulinilkunnil, T., Chen, Z., Samaan, M.C., et al. (2014). AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* *57*, 1693–1702.
- Ouellet, D.L., Cherif, K., Rousseau, J., and Tremblay, J.P. (2017). Deletion of the GAA repeats from the human frataxin gene using the CRISPR-Cas9 system in YG8R-derived cells and mouse models of Friedreich ataxia. *Gene Ther.* *24*, 265–274.
- Packer, L., Tritschler, H.J., and Wessel, K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* *22*, 359–378.
- Palandri, A., Martin, E., Russi, M., Rera, M., Tricoire, H., and Monnier, V. (2018a). Identification of cardioprotective drugs by medium-scale in vivo pharmacological screening on a *Drosophila* cardiac model of Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech* *11*.
- Palandri, A., Martin, E., Russi, M., Rera, M., Tricoire, H., and Monnier, V. (2018b). Identification of cardioprotective drugs by medium-scale in vivo pharmacological screening on a *Drosophila* cardiac model of Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech* *11*.
- Palomo, G.M., Cerrato, T., Gargini, R., and Diaz-Nido, J. (2011). Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 2807–2822.
- Pandey, A., Yoon, H., Lyver, E.R., Dancis, A., and Pain, D. (2011). Isd11p protein activates the mitochondrial cysteine desulfurase Nfs1p protein. *J. Biol. Chem.* *286*, 38242–38252.
- Pandolfo, M. (2006). Friedreich's ataxia. In R. D. Wells & T. Ashizawa (Eds.), *Genetic Instabilities and Neurological Diseases*, (Burlington, Massachusetts: Academic Press), pp. 277–296.
- Pandolfo, M. (2009). Friedreich ataxia: The clinical picture. *J Neurol* *256*, 3–8.
- Pandolfo, M., and Hausmann, L. (2013). Deferiprone for the treatment of Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* *126 Suppl 1*, 142–146.

- Pandolfo, M., and Pastore, A. (2009). The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *J. Neurol.* *256 Suppl 1*, 9–17.
- Pandolfo, M., Arpa, J., Delatycki, M.B., Le Quan Sang, K.H., Mariotti, C., Munnich, A., Sanz-Gallego, I., Tai, G., Tarnopolsky, M.A., Taroni, F., et al. (2014). Deferiprone in Friedreich ataxia: a 6-month randomized controlled trial. *Ann. Neurol.* *76*, 509–521.
- Paradkar, P.N., Zumbrennen, K.B., Paw, B.H., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2009). Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 1007–1016.
- Paredes, F., Sheldon, K., Lassègue, B., Williams, H.C., Faidley, E.A., Benavides, G.A., Torres, G., Sanhueza-Olivares, F., Yeligar, S.M., Griendling, K.K., et al. (2018). Poldip2 is an oxygen-sensitive protein that controls PDH and α KGDH lipoylation and activation to support metabolic adaptation in hypoxia and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, 1789–1794.
- Parent, A., Elduque, X., Cornu, D., Belot, L., Caer, J.-P.L., Grandas, A., Toledano, M.B., and D’Autréaux, B. (2015). Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nature Communications* *6*, ncomms6686.
- Park, J.-M., Jung, C.H., Seo, M., Otto, N.M., Grunwald, D., Kim, K.H., Moriarity, B., Kim, Y.-M., Starker, C., Nho, R.S., et al. (2016). The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy* *12*, 547–564.
- Parkinson, M.H., Boesch, S., Nachbauer, W., Mariotti, C., and Giunti, P. (2013). Clinical features of Friedreich’s ataxia: classical and atypical phenotypes. *Journal of Neurochemistry* *126*, 103–117.
- Parry, R.J., and Trainor, D.A. (1978). Biosynthesis of lipoic acid. 2. Stereochemistry of sulfur introduction at C-6 of octanoic acid. *J. Am. Chem. Soc.* *100*, 5243–5244.
- Patra, S., and Barondeau, D.P. (2019). Mechanism of activation of the human cysteine desulfurase complex by frataxin. *PNAS* *116*, 19421–19430.
- Paupe, V., Dassa, E.P., Goncalves, S., Auchère, F., Lönn, M., Holmgren, A., and Rustin, P. (2009). Impaired Nuclear Nrf2 Translocation Undermines the Oxidative Stress Response in Friedreich Ataxia. *PLOS ONE* *4*, e4253.
- Payne, R.M. (2011). The Heart in Friedreich’s Ataxia: Basic Findings and Clinical Implications. *Prog. Pediatr. Cardiol.* *31*, 103–109.
- Payne, R.M., and Wagner, G.R. (2012). Cardiomyopathy in Friedreich ataxia: clinical findings and research. *J Child Neurol* *27*, 1179–1186.
- Peltier, A.C., and Russell, J.W. (2002). Recent advances in drug-induced neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* *15*, 633–638.
- Perdomini, M., Belbellaa, B., Monassier, L., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Cartier, N., Crystal, R.G., Aubourg, P., and Puccio, H. (2014). Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich’s ataxia. *Nat. Med.* *20*, 542–547.
- Pereira, M., Francisco, S., Varanda, A.S., Santos, M., Santos, M.A.S., and Soares, A.R. (2018). Impact of tRNA Modifications and tRNA-Modifying Enzymes on Proteostasis and Human Disease. *Int J Mol Sci* *19*.

