



Accentuation du phénotype des souris YG8sR, un modèle de l'ataxie de Friedreich, à l'aide de shARNs ciblant le gène de la frataxine

Mémoire

Solange Gni-Fiene Yanyabe

Maîtrise en médecine moléculaire - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada



UNIVERSITÉ
LAVAL

Faculté de médecine

**Accentuation du phénotype des souris YG8sR,
un modèle de l'ataxie de Friedreich,
à l'aide de shARNs ciblant le gène de la frataxine**

Mémoire de maîtrise en Médecine Moléculaire

Solange GNI-FIENE YANYABE

Sous la direction de :

Jacques P. TREMBLAY

Résumé

L'ataxie de Friedreich (FRDA) est la plus fréquente ataxie neurodégénérative invalidante. Elle est une maladie héréditaire récessive progressive qui touche sévèrement le système nerveux et cardiaque. La FRDA pose non seulement un défi de thérapie curative mais aussi celui du modèle animal reproduisant la symptomatologie. Dépendant du nombre de répétitions GAA, les souris modèles, telles que les souris YG8sR contenant entre 250-300 GAA, présentent un phénotype plus ou moins sévère. Notre étude a pour but d'accentuer le phénotype des souris YG8sR en utilisant des short hairpin ARNs (shARNs) ciblant l'ARNm de la frataxine pour réduire l'expression de cette protéine. Nous avons pu, après un test d'efficacité des shARNs *in vitro* dans les cellules HeLa et HEK 293T, choisir 2 shARNs parmi les 4 testés capables de réduire le taux de frataxine. Nous avons sélectionné les shARN6 et shARN1 qui étaient capables après la transfection dans les cellules à 2 µg d'ADN de réduire respectivement de 40% et 70% le taux de frataxine dans les cellules. Lorsque nous avons injecté en intraveineuse 1.2×10^{12} ou 2.4×10^{12} copies d'AAV-PHP.B codant pour ces shARNs, nous avons observé une perte de poids, des troubles de la motricité et de la coordination, ainsi qu'une diminution de la force motrice chez les souris YG8sR ayant reçu du shARN1 à 1.2×10^{12} . Nous avons donc développé un modèle amélioré de souris (Imp-YG8sR) en réduisant davantage l'expression de la frataxine avec cette dose de shARN1. Le phénotype plus sévère de ces souris est plus proche de celui des patients atteints de l'ataxie de Friedreich que le modèle original YG8sR utilisé sans les shARNs. Notre modèle de souris Imp-YG8sR sera donc bénéfique pour des tests de thérapies géniques actuellement en développement.

Abstract

Friedreich's ataxia (FRDA) is the most common disabling neurodegenerative ataxia. It is a progressive recessive inherited disease that severely affects the nervous and cardiac systems. FRDA poses not only a challenge of curative therapy but also that of the animal model reproducing the symptomatology. Depending on the number of GAA repeats, mouse models, such as YG8sR containing between 250-300 GAA, exhibit a more or less severe phenotype. Our study aims to enhance the phenotype of YG8sR mice by using short hairpin RNAs (shRNAs) targeting the frataxin mRNA to reduce the expression of this protein. We were able, after an *in vitro* efficacy test of the shRNAs in HeLa and HEK 293T cells, to choose 2 shRNAs among the 4 tested, to reduce the frataxin level. We selected shARN6 and shARN1 which were able to reduce the frataxin level by up to 40% and 70%, respectively in cells, when injected intravenously at 1.2×10^{12} or 2.4×10^{12} copies of AAV-PHP.B encoding these shRNAs. We observed a loss of weight, a disturbance of the motor skills, a reduced coordination and force in the YG8sR mice, which received the shRNA1 at 1.2×10^{12} . We have therefore developed an improved mouse model (Imp-YG8sR) by further reducing the expression of frataxin with this dose of shRNA1. The more severe phenotype of the Imp-YG8sR is closer to that of patients with Friedreich's ataxia than the original model used without the shRNAs. Our Imp-YG8sR mouse model will therefore be beneficial for gene therapies currently in development.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Résumé..... | ii |
| Abstract | iii |
| Table des matières..... | iv |
| Liste des figures, tableaux, illustrations..... | vii |
| Liste des abréviations, sigles, acronymes | ix |
| Remerciements | xiv |
| Introduction | 1 |
| Chapitre 1 : L'ataxie de Friedreich | 5 |
| 1.1 Historique..... | 5 |
| 1.2 Le rôle de la frataxine | 5 |
| 1.3 Conséquence de la baisse de frataxine et apparition de la symptomatologie | 7 |
| 1.3.1 Symptômes de la FRDA..... | 8 |
| 1.3.2 Diagnostic de l'ataxie de Friedreich | 9 |
| 1.5 Avancées thérapeutiques dans le domaine de recherche sur la FRDA | 11 |
| 1.5.1 Les thérapies visant l'augmentation des fonctions mitochondriales et la réduction du stress oxydatif | 12 |
| 1.5.2 Les approches visant l'action sur le métabolisme de contrôle de la frataxine | 12 |
| 1.5.3 Les médicaments visant à accroître l'expression du gène | 13 |
| 1.5.4 Les traitements symptomatiques de support..... | 14 |
| 1.6 Modèles murins de l'ataxie de Friedreich..... | 15 |
| 1.6.1 Modèles de souris knockout à la frataxine | 15 |
| 1.6.2 Souris avec des séquences GAA répétées insérées dans le gène <i>Fxn</i> de la souris..... | 15 |
| 1.6.4 Modèle de souris knock-down inductible de frataxine | 18 |
| Chapitre 2 : Les ARNs interférents..... | 19 |
| 2.1 Découverte des ARNs interférents..... | 19 |
| 2.2 Biogenèse et mécanisme d'action des ARNs interférents..... | 20 |
| 2.3 Rôle des ARN interférents | 21 |
| 2.3.1 Intérêt des microARNs comme outils diagnostiques | 21 |
| 2.3.2 Intérêt des microARNs comme outils pronostiques | 22 |
| 2.3.3 Intérêt des microARNs comme outils thérapeutiques | 22 |
| 2.4 Conception optimale de shARNs | 23 |
| 2.4.2 Les différents types de shARNs selon leur structure..... | 24 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 2.4.3 | Localisation du site ciblé | 27 |
| 2.4.4 | Le choix du promoteur | 27 |
| 2.4.5 | Vecteurs utilisés pour la livraison des shARNs | 28 |
| Chapitre 3 : Matériel et méthodes..... | | 31 |
| 3.1 | Constructions des plasmides shARNs | 31 |
| 3.2 | Test <i>in vitro</i> des shARNs dans les cellules HeLa et HEK 293T | 34 |
| 3.2.1 | Isolation de l'ARN messager avec du TRIZOL..... | 34 |
| 3.2.2 | Vérification de l'intégrité des ARNm extraits | 34 |
| 3.2.3 | Test RTqPCR pour la quantification de l'ARNm de la frataxine | 36 |
| 3.2.4 | Extraction des protéines des cellules après les transfections avec les shARNs | 38 |
| 3.2.5 | Quantification de la frataxine restante après le knockdown | 39 |
| 3.3 | Test <i>in vivo</i> chez les souris YG8sR..... | 40 |
| 3.3.1 | Sélection des souris YG8sR par génotypage..... | 40 |
| 3.3.2 | Production des virus adéno-associés..... | 41 |
| 3.3.3 | Procédure des tests comportementaux <i>in vivo</i> | 42 |
| 3.3.4 | Tests de comportement des souris YG8sR..... | 44 |
| Chapitre 4 : Résultats | | 47 |
| 4.1 | Résultats <i>in vitro</i> des tests d'efficacité des shARNs | 47 |
| 4.1.1 | Contrôle de la transfection | 47 |
| 4.1.2 | RTqPCR avec des ARNs extraits après transfection des cellules HeLa | 49 |
| 4.1.3 | ELISA avec des protéines extraites après transfection de shARNs dans des cellules HeLa ou HEK 293T | 50 |
| 4.2 | Résultats <i>in vivo</i> chez les souris YG8sR..... | 54 |
| 4.2.1 | Détection par PCR des gènes livrés dans les organes des souris YG8sR | 54 |
| 4.2.2 | Résultats de l'effet des shARNs évalué par la croissance pondérale des souris YG8sR. | 55 |
| 4.2.3 | Résultats de l'effet des shARNs évalué par le test de notched ou barre dentée..... | 56 |
| 4.2.4 | Résultats de l'effet des shARNs sur les souris YG8sR évalué par le test de T inversé | 57 |
| 4.2.5 | Résultats de l'effet des shARNs sur le test de parallel rod floor des souris YG8sR. | 58 |
| 4.2.6 | Résultats de l'effet des shARNs sur le test de Hanging ou test d'accrochage des souris YG8sR..... | 59 |
| Chapitre 5 : Discussion | | 60 |
| 5.1 | Les tests d'efficacité de shARNs <i>in vitro</i> : | 61 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 5.1.1 | Les shARNs diminuent les ARNm de la frataxine dans les cellules HeLa et HEK 293T | 61 |
| 5.1.2 | Les shARNs réduisent les taux de frataxine dans les cellules HeLa et HEK 293T | 62 |
| 5.2 | Test <i>in vivo</i> dans les souris YG8sR | 62 |
| 5.2.1 | Les shARNs entraînent la perte de poids chez les souris YG8sR | 63 |
| 5.2.2 | Les shARNs entraînent des erreurs des pattes pendant les traversées des barres dentées et en T inversée. | 63 |
| 5.2.3 | Les shARNs prolongent le temps d'immobilisation et augmentent le rapport du nombre d'erreurs de pattes sur la distance parcourue pendant le test de parallel rod floor. | 64 |
| 5.2.4 | Les shARNs diminuent le rapport temps d'accrochage/poids pendant le test de Hanging | 64 |
| | Conclusion | 66 |
| | Bibliographie | 68 |

Liste des figures, tableaux, illustrations

Liste des figures :

| | |
|--|----|
| Figure 1: Image représentative de l'impact de la carence en FXN sur le complexe d'assemblage Fe-S (34). | 6 |
| Figure 2: Organigramme pour le diagnostic et la prise en charge de l'ataxie de Friedreich (46)..... | 9 |
| Figure 3: Les stratégies thérapeutiques à plusieurs niveaux pour la FRDA (10). | 11 |
| Figure 4: Biosynthèse et mécanisme d'action des ARNs interférents (80)..... | 20 |
| Figure 5: Structures impliquées dans les divers modèles de shARNs (93)..... | 24 |
| Figure 6: Description de la construction des plasmides. | 31 |
| Figure 7: Étapes du test ELISA (Abcam #ab176112, Human Frataxin SimpleStep ELISA® Kit) | 39 |
| Figure 8: Image de la migration des produits PCR amplifiés avec l'ADN de queues des souris. | 40 |
| Figure 9: Calendrier des tests pour le suivi des souris in vivo..... | 42 |
| Figure 10: Image descriptive des tests de comportement des souris. | 44 |
| Figure 11: Images en fluorescence des cellules HeLa 72h après la transfection avec différents plasmides shARNs-mCherry..... | 47 |
| Figure 12: Effet des shARNs sur l'ARNm de la frataxine dans les cellules HeLa. | 49 |
| Figure 13: Effet de shARNs sur le taux de la protéine frataxine dans les cellules HEK 293T et HeLa. | 50 |
| Figure 14: Effet des combinaisons de shARNs sur le taux de frataxine dans les cellules HeLa et HEK 293T. | 52 |
| Figure 15: Image des gels d'électrophorèse des PCRs faits avec les ADNs extraits des tissus des souris injectées avec AAV-shARN-mCherry. | 54 |
| Figure 16: Effets des shARNs sur le poids des souris YG8sR..... | 55 |
| Figure 17: Effets des shARNs sur les erreurs des pattes et le temps mis pour traverser la barre dentée. | 56 |
| Figure 18: L'effet des shARNs sur le nombre d'erreurs de pattes et du temps mis pendant la traversée de la barre en T inversé. | 57 |
| Figure 19: L'effet des shARNs sur le temps d'immobilisation et le rapport entre les nombres d'erreurs de pattes sur la distance parcourue pendant le test de parallel rod floor. | 58 |
| Figure 20: L'effet des shARNs sur le rapport temps d'accrochage/poids pendant le test de Hanging. | 59 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Récapitulatif des différents shARNs et leurs caractéristiques(93) | 26 |
| Tableau 2: Tropisme naturel des AAVs(20). | 29 |
| Tableau 3: Concentration recommandée pour l'échantillon en fonction du volume de l'échantillon. . | 36 |
| Tableau 4 : Taux de transfection de cellules HeLa | 47 |

Liste des abréviations, sigles, acronymes

AAV : Adeno-Associated-Virus

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADP: Adénosine diphosphate

AGO2: Argonaute 2

AGPI : acides gras polyinsaturés

ALCAR : Acétyl-L-Carnitine

ANOVA: Analysis of Variance

ApoA1 : Apolipoprotéine A1

ARN : Acide ribonucléique

ARNdb: ARN double brin

ARNi: ARN interférent

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP: Adénosine triphosphate

BCA: Acide bicinchoninique

BHE : barrière hémato-encéphalique

BSA : Bovine serum albumin

CCPA : Conseil canadien de protection des animaux

Cq : Quantification cycle

Cre: Cycling recombination

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DAAO : D-amino-acide oxydase

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP : Désoxyribonucléoside triphosphate

DRG : Ganglion de la racine dorsale

dsARN: Double strand ARN

DTT: Dithiothreitol

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

Exp5 : Exportine 5

FBS: Sérum Bovin Foetal

Fe-S : Fer-Soufre

FRDA : Friedreich's ataxia (Ataxie de Friedreich)

FXN : Gène de la frataxine humaine

Fxn : Gène de la frataxine de souris

GAA : Guanine Adénine Adénine

G-SCF: Granulocyte Stem Cell Factor

HDACi : Inhibiteur d'Histone Désacétylase

HDL: High Density Lipoprotein

HIF-2 α : Hypoxia-inducible factor-2 alpha

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase

IDT : Integrated DNA Technologies

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISC : Iron Suffer Complex

Kb: Kilobase

kDa: KiloDalton

KIKI: Knock-In knock-In

KIKO: Knock-in Knock-Out

KO : Knock-out

Lys: Lysine

MCK: Muscle creatine kinase

mL: Millilitre

mM : Millimolaire

NaCl : Chlorure de sodium

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NaOH : Hydroxide de sodium

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B

NRF2: Nuclear Factor erythroid-derived 2-related factor 2

NSE : Neuron specific enolase

nt : Nucléotide

pb : Paire de bases

PCR: Polymerase chain reaction

PP AR- γ) : récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes

Pré-microARN : Précurseurs des microARNs

Pri-microARN : MicroARN primaires

Pro: Proline

Qsp : Quality standard product

Redox : Réaction d'oxydoréduction

RISC: RNA Induced Silencing Complex

ROS: Reactive oxygen species

rpm : Rotations par minute

RTqPCR : Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction

SCF: Stem Cell Factor

SDS : Sodium dodécyl sulfate

Ser : Sérine

shARN : Short hairpin RNA

siRNA: Small interfering RNA

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

TALE : Transcription Activator-Like Effector

Tat : Trans-activateur de transcription

TRC : The ARNi Consortium

Tris-HCl : Tris (hydroxyméthyl) aminométhane hydrochloride

UCLA: Université de Californie à Los Angeles.

xg : Force de centrifugation

YAC: Yeast Artificial Chromosome

µL : Microlitre

µM : Micromolaire

< Je dédie ce travail à mes parents car sans leur soutien je n'aurais pas pu être là. >

Remerciements

Mes reconnaissances au Programme Canadien de Bourses de la Francophonie (PCBF) pour l'opportunité offerte et l'accompagnement financier et moral tout au long de ces 2 années d'études.

Je voudrais par ces lignes exprimer ma gratitude au Pr Jacques P-TREMBLAY pour sa confiance, en acceptant d'être mon directeur sans même m'avoir rencontré. Je ne saurais vous remercier assez pour ce que vous avez fait, malgré votre emploi du temps chargé vous avez suivi pas à pas ce travail. Votre sens de collaboration et de rigueur pour le travail bien fait de vous un exemple à suivre. Recevez ici l'expression de mon admiration.

Sans oublier toute l'équipe du Pr Tremblay et particulièrement mesdames Catherine Gérard et Nathalie Majeau pour leur coaching. Merci pour tout.

Introduction

L'ataxie de Friedreich (FRDA) est l'ataxie récessive héréditaire la plus fréquente, une maladie neurodégénérative progressive(1)(1)(1)(1)(1). Cette pathologie est causée par une mutation du gène de la frataxine (*FXN*) et c'est plus fréquemment une insertion d'une expansion d'une répétition GAA dans l'intron 1 entraînant une concentration réduite de la protéine frataxine(2).

Cette petite protéine est impliquée dans le transport et le métabolisme du fer dans les mitochondries. Elle est aussi impliquée dans l'assemblage des complexes Fe-S(3). Par conséquent, sa diminution entraîne un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydatif conduisant à la mort cellulaire. Certaines cellules de l'organisme sont plus sensibles à cette désorganisation; il s'agit des cellules du système cardiaque et du système nerveux (SNC)(4).