- Perry, T.L., Urquhart, N., MacLean, J., Evans, M.E., Hansen, S., Davidson, G.F., Applegarth, D.A., MacLeod, P.J., and Lock, J.E. (1975). Nonketotic hyperglycinemia. Glycine accumulation due to absence of glycerine cleavage in brain. *N. Engl. J. Med.* *292*, 1269–1273.
- Piemonte, F., Pastore, A., Tozzi, G., Tagliacozzi, D., Santorelli, F.M., Carozzo, R., Casali, C., Damiano, M., Federici, G., and Bertini, E. (2001). Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *European Journal of Clinical Investigation* *31*, 1007–1011.
- Piguet, F., de Montigny, C., Vaucamps, N., Reutenauer, L., Eisenmann, A., and Puccio, H. (2018a). Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia. *Mol. Ther.* *26*, 1940–1952.
- Piguet, F., Montigny, C. de, Vaucamps, N., Reutenauer, L., Eisenmann, A., and Puccio, H. (2018b). Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia. *Molecular Therapy* *0*.
- Pook, M.A., Al-Mahdawi, S., Carroll, C.J., Cossée, M., Puccio, H., Lawrence, L., Clark, P., Lowrie, M.B., Bradley, J.L., Cooper, J.M., et al. (2001). Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics* *3*, 185–193.
- Prakash, S., and Prakash, L. (2002). Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev.* *16*, 1872–1883.
- Prischi, F., Konarev, P.V., Iannuzzi, C., Pastore, C., Adinolfi, S., Martin, S.R., Svergun, D.I., and Pastore, A. (2010). Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. *Nat Commun* *1*, 95.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* *27*, 181–186.
- Puente, C., Hendrickson, R.C., and Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J. Biol. Chem.* *291*, 6026–6035.
- Punga, T., and Bühler, M. (2010). Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol Med* *2*, 120–129.
- Qiu, X., Liu, K., Xiao, L., Jin, S., Dong, J., Teng, X., Guo, Q., Chen, Y., and Wu, Y. (2018). Alpha-lipoic acid regulates the autophagy of vascular smooth muscle cells in diabetes by elevating hydrogen sulfide level. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1864*, 3723–3738.
- Quinn, J.F., Bussiere, J.R., Hammond, R.S., Montine, T.J., Henson, E., Jones, R.E., and Stackman, R.W. (2007). Chronic dietary alpha-lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiol. Aging* *28*, 213–225.
- Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E.G., and Korolchuk, V.I. (2017). mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem* *61*, 565–584.
- Rai, M., Soragni, E., Jenssen, K., Burnett, R., Herman, D., Coppola, G., Geschwind, D.H., Gottesfeld, J.M., and Pandolfo, M. (2008). HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. *PLoS ONE* *3*, e1958.
- Rai, M., Soragni, E., Chou, C.J., Barnes, G., Jones, S., Rusche, J.R., Gottesfeld, J.M., and Pandolfo, M. (2010). Two New Pimelic Diphenylamide HDAC Inhibitors Induce Sustained Frataxin Upregulation in Cells from Friedreich's Ataxia Patients and in a Mouse Model. *PLOS ONE* *5*, e8825.

- Reed, L.J. (2001). A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *J. Biol. Chem.* *276*, 38329–38336.
- Reed, K.E., and Cronan, J.E. (1993). Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: sequencing and functional characterization of the *lipA* and *lipB* genes. *J. Bacteriol.* *175*, 1325–1336.
- Reed, L.J., Leach, F.R., and Koike, M. (1958). Studies on a lipoic acid-activating system. *J. Biol. Chem.* *232*, 123–142.
- Reetz, K., Dogan, I., Hohenfeld, C., Didszun, C., Giunti, P., Mariotti, C., Durr, A., Boesch, S., Klopstock, T., Rodríguez de Rivera Garrido, F.J., et al. (2018). Nonataxia symptoms in Friedreich Ataxia: Report from the Registry of the European Friedreich's Ataxia Consortium for Translational Studies (EFACTS). *Neurology* *91*, e917–e930.
- Reiss, J., and Johnson, J.L. (2003). Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes *MOCS1*, *MOCS2*, and *GEPH*. *Hum. Mutat.* *21*, 569–576.
- Ristow, M., Mulder, H., Pomplun, D., Schulz, T.J., Müller-Schmehl, K., Krause, A., Fex, M., Puccio, H., Müller, J., Isken, F., et al. (2003). Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of β cell mass. *Journal of Clinical Investigation* *112*, 527–534.
- Robida-Stubbs, S., Glover-Cutter, K., Lamming, D.W., Mizunuma, M., Narasimhan, S.D., Neumann-Haefelin, E., Sabatini, D.M., and Blackwell, T.K. (2012). TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating *SKN-1/Nrf* and *DAF-16/FoxO*. *Cell Metab.* *15*, 713–724.
- Roche, B., Agrebi, R., Huguenot, A., Choudens, S.O. de, Barras, F., and Py, B. (2015). Turning *Escherichia coli* into a Frataxin-Dependent Organism. *PLOS Genetics* *11*, e1005134.
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* *17*, 215–217.
- Rouault, T.A. (2012). Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis Model Mech* *5*, 155–164.
- Rouault, T.A. (2019). The indispensable role of mammalian iron sulfur proteins in function and regulation of multiple diverse metabolic pathways. *Biometals* *32*, 343–353.
- Rouault, T.A., Haile, D.J., Downey, W.E., Philpott, C.C., Tang, C., Samaniego, F., Chin, J., Paul, I., Orloff, D., Harford, J.B., et al. (1992). An iron-sulfur cluster plays a novel regulatory role in the iron-responsive element binding protein. *Biometals* *5*, 131–140.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W.J., Stark, M.J.R., and White, M.F. (2006). The DNA Repair Helicases *XPD* and *FancJ* Have Essential Iron-Sulfur Domains. *Molecular Cell* *23*, 801–808.
- Rufini, A., Fortuni, S., Arcuri, G., Condò, I., Serio, D., Incani, O., Malisan, F., Ventura, N., and Testi, R. (2011). Preventing the ubiquitin–proteasome-dependent degradation of frataxin, the protein defective in Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics* *20*, 1253–1261.
- Rufini, A., Cavallo, F., Condò, I., Fortuni, S., De Martino, G., Incani, O., Di Venere, A., Benini, M., Massaro, D.S., Arcuri, G., et al. (2015). Highly specific ubiquitin-competing molecules effectively promote frataxin accumulation and partially rescue the aconitase defect in Friedreich ataxia cells. *Neurobiol Dis* *75*, 91–99.

- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* *15*, 741–750.
- Saccà, F., Marsili, A., Puorro, G., Antenora, A., Pane, C., Tessa, A., Scoppettuolo, P., Nesti, C., Brescia Morra, V., De Michele, G., et al. (2013). Clinical use of frataxin measurement in a patient with a novel deletion in the FXN gene. *J. Neurol.* *260*, 1116–1121.
- Saccà, F., Puorro, G., Marsili, A., Antenora, A., Pane, C., Casali, C., Marcotulli, C., Defazio, G., Liuzzi, D., Tatillo, C., et al. (2016). Long-term effect of epoetin alfa on clinical and biochemical markers in friedreich ataxia. *Mov. Disord.* *31*, 734–741.
- Sahdeo, S., Scott, B.D., McMackin, M.Z., Jasoliya, M., Brown, B., Wulff, H., Perlman, S.L., Pook, M.A., and Cortopassi, G.A. (2014). Dyclonine rescues frataxin deficiency in animal models and buccal cells of patients with Friedreich’s ataxia. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 6848–6862.
- Sajish, M., and Schimmel, P. (2015). A human tRNA synthetase is a potent PARP1-activating effector target for resveratrol. *Nature* *519*, 370–373.
- Sakamoto, K., and Holman, G.D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *295*, E29–E37.
- Sakamoto, N., Chastain, P.D., Parniewski, P., Ohshima, K., Pandolfo, M., Griffith, J.D., and Wells, R.D. (1999). Sticky DNA: self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich’s ataxia. *Mol. Cell* *3*, 465–475.
- Sakamoto, N., Ohshima, K., Montermini, L., Pandolfo, M., and Wells, R.D. (2001). Sticky DNA, a self-associated complex formed at long GAA*TTC repeats in intron 1 of the frataxin gene, inhibits transcription. *J. Biol. Chem.* *276*, 27171–27177.
- Salehi, B., Berkay Yılmaz, Y., Antika, G., Boyunegmez Tumer, T., Fawzi Mahomoodally, M., Lobine, D., Akram, M., Riaz, M., Capanoglu, E., Sharopov, F., et al. (2019). Insights on the Use of α -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules* *9*.
- Sánchez-Martín, P., Saito, T., and Komatsu, M. (2019). p62/SQSTM1: “Jack of all trades” in health and cancer. *FEBS J.* *286*, 8–23.
- Sanders, L.L.O., de Souza Menezes, C.E., Chaves Filho, A.J.M., de Almeida Viana, G., Fechine, F.V., Rodrigues de Queiroz, M.G., Gonçalves da Cruz Fonseca, S., Mendes Vasconcelos, S.M., Amaral de Moraes, M.E., Gama, C.S., et al. (2017). α -Lipoic Acid as Adjunctive Treatment for Schizophrenia: An Open-Label Trial. *J Clin Psychopharmacol* *37*, 697–701.
- Sandi, C., Pinto, R.M., Al-Mahdawi, S., Ezzatizadeh, V., Barnes, G., Jones, S., Rusche, J.R., Gottesfeld, J.M., and Pook, M.A. (2011a). Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol. Dis.* *42*, 496–505.
- Sandi, C., Pinto, R.M., Al-Mahdawi, S., Ezzatizadeh, V., Barnes, G., Jones, S., Rusche, J.R., Gottesfeld, J.M., and Pook, M.A. (2011b). Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiol. Dis.* *42*, 496–505.
- Sandi, C., Sandi, M., Jassal, H., Ezzatizadeh, V., Anjomani-Virmouni, S., Al-Mahdawi, S., and Pook, M.A. (2014). Generation and characterisation of Friedreich ataxia YG8R mouse fibroblast and neural stem cell models. *PLoS ONE* *9*, e89488.
- Santos, M.M., Ohshima, K., and Pandolfo, M. (2001). Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1935–1944.

- Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z., and Festenstein, R. (2003). DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* *422*, 909–913.
- Schadewaldt, P., and Wendel, U. (1997). Metabolism of branched-chain amino acids in maple syrup urine disease. *Eur. J. Pediatr.* *156 Suppl 1*, S62-66.
- Schadt, K.A., Friedman, L.S., Regner, S.R., Mark, G.E., Lynch, D.R., and Lin, K.Y. (2012). Cross-sectional analysis of electrocardiograms in a large heterogeneous cohort of Friedreich ataxia subjects. *J Child Neurol* *27*, 1187–1192.
- Schiavi, A., Torgovnick, A., Kell, A., Megalou, E., Castelein, N., Guccini, I., Marzocchella, L., Gelino, S., Hansen, M., Malisan, F., et al. (2013). Autophagy induction extends lifespan and reduces lipid content in response to frataxin silencing in *C. elegans*. *Exp. Gerontol.* *48*, 191–201.
- Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., and Puccio, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum Mol Genet* *17*, 3521–3531.
- Schmucker, S., Martelli, A., Colin, F., Page, A., Wattenhofer-Donzé, M., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2011). Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. *PLoS One* *6*.
- Schnackerz, K.D., Dobritzsch, D., Lindqvist, Y., and Cook, P.F. (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase: a flavoprotein with four iron-sulfur clusters. *Biochim. Biophys. Acta* *1701*, 61–74.
- Schoenfeld, R.A., Napoli, E., Wong, A., Zhan, S., Reutenauer, L., Morin, D., Buckpitt, A.R., Taroni, F., Lonnerdal, B., Ristow, M., et al. (2005). Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3787–3799.
- Schonauer, M.S., Kastaniotis, A.J., Kursu, V.A.S., Hiltunen, J.K., and Dieckmann, C.L. (2009). Lipoic acid synthesis and attachment in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* *284*, 23234–23242.
- Schulz, J.B., Dehmer, T., Schöls, L., Mende, H., Hardt, C., Vorgerd, M., Bürk, K., Matson, W., Dichgans, J., Beal, M.F., et al. (2000). Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* *55*, 1719–1721.
- Schulz, J.B., Boesch, S., Bürk, K., Dürr, A., Giunti, P., Mariotti, C., Pousset, F., Schöls, L., Vankan, P., and Pandolfo, M. (2009). Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective. *Nat Rev Neurol* *5*, 222–234.
- Schwarz, G. (2005). Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 2792–2810.
- Sellers, V.M., Johnson, M.K., and Dailey, H.A. (1996). Function of the [2Fe-2S] cluster in mammalian ferrochelatase: a possible role as a nitric oxide sensor. *Biochemistry* *35*, 2699–2704.
- Sellers, V.M., Wang, K.F., Johnson, M.K., and Dailey, H.A. (1998). Evidence that the fourth ligand to the [2Fe-2S] cluster in animal ferrochelatase is a cysteine. Characterization of the enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* *273*, 22311–22316.
- Selvadurai, L.P., Harding, I.H., Corben, L.A., and Georgiou-Karistianis, N. (2018). Cerebral abnormalities in Friedreich ataxia: A review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* *84*, 394–406.
- Seznec, H., Simon, D., Monassier, L., Criqui-Filipe, P., Gansmuller, A., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2004). Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* *13*, 1017–1024.

- Shackelford, D.B., and Shaw, R.J. (2009). The LKB1–AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* 9, 563–575.
- Shan, Y., Schoenfeld, R.A., Hayashi, G., Napoli, E., Akiyama, T., Iodi Carstens, M., Carstens, E.E., Pook, M.A., and Cortopassi, G.A. (2013). Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich’s ataxia YG8R mouse model. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1481–1493.
- Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Spang, R.J., and Walden, W.E. (2010). Cytosolic Iron-Sulfur Cluster Assembly (CIA) System: Factors, Mechanism, and Relevance to Cellular Iron Regulation. *J. Biol. Chem.* 285, 26745–26751.
- Shchepinov, M.S. (2020). Polyunsaturated Fatty Acid Deuteration against Neurodegeneration. *Trends in Pharmacological Sciences* 41, 236–248.
- Shen, X., Kilikevicius, A., O’Reilly, D., Prakash, T.P., Damha, M.J., Rigo, F., and Corey, D.R. (2018). Activating frataxin expression by single-stranded siRNAs targeting the GAA repeat expansion. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28, 2850–2855.
- Shen, X., Beasley, S., Putnam, J., Li, Y., Prakash, T., Rigo, F., Napierala, M., and Corey, D. (2019). Efficient Electroporation of Neuronal Cells Using Synthetic Oligonucleotides: Identifying Duplex RNA and Antisense Oligonucleotide Activators of Human Frataxin Expression. *RNA* rna.071290.119.
- Shen, Y., McMackin, M.Z., Shan, Y., Raetz, A., David, S., and Cortopassi, G. (2016). Frataxin Deficiency Promotes Excess Microglial DNA Damage and Inflammation that Is Rescued by PJ34. *PLoS ONE* 11, e0151026.
- 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.
- Shidara, Y., and Hollenbeck, P.J. (2010). Defects in mitochondrial axonal transport and membrane potential without increased reactive oxygen species production in a *Drosophila* model of Friedreich ataxia. *J. Neurosci.* 30, 11369–11378.
- Siegel, A., and Hreday, N.S. (2011). *Essential Neuroscience* (Philadelphia, United States: Lippincott Williams & Wilkins).
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2004a). Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia. *J. Neurosci.* 24, 1987–1995.
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2004b). Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 24, 1987–1995.
- Smith, S., Witkowski, A., Moghul, A., Yoshinaga, Y., Nefedov, M., de Jong, P., Feng, D., Fong, L., Tu, Y., Hu, Y., et al. (2012). Compromised mitochondrial fatty acid synthesis in transgenic mice results in defective protein lipoylation and energy disequilibrium. *PLoS ONE* 7, e47196.
- Söderberg, C., Gillam, M.E., Ahlgren, E.-C., Hunter, G.A., Gakh, O., Isaya, G., Ferreira, G.C., and Al-Karadaghi, S. (2016). The Structure of the Complex between Yeast Frataxin and Ferrochelatase: CHARACTERIZATION AND PRE-STEADY STATE REACTION OF FERROUS IRON DELIVERY AND HEME SYNTHESIS. *J. Biol. Chem.* 291, 11887–11898.

- Solomonson, A., and DeBerardinis, R.J. (2018). Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *J. Biol. Chem.* *293*, 7522–7530.
- Soragni, E., Miao, W., Iudicello, M., Jacoby, D., De Mercanti, S., Clerico, M., Longo, F., Piga, A., Ku, S., Campau, E., et al. (2014a). Epigenetic Therapy for Friedreich Ataxia. *Ann Neurol* *76*, 489–508.
- Soragni, E., Miao, W., Iudicello, M., Jacoby, D., De Mercanti, S., Clerico, M., Longo, F., Piga, A., Ku, S., Campau, E., et al. (2014b). Epigenetic therapy for Friedreich ataxia. *Ann. Neurol.* *76*, 489–508.
- Soreze, Y., Boutron, A., Habarou, F., Barnerias, C., Nonnenmacher, L., Delpech, H., Mamoune, A., Chrétien, D., Hubert, L., Bole-Feysot, C., et al. (2013). Mutations in human lipoyltransferase gene LIPT1 cause a Leigh disease with secondary deficiency for pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Orphanet Journal of Rare Diseases* *8*, 192.
- Soriano, S., Llorens, J.V., Blanco-Sobero, L., Gutiérrez, L., Calap-Quintana, P., Morales, M.P., Moltó, M.D., and Martínez-Sebastián, M.J. (2013). Deferiprone and idebenone rescue frataxin depletion phenotypes in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Gene* *521*, 274–281.
- Soriano, S., Calap-Quintana, P., Llorens, J.V., Al-Ramahi, I., Gutiérrez, L., Martínez-Sebastián, M.J., Botas, J., and Moltó, M.D. (2016). Metal Homeostasis Regulators Suppress FRDA Phenotypes in a *Drosophila* Model of the Disease. *PLoS ONE* *11*, e0159209.
- Sousa, J.S., D'Imprima, E., and Vonck, J. (2018). Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell. Biochem.* *87*, 167–227.
- Spiegel, R., Saada, A., Halvardson, J., Soiferman, D., Shaag, A., Edvardson, S., Horovitz, Y., Khayat, M., Shalev, S.A., Feuk, L., et al. (2014). Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *Eur J Hum Genet* *22*, 902–906.
- Stehling, O., Elsässer, H.-P., Brückel, B., Mühlenhoff, U., and Lill, R. (2004). Iron-sulfur protein maturation in human cells: evidence for a function of frataxin. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 3007–3015.
- Stehling, O., Vashisht, A.A., Mascarenhas, J., Jonsson, Z.O., Sharma, T., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., Wohlschlegel, J.A., and Lill, R. (2012). MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science* *337*, 195–199.
- Stehling, O., Wilbrecht, C., and Lill, R. (2014). Mitochondrial iron-sulfur protein biogenesis and human disease. *Biochimie* *100*, 61–77.
- Steinkellner, H., Singh, H.N., Muckenthaler, M.U., Goldenberg, H., Moganty, R.R., Scheiber-Mojdehkar, B., and Sturm, B. (2017). No changes in heme synthesis in human Friedreich's ataxia erythroid progenitor cells. *Gene* *621*, 5–11.
- Sturm, B., Bistrich, U., Schranzhofer, M., Sarsero, J.P., Rauen, U., Scheiber-Mojdehkar, B., de Groot, H., Ioannou, P., and Petrat, F. (2005a). Friedreich's ataxia, no changes in mitochondrial labile iron in human lymphoblasts and fibroblasts: a decrease in antioxidative capacity? *J. Biol. Chem.* *280*, 6701–6708.
- Sturm, B., Stupphann, D., Kaun, C., Boesch, S., Schranzhofer, M., Wojta, J., Goldenberg, H., and Scheiber-Mojdehkar, B. (2005b). Recombinant human erythropoietin: effects on frataxin expression in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* *35*, 711–717.
- Sun, H., Yao, W., Tang, Y., Zhuang, W., Wu, D., Huang, S., and Sheng, H. (2017). Urinary exosomes as a novel biomarker for evaluation of α -lipoic acid's protective effect in early diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* *31*.