L'incidence de la FRDA est comprise entre 2 à 5/100 000 individus chez les Caucasiens (5). C'est une maladie systémique qui touche sévèrement le SNC avec une prédilection pour le cervelet et les ganglions de la racine dorsale (6).

Au cours de leur pathologie, entre 60-70% des patients ataxiques développent une cardiomyopathie hypertrophique. Ce qui est l'une des causes majeures de la mortalité imputable à cette maladie (7). Puis entre 20-30% développent plus tard un diabète de type 1 (5). Il faut noter que l'apparition ou non de la symptomatologie est étroitement liée au taux de la frataxine qui est inversement dépendant du nombre des triplets de GAA (8) présents dans le génome du patient. Les réserves de protéines frataxine chez les patients FRDA représentent 20 à 25 % de celles observées chez les individus normaux, mais nous ne savons pas encore quelle quantité de protéines est nécessaire pour un phénotype normal (9).

De nos jours, il n'existe pas encore de traitement curatif (10). Néanmoins, plusieurs recherches dans le domaine de la thérapie de la FRDA sont en cours et il y a entre autres la supplémentation en protéine frataxine. Différentes approches pour augmenter la frataxine ont été investiguées : l'administration de la protéine frataxine fusionnée avec un peptide pénétrant dans les cellules (11), l'induction de l'expression de la frataxine par la protéine TALE (Transcription activator-like effector) fusionnée avec VP64 et l'administration d'un AAV codant pour la frataxine (12). Une autre approche de la thérapie génique consiste à exciser la répétition du GAA avec une nucléase à doigt de zinc (13)

ou avec les technologies CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (14).

Enfin, il existe aussi certains médicaments qui peuvent empêcher la formation de boucles R (formation d'hybrides ARN/ADN), qui réduisent la transcription (15).

En plus du manque de traitement curatif, l'un des plus grands défis de l'étude de la FRDA est le développement des modèles animaux. Plusieurs essais de modèles murins de l'ataxie de Friedreich ont été proposés et nous pouvons les répartir en 4 grands groupes.

Le tout premier modèle est celui du Knock-out (KO) de la *Fxn* qui était létal au stade embryonnaire (16). Ensuite, des modèles de KO spécifiques à un organe particulier, à savoir le cœur (17) et le SNC (18), ont été proposés. Ces modèles ont présenté des phénotypes très sévères et moins généralisés que celui retrouvé chez le patient ataxique.

Puis est né le modèle transgène contenant un gène de la *FXN* humaine avec des expansions des triplets de GAA; ce sont entre autres les souris YG8R ou YG8sR avec des GAA allant de 90 à 200 (19). Bien qu'il contienne la mutation, il faut noter que ce modèle ne présente pas une symptomatologie proche du patient ataxique.

Au cours des derniers mois, un nouveau modèle de souris a été étudié, c'est le YG8JR qui contient plus de 800 GAA (20). Ce modèle est sur le plan génotypique le plus proche du patient ataxique, mais il manque de données sur le plan phénotypique. Il y a un autre modèle qui a été testé par Chandran et coll. qui utilise un shARN inducible par la doxycycline pour réprimer le gène de la frataxine (21). L'utilisation de ces souris est limitée aux études temporelles sur le knock-down de frataxine et du phénotype mais pas d'approches thérapeutiques ou encore d'études d'impact *in vivo* des répétitions GAA. Le shARN est un microARN en forme d'épingle qui interfère avec l'ARN messager d'une protéine pour réprimer la traduction de celui-ci.

Il est nécessaire d'avoir un modèle animal reproduisant les signes cliniques proches de ceux du patient ataxique qui permettra non seulement d'étudier la progression des signes, mais aussi de tester les thérapies et étudier la réversibilité des signes. Comme mentionné plus haut, les souris YG8sR présentent un phénotype léger par rapport aux patients ataxiques, notre étude a donc porté sur l'accentuation du phénotype des souris YG8sR à l'aide des shARNs ciblant le gène de la frataxine. Nous avons procédé aux tests d'efficacité et de sélection des shARNs *in vitro* dans les cellules HEK 293T et HeLa. Pour les tests *in vivo*, nous avons étudié plus attentivement 2 shARNs (shARN1

et shARN6). Nous avons obtenu une version améliorée du modèle YG8sR en administrant 1.2×10^{12} AAV-shARN1. Le phénotype obtenu est plus proche de l'ataxie de Friedreich.

Notre **hypothèse** est que le phénotype moins sévère chez les souris YG8sR est due à leur niveau de frataxine qui n'est pas assez bas. Nous nous sommes fixés comme **objectif général** d'intensifier le phénotype des souris YG8sR en utilisant un shARN ciblant le gène de la frataxine afin de baisser le taux de cette protéine. Les **3 objectifs spécifiques** de mon projet de recherche sont de :

1. Concevoir et construire les plasmides shARNs
2. Tester l'efficacité des plasmides shARNs construits pour réduire le taux de frataxine *in vitro* dans les cellules HeLa et HEK 293T
 - Transfection dans les cellules
 - Évaluation de la transfection
 - Extraction d'ARN messagers de la frataxine, de protéines
 - Test de RTqPCR pour la quantification des ARNm de la frataxine après transcription inverse.
 - Test ELISA pour la quantification du taux de frataxine
 - Choix du meilleur shARN pour les tests *in vivo*.
3. Évaluer le phénotype des souris avec les tests comportementaux après injection des shARNs.
 - Injection des souris YG8sR
 - Évaluation des courbes pondérales avant et après l'injection des AAV-shARN-mCherry.
 - Test de notched pour déceler les déficits subtils de la motricité et évaluer l'équilibre.
 - Test de T inverted comme le notched pour déceler les déficits subtils de la motricité et évaluer l'équilibre.
 - Test de parallel root floor pour évaluer les différences de coordination et motrices.
 - Test de Hanging pour évaluer la force musculaire.
 - Extraction d'ADN des organes des souris après sacrifice pour la détection de la présence du gène.

Ce travail a pour objectif de répondre à l'un des grands défis dans la recherche sur la FRDA en proposant un modèle reproduisant le phénotype de la maladie. Le modèle de souris transgéniques

YG8sR porte déjà des expansions des GAA qui le rapproche de l'humain. En baissant le taux de frataxine nous avons prévu avoir un modèle de souris présentant un phénotype plus accentué avec une perte de poids, un trouble de la coordination, un déficit moteur et une faiblesse musculaire. Avec cette étude nous avons voulu offrir une possibilité de faire des études plus poussées sur l'apparition des signes dans la FRDA. Pour les thérapies en cours de développement visant la supplémentation en frataxine humaine ou autre alternative comme la thérapie génique il permettra de faire les tests *in vivo* tout en suivant les modifications tant sur le plan phénotypique que génotypique.

Chapitre 1 : L'ataxie de Friedreich

L'ataxie de Friedreich est une pathologie héréditaire génétique rare, transmise par le mode autosomique récessif. Un gène se trouvant sur le chromosome 9 en est la cause. Ce gène contient l'information génétique nécessaire à la synthèse d'une protéine appelée frataxine composée de 216 acides aminés

1.1 Historique

L'ataxie de Friedreich tire son nom du Dr Nikolaus Friedreich (1825-1882). Il a présenté les résultats cliniques de patients atteints d'une anomalie génétique sévère du système nerveux qu'il a décrit dans cinq articles publiés au cours du 19ème siècle (4). Le Dr Friedreich a relevé les principales caractéristiques de la maladie et a précisé son caractère héréditaire puisque la plupart des signes cliniques apparaissaient avant la puberté. Il a aussi décrit la cardiomyopathie hypertrophique associée à la maladie. Cette atteinte cardiaque est reconnue de nos jours comme la majeure cause de décès imputable à l'ataxie de Friedreich.

Cent ans plus tard, Chamberlain et coll. (1988) ont découvert que l'altération génétique responsable de cette maladie se trouvait dans le bras long du chromosome 9 (22). Campuzano et coll. en 1996 ont réussi à identifier un gène, X25, codant pour une petite protéine de 210 acides aminés dans une région critique du locus FRDA chez un patient ataxique (23). Au-delà de cette découverte fondamentale, une relation étroite entre le nombre de répétitions GAA (soit 70 à 1 000 triplets de GAA chez les patients et 35 à 40 triplets chez les personnes non atteintes) et l'apparition des symptômes a été observée (24, 25). Il a aussi été noté que 98% des patients étaient homozygotes pour l'expansion de GAA et seulement environ 2 à 5 % des patients portaient une mutation ponctuelle dans le gène de la frataxine. La biologie structurale et la biochimie concernant cette protéine ont progressé de façon notable dans plusieurs directions au cours des deux dernières décennies. En particulier, au cours des dix dernières années, des découvertes extrêmement intéressantes ont permis de clarifier le rôle de la frataxine (26-31).

1.2 Le rôle de la frataxine

La frataxine est donc cruciale pour la survie cellulaire. Bien que la fonction exacte de cette protéine est encore peu claire, elle est impliquée dans diverses fonctions biologiques, telles que l'homéostasie du fer (32), la biosynthèse d'agrégat fer-soufre (ISC) (31), la protection contre le stress oxydatif et

l'apoptose. On sait très peu de choses sur la régulation moléculaire de l'expression de la frataxine : les inhibiteurs d'histone désacétylase, l'érythropoïétine, la cisplatine, l'acide 3-nitropropionique et l'hémine augmentent les niveaux de frataxine *in vitro*. En outre, des facteurs de transcription, comme le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR- γ) et le hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 α), régulent positivement l'expression de la frataxine (28, 33).

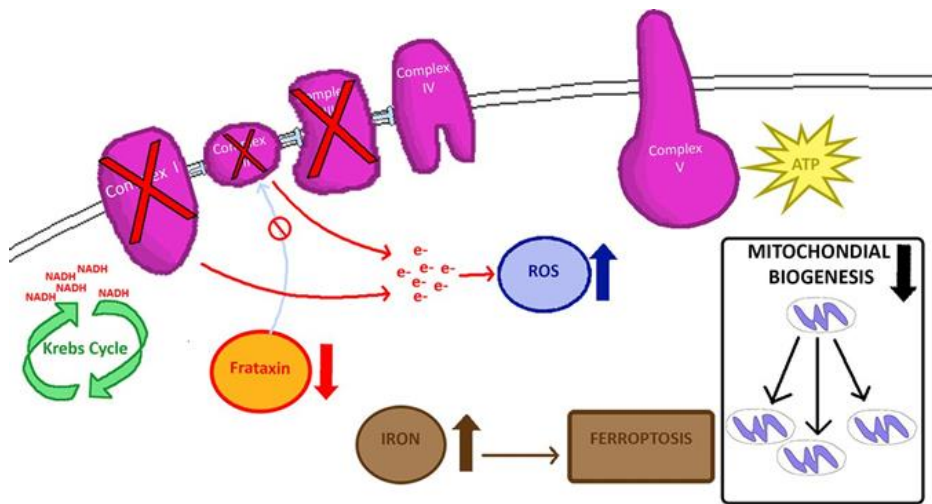


Figure 1: Image représentative de l'impact de la carence en FXN sur le complexe d'assemblage Fe-S (34).

Une carence en frataxine entraîne une perte de groupes Fe-S dans les complexes I, II et III avec une production de ROS (reactive oxygen species) en aval et d'autres événements en amont comme le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial, l'apoptose, l'accumulation de fer au niveau des mitochondries et la ferroptose (Figure 1).

La frataxine est impliquée dans l'assemblage du Complexe Fer-Soufre. Les amas de fer et de Fe-S sont essentiels aux processus métaboliques, notamment le transport d'électrons, la synthèse d'ADN, les réactions redox et non redox, ainsi que d'autres fonctions cellulaires (29, 35). La surexpression de la frataxine démontre le rôle crucial de cette protéine dans la conversion d'énergie mitochondriale et la phosphorylation oxydative, ainsi que dans la régulation du cycle de Krebs (36).

La frataxine interagit directement avec les sous-unités du complexe II, démontrant qu'elle soutient directement la chaîne de transport d'électrons en fournissant des complexes Fe-S (26, 37, 38). Les

biopsies endocardiques et myocardiques faites chez des patients FRDA montrent une diminution de l'activité des complexes I, II et III (27). Les modèles murins FRDA présentent dans leur cervelet un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative et une altération de la biogenèse mitochondriale dans les complexes de chaînes respiratoires I, II et IV (39). Ce complexe capture les radicaux libres qui sont des déchets d'oxydation provenant de la respiration cellulaire.

Quand il y a un manque de frataxine, la chaîne d'assemblage est arrêtée et le fer n'est pas lié avec le soufre, il n'y a donc pas de capture des radicaux libres, ce qui va accroître la toxicité au niveau cellulaire. On parle alors de « stress oxydatif ». Ces radicaux libres altèrent la fonction des mitochondries et empêchent la production de l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules. De plus, l'accumulation du fer dans la cellule entraîne sa mort, c'est ce qu'on appelle la ferroptose (40, 41).

La frataxine est une protéine indispensable au bon fonctionnement des tissus de certains organes. Elle est présente en très petite quantité chez une personne atteinte de FRDA.

1.3 Conséquence de la baisse de frataxine et apparition de la symptomatologie

La mutation par insertion des répétitions des triplets des nucléotides GAA entraîne systématiquement une expression réduite du gène *FXN* car la lecture du gène est perturbée par une barrière formée par cette mutation. Les malades ataxiques génèrent donc peu d'ARN messagers de frataxine. Ce ralentissement dans le mécanisme de la synthèse de la frataxine serait dû à la formation de boucles R, un complexe entre l'ARN messager (ARNm) et l'ADN (15). L'altération du gène *FXN* entraîne des faibles niveaux de frataxine. Cette baisse est responsable d'un dysfonctionnement mitochondrial (stress oxydatif).

Comme nous avons mentionné précédemment, la frataxine est impliquée dans l'activation et la régulation du complexe Fe-S et dans l'entrée du fer dans la mitochondrie. Ceci empêche donc la formation de radicaux libres dont la toxicité entraîne une dégénération cellulaire progressive en altérant la production d'énergie nécessaire à la survie cellulaire. En fait, la carence en frataxine chez l'homme affecte de manière critique la survie des grands neurones primaires des ganglions de la racine dorsale, des cardiomyocytes et des cellules β pancréatiques (42), ce qui explique les caractéristiques symptomatiques de la FRDA.

Les cellules humaines ayant le plus besoin d'énergie sont celles du SNC et du cœur. Ces deux tissus sont sévèrement touchés, le patient ataxique va donc présenter les symptômes décrits à la section 1.3.1.

1.3.1 Symptômes de la FRDA

Le cervelet et les voies sensibles profondes sont premièrement touchés. Le cervelet sert de médiateur de transmission entre le cerveau et les autres parties de l'organisme. Il intervient dans l'adaptation des postures et dans l'exécution des mouvements volontaires. Le recueil et la transmission des informations du niveau musculaire au cerveau sont permis par le cervelet.

- Des troubles progressifs de l'équilibre et de la coordination des mouvements sont à l'origine d'une succession de signes comme : une maladresse des gestes, une dégradation de l'écriture, une dysarthrie (91 %) et une difficulté croissante de la marche.

Les signes suivants sont aussi retrouvés à l'examen clinique (43-45) :

- Une perte des réflexes des membres inférieurs (87 %)
- Des troubles de la sensibilité (78 %)
- Un signe de Babinski, trouble du réflexe cutané du pied (79 %)
- Une faiblesse musculaire secondaire (67 %)
- Fréquemment une scoliose et des pieds creux (90 %)
- Une cardiomyopathie, atteinte du muscle cardiaque (63 %)
- Un risque plus élevé de diabète (32 % des cas)

1.3.2 Diagnostic de l'ataxie de Friedreich

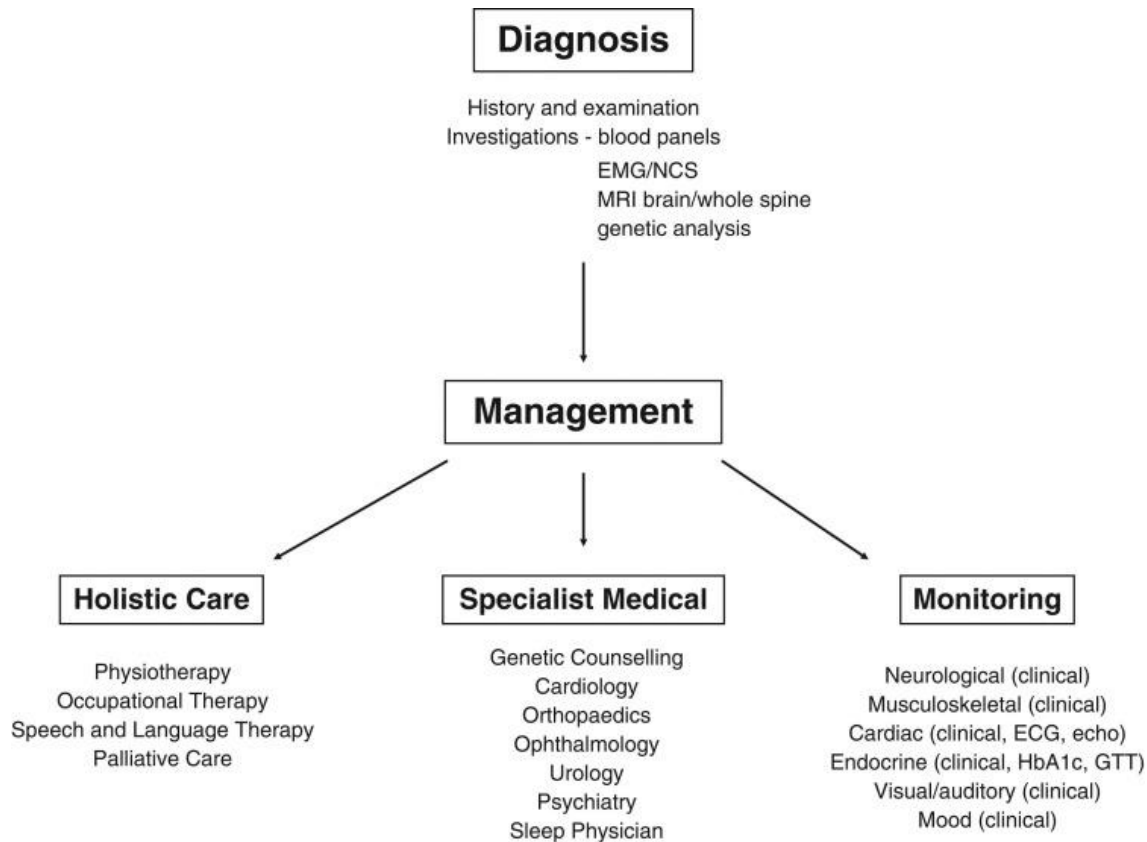


Figure 2: Organigramme pour le diagnostic et la prise en charge de l'ataxie de Friedreich (46).

Le diagnostic de la FRDA se fait habituellement dans un Centre Hospitalier Universitaire, par un généticien en coordination avec un neurologue. Tout débute par le recueil des antécédents médicaux et l'examen physique complet avec un examen neuromusculaire poussé qui permettront de détecter un mauvais équilibre, un manque de réflexes et un manque de sensation dans les articulations.

Pour l'investigation, une tomodensitométrie et une imagerie par résonance magnétique (IRM) du cerveau et de la moelle épinière sont nécessaires. Des radiographies régulières de la tête, de la colonne vertébrale et de la poitrine sont parfois nécessaires.

Les tests génétiques permettent de déceler l'anomalie dans le gène *FXN* qui code pour la frataxine. Une électromyographie et une étude de conduction nerveuse peuvent faire partie des examens demandés. Un examen ophtalmologique pour l'évaluation des dommages au niveau du nerf optique

ainsi que des échocardiogrammes et des électrocardiogrammes pour diagnostiquer les atteintes cardiaques font partie de la batterie d'examens complémentaires (44, 47).

1.5 Avancées thérapeutiques dans le domaine de recherche sur la FRDA

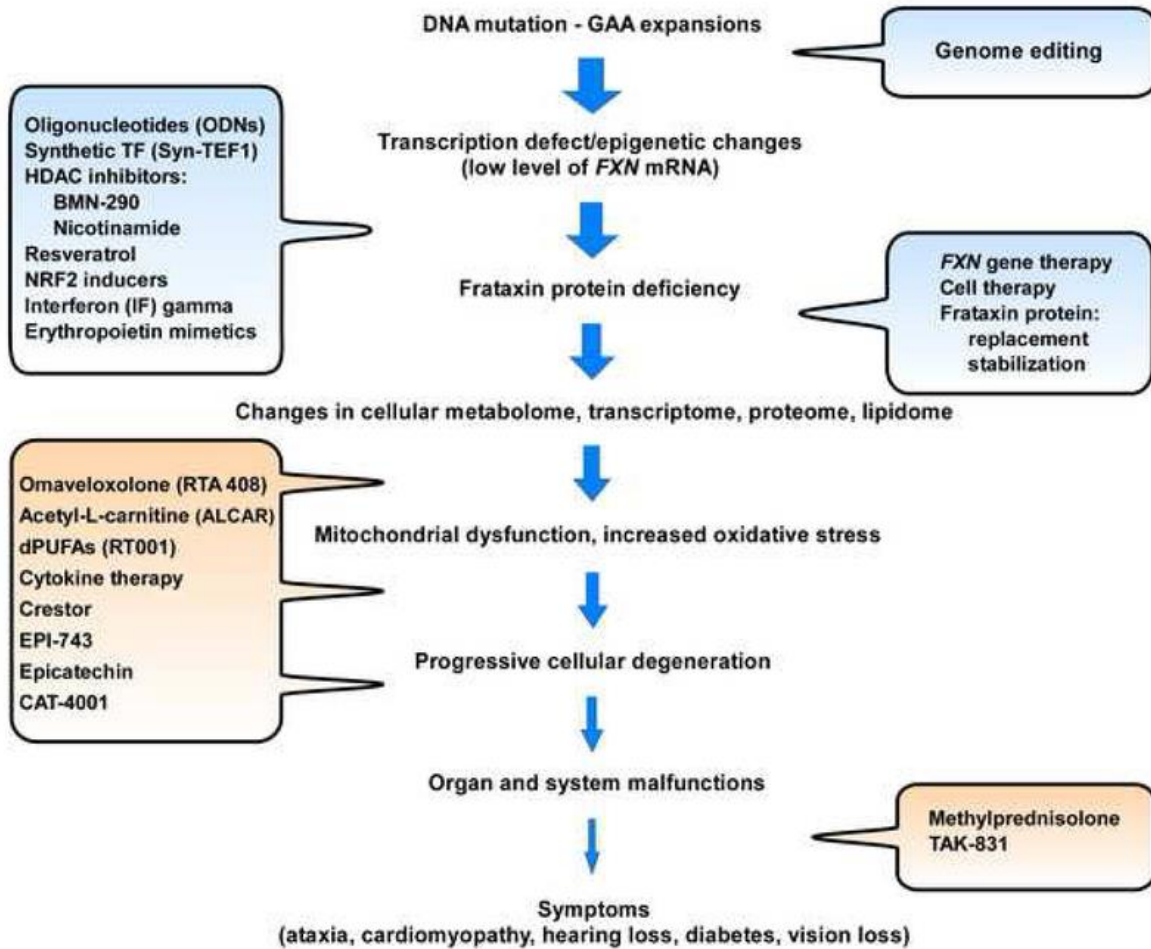


Figure 3: Les stratégies thérapeutiques à plusieurs niveaux pour la FRDA (10).

La figure 3 illustre de nombreuses manifestations de la FRDA, mettant en évidence des opportunités multiples et diverses d'interventions thérapeutiques (bulles de texte). Les stratégies visant à augmenter les niveaux de frataxine sont indiquées en bleu, tandis que les approches visant à diminuer les conséquences de la déficience en frataxine sont indiquées en orange.

Il n'existe pas d'options thérapeutiques qui permettent de guérir complètement ni même d'arrêter la progression. Plusieurs traitements potentiels sont cependant à l'essai. Nous pouvons classer ces thérapies en 3 grands groupes décrits aux sections 1.5.1 à 1.5.3.

1.5.1 Les thérapies visant l'augmentation des fonctions mitochondriales et la réduction du stress oxydatif

Plusieurs traitements permettent d'agir sur la fonction mitochondriale perturbée par le déficit en frataxine.

L'**EPI-743** est une molécule antioxydante qui cible la NADPH quinone oxydoréductase 1 (NQO1) pour améliorer le métabolisme énergétique cellulaire chez les patients atteints de la FRDA (48).

L'**épicatéchine**, un flavanol dont il a été démontré qu'il stimule la biogenèse des mitochondries et améliore le métabolisme chez les patients atteints de FRDA.

L'**acétyl-L-carnitine (ALCAR)** est un autre antioxydant étudié comme traitement de la FRDA. L'ALCAR est un dérivé de la L-carnitine, un transporteur intracellulaire d'acides gras. Reconnue pour la réversibilité des symptômes neurologiques par son efficacité de protection du système nerveux dans la FRDA (49).

Le **linoléate d'éthyle deutéré (RT001)** est un AGPI (acides gras polyinsaturés) deutéré pour contre-carrer les effets en aval du stress oxydatif après son introduction. Il s'est récemment révélé sûr et tolérable lors d'un essai clinique de phases I/II en double aveugle contrôlé par un placebo chez des adultes atteints de FRDA (essai clinique NCT02445794) (50).

Le **médicament omaveloxolone (RTA 408)** inhibe l'ubiquitination de NRF2 et protège les cellules neuronales isolées de modèles animaux de la FRDA ou les fibroblastes de peau de patients atteints de la FRDA contre les facteurs impliqués dans le stress oxydatif (51).

Thérapie à base de cytokines : fait référence aux traitements par le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) et le facteur de cellules souches (SCF) qui ont montré des effets bénéfiques contre la pathologie de la FRDA dans un modèle de souris, notamment une augmentation de l'ARNm et de la protéine frataxine, une amélioration de la fonction neurophysiologique, une augmentation du nombre de cellules souches neurales et une réduction de l'inflammation (52).

1.5.2 Les approches visant l'action sur le métabolisme de contrôle de la frataxine

Plusieurs types d'approches sont employées pour agir sur le métabolisme de contrôle de la frataxine, nous avons les plus connues qui sont les suivantes :

1.5.2.1 *Stabiliser, activer ou remplacer la frataxine*

Remplacement de la protéine frataxine par l'administration de protéines ou de peptides synthétiques capables de se localiser dans les mitochondries via des séquences spécifiques de ciblage des organites (11, 12).

1.5.2.2 *Thérapie génique*

La thérapie génique nécessite l'administration d'un virus Adeno-Associated Virus (AAV) porteur du gène *FXN* humain (11, 53). Elle a été testée dans deux modèles murins différents de FRDA, à la fois avant et après l'apparition de l'insuffisance cardiaque ou des dysfonctionnements neurologiques. La livraison de la protéine par AAV a été suffisante pour inhiber ou inverser respectivement et de façon complète la cardiomyopathie ou la neuropathie sensorielle (54, 55).

1.5.2.3 *Thérapie cellulaire*

La transplantation de moelle osseuse ou de cellules souches progénitrices hématopoïétiques a été démontrée comme une méthode pour améliorer plusieurs anomalies phénotypiques dans des modèles de souris FRDA (56).

1.5.2.4 *Stabilisation de la protéine frataxine*

L'administration de petites molécules conçues pour interférer avec les voies naturelles de dégradation de la protéine frataxine a entraîné une augmentation des niveaux intracellulaires de cette protéine (57).

1.5.3 Les médicaments visant à accroître l'expression du gène

Il est possible d'accroître l'expression de la protéine frataxine avec plusieurs classes de traitements telles que :

Inhibiteurs d'histone désacétylase (HDACi) : des petites molécules qui ciblent les enzymes répressifs modifiant la chromatine (58). Le BMN-290 et la nicotinamide (vitamine B3) (59, 60) sont tous deux étudiés dans le but d'augmenter la transcription du gène *FXN*.

Mimétiques de l'érythropoïétine : ce sont de petites molécules agonistes du récepteur de l'érythropoïétine. Elles augmentent les niveaux d'ARN messagers de la frataxine. Leur mécanisme d'action n'est pas encore bien défini (61).

Interféron gamma (IFN- γ) : il s'est avéré que cette cytokine impliquée dans la réponse immunitaire est capable de stimuler la transcription de la frataxine ou augmenter la stabilité de l'ARNm de la frataxine *in vitro* (62).

Inducteurs de NRF2 : suivant la corrélation entre les niveaux de frataxine et le NRF2 (63), il a été démontré que les inducteurs du NRF2 augmentent aussi l'expression de l'ARNm du gène *FXN* (45). L'interaction transcriptionnelle entre NRF2 et *FXN* n'est pas encore entièrement comprise.

Resvératrol : un composé naturel aux propriétés antioxydantes qui a été reconnu pour stimuler l'expression de la frataxine *in vitro* dans les cellules FRDA et dans des modèles de souris. Le mécanisme exact de cette régulation à la hausse n'a pas été élucidé (64).

CAT-4001 : développée comme traitement potentiel de la FRDA, c'est une petite molécule qui active NRF2 et inhibe NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) (10).

Crestor : un médicament ciblant la protéine ApoA1 (Apolipoprotéine A1), un composant du cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL). Le niveau d'ApoA1 est plus bas chez les patients FRDA que chez les témoins (étude clinique NCT02705547). Cependant, la signification et les conséquences potentielles de la diminution de l'ApoA-1 dans le FRDA sont actuellement inconnues.

À ces 3 grands groupes nous pouvons ajouter le groupe des traitements symptomatiques de support.

1.5.4 Les traitements symptomatiques de support

Quelques traitements sont aussi proposés dans le but d'alléger les symptômes des patients tels que :

TAK-831 : un inhibiteur de la D-amino-acide oxydase (DAAO) qui augmente les niveaux de D-sérine afin d'améliorer la coordination motrice et de soulager les symptômes neurologiques de la FRDA (65).

Méthylprednisolone : un stéroïde utilisé pour traiter la réponse inflammatoire secondaire détectée dans la FRDA (66).

1.6 Modèles murins de l'ataxie de Friedreich

1.6.1 Modèles de souris knockout à la frataxine

Le premier modèle proposé était le knockout complet à la frataxine qui était létal pour les embryons entre le 5^{ème} et le 6^{ème} jour, confirmant ainsi que la frataxine est une protéine indispensable voir même vitale (16).

La Dre Hélène Puccio et son équipe ont créé et caractérisé plusieurs modèles de souris knockout conditionnelles créées par le système de recombinaison Cre-LoxP pour générer un changement conditionnel du cadre de lecture dans l'exon 4 du gène de la frataxine de souris. Ainsi, quand la Cre recombinase est exprimée, la frataxine est éliminée dans les organes cibles. On retrouve chez ces modèles des phénotypes cardiaques et nerveux qui sont plus sévères que chez le patient ataxique car la frataxine est complètement supprimée dans les tissus concernés. Le KO conditionnel résulte d'un croisement entre les souris hétérozygotes pour l'allèle supprimé et portant un transgène Cre spécifique de l'organe, avec une souris homozygote pour l'allèle conditionnel. Nous avons deux modèles conditionnels : 1) le modèle cardiaque exprimant la Cre recombinase sous le promoteur du muscle squelettique MCK (MCK-Cre) et 2) le modèle neuronal exprimant la Cre recombinase sous le promoteur neuronal NSE (NSE-Cre) (17). Le modèle neurologique Prp-Cre-ERT^T quant à lui a été généré par un KO inducible par le tamoxifène. Deux lignées transgéniques exprimant la recombinase (Cre-ERT^T) ont été utilisées pour créer ce modèle (67). En 2018, Piguot et coll. ont créé un modèle *Pvalb* cKO qui présentait un phénotype du SNC plus rapproché de celui du patient ataxique (55). Ces modèles peuvent être utilisés pour les stratégies de thérapies visant la modification du gène *FXN* ou l'administration de protéines frataxine pour permettre de comprendre la physiopathologie de la FRDA dans les organes ciblés.

1.6.2 Souris avec des séquences GAA répétées insérées dans le gène *Fxn* de la souris.

Par recombinaison homologue, l'introduction des répétitions de GAA dans le gène *Fxn* chez la souris a permis de recréer la maladie plus fidèlement d'un point de vue moléculaire et génétique. Une séquence de 230 répétitions GAA obtenue d'un patient FRDA a été clonée dans le locus endogène de la souris. Le premier modèle, appelé KIKI (Knock-In Knock-In) a vu le jour. Il était homozygote à la séquence GAA insérée dans le gène de la frataxine (68). Ce modèle a présenté une réduction approximative de 25% du taux de frataxine. La taille de la répétition GAA s'est avérée

stable sur les 6 générations étudiées. Les souris homozygotes pour la mutation ciblée sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent aucune anomalie physique ou comportementale.

Afin d'accentuer la diminution de la frataxine, un croisement a été fait avec des souris *Fxn*^{+/-} pour générer le modèle KIKO (Knock-In Knock-Out) (*Fxn* (GAA) 230). Une diminution de 70% du taux de frataxine a été observée chez le modèle KIKO. Récemment, des modifications moléculaires et cellulaires importantes ont fait l'objet d'études (39), ainsi que certains troubles synaptiques dans le cervelet des souris KIKO (69). Ces troubles détectables avant les manifestations cliniques peuvent être considérées comme un modèle d'une phase précoce de la pathogenèse cérébelleuse de la FRDA. Des déficits neurocomportementaux ont été détectés par un examen approfondi des performances et ont donc permis de décrire un phénotype neurologique chez les souris KIKO à 9 mois de vie (18). Ainsi, ce modèle ratifie son utilité pour l'étude de l'efficacité de la thérapie de la FRDA.