- Synofzik, M., and Németh, A.H. (2018). Recessive ataxias. *Handb Clin Neurol* 155, 73–89.
- Sznajder, Ł.J., Thomas, J.D., Carrell, E.M., Reid, T., McFarland, K.N., Cleary, J.D., Oliveira, R., Nutter, C.A., Bhatt, K., Sobczak, K., et al. (2018). Intron retention induced by microsatellite expansions as a disease biomarker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 4234–4239.
- Tangeman, L., Wyatt, C.N., and Brown, T.L. (2012). Knockdown of AMP-activated protein kinase alpha 1 and alpha 2 catalytic subunits. *J RNAi Gene Silencing* 8, 470–478.
- Télot, L., Rousseau, E., Lesuisse, E., Garcia, C., Morlet, B., Léger, 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 Mol Basis Dis* 1864, 997–1009.
- Thierbach, R., Schulz, T.J., Isken, F., Voigt, A., Mietzner, B., Drewes, G., Kleist-Retzow, J.-C. von, Wiesner, R.J., Magnuson, M.A., Puccio, H., et al. (2005). Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3857–3864.
- Tian, W., Li, W., Chen, Y., Yan, Z., Huang, X., Zhuang, H., Zhong, W., Chen, Y., Wu, W., Lin, C., et al. (2015). Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy. *FEBS Lett.* 589, 1847–1854.
- Tomassini, B., Arcuri, G., Fortuni, S., Sandi, C., Ezzatizadeh, V., Casali, C., Condò, I., Malisan, F., Al-Mahdawi, S., Pook, M., et al. (2012). Interferon gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Hum Mol Genet* 21, 2855–2861.
- Tort, F., Ferrer-Cortès, X., Thió, M., Navarro-Sastre, A., Matalonga, L., Quintana, E., Bujan, N., Arias, A., García-Villoria, J., Acquaviva, C., et al. (2014). Mutations in the lipoyltransferase LIPT1 gene cause a fatal disease associated with a specific lipoylation defect of the 2-ketoacid dehydrogenase complexes. *Hum Mol Genet* 23, 1907–1915.
- Tozzi, G., Nuccetelli, M., Bello, M.L., Bernardini, S., Bellincampi, L., Ballerini, S., Gaeta, L.M., Casali, C., Pastore, A., Federici, G., et al. (2002). Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich’s ataxia. *Archives of Disease in Childhood* 86, 376–379.
- Tsou, A.Y., Paulsen, E.K., Lagedrost, S.J., Perlman, S.L., Mathews, K.D., Wilmot, G.R., Ravina, B., Koeppen, A.H., and Lynch, D.R. (2011). Mortality in Friedreich ataxia. *J. Neurol. Sci.* 307, 46–49.
- Uhrigshardt, H., Singh, A., Kovtunovych, G., Ghosh, M., and Rouault, T.A. (2010). Characterization of the human HSC20, an unusual DnaJ type III protein, involved in iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3816–3834.
- Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Kharchenko, P.V., et al. (2015). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience* 18, 145–153.
- Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.-A., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol. Biol. Cell* 24, 1830–1841.
- Uzarska, M.A., Nasta, V., Weiler, B.D., Spantgar, F., Ciofi-Baffoni, S., Saviello, M.R., Gonnelli, L., Mühlenhoff, U., Banci, L., and Lill, R. (2016). Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. *Elife* 5.