1.6.2.1 *Le modèle transgène FXN YAC humaine (GAA)*

Les trois modèles de souris transgéniques YAC (YG8R, YG22R et YG8sR) présentent une diminution progressive de la coordination motrice et une instabilité somatique des répétitions GAA dans le cerveau, le cervelet et le foie avec un phénotype léger, ainsi qu'une intolérance au glucose et une hypersensibilité à l'insuline. Les souris dérivées de YG8 présentent une instabilité des répétitions GAA et le phénotype est limité. C'est cette instabilité des répétitions somatiques GAA qui entraîne des expansions et des contractions du nombre de répétitions du GAA d'une génération à l'autre (70). Les plus grandes déficiences des trois modèles testés se trouvent chez les souris YG8sR (19). Ces souris conviennent à l'étude des composés régulateurs de la frataxine et peuvent être utiles pour les composés qui agissent en aval de et, éventuellement, pour les stratégies de remplacement de la frataxine.

1.6.2.2 *Modèle YG8sR de Pook*

Ce modèle de souris transgénique *FXN* YAC humaine possède l'allèle KO de la frataxine de souris (*Fxn*⁻) et le transgène humain *FXN* YAC répété YG8 (YG8s). Le transgène YG8s présente une contraction de l'intégration du transgène YG8 d'origine dans une copie unique du gène *FXN* humain avec des trinuécléotides GAA. L'expansion des GAA chez ces souris est comprise entre 250 et 300. La létalité du KO complet de la frataxine est remédiée par l'expression du transgène YG8s qui modélise le phénotype de l'ataxie de Friedreich (19). Les souris homozygotes pour le KO et

hémizygotes pour le transgène YG8s portent la nomination de YG8sR. Par rapport à d'autres modèles de souris de sauvetage transgéniques YAC de *FXN* humaine, le modèle YG8sR exprime une frataxine humaine contractée, ce qui entraîne une déficience en *FXN* beaucoup plus importante. Cependant, elles sont viables et fertiles avec une espérance de vie normale. Contrairement aux souris YG8R, les souris YG8sR présentent des déficits de coordination, de comportement et de motricité, ainsi qu'une diminution de l'activité aconitase et une instabilité du GAA. Bien que tous ces modèles présentent un phénotype pathologique, celui-ci est plutôt léger (71). Une explication possible pourrait être le nombre réduit de répétitions par rapport au génome des patients humains qui permet de maintenir un taux de frataxine assez conséquent pour alléger les signes.

Ce problème est abordé par le modèle *Fxn^{null}*: YG8s (GAA)_{>800} ou YG8JR. Ces modèles de souris transgéniques hébergeant un allèle nul de la frataxine de souris (*Fxn^{null}*) et le transgène YAC humain à répétition unique de YG8s avec une taille de répétition GAA de >800, mais le phénotype de ce dernier n'a pas encore été documenté (20) hormis l'alopecie rapportée par The Jackson Laboratory.

1.6.4 Modèle de souris knock-down inductible de frataxine

1.6.4.1 Modèle de souris FRDAkd de l'Université de Californie à Los Angeles (UCLA).

Un modèle par intégration génomique d'une copie d'un transgène shARN ciblant la frataxine sous l'influence du promoteur H1 a été généré par Chandran et coll. Ce transgène est inductible par la doxycycline, c'est-à-dire que la frataxine est conditionnellement réduite par l'induction de l'expression du shARN par la doxycycline. Le phénotype retrouvé est similaire à celui des patients atteints de FRDA, notamment une hypertrophie cardiaque, une augmentation des protéines sensibles au fer, une neurodégénérescence, une neuropathie motrice, une scoliose et une ataxie (21). En effet, un shARN inductible interfère pour cliver ou détruire l'ARNm de la frataxine pour récapituler un phénotype de type FRDA.

La réversibilité des signes et la récupération des fonctions des organes lors du retrait de la doxycycline (augmentation des niveaux de la frataxine), ne sont pas encore complètement comprises sur le plan de la caractérisation moléculaire et physiologique. Ces modèles pourraient être utiles pour des stratégies thérapeutiques qui n'impliquent pas d'augmenter la frataxine endogène car ils ne présentent aucun génotype d'expansion de GAA pathologique (21).

Chapitre 2 : Les ARNs interférents

2.1 Découverte des ARNs interférents

Un phénomène particulier a été observé en 1993 chez les vers nématodes *Caenorhabditis elegans*. Chez ces vers, à la fin de leur stade larvaire, un petit ARN intervenait pour que la métamorphose soit complète surtout vers la fin du 1^{er} stade larvaire (72). Cet ARN court se fixant partiellement sur l'ARNm de la protéine Lin-14, inhibait sa synthèse pour permettre sa transition vers le stade 2. Ce microARN avait pour caractéristiques d'être court (21 nucléotides), d'inhiber la synthèse protéique et de jouer un rôle fondamental dans le contrôle de la séquence des phases du développement (73). Il a fallu la découverte dans les années 2000 de let-7 chez le même vers ainsi que celle des microARNs chez plusieurs espèces pour que se déclenchent des études sur la généralisation du mécanisme de régulation post-transcriptionnel (74). Les miARNs peuvent soit induire le clivage direct de l'ARNm cible, soit initier un processus beaucoup plus long caractérisé par une répression translationnelle et une répression post-transcriptionnelle par la désintégration de l'ARNm (75).

La première ligne de preuve implique que la biogenèse des miARNs et la maturation des ARNi reposent sur la même machinerie cellulaire. Par la suite, on a découvert que Dicer était responsable de la transformation des shARNs en siARNs (76). Cette première génération de shARNs (pre-miRNAs comme shARNs) était caractérisée par l'utilisation de promoteurs d'ARN polymérase III (Pol III). Cela a permis la synthèse précise de transcrits qui se sont repliés en structures en tige et boucle semblables à celles des pré-miARNs (77). L'imitation des structures des pri-miRNAs a ouvert la voie à la conception de la deuxième génération de shARNs (pri-miRNA-like shRNAs) pilotés par des promoteurs d'ARN polymérase II (Pol II) (78) .

2.2 Biogenèse et mécanisme d'action des ARNs interférents

Chez les mammifères, il existe deux voies de synthèse des ARN interférents. L'une de ces voies est endogène et l'autre exogène (79). L'interférence par ARN est un mécanisme intracellulaire déclenché par de petits ARNs qui incluent les petits ARN interférents (siRNAs), les microARNs (miARNs) et les ARNs en épingle à cheveux courts (shARNs).

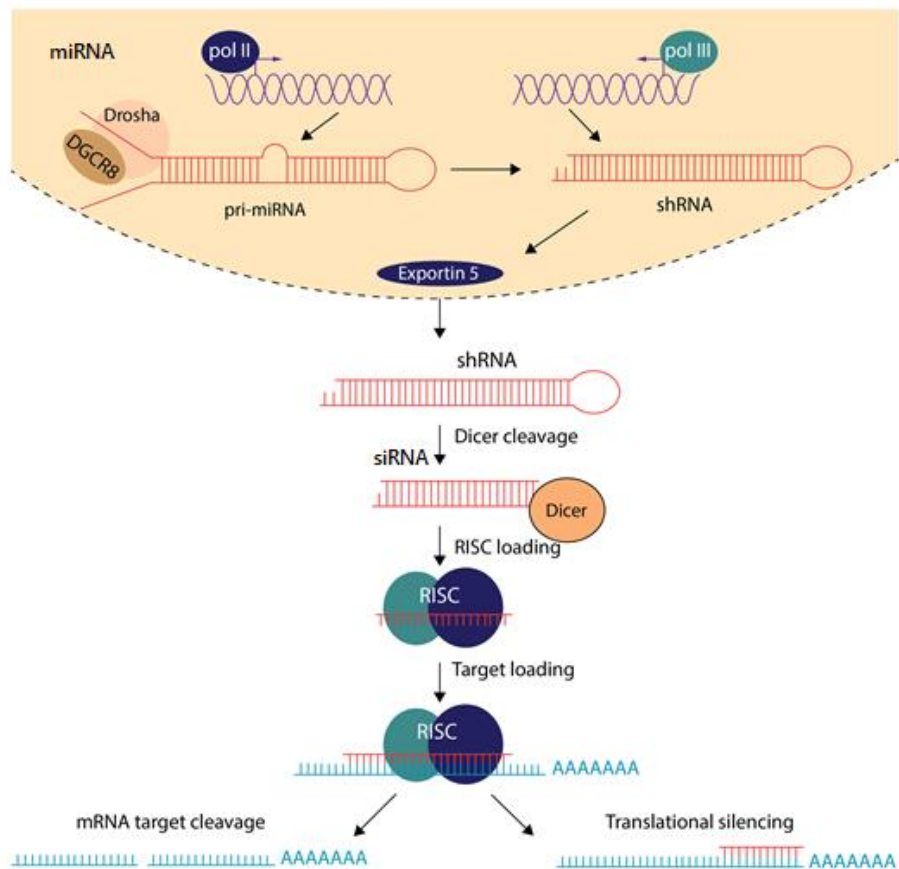


Figure 4: Biosynthèse et mécanisme d'action des ARNs interférents (80).

La voie des miARNs emprunte la voie endogène, elle commence lorsque les miRNAs (pre-miRNAs) sont transcrits à partir des promoteurs de l'ARN polymérase II (Pol II), formant des structures en épingle à cheveux. Celles-ci sont traitées par le complexe microprocesseur constitué de Drosha, donnant naissance à des précurseurs des miARNs (pre-miARNs). Ce sont également des structures en forme de tige avec un surplomb de 2 nucléotides (81). Les pré-miARNs sont transportés dans le

cytoplasme par l'exportine 5 (Exp5), où ils sont transformés en duplexes, des ARNs doubles brins imparfaits d'environ 21-25 nt par complexe contenant la protéine Dicer (82). Ce sont les dsARNs (double-strand RNA) qui constituent les miARNs matures (83). Une fois que le duplex de miARNs est traité, la séquence guide est chargée dans le complexe RNA Induced Silencing Complex (RISC). Cette séquence sert ensuite de médiateur pour la liaison à la séquence cible. D'une part, si la séquence guide du miARN est entièrement complémentaire avec son site cible, elle déclenche le clivage spécifique du site et la dégradation de l'ARNm par le domaine catalytique d'Argonaute 2 (AGO2). Cependant, si l'appariement des bases est incomplet, mais tout à fait complémentaire dans la région d'initiation (nucléotides 2 à 8 du miARN), il se produit une répression de l'expression de la protéine. Ce processus est souvent accompagné d'une dégradation de l'ARNm dans le processus de traitement cytoplasmique (84).

En imitant le mécanisme des miARNs, des constructions de vecteurs d'ADN synthétiques ou des particules virales codantes pour des shARNs stables sont produites. Ces shARNs sont transcrits à partir d'un promoteur de l'ARN polymérase II/III et forment des structures en épingle à cheveux. Ils sont transportés dans le cytoplasme par l'Exp5 et reconnus par la protéine Dicer. Ce mécanisme conduit à la formation de siARNs homologues à l'ARNm cible pour aboutir à la dégradation de l'ARNm (85, 86).

La voie des siARNs débute lorsque les dsARNs sont découpés par le complexe de Dicer en siARNs. Il est également possible d'introduire des siARNs synthétiques directement dans le cytoplasme de la cellule (87). Ces siARNs sont incorporés dans le RISC, où ils sont déroulés. Si le siARN présente une parfaite complémentarité avec la séquence de l'ARNm, la protéine AGO2 présente dans le RISC clive le brin passager (sens). Ce clivage est effectué par le domaine catalytique d'AGO2 (88).

2.3 Rôle des ARN interférents

On peut utiliser les miARNs pour la lutte contre les maladies sur le plan diagnostique, pronostic et thérapeutique.

2.3.1 Intérêt des microARNs comme outils diagnostiques

Les microARNs peuvent être ciblés et utilisés comme biomarqueurs. L'une des principales caractéristiques des miARNs est leurs grandes efficacité et spécificité pour la distinction tissulaire et tumorale. Ces propriétés confirment leur implication dans le développement des organes chez les

espèces. On peut les retrouver dans plusieurs liquides biologiques ayant chacun une signature spécifique. Ils sont plus facilement identifiables comme biomarqueurs que les ARN messagers et ont une bonne stabilité extracellulaire. Les miARNs sont en effet des molécules très stables et leurs profils d'expression sont stables. De grandes analyses rétrospectives dans les échantillons avec les tissus conservés ou archivés peuvent être faites grâce à leur grande stabilité. Des techniques conventionnelles de qPCR ou d'hybridation permettent de les visualiser au niveau cellulaire (89)

2.3.2 Intérêt des microARNs comme outils pronostiques

Grâce à leur stabilité, de véritables “signatures” cancéreuses peuvent être établies. Elles permettent d'explorer de nouvelles classifications des cancers et la mise en évidence de nouveaux facteurs pronostiques. Les miARNs sont devenus des biomarqueurs hautement spécifiques aux tissus. Ils sont connus pour jouer un rôle important dans la différenciation pendant le développement et ont été liés au développement de malignités spécifiques. Ils apparaissent non seulement comme des candidats prometteurs contribuant à un algorithme de classification biologique, mais sont aussi pilotés pour identifier le tissu d'origine du cancer. La détection des microARNs permet de classifier les tumeurs selon leur pronostic, car plusieurs d'entre eux sont impliqués dans le processus métastatique (90).

2.3.3 Intérêt des microARNs comme outils thérapeutiques

Les miARNs sont des cibles thérapeutiques potentielles. L'altération d'expression de certains miARNs au cours du cancer a permis l'exploration de nouvelles approches permettant de l'utiliser comme stratégie thérapeutique dans plusieurs maladies, soit en contrôlant l'expression des microARNs, comme thérapie combinatoire ou en modulant les microARNs pour rendre les cellules tumorales plus sensibles à l'expression d'un miARN au cours de l'oncogenèse. L'avantage est que par leur stabilité, ils peuvent se présenter sous plusieurs formes : vaccins pour la prophylaxie, produits pharmaceutiques et même en thérapie génique (91).

Les avancées dans le domaine des ARN interférents ont permis l'utilisation du shARN comme un outil prometteur en thérapie génique. Actuellement, plusieurs formulations médicamenteuses (shARNs) font l'objet d'essais cliniques de phases I et II pour le traitement de tumeurs solides et de l'hépatite C (clinical trials.gov 2016). Le criblage génétique par perte de fonction est une autre application répandue des shARNs (78).

Pour permettre la réalisation des knockdowns efficaces pour chaque gène, des bibliothèques couvrant plus de 15 000 gènes chez l'homme et la souris ont été conçues par The RNAi Consortium (TRC) (92).

Dans la même optique, les shARNs sont utilisés pour produire les modèles animaux comme dans notre étude actuelle.

2.4 Conception optimale de shARNs

Le domaine des shARNs demeure confronté à de nombreux défis. Une efficacité d'élimination insatisfaisante et une augmentation des effets hors cible continuent d'être des obstacles à ces applications. Ces inconvénients sont souvent liés à des défauts de conception. Les nouvelles avancées dans la compréhension de la biogenèse des miARNs ne sont pas toujours prises en compte dans de nombreuses conceptions de shARNs. Selon la compréhension de la biogenèse des shARNs nous distinguons 3 différents types de shARNs selon leur conception. Il y a les shARNs de 1^{re} génération qui sont les Pre-miRNA-like shARNs, la deuxième génération est constituée de Pri-miRNA-like shARNs et la troisième génération concerne les Ago-shARNs (93).

2.4.2 Les différents types de shARNs selon leur structure

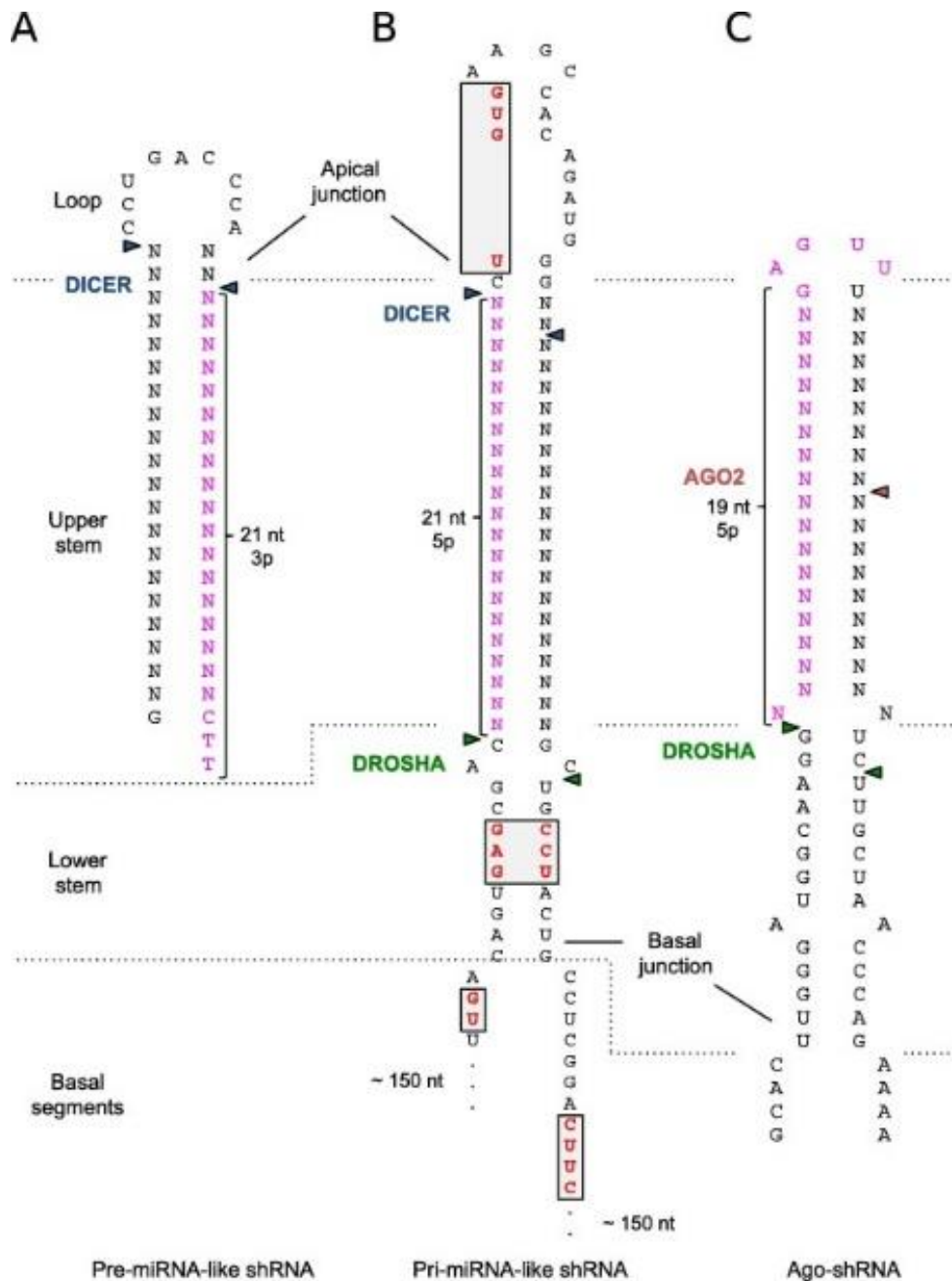


Figure 5: Structures impliquées dans les divers modèles de shARNs (93).