- Van Vranken, J.G., Jeong, M.-Y., Wei, P., Chen, Y.-C., Gygi, S.P., Winge, D.R., and Rutter, J. (2016). The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis. *ELife* 5.
- Vankan, P. (2013). Prevalence gradients of Friedreich's ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *J. Neurochem.* 126 *Suppl 1*, 11–20.
- Varma, H., Lo, D.C., and Stockwell, B.R. (2011). High-Throughput and High-Content Screening for Huntington's Disease Therapeutics. In *Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*, D.C. Lo, and R.E. Hughes, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis), p.
- Vázquez-Manrique, R.P., González-Cabo, P., Ros, S., Aziz, H., Baylis, H.A., and Palau, F. (2006). Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *FASEB J.* 20, 172–174.
- Ventosa, M., Wu, Z., and Lim, F. (2017). Sustained FXN expression in dorsal root ganglia from a nonreplicative genomic HSV-1 vector. *J Gene Med* 19, 376–386.
- Vernis, L., El Banna, N., Baille, D., Hatem, E., Heneman, A., and Huang, M.-E. (2017). Fe-S Clusters Emerging as Targets of Therapeutic Drugs. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 3647657.
- Vickery, L.E., and Cupp-Vickery, J.R. (2007). Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 95–111.
- Vinik, A.I., Holland, M.T., Le Beau, J.M., Liuzzi, F.J., Stansberry, K.B., and Colen, L.B. (1992). Diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 15, 1926–1975.
- Vyas, P.M., Tomamichel, W.J., Pride, P.M., Babbey, C.M., Wang, Q., Mercier, J., Martin, E.M., and Payne, R.M. (2012a). A TAT-Frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum Mol Genet* 21, 1230–1247.
- Vyas, P.M., Tomamichel, W.J., Pride, P.M., Babbey, C.M., Wang, Q., Mercier, J., Martin, E.M., and Payne, R.M. (2012b). A TAT-frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1230–1247.
- Walden, H.R., Kirby, J.A., Yeaman, S.J., Gray, J., Jones, D.E., and Palmer, J.M. (2008). Xenobiotic incorporation into pyruvate dehydrogenase complex can occur via the exogenous lipoylation pathway. *Hepatology* 48, 1874–1884.
- Waldvogel, D., van Gelderen, P., and Hallett, M. (1999). Increased iron in the dentate nucleus of patients with Friedrich's ataxia. *Ann. Neurol.* 46, 123–125.
- Wang, T., and Craig, E.A. (2008). Binding of yeast frataxin to the scaffold for Fe-S cluster biogenesis. *Isu. J. Biol. Chem.* 283, 12674–12679.
- Wang, J., Yang, X., and Zhang, J. (2016). Bridges between mitochondrial oxidative stress, ER stress and mTOR signaling in pancreatic β cells. *Cell. Signal.* 28, 1099–1104.
- Wang, Y., Everaert, N., Song, Z., Decuypere, E., Vermeulen, D., and Buyse, J. (2017). Alpha-lipoic acid impairs body weight gain of young broiler chicks via modulating peripheral AMPK. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 211, 34–40.
- Watt, M.J., Holmes, A.G., Pinnamaneni, S.K., Garnham, A.P., Steinberg, G.R., Kemp, B.E., and Febbraio, M.A. (2006). Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290, E500–508.

- Wei, F.-Y., and Tomizawa, K. (2011). Functional loss of *Cdkal1*, a novel tRNA modification enzyme, causes the development of type 2 diabetes. *Endocr. J.* 58, 819–825.
- White, M.F., and Dillingham, M.S. (2012). Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 94–100.
- Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K., Davidson, A.J., Schmidt, B., et al. (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436, 1035–1039.
- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F., and Cortopassi, G. (1999). The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 8, 425–430.
- Wong, A.O.-T., Wong, G., Shen, M., Chow, M.Z.-Y., Tse, W.W., Gurung, B., Mak, S.Y., Lieu, D.K., Costa, K.D., Chan, C.W., et al. (2019). Correlation between frataxin expression and contractility revealed by in vitro Friedreich's ataxia cardiac tissue models engineered from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 10, 203.
- Woodward, P.W., Williams, C., Sewing, A., and Benson, N. (2006). Improving the design and analysis of high-throughput screening technology comparison experiments using statistical modeling. *J Biomol Screen* 11, 5–12.
- Wu, S.-B., Wu, Y.-T., Wu, T.-P., and Wei, Y.-H. (2014). Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1331–1344.
- Wu, Y.-L., Chang, J.-C., Lin, W.-Y., Li, C.-C., Hsieh, M., Chen, H.-W., Wang, T.-S., Liu, C.-S., and Liu, K.-L. (2017). Treatment with Caffeic Acid and Resveratrol Alleviates Oxidative Stress Induced Neurotoxicity in Cell and Drosophila Models of Spinocerebellar Ataxia Type3. *Sci Rep* 7, 11641.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115–124.
- Xia, H., Cao, Y., Dai, X., Marelja, Z., Zhou, D., Mo, R., Al-Mahdawi, S., Pook, M.A., Leimkühler, S., Rouault, T.A., et al. (2012). Novel Frataxin Isoforms May Contribute to the Pathological Mechanism of Friedreich Ataxia. *PLoS One* 7.
- Yagoda, N., von Rechenberg, M., Zaganjor, E., Bauer, A.J., Yang, W.S., Fridman, D.J., Wolpaw, A.J., Smukste, I., Peltier, J.M., Boniface, J.J., et al. (2007). RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 447, 864–868.
- Ye, H., Jeong, S.Y., Ghosh, M.C., Kovtunovych, G., Silvestri, L., Ortillo, D., Uchida, N., Tisdale, J., Camaschella, C., and Rouault, T.A. (2010). Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J. Clin. Invest.* 120, 1749–1761.
- Yi, X., and Maeda, N. (2005). Endogenous Production of Lipoic Acid Is Essential for Mouse Development. *Mol Cell Biol* 25, 8387–8392.
- Yiu, E.M., Tai, G., Peverill, R.E., Lee, K.J., Croft, K.D., Mori, T.A., Scheiber-Mojdehkar, B., Sturm, B., Prasherger, M., Vogel, A.P., et al. (2015). An open-label trial in Friedreich ataxia suggests clinical benefit with high-dose resveratrol, without effect on frataxin levels. *J. Neurol.* 262, 1344–1353.