Les triangles indiquent les sites de clivage des ARN polymérases intervenant dans le processus de maturation. L'emplacement de la séquence guide du shARN est surligné en rose et les motifs sont écrits en rouge dans la boîte grise.

A. *Pre-miARN-like shARN* "première génération", sa conception dérive de la compréhension de la biogenèse pre-miR-22.

B. *Pri-miARN-like shARN* "deuxième génération", prend son origine du pri-miR-3a (notez les régions flanquantes 5' et 3' incomplètes).

C. *Ago-shARN* synthétisé sur la base de la biogenèse de miR-451.

Chaque type de shARN discuté ici a ses avantages et ses inconvénients. Néanmoins, le shARN de type pré-miARN piloté par la Pol III est plus répandu et davantage approuvé que les autres. Les détails de son traitement sont bien caractérisés.

Tableau 1:Récapitulatif des différents shARNs et leurs caractéristiques(93)

| Design | Structure | Promoteur | Dépend de Drosha | Dépend de Dicer | Avantages | Inconvénients |
|-------------------------------------|-----------|------------|------------------|-----------------|---|--|
| Pre-miRNA de type "1ère génération" | Pré-ARNi | Pol III | X | ✓ | Système bien caractérisé. | Compétition avec la voie des miARNs endogènes. Manque de spécificité avec le promoteur. |
| Pri-miRNA-like "2e génération" | Pri-miRNA | Pol II/III | ✓ | ✓ | Spécificité potentielle du type de cellule en fonction du promoteur. | Traitement compliqué. |
| Ago-shRNA "3e génération" | miR-451 | Pol II/III | ✓ | X | Le brin guide est chargé dans AGO2. Limite les effets hors cible du brin passager. | Activités 3'-5' exonucléolytiques variables (23-26 nt matures). |

Le tableau 1 résume les différents shARNs avec leurs caractéristiques.

La 1ère génération des shARNs concerne les pré-miARNs. Le promoteur approprié pour cette catégorie de shARNs est la polymérase III. La biosynthèse de cette génération ne fait pas appel à la protéine Drosha mais dépend de la protéine Dicer. Leur avantage est qu'ils sont bien caractérisés, cependant, ils entrent en compétition avec la voie des miARNs endogènes et manquent de spécificité avec leur promoteur (94).

La 2^e génération est constituée des pri-miARNs. Ils peuvent être sous l'influence de la polymérase II ou III. Leur biosynthèse implique le Drosha et le Dicer. Ils ont l'avantage d'avoir une spécificité potentielle dépendant du type cellulaire en fonction du promoteur, mais sont difficiles à traiter (95, 96).

Les Ago-shARNs sont de la 3^e génération. Ils sont conçus sur la base de la biogenèse de miR-451 et peuvent fonctionner sous l'influence des deux polymérases (II/III) comme ceux de la 2^e génération. Ils ont cet avantage que le brin guide est chargé dans AGO2 ce qui limite les effets hors cible, mais ont une activité exonucléolytique variable (97).

2.4.3 Localisation du site ciblé

Chez les animaux, les sites ciblés par les miARNs sont souvent localisés dans la région 3' non traduite (3' UTR). Cela est dû au fait que pendant la traduction, les ribosomes en progression interfèrent avec la faible liaison entre le RISC et sa séquence cible dans la région codante (98)

Au contraire, le RISC induit par siARN clive transitoirement l'ARNm, qui est moins affecté par les mécanismes de traduction. Ainsi, le shARN peut être conçu pour avoir une parfaite complémentarité pour cibler n'importe quelle partie de la séquence de l'ARNm.

Un autre facteur à prendre en considération est la spécificité de la séquence ciblée. Comme de nombreux ARNm d'une même famille de gènes partagent des séquences similaires, une attention particulière doit être apportée à la sélection de la séquence ciblée pour permettre une répression spécifique du gène. Par ailleurs, le ciblage d'une séquence consensus est une bonne stratégie pour réprimer l'expression de toute la famille de gènes. En outre, l'épissage alternatif et la sélection du site polyA génèrent des isoformes d'ARNm. Pour obtenir un knockdown complet de l'expression du gène, le shARN doit cibler des séquences partagées par toutes les isoformes (93).

2.4.4 Le choix du promoteur

Le point de départ pour concevoir un shARN consiste à sélectionner une cassette d'expression. Comme d'autres produits génétiques, le shARN peut être transcrit par tout promoteur dans des vecteurs d'expression commerciaux. Cependant, en raison de leur nature non codante, certaines considérations doivent être prises en compte afin de permettre aux transcrits de se plier en structures correctes, ce qui facilite leur reconnaissance et leur traitement par la machinerie de biogenèse des miARNs. Les promoteurs de Pol III initient la transcription à une position spécifique (23 nt de la boîte TATA) et l'aboutissent dans une piste thymidine (T). Cette caractéristique unique le rend idéal pour exprimer des séquences précises de shARNs du type pré-miARN.

Les promoteurs de Pol II sont cependant couplés avec un traitement post-transcriptionnel (capsulage et adjonction de polyA) et sont donc incapables d'effectuer une telle tâche. Il convient de noter que les promoteurs de Pol III présentent généralement une forte préférence pour l'initiation de la transcription avec une purine. Afin d'accommoder cette préférence, le premier nucléotide de shARN piloté par Pol III doit être G ou A (99). Le promoteur Pol III le plus utilisé est U6 (100, 101), suivi par H1 (100) ou 7SK (102). Bien que H1 puisse initier la transcription avec une pyrimidine ou une purine, la fidélité à la position de démarrage est moins précise (99). Au contraire, le promoteur U6 est reconnu

pour sa robustesse et son démarrage plus précis. Ainsi, les shARNs dirigés par U6 sont plus puissants, par rapport à ceux transcrits par Pol II dépendant de la lignée cellulaire (103-105).

2.4.5 Vecteurs utilisés pour la livraison des shARNs

L'approche la plus simple et la plus directe pour des expériences avec des shARNs se fait par l'utilisation de vecteurs plasmidiques. Comme les siARNs synthétiques, leur utilisation *in vitro* est extrêmement répandue et repose sur une seule condition fondamentale qui est la bonne réponse de la lignée cellulaire à la transfection (106).

Il existe une multitude de plasmides ARNi qui peuvent être sélectionnés en fonction des besoins expérimentaux spécifiques, y compris les vecteurs de clonage des shARNs disponibles commercialement et les bibliothèques de shARNs (106).

Cependant, la première utilisation de shARNs *in vivo* a consisté en l'injection par le mécanisme hydrodynamique des vecteurs plasmidiques qui exprimaient des shARNs anti-hépatite C (HCV) dans les veines de la queue de souris (107). La même approche a été utilisée pour inhiber la réplication de l'hépatite B (108). Il est évident que l'impact de ces expériences a été exceptionnel, mais l'application de cette approche est principalement limitée aux études de l'ARNi dans le foie et n'est donc pas très utile pour d'autres organes.

Ces nombreuses limitations de livraison des shARNs par les vecteurs plasmidiques peuvent être remédiées par l'utilisation du système de vecteurs viraux, notamment quand les lignées cellulaires sont difficiles à transfecter et pour une livraison généralisée *in vivo* (85).

Des vecteurs viraux ont été mis au point et appartiennent à deux classes principales : les virus à ARN (tels que les rétrovirus et les lentivirus), qui peuvent s'intégrer dans les chromosomes de la cellule hôte et les virus à ADN (tels que les adénovirus, les virus adéno-associés (AAV) et les herpès virus (HSV)), qui persistent généralement sous forme d'épisomes (20).

Les AAVs permettent de transférer une petite taille d'ADN (4kb) sans intégration dans l'ADN de la cellule cible. Cela permet d'éviter une insertion non contrôlée qui pourrait perturber la fonction cellulaire (109). Ce type de virus nécessite des titres élevés et leur production est complexe. Les AAVs induisent la synthèse des anticorps neutralisants. La configuration moléculaire des AAVs repose sur plusieurs facteurs nécessaires pour leur bon fonctionnement. Ils sont très efficaces pour transduire les cellules

post-mitotiques, déclenchent une réponse immunitaire modérée à la première exposition et peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (110).

2.4.5.1 Le choix du virus adéno-associé

Ils existent plusieurs sérotypes d'AAVs qui sont utilisés pour la livraison des gènes. Les vecteurs AAVs présentent plusieurs avantages.

Tableau 2: Tropisme naturel des AAVs(20).

| Sérotypes | Tropisme |
|-----------|---|
| AAV 1 | SNC, muscle squelettique |
| AAV 2 | SNC, reins et rétine |
| AAV 3 | Foie |
| AAV 4 | SNC, cœur, poumons |
| AAV 5 | SNC, rétine |
| AAV 6 | Muscle squelettique, cœur, pancréas |
| AAV 7 | Muscle squelettique, cœur, foie, rétine |
| AAV 8 | Muscle squelettique, cœur, pancréas, foie, rétine |
| AAV 9 | Muscle squelettique, cœur, reins, poumons, foie, rétine |
| AAV 10 | SNC, iléon, tissus lymphatiques |
| AAV 11 | Iléon, tissus lymphatique |
| AAVrh10 | SNC, muscle squelettique, cœur |

Les sérotypes d'AAVs diffèrent par les acides aminés dans leur capsid. Chaque sérotype a un tropisme spécifique et il est important de choisir le sérotype approprié en fonction du tissu ciblé. Pour

le SNC, AAV9 et AAVrh10 ont montré une plus large biodistribution dans le cerveau et la moelle épinière. Ces deux sérotypes sont en essais cliniques dans plusieurs maladies neurologiques (20).

Dernièrement le AAV-PHP.B a été découvert. C'est une variante de l'AAV9 avec une insertion d'acides aminés (un heptamère) dans la séquence de sa capsid. Ce sérotype a un tropisme amélioré pour le SNC (neurotrope) car il a la capacité de traverser la BHE après une administration intraveineuse chez des souris adultes C57BL/6J (111).

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1 Constructions des plasmides shARNs

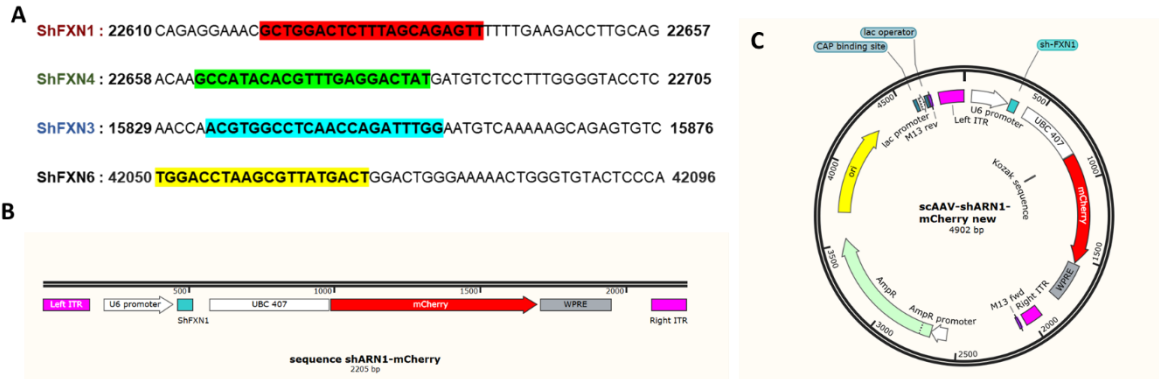


Figure 6: Description de la construction des plasmides.

A : sites de complémentarité des shARNs avec le gène de la FXN (le site shARN1 est en rouge, le shARN4 en vert, le shARN3 en bleu et le shARN6 en jaune). Les numéros au début et à la fin de chaque ligne indiquent la position de la séquence sur le gène de la FXN ; **B :** exemple d'une séquence comprenant un shARN (shARN1) en vert, sous le promoteur U6 en blanc, le gène de mCherry en rouge sous le promoteur UBC 407 en blanc et le WREP (Woodchuck Hepatitis Virus Post transcriptional Regulatory Element). Tous ces éléments sont insérés entre deux ITRs (left et right) en violet magenta. **C :** le plasmide scAAV-shARN-mCherry construit.

La sélection des séquences des shARNs cibles pour le gène de la FXN a été faite en utilisant le logiciel Snppgene.

Nous avons sélectionné le site de complémentarité de shARN1 et shARN4 sur l'exon 3 du gène FXN respectivement en position 22610-22657 pour le shARN1 et en position 22658-22705 pour le shARN4. Le site de complémentarité du shARN3 se situe en position 15829-15876 sur l'exon 2. Et le shARN6 en position 42050-42096 sur l'exon 5 (Figure 6 A).

Remarque : Le 5^{ème} shARN construit est le sh-scramble. Ce dernier est un assemblage des mêmes nucléotides mélangés de manière qu'il n'y ait aucune complémentarité sur le gène de la FXN ainsi que le génome de la souris.

Nous avons procédé au design des différents shARNs en suivant les étapes ci-dessous :

- a) Construction du brin sens en ajoutant 5 T à la fin de la séquence du shARN (Passenger-Loop-Guide-5T).
- b) Conception du brin sens en réalisant la complémentarité inverse du brin sens.
- c) Ajout du GATC à l'extrémité 5' du brin sens.
- d) Ajout du GTAC à l'extrémité 3' du brin sens.

Une fois le design fait, nous avons alors commandé des oligos chez IDT(Integrated DNA Technologies).

Toute la séquence composée du promoteur U6-shARN-promoteur UBC 407-mCherry (Figure 6B) a été construite par alignement des oligos et ligation. Une fois notre séquence prête, nous avons procédé au clonage.

La séquence a été clonée entre deux ITRs (Figure 6B) dans le plasmide pscAAV-GFP (fourni gracieusement par le Dr John T Gray (plasmide #32396; <http://n2t.net/addgene:32396>; RRID: Addgene_32396) de chez Addgene (Figure 6C).

Nous avons utilisé les enzymes de restriction AvrII et MfeI pour retirer le gène de la GFP qui était sous le promoteur CMV.

1. Pour la digestion, nous avons pris 5 µg du plasmide initial pscAAV-GFP. Nous avons procédé à la digestion avec deux enzymes de restriction à raison de 1 µL de AvrII (5 000 unités/mL) et 1 µL de MfeI-HF (20 000 unités/mL) avec 2.5 µL de tampon CutSmart et 15.5 µL d'eau distillée. L'incubation a été faite pendant 1 h à 37°C. Nous avons vérifié l'efficacité de la digestion par migration sur un gel d'agarose et purifié le vecteur linéarisé.

La purification sur colonne a été faite avec la trousse EZ-10 Spin Column PCR Product Purification Kit (Bio Basic inc., Markham, ON).

2. L'alignement des oligos a été obtenu en associant 7 µL d'eau distillée, 1 µL d'oligo 1 (brin sens) à une concentration de 100 µM, 1 µL d'oligo 2 (100 µM) et 1 µL de tampon 10X T4 ligation buffer (New England BioLabs (NEB) Ltd. Massachusetts. USA). Le thermocycleur était réglé à 95°C pendant 5 min puis une décroissance de 5°C/min pour atteindre 25 °C ensuite. Nous avons procédé à la dilution dans de l'eau sans nucléase de nos oligos alignés à raison de 1:200.