- Yoon, T., and Cowan, J.A. (2003). Iron–Sulfur Cluster Biosynthesis. Characterization of Frataxin as an Iron Donor for Assembly of [2Fe-2S] Clusters in ISU-Type Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 6078–6084.
- Yoon, T., and Cowan, J.A. (2004). Frataxin-mediated Iron Delivery to Ferrochelatase in the Final Step of Heme Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 25943–25946.
- Yoon, H., Knight, S.A.B., Pandey, A., Pain, J., Turkarslan, S., Pain, D., and Dancis, A. (2015). Turning *Saccharomyces cerevisiae* into a Frataxin-Independent Organism. *PLOS Genetics* *11*, e1005135.
- Zanella, I., Derosas, M., Corrado, M., Cocco, E., Cavadini, P., Biasiotto, G., Poli, M., Verardi, R., and Arosio, P. (2008). The effects of frataxin silencing in HeLa cells are rescued by the expression of human mitochondrial ferritin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1782*, 90–98.
- Zesiewicz, T., Heerinckx, F., De Jager, R., Omidvar, O., Kilpatrick, M., Shaw, J., and Shchepinov, M.S. (2018). Randomized, clinical trial of RT001: Early signals of efficacy in Friedreich’s ataxia. *Mov. Disord.* *33*, 1000–1005.
- Zhang, N., and Ashizawa, T. (2017). RNA toxicity and foci formation in microsatellite expansion diseases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *44*, 17–29.
- Zhang, Y., and Xu, H. (2016). Translational regulation of mitochondrial biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 1717–1724.
- Zhang, null, Chung, null, and Oldenburg, null (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* *4*, 67–73.
- Zhang, Y., Burke, C.W., Ryman, K.D., and Klimstra, W.B. (2007). Identification and Characterization of Interferon-Induced Proteins That Inhibit Alphavirus Replication. *J Virol* *81*, 11246–11255.
- Zhou, L., and Cheng, Y. (2019). Alpha-lipoic acid alleviated 6-OHDA-induced cell damage by inhibiting AMPK/mTOR mediated autophagy. *Neuropharmacology* *155*, 98–103.
- Ziegler, D., Low, P.A., Freeman, R., Tritschler, H., and Vinik, A.I. (2016). Predictors of improvement and progression of diabetic polyneuropathy following treatment with α -lipoic acid for 4 years in the NATHAN 1 trial. *J. Diabetes Complicat.* *30*, 350–356.
- Zouari, M., Feki, M., Ben Hamida, C., Larnaout, A., Turki, I., Belal, S., Mebazaa, A., Ben Hamida, M., and Hentati, F. (1998). Electrophysiology and nerve biopsy: comparative study in Friedreich’s ataxia and Friedreich’s ataxia phenotype with vitamin E deficiency. *Neuromuscul. Disord.* *8*, 416–425.

Développement et caractérisation d'un nouveau modèle de neurones sensitifs de l'ataxie de Friedreich : étude de la neurophysiopathologie et mise en place d'un criblage pharmacologique

Résumé

L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie neurodégénérative rare autosomique récessive provoquant une ataxie spinocérébelleuse et sensitive associée à une cardiomyopathie. Les neurones sensitifs proprioceptifs des ganglions dorsaux rachidiens (DRG) sont principalement affectés. En cause, une mutation du gène *FXN* provoquant la sous-production de la frataxine (FXN), une protéine mitochondriale essentielle à la production des centres fer-soufre (Fe-S), cofacteurs essentiels pour la cellule. Afin d'étudier la neurophysiopathologie de l'AF, un modèle de culture primaire de neurones sensitifs déficient en FXN a été développé. Le travail de thèse a permis de caractériser le modèle et identifier de nouvelles voies affectées dans ces cellules en absence de FXN. Résumant l'ensemble des phénotypes biochimiques connus de l'AF, les neurones sensitifs déficients en FXN montrent un défaut de croissance lié à l'activation de la voie de l'AMPK et dépendant de l'expression de FXN. Le travail de thèse a également servi à développer une stratégie de criblage de molécules pharmacologiques, qui permettra d'identifier des composés permettant de remplacer la FXN dans les cellules.

Mots clés : Ataxie de Friedreich, neurophysiopathologie, neurones sensitifs, Modèle, DRG, Frataxine, Fe-S, Mitochondries, AMPK, Criblage, Thérapies

Résumé en anglais

Friedreich's Ataxia (FA) is a rare neurodegenerative autosomal recessive disorder characterized by a spinocerebellar and sensory ataxia associated to a cardiomyopathy. Sensory proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia (DRG) are primarily affected. The disease results from a mutation of the *FXN* gene, inducing a decreased expression of the frataxin (FXN), a mitochondrial protein essential for the synthesis of iron-sulfur (Fe-S) clusters, cofactors involved throughout the cell. In order to investigate FA neuropathophysiology, a model of primary cultures of sensory neurons deficient in FXN was developed. The PhD thesis allowed the characterization of the model and identification of new pathways involved in these cells in the absence of FXN. Recapitulating all the biochemical features associated to FA, frataxin-depleted neurons showed a growth defect linked to the activation of AMPK and depending on FXN expression. The PhD work also permitted the development of a pharmaceutical compound screening strategy, that will be used in the search for molecules replacing FXN function in these cells.