3. La ligation a été faite en mélangeant 1 µL de 10X T4 ligation buffer, x µL de plasmide linéarisé 100 ng (x µL représente un volume variable de plasmide dépendamment de la concentration obtenue

après purification), 2 μL d'oligo dilué, 0.5 μL de T4 ligase (New England BioLabs (NEB) Ltd. Massachusetts. USA) et 10 μL d'eau distillée. Le tout est laissé à température ambiante pendant 1 h. La ligase a été inactivée à 65°C pendant 10 min.

Nous avons ensuite procédé à la transformation de nos plasmides dans les bactéries compétentes. Il y a dans le plasmide un gène de résistance à l'ampicilline.

4. Nous avons procédé à la transformation dans les bactéries compétentes en suivant les étapes ci-dessous :

- Les boîtes de Pétri ont été mises à 37 °C pour les sécher.
- L'ADN est ajouté au tube de bactéries compétentes (1 μL d'ADN pour 10 μL de bactéries compétentes).
- Incubation à 4°C (sur glace) pendant 30 min.
- Choc thermique à 42 °C pendant 45 sec.
- Ajout de milieu LB (*lysogeny broth* ou Luria-Bertani) pour un volume final de 1 mL.
- Incubation à 37 °C pendant 45 min puis 4°C pendant 2 min.
- Étalement de 100 μL qui représente le 1/10 de la solution de culture sur les boîtes de Pétri contenant de l'ampicilline.
- Centrifugation 3 500 rpm pendant 5 min.
- Retrait du surplus de surnageant pour laisser seulement 100 μL sur les 900 μL de quantité de LB restant.
- Suspension des bactéries par des « up and down » dans les 100 μL de surnageant.
- Étalement des 100 μL de bactéries mélangées au milieu sur une autre boîte de Pétri. Ce mélange représente le 9/10 de la solution de culture.
- Incubation à 37°C pendant 16h.

5. La sélection des colonies et la production des plasmides par des mini-preps ont été réalisées. Une fois les plasmides obtenus, le séquençage a été fait par la plateforme de séquençage Sanger du CRCHUQ.

Nous avons procédé au test d'efficacité dans les cellules HeLa et HEK 293T.

3.2 Test *in vitro* des shARNs dans les cellules HeLa et HEK 293T

Après la mise en culture des cellules, nous avons compté et réparti 50 000 cellules par puits sur des plaques de 24 puits. Les transfections des deux lignées cellulaires (cellules HEK 293T et cellules HeLa) ont été faites à l'aide de 1 μ L de Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA USA) avec les différents plasmides codant pour un shARN et pour mCherry (scAAV-shARN-mCherry) seul ou en combinaison. La construction de ce plasmide est décrite à la section précédente. Les cellules ont été collectées après 72 h, les ARNm et les protéines ont été extraits. La fluorescence de mCherry a été utilisée pour évaluer le succès de la transfection en faisant le rapport du nombre de cellules rouges sur le nombre total de cellules. L'ARNm a été quantifié par RTqPCR et le niveau de protéines a été mesuré par des tests ELISA. Ces tests *in vitro* nous ont permis de sélectionner les meilleurs shARNs susceptibles de réduire la frataxine *in vivo*.

3.2.1 Isolation de l'ARN messenger avec du TRIZOL

Du Trizol (Sigma-Aldrich Inc., St-Louis, MO, USA) a été ajouté aux tubes contenant les cellules à raison de 1 mL de Trizol par tube. Chaque tube contenait les cellules d'un puits (50 000 cellules initialement). Le contenu des tubes a été bien mélangé et incubé pendant 5 min entre 15 et 30 °C. La séparation des phases a été faite en ajoutant 0,2 mL de chloroforme pour chaque mL de Trizol utilisé. Les phases aqueuses après centrifugation à 1 200 g pendant 15 min (2-8 °C) ont été transférées dans de nouveaux tubes et précipitées avec de l'alcool isopropylique à raison de 0,5 mL par mL de Trizol initialement utilisé. Les culots obtenus par centrifugation à 1 200 g pendant 10 min ont été lavés avec de l'éthanol à 75 % à température ambiante. Les culots ont ensuite été séchés et re-dissous dans de l'eau sans nucléase et analysés au spectromètre. Un rapport de l'absorbance 260/280 entre 1,6 et 1,8 est souhaité. L'intégrité des ARNs est évaluée par le Qubit (Qubit™ 4 Fluorometer Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2.2 Vérification de l'intégrité des ARNm extraits

Nous avons suivi les recommandations du protocole de Qubit™ RNA IQ Assay Kits Catalog No. Q33221, Q33222. Le test Qubit™ RNA IQ Assay nécessite 3 standards d'étalonnage.

Les caractéristiques des tubes PCR recommandés sont à paroi mince, transparents, de 0,5 mL indépendamment de la compagnie. Les tubes acceptables sont les tubes d'essai Qubit™.

Nous avons commencé par étiqueter les couvercles des tubes. La solution de travail a été préparée en diluant le réactif Qubit™ RNA IQ 1:200 dans le tampon Qubit™ RNA IQ dans un tube en plastique propre. Le volume final dans chaque tube était de 200 µL. Chaque tube de standard a nécessité 190 µL de solution de travail Qubit™ et chaque tube d'échantillon a nécessité entre 180 et 199 µL. Pour 4 échantillons et 3 standards, nous avons préparé suffisamment de la solution de travail pour les échantillons et 200 µL par tube pour 7 tubes nécessite 1 400 µL de solution de travail (7 µL de réactif Qubit™ plus 1 393 µL de solution de tampon Qubit). Nous avons ajouté 190 µL de solution de travail Qubit™ à chacun des tubes standards qui étaient utilisés pour l'étalonnage. Toutes nos solutions ont été manipulées dans un environnement propre et exempt de nucléases. Après avoir ajouté 10 µL de chaque solution d'étalonnage Qubit™ dans le tube approprié, nous avons mélangé au vortex 2 à 3 sec sans créer de bulles. La solution de travail Qubit™ a été ajoutée dans les tubes d'échantillons de façon que le volume final dans chaque tube après l'ajout de l'échantillon soit de 200 µL.

Le volume de notre échantillon d'ARN était compris entre 1 et 20 µL. Le tableau 3 indique la gamme de concentrations appropriées pour différents volumes d'échantillon. Nous avons ajusté un volume correspondant de solution de travail Qubit™ à chaque tube test, soit entre 180 et 199 µL.

Tableau 3: Concentration recommandée pour l'échantillon en fonction du volume de l'échantillon.

| Volume des échantillons | Intervalle de concentrations |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| 1.0 µL | 500 ng/µL–1 500 ng/µL |
| 2.0 µL | 250 ng/µL–750 ng/µL |
| 5.0 µL | 100 ng/µL–300 ng/µL |
| 10.0 µL | 50 ng/µL–150 ng/µL |
| 15.0 µL | 33 ng/µL–100 ng/µL |
| 20.0 µL | 25 ng/µL–75 ng/µL |

Une fois les solutions prêtes, nous avons sélectionné sur l'écran du fluorimètre la mesure de l'intégrité de l'ARN. Après la lecture réussie des tubes d'étalonnage un par un, nous sommes passés à la lecture des échantillons. L'étalonnage du fluorimètre Qubit™ 4 exige que les 3 tubes de standards soient insérés dans l'instrument dans le bon ordre. L'instrument effectue plusieurs vérifications des standards pendant l'étalonnage, afin de s'assurer que les procédures d'étalonnage appropriées sont suivies.

À l'intérieur du cercle se trouve un affichage graphique des résultats : bleu pour un QI ARN = 10, tandis que le cercle entier sera orange pour un QI ARN de 0. La valeur inférieure indique la composition de votre échantillon d'ARNs en pourcentage d'ARN de grandes tailles (complets) ou en pourcentage d'ARNs de petites tailles (dégradés).

3.2.3 Test RTqPCR pour la quantification de l'ARNm de la frataxine

3.2.3.1 *Transcription inverse*

Une fois l'ARN extrait, nous avons procédé à la transcription inverse pour obtenir l'ADN complémentaire (ADNc). Nous avons débuté notre expérience avec 2 µg d'ARN extrait pour chaque échantillon. La digestion de l'ADN a été faite avec 1 µL d'ADN polymérase I et 2 µL du tampon 10X (500 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 25 °C), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT) de chez Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). La quantité d'eau rajoutée permet d'obtenir un volume total de 20 µL. Nous

avons ensuite procédé à l'incubation pendant 1 h à 25 °C. Avant de procéder à l'incubation de 10 min à 65 °C pour inactiver l'ADN polymérase, nous avons ajouté 2 µL d'EDTA pour conserver l'ARN et éviter qu'il ne se dénature. Après cette phase de digestion, nous avons obtenu une solution de 22 µL. Nous avons procédé à l'alignement aléatoire avec 11 µL de la solution de digestion sur le total de 22 µL. Cette quantité de 11 µL équivaut à 1 µg d'ARN à lequel nous avons ajouté 1 µL l'oligo dT (Promega, Madison, WI, USA), et 2 µL d'eau sans nucléase (incubation 10 min à 65 °C).

La transcription inverse a été faite en utilisant le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Inc. Bedford MA USA). Cette trousse est composée de 10X RT Buffer, 10X RT Random Primers, 25X dNTP Mix (100 mM), MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/µL, et/ou RNase Inhibitor 100 µL. Nous avons procédé à la préparation du Master Mix selon les recommandations du fabricant. Pour une réaction, nous avons mélangé 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de dNTPs, 2 µL de 10X RT Random Primers, 1 µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase et 4,2 µL d'eau sans nucléases. Ce Master Mix est ensuite ajouté à 14 µL de la solution d'alignement totale. Cette quantité représente 1 µg d'ARN initial. Nous avons ensuite incubé pendant 10 min à 25°C puis 120 min à 37°C et enfin 5 min à 85°C. Une fois l'ADNc obtenu, nous avons procédé à la RTqPCR.

3.2.3.2 Test RT-qPCR

Avec les ADNc obtenus, nous avons procédé à la RT-qPCR. Nous avons fait 2 mélanges différents avec 5 µL de SYBR Green Supermix (Bio-Rad Inc. Hercules, CA, USA) et 0,4 µL de chacune des deux amorces à une concentration de 100 µM. Un des mélanges a permis d'amplifier l'ARNm de la frataxine (*FXNm*) et l'autre l'ARNm de HPRT que nous avons utilisé comme gène de référence. Les amorces utilisées sont les suivantes : (*FXNm*) amorce sens 5'AAGCCATACACGTTTGAGGACTA³ et anti-sens 3' ACTAGTTGTTTCGTCTGCGGTT^{5'}; (HPRT) amorce sens 5'CAGGACTGAAAGACTTGCTCGAGAT³ et anti-sens 3'CGATATTCAAGAAACGACTGGACGAC^{5'}. Au mélange SYBR Green et amorces, nous avons ajouté 2,2 µL d'eau sans nucléase. Dans chaque puits de la plaque de 96 puits, 8 µL de chaque mélange ont été ajoutés à 2 µL de chaque échantillon selon le gène à amplifier. Nous avons fait 3 réplicats pour chaque échantillon. Le thermocycleur a été programmé selon les instructions pour le SYBR Green : dénaturation initiale de 3 sec à 95 °C, dénaturation de 15 sec à 95 °C, hybridation de 30 sec à 60 °C et amplification de 30 sec à 72 °C pour 40 cycles.

Les résultats ont été obtenus en faisant une normalisation. Les 3 réplicats nous ont permis de faire une moyenne pour chaque échantillon. Le ΔCq est calculé en faisant la différence de Cq entre le Cq de l'ARNm de référence HPRT et le Cq de l'ARNm de la frataxine de chaque échantillon. Puis, comme nous avons considéré les cellules traitées avec le sh-scramble comme contrôle, nous avons obtenu le $\Delta\Delta Cq$ en faisant la soustraction entre le ΔCq de chaque condition et le ΔCq du contrôle. Enfin, le résultat est obtenu en faisant $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Les expériences ont été répétées 3 fois. Nous avons utilisé l'ANOVA pour comparer les moyennes des quantités d'ARNm des différents traitements. Le seuil de signification considéré était $P < 0,05$.

3.2.4 Extraction des protéines des cellules après les transfections avec les shARNs

L'extraction des protéines a été réalisée selon les recommandations du fabricant du kit ELISA. Nous avons collecté par raclage les cellules adhérentes aux flacons de culture. Les conditions typiques de centrifugation des cellules sont de 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Nous avons rincé les cellules deux fois avec du PBS et solubilisé le culot avec 400 μL (chaque tube) de tampon d'extraction cellulaire PTR 1X préparé en diluant le tampon d'extraction de protéines cellulaires PTR 5X et la solution refroidie de renforcement d'extraction des protéines cellulaires 50X offerte dans le kit ELISA (Annexe A). Nous avons incubé sur glace pendant 20 min, puis centrifugé à 18 000 xg pendant 20 min à 4°C. Pour finir, nous avons transféré 250 μL de surnageant de chaque tube dans des tubes propres et frais. Puis les culots ont été jetés. Les protéines ont été conservées à -80°C.

Avant de procéder au test ELISA, nous avons déterminé la concentration de protéines par BCA.

Le BCA a été réalisé en suivant les recommandations de la trousse BCA Protein Assay Kit, (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Pour les plaques 96 puits, nous avons prélevé 25 μL de chaque standard et de chaque échantillon répliqué dans un puits de microplaque. Nous avons ajouté 200 μL du mélange (50 μL de la solution A + 1 μL de la solution B) à chaque puit et homogénéisé soigneusement le mélange dans chaque puits en utilisant un agitateur de plaque pendant 30 sec. La plaque a été couverte et incubée à 37°C pendant 30 min à l'abri de la lumière ; l'absorbance a été mesurée à 560 nm sur un lecteur de plaque (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories). Avec le logiciel Excel, nous avons tracé notre courbe standard et calculé la concentration totale de protéines dans nos échantillons.

3.2.5 Quantification de la frataxine restante après le knockdown

La concentration en protéines de l'échantillon a été quantifiée à l'aide du test ELISA quantitatif. La trousse utilisée est l'Human Frataxin SimpleStep ELISA® Kit (Abcam Inc., Cambridge, MA). Les échantillons ont été dilués en tenant compte de la concentration totale de protéines. Nous avons donc normalisé à la concentration souhaitée dans le tampon d'extraction cellulaire PTR 1X. Une quantité de 0,5 µg (HEK 293T) ou de 1 µg (HeLa) de protéines totales dans chaque échantillon à partir des protéines extraites des cellules a servi de quantité de départ pour tous nos tests. Le test ELISA a été réalisé en suivant les étapes du fabricant ci-dessous.

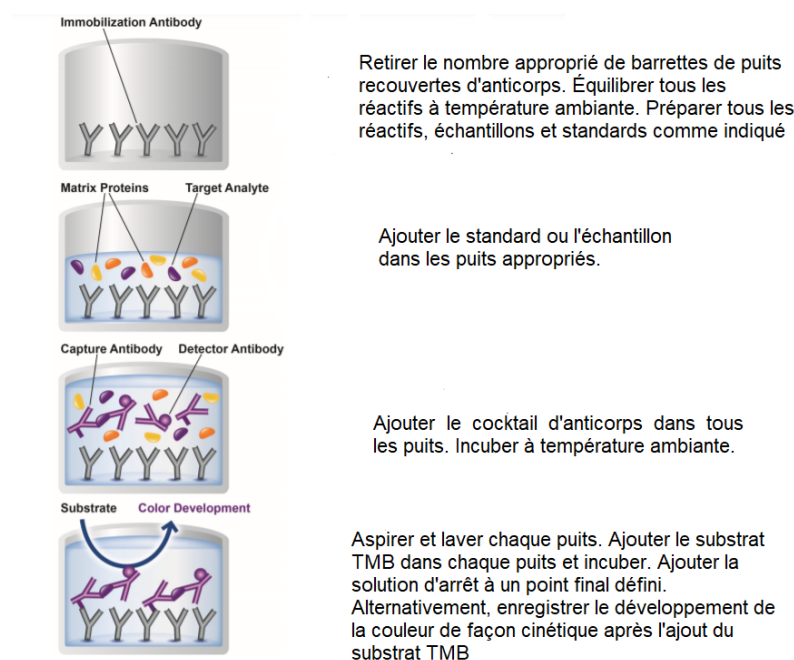


Figure 7: Étapes du test ELISA (Abcam #ab176112, Human Frataxin SimpleStep ELISA® Kit)

Tous les réactifs ont été équilibrés et préparés à température ambiante. Les échantillons et standards ont été apprêtés comme indiqué dans le protocole fourni par le fabricant. Les échantillons ont été équilibrés à raison de 1 µg (HeLa) et 0.5 µg (HEK 293T) de protéine totale pour 50 µL. Une fois que 50 µL du standard ou de l'échantillon ont été ajoutés dans les puits appropriés, on a rajouté 50 µL du cocktail d'anticorps (antibody detector + antibody capture) dans tous les puits. L'incubation s'est faite à température ambiante pendant 1 h. Nous avons procédé à l'aspiration et le lavage de

chaque puits. Cette opération a été refaite 3 fois. Une quantité de 100 μL du substrat de développement TBM fourni dans la trousse (Annexe A) a été ajoutée dans chaque puits après le dernier lavage et la plaque a été incubée à température ambiante pendant 10 min. La solution d'arrêt fourni dans la trousse a été ajoutée à raison de 100 μL à un point final défini. La lecture a ensuite été faite après 2 min.

Le logiciel Excel nous a permis de tracer la courbe standard et d'obtenir l'équation de la droite. En utilisant l'équation, nous avons calculé la concentration (x) à partir d'une absorbance donnée (y) dans l'intervalle de la courbe standard. La concentration obtenue est la moyenne des y des deux duplicatas. Après l'obtention de chaque concentration, nous avons ensuite pris comme référence ou contrôle la concentration de frataxine des cellules traitées avec le shARN scramble. Ceci représente les 100 % de frataxine. Les pourcentages des autres conditions ont donc été calculés par rapport à la référence. Les expériences ont été répétées 3 fois. Les moyennes ont été analysées par ANOVA avec un seuil significatif de $P < 0,05$.

3.3 Test *in vivo* chez les souris YG8sR

3.3.1 Sélection des souris YG8sR par génotypage.

Les souris pour la reproduction ont été obtenues auprès de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). La souris YG8sR (*Fxntm1MknTg (Fxn)YG8Pook/2J*; <https://www.jax.org/strain/024113>) est knockout pour le gène de la frataxine de souris, mais a respectivement un transgène contenant le gène de la frataxine humaine avec un triplet de 250-300 GAA. Toutes les expériences impliquant des animaux ont été approuvées par le Comité de protection des animaux de l'Université Laval.

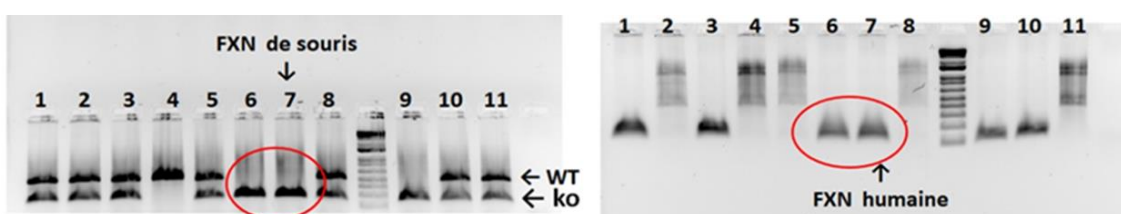


Figure 8: Image de la migration des produits PCR amplifiés avec l'ADN de queues des souris.

Les numéros 1 à 11 correspondent chacun à une souris.

Les queues des souris sont prélevées dans les tubes Eppendorf étiquetés à l'animalerie par les techniciens en charge. Ensuite, les tissus de queues sont récupérés et préparés en ajoutant 90 µL de NaOH 50 mM pour libérer l'ADN du tissu.

Les tubes ont été placés sur une plaque chauffante à 95°C pendant 10 min. Ensuite, pour stopper la réaction, 10 µL de Tris base 50 mM ont été ajoutés dans les tubes retirés de la plaque. Une fois mélangés au vortex, nous avons envoyé les tubes pour amplification PCR à la plateforme de séquençage Sanger du Centre de recherche du CHUL.

Les PCRs des queues de souris ont permis de détecter les souris transgéniques qui sont homozygotes pour le KO du gène *Fxn* de souris et qui sont hémizygotiques pour un transgène *FNX* humaine provenant d'un patient Friedreich et contenant donc une expansion de la répétition du trinucleotide GAA. Les souris qui sont éligibles pour les tests *in vivo* sont celles qui sont homozygotes KO pour la frataxine de souris et hémizygotiques pour la frataxine humaine (comme indiqué à la Figure 8 dans les cercles rouges).

3.3.2 Production des virus adéno-associés

Les vecteurs scAAV-PHP.B ont été produits et le titre du vecteur a été mesuré par la Plateforme d'outils moléculaires du Centre de recherche CERVO de l'Université Laval.

Les plasmides scAAV-shARN-mCherry ont été construits dans notre laboratoire en suivant la procédure décrite à la section 3.1. Un séquençage a été fait par la plateforme de séquençage du Centre de recherche du CHUL pour s'assurer que le transgène et les ITRs sont sans anomalies. Les amorces choisies pour le séquençage sont M13R : amorce sens GCGGATAACAATTTACACAGG et amorce anti-sens M13F GTAAAACGACGGCCAGT. Les AAVs utilisés dans toutes les expériences *in vivo* ont été fournis par la plateforme d'outils moléculaires du Centre de recherche CERVO.

Brièvement, les cellules HEK 293T sont mises en culture dans du milieu de culture complet. Ce milieu est composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine. Ces cellules sont maintenues à 70 % de confluence et passées moins de 30 fois après leur mise en culture pour conserver les caractéristiques appropriées.

Ces cellules HEK 293T ont été tri-transfectées avec :

- 1) Un plasmide auxiliaire d'adénovirus plasmide pHelper contenant les gènes E4, E2A et VA de l'adénovirus qui facilitent la production d'AAVs dans les cellules HEK 293T.

- 2) Le plasmide pCapsid contient le gène rep qui code quatre protéines non structurales nécessaires à la réplication, à savoir Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40, ainsi que le gène cap qui code trois protéines structurales de capsid, à savoir VP1, VP2 et VP3.
- 3) Le plasmide transgénique scAAV-shARN-mCherry.

Les vecteurs ont été purifiés en utilisant une stratégie de gradient de densité d'iodixanol. Après les avoir concentrés, les titres de vecteurs ont été déterminés par Taqman ddPCR et la pureté évaluée par SDS-PAGE et coloration à l'argent.

3.3.3 Procédure des tests comportementaux *in vivo*

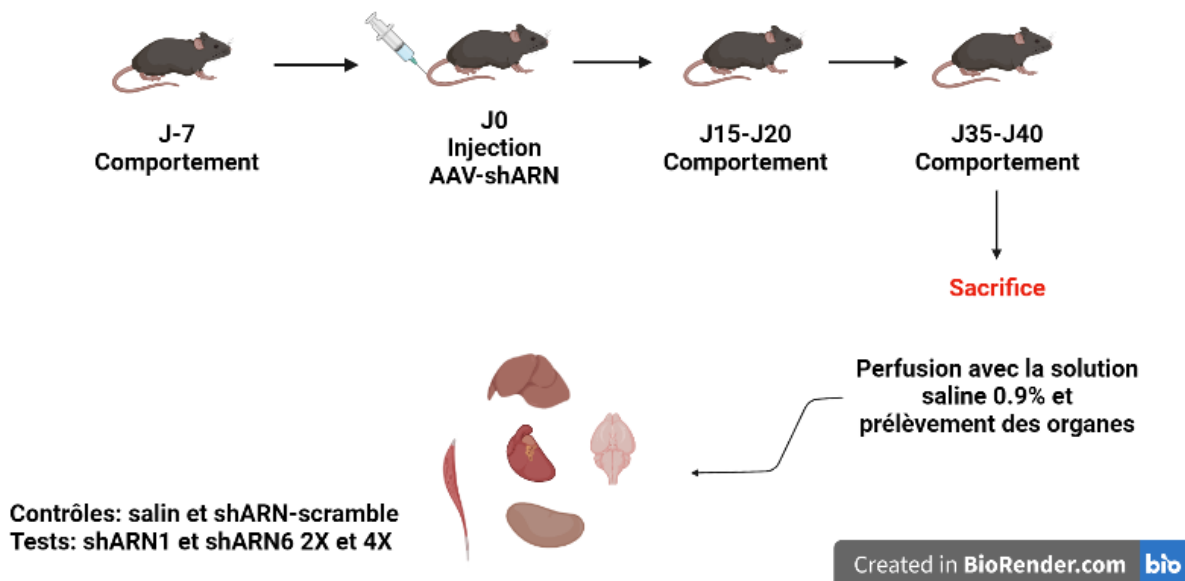


Figure 9: Calendrier des tests pour le suivi des souris *in vivo*.

2X= 1.2×10^{12} particules virales et 4X= 2.4×10^{12} particules virales,

Des souris (âgées d'environ 2 mois) ont été injectées dans la veine de la queue avec un AAV-shARN-mCherry. Les souris ont été sélectionnées par génotypage. Les souris YG8sRs de bon phénotype c'est-à-dire homozygotes pour le KO du gène *Fxn* de souris et qui sont hémizygotés pour un transgène *FNX* humaine ne représente qu'environ 11%. Pour avoir les mêmes conditions à savoir l'âge des souris et le traitement nous avons procédé au comportement par groupe de souris

comportant les différentes conditions selon la disponibilité des souris. Un réplicat de 4 souris dans le groupe traité avec le shARN1, shARN6 et scramble a été obtenu. Nous avons un groupe de 15 souris qui ont reçu de la solution. Le sérotype utilisé était le AAV.PHP.B. Les souris traitées considérées comme souris testées ont reçu des injections de virus AAV-shARN1 et AAV-shARN6 et les contrôles ont reçu des AAV-sh-scramble ou une solution saline à 0,9 % NaCl. Ces injections sont faites par les techniciens de l'animalerie. Le suivi a été fait par des tests comportementaux sur 45 jours répartis en 3 étapes. Le premier test s'est fait 7 jours avant l'injection d'AAV. Le deuxième test a eu lieu entre le 15^{ème} et le 20^{ème} jour après l'injection. Puis, le dernier test s'est déroulé entre le 35^{ème} et le 40^{ème} jour après l'injection. Deux doses d'AAV-shARN-mCherry ont été utilisées, soit 2X qui correspondait à $1,2 \times 10^{12}$ copies du génome ou 4X à $2,4 \times 10^{12}$ copies de virus. Les volumes inoculés aux souris dépendent de la concentration du virus produit, ils sont d'environ 1X= $6 \cdot 10^{11}$ particules virales dans 100 μ L. Les souris ont été ensuite sacrifiées et perfusées avec une solution saline à 0,9 % NaCl pour éliminer le sang des tissus. Différents tissus, à savoir le muscle tibial antérieur, le cœur, le foie, le cerveau, le cervelet et les ganglions de la racine dorsale (DRG) ont ensuite été prélevés dans des tubes Eppendorf étiquetés et conservés. Ces organes ont servi à la détection du gène par PCR ainsi que le dosage du taux de frataxine dans les tissus. Ces dosages n'ont cependant pas été faits dans tous les tissus prélevés ; certains ont été préservés pour des études subséquentes.

3.3.4 Tests de comportement des souris YG8sR

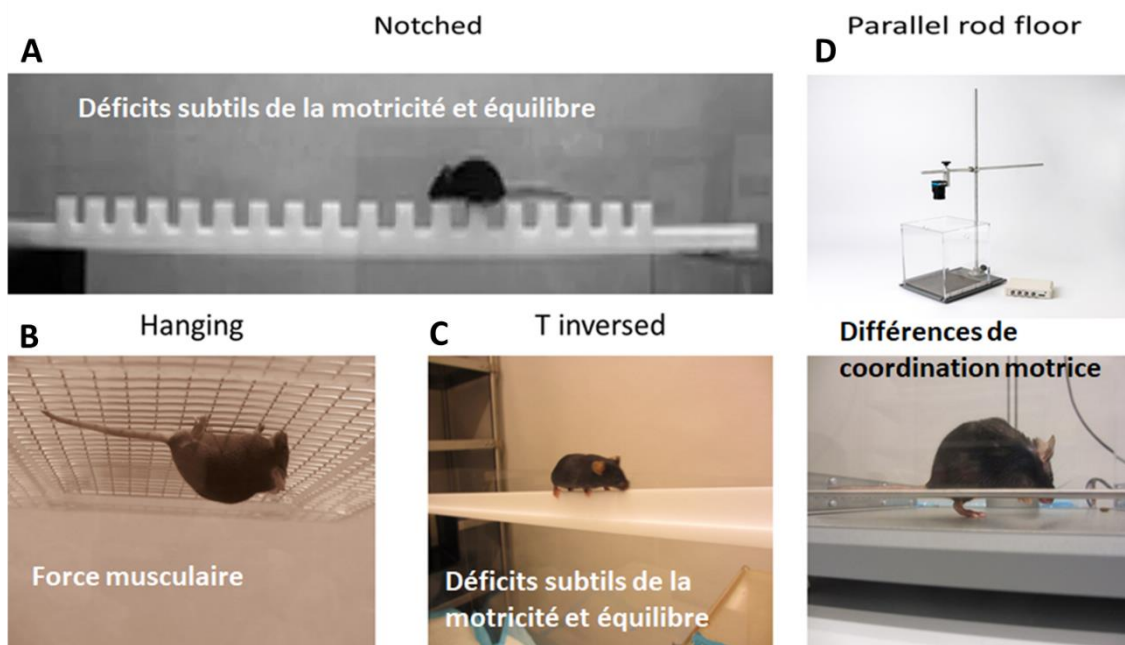


Figure 10: Image descriptive des tests de comportement des souris.

3.3.4.1 Test sur une barre dentée (Notched) :

En se basant sur le test de la barre dentée de Di Bonito, ce 'Notched' test permet d'évaluer l'équilibre et les déficits subtils de la motricité (112). La barre en plexiglas de 1 m comprend des dents en carrés de 2 cm de largeur, profondeur et longueur et espacés de 2 cm (Figure 10A). La marche était évaluée par le temps que la souris prenait pour traverser la barre à l'extrémité supérieure des carrés. Les erreurs des pattes ont également été comptées (c'est-à-dire chaque fois que la patte de la souris glisse et touche le fond du carré). Nous avons fait la moyenne de 3 essais.

3.3.4.2 Test de suspension (Hanging) :

Pour le test de suspension (Hanging) (Figure 10B), les poids des souris ont été évalués avant chaque séance de test. Il s'agit d'un test de suspension à quatre membres où la souris s'agrippe à une grille métallique inversée, basé sur le test de l'écran inversé de Kondziela (113). Le chronomètre a été mis en marche dès que la souris est inversée en dessous de la grille. Le temps de suspension de la souris (avant la chute de la souris) a été noté, avec un maximum de 300 sec pour le test. Trois séries de tests de suspension ont été effectuées avec un minimum de 2 min entre chaque test. Le temps le

plus long pendant lequel la souris est restée suspendue à la grille a été noté. Ce test est utilisé dans le but d'évaluer la force musculaire des quatre membres de la souris.

3.3.4.3 Test sur une barre T inversée (inversed T) :

Cette barre T inversée était également en plexiglas et d'une longueur de 1 m et de 2 cm de large (Figure 10C). Elle a une forme de T inversé avec une base inférieure et une hauteur centrale de 0,66 cm de large et de 0,66 cm de haut; basée sur le test d'équilibre de Luong et coll. 2011 (114). Le temps de traversée de la barre a également été enregistré ainsi que chaque erreur de pattes (lorsque la patte de la souris glisse et se retrouve sur la base de la barre). L'expérience a été faite 3 fois et la moyenne a été utilisée. Ce test tout comme le test de notched permettent d'évaluer l'équilibre et les déficits subtils de la motricité.

3.3.4.4 Le test sur un plancher de tiges parallèles (parallel rod floor) :

Les souris ont été placées dans une cage avec des tiges parallèles au fond (Figure 10D). Cette cage est reliée à un dispositif ayant un logiciel de test. La souris a passé 8 min dans la cage et son activité a été suivie avec une caméra. L'appareil a détecté les erreurs de pattes, c'est-à-dire lorsqu'une patte a glissé à travers les tiges parallèles et s'est retrouvée au fond sur la base de la cage. Différents autres paramètres ont aussi été évalués, à savoir la distance parcourue, la vitesse moyenne et le temps d'immobilisation ont été enregistrés avec le logiciel ANY-maze (Stoelting Co. 620 Wheat Lane Wood Dale, IL 60191 U.S.A). Ce test a été utilisé pour évaluer les différences de coordination motrice (115).

3.3.4.5 Extraction d'ADN génomique dans les tissus après sacrifice.

Une fois le tampon de lyse préparé (1,82 g Tris base, 5 g SDS, 10 mL EDTA 0,5 M (Qsp) avec 500 mL d'eau distillée, le tout à pH 8). Nous avons conditionné nos tissus et procédé à la digestion en ajoutant à nos tubes contenant nos tissus émincés 450 µL de lysis buffer et 50 µL de la protéinase K à 20 mg/mL. Les tubes ont ensuite été mixés au vortex et mis à 55°C pendant 1 h puis mélangés au vortex. Ils ont été laissés à la même température pendant toute la nuit. Le lendemain, les tubes ont été récupérés et une quantité de 500 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (Fischer Scientific Inc., PA, USA) (à 4°C) a été ajoutée dans chaque tube. Après avoir obtenu le mélange laiteux en agitant fortement les tubes, nous avons centrifugé 3 min à 1 200 rpm et récupéré la phase du dessus dans de nouveaux tubes Eppendorf. Une quantité de 500 µL de chloroforme a été ajoutée dans chacun des tubes, ensuite les tubes ont été secoués et centrifugés à nouveau. La phase du dessus a été récupérée

dans des tubes frais. On a ajouté 50 μL de NaCl 5M, retourné les tubes puis ajouté 1 mL d'éthanol 100 % froid (-20°C). Après avoir mélangé en inversant doucement les tubes plusieurs fois, nous avons procédé à la centrifugation pendant 8 min à 12 000 rpm. Les surnageants ont été retirés et une quantité de 700 μL d'éthanol 70 % froid (-20°C) a été ajoutée sur les culots dans les tubes. Les tubes ont été mixés au vortex puis centrifugés. Une fois les surnageants retirés, les tubes ont été séchés au speedvac pendant 8 min.

Les culots secs ont été dissouts dans de l'eau sans nucléase à raison de 20 μL pour le muscle et les ganglions de la racine dorsale. Puis, des quantités de 150 μL , 30 μL , 40 μL ou 40 μL d'eau ont été ajoutées respectivement aux culots du foie, du cœur du cerveau et du cervelet.

3.3.4.6 *PCR des ADNs extraits des tissus pour la détection des gènes*

Les ADNs ont ensuite servi à faire des PCRs pour l'amplification du gène de mCherry afin de confirmer la présence de notre gène dans les différents organes. Nous avons dosé les échantillons d'ADN. Nous avons prélevé une quantité de chaque échantillon pour une dilution enfin d'obtenir une concentration finale de 25 ng. Deux μL de chaque échantillon à 25 ng ont servi pour l'amplification par PCR. Pour chaque échantillon, nous avons mélangé 12,5 μL de CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara Bio Inc., Mountain View, CA USA), 0,75 μL de chaque amorce (diluée à 1 pour 200 μL à partir de la concentration initiale de 100 μM). Les amorces utilisées pour cette expérience sont les suivantes : mCherry amorce sens 5'GGCCATCATCAAGGAGTTC^{3'} et amorce anti-sens : 3'ATTACGTCTTCTTCTGGTACC^{5'} (9 μL d'eau sans nucléase pour un total de 25 μL). Le thermocycleur a été programmé pour 34 cycles. Un cycle comprenait une dénaturation initiale de 3 sec à 98°C , une dénaturation de 10 sec à 98°C , une hybridation de 30 sec à 60°C et une amplification de 30 sec à 72°C .

Le produit PCR a été migré par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,25%.

Chapitre 4 : Résultats

4.1 Résultats *in vitro* des tests d'efficacité des shARNs

4.1.1 Contrôle de la transfection

L'évaluation de la transfection après 72 h a été faite par vérification de la fluorescence des cellules au microscope. Les images prises ont servi pour l'évaluation du taux de transfection.

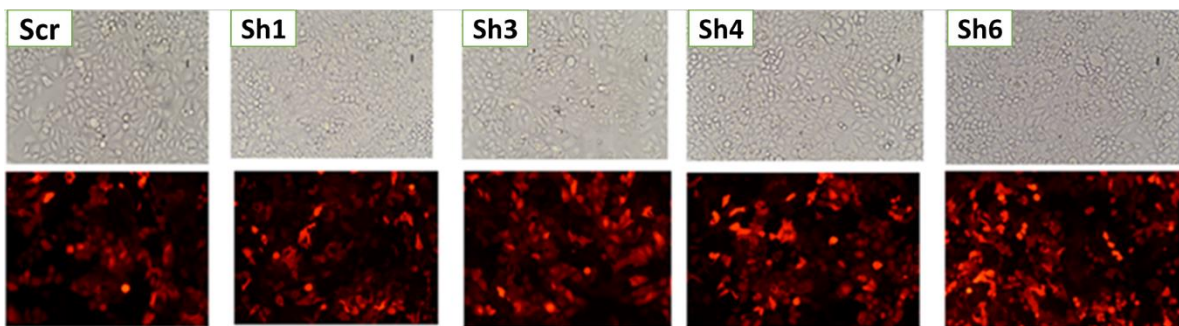


Figure 11: Images en fluorescence des cellules HeLa 72h après la transfection avec différents plasmides shARNs-mCherry.

Nous avons pu observer une assez bonne fluorescence dans toutes les cellules traitées avec les shARNs-mCherry confirmant la présence du gène mCherry.

L'évaluation du taux de transfection a été obtenue après avoir compté les cellules rouges (mCherry) et fait le rapport du nombre de cellules rouges sur le nombre total de cellules. Les images de contraste de phase nous ont permis de compter les cellules totales. Nous avons obtenu un taux de transfection de 75 %. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Taux de transfection de cellules HeLa

| Puits | Nombre de cellules rouges (mCherry+) | Nombre de cellules totales | Taux de transfection (rapport cellules rouges/cellules totales) |
|---------|--------------------------------------|----------------------------|---|
| Scr | 29 | 47 | 61,7 |
| Sh1 | 48 | 54 | 88,9 |
| Sh3 | 63 | 81 | 77,8 |
| Sh4 | 46 | 63 | 73,0 |
| Sh6 | 20 | 30 | 66,7 |
| Moyenne | 41,2 | 55 | 73,62 |

4.1.2 RTqPCR avec des ARNs extraits après transfection des cellules HeLa

Les ARNs extraits des cellules HeLa 72 h après la transfection avec les différents shARNs nous ont permis d'effectuer une RTqPCR avec les ARNs pour évaluer l'impact des shARNs sur l'ARNm de la frataxine. Pour la vérification de l'intégrité des ARNm au Qubit, nous avons obtenu des valeurs allant de 3/10 à 6,4/10 pour les ARNs de grandes tailles.

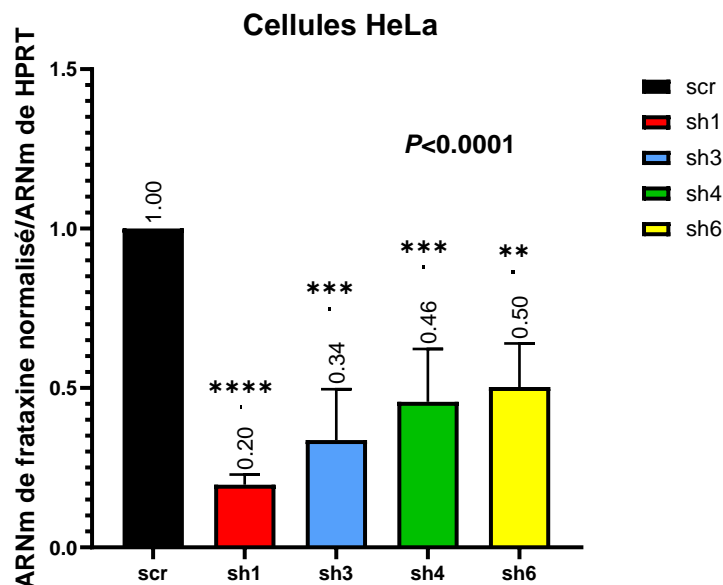


Figure 12: Effet des shARNs sur l'ARNm de la frataxine dans les cellules HeLa.

L'analyse des résultats obtenus après la RTqPCR est présentée à la Figure 12. Le sh-scramble est représenté par scr, le shARN1 par sh1, le shARN3 par sh3, le shARN4 par sh4 et le shARN6 par sh6.

Nous avons observé une diminution très significative allant de 25 à 50 % de l'ARNm de la frataxine restant dans tous les groupes de cellules traitées. Cette observation est faite pour les groupes ayant reçu les shARN1, shARN3, shARN4 et shARN6 par rapport aux cellules contrôles traitées avec le shARN-scramble avec une valeur P inférieure à 0,05. Pour ces groupes, les pourcentages de réduction sont respectivement de 20%, 34%, 46% et 50%.

4.1.3 ELISA avec des protéines extraites après transfection de shARNs dans des cellules HeLa ou HEK 293T

Le dosage des protéines extraites des cellules nous a permis d'obtenir les résultats suivants.

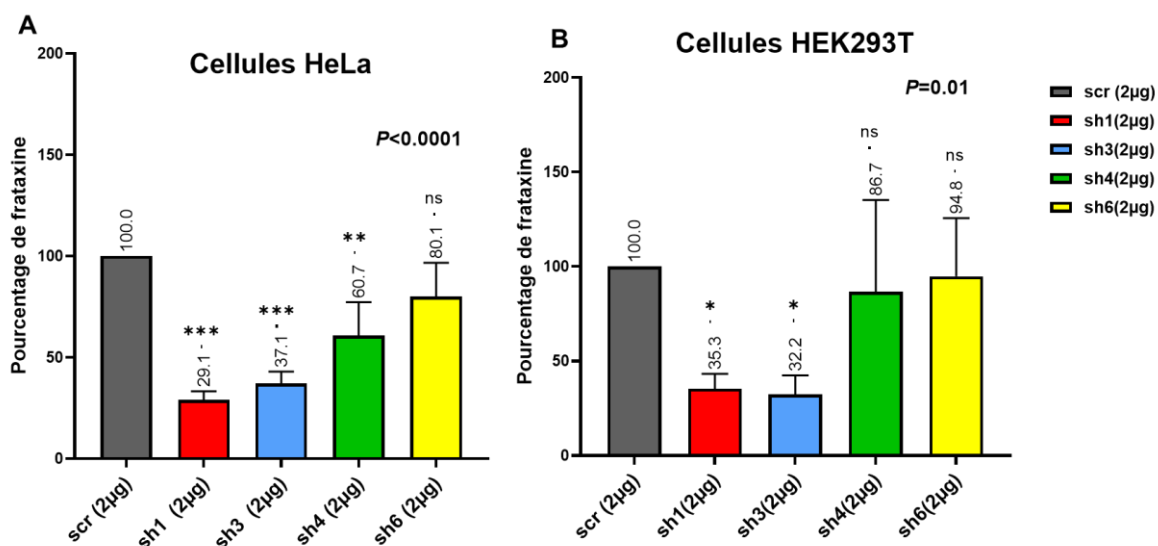


Figure 13: Effet de shARNs sur le taux de la protéine frataxine dans les cellules HEK 293T et HeLa.

Les protéines extraites des cellules ont été recueillies après 72 h de transfection avec 2 µg de chacun de nos différents shARNs, nous avons ensuite effectué un test ELISA pour doser la protéine frataxine. Ces dosages nous ont permis d'observer (Figure 13A) des diminutions significatives ($P < 0.0001$) pour les groupes shARN1, shARN3 et shARN4 avec les cellules HeLa. Tandis que dans la lignée HEK 293T (Figure 13B), nous avons observé une baisse significative ($P = 0.01$) dans les groupes traités avec les shARN1 et shARN3 par rapport au groupe contrôle traité avec le shARN-scramble. Il faut noter que les HEK 293T ont un taux de frataxine plus élevé que les cellules HeLa. Le groupe traité avec le shARN4 n'a pas révélé une différence significative dans les cellules HEK 293T contrôles (Figure 13B); pourtant, le shARN4 a produit une baisse significative dans les cellules HeLa (Figure 13A). Pour les groupes traités avec le shARN6, aucune différence significative n'a été observée dans les deux lignées.

Les sites de complémentarité étant différents, nous avons réalisé des co-transfections des cellules avec les shARNs deux par deux avec le contrôle shARN-scramble et aussi les shARNs tests entre eux, deux par deux.

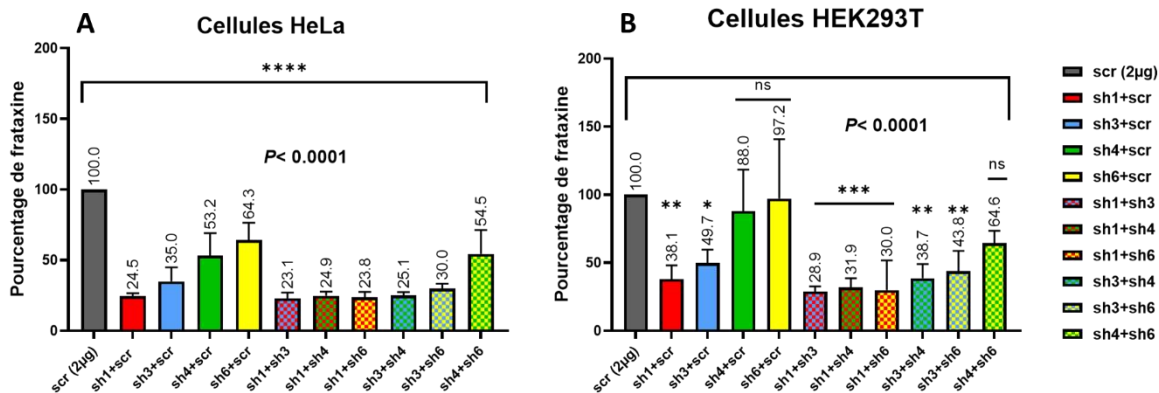


Figure 14: Effet des combinaisons de shARNs sur le taux de frataxine dans les cellules HeLa et HEK 293T.

Les protéines obtenues des co-transfections des cellules avec les shARNs ont été recueillies après 72 h de transfection. Le pourcentage de transfection après les calculs a été estimé à 75 %. L'analyse par les tests ELISA nous a permis d'obtenir les résultats suivants.

Pour l'effet des combinaisons des shARNs sur les cellules HeLa (Figure 14A), nous avons observé une diminution significative du niveau de frataxine dans tous les groupes cellulaires traités avec les combinaisons des shARNs et le contrôle shARN-scramble. Puis, les combinaisons des shARNs (1, 3, 4 et 6) entre eux, deux à deux, nous ont révélé des diminutions très significatives par rapport aux cellules traitées uniquement au shARN-scramble à 2 µg ($P < 0.0001$). Pour l'évaluation de l'effet des combinaisons dans les cellules HEK293T (Figure 14A), des diminutions significatives du niveau de frataxine ont été observées dans les groupes traités avec le shARN1 ou le shARN3 associé au shARN-scramble par rapport au contrôle ($P < 0.0001$). Les diminutions ne sont pas significatives dans les groupes traités avec les shARN4 et shARN6 associés au shARN-scramble. Pour les associations de shARNs (1, 3, 4 et 6) entre eux, nous avons observé des diminutions significatives. Cette observation est faite entre les combinaisons qui contiennent du shARN1 et/ou du shARN3 seulement par rapport au contrôle traité avec le shARN-scramble uniquement ($P < 0.0001$). Cette variation n'est pas significative dans le groupe traité avec la combinaison shARN4 et shARN6.

D'après les résultats obtenus des expériences *in vitro* dans les deux lignées cellulaires, nous avons procédé au choix des shARNs capables de réduire de plus de 70 % le taux de frataxine. Notre choix s'est porté sur le shARN1. Sachant que la baisse du taux de frataxine peut être létale pour la survie,

nous avons aussi choisi le shARN le moins efficace, soit le shARN6 qui pouvait réduire jusqu'à 40 % le taux de frataxine. Ces deux shARNs ont été testés *in vivo* chez les souris YG8sR et les résultats sont présentés dans les pages suivantes.

4.2 Résultats *in vivo* chez les souris YG8sR

4.2.1 Détection par PCR des gènes livrés dans les organes des souris YG8sR

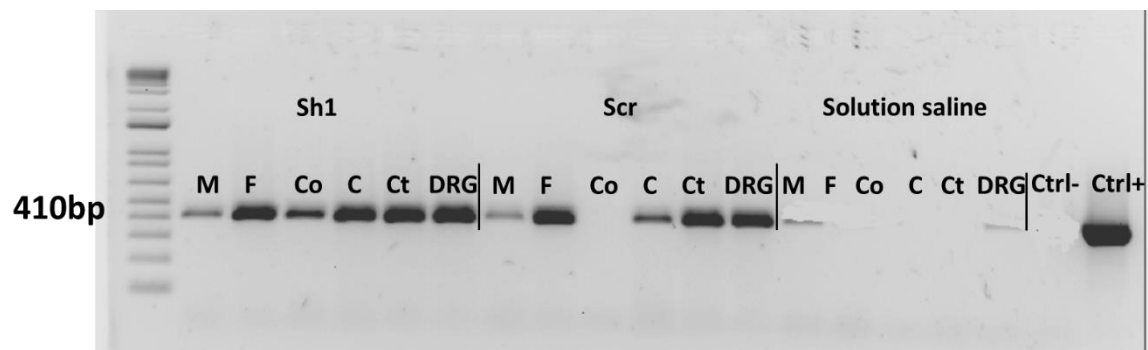


Figure 15: Image des gels d'électrophorèse des PCRs faits avec les ADNs extraits des tissus des souris injectées avec AAV-shARN-mCherry.

M : muscle, **F** : foie, **Co** : cœur, **C** : cerveau, **Ct** : cervelet, **DRG** : ganglion de la racine dorsale, **C-** : contrôle négatif (eau sans nucléase), **Ctrl+** : contrôle positif est le plasmide scAAV-shARN-mCherry dont la description est faite dans la section 3.1. L'amplicon correspondant au 410 bp du gène *mCherry* :
GGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGC
GAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCCGCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGT
TCATGTACGGCTCCAAGGCCACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTG
ATGAACTTCGAGGACGGCGGGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCA
ACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGG

Après avoir livré les gènes avec du AAV-shARN-mCherry (PHP.B), l'électrophorèse des produits PCR a été faite. La détection du gène de mCherry associé au shARN dans les tissus murins nous a permis de déceler le mCherry dans les organes des souris traitées sauf au niveau du cœur d'une des souris traitées. Nous avons confirmé l'absence du gène dans les organes de la souris non traitée.

4.2.2 Résultats de l'effet des shARNs évalué par la croissance pondérale des souris YG8sR.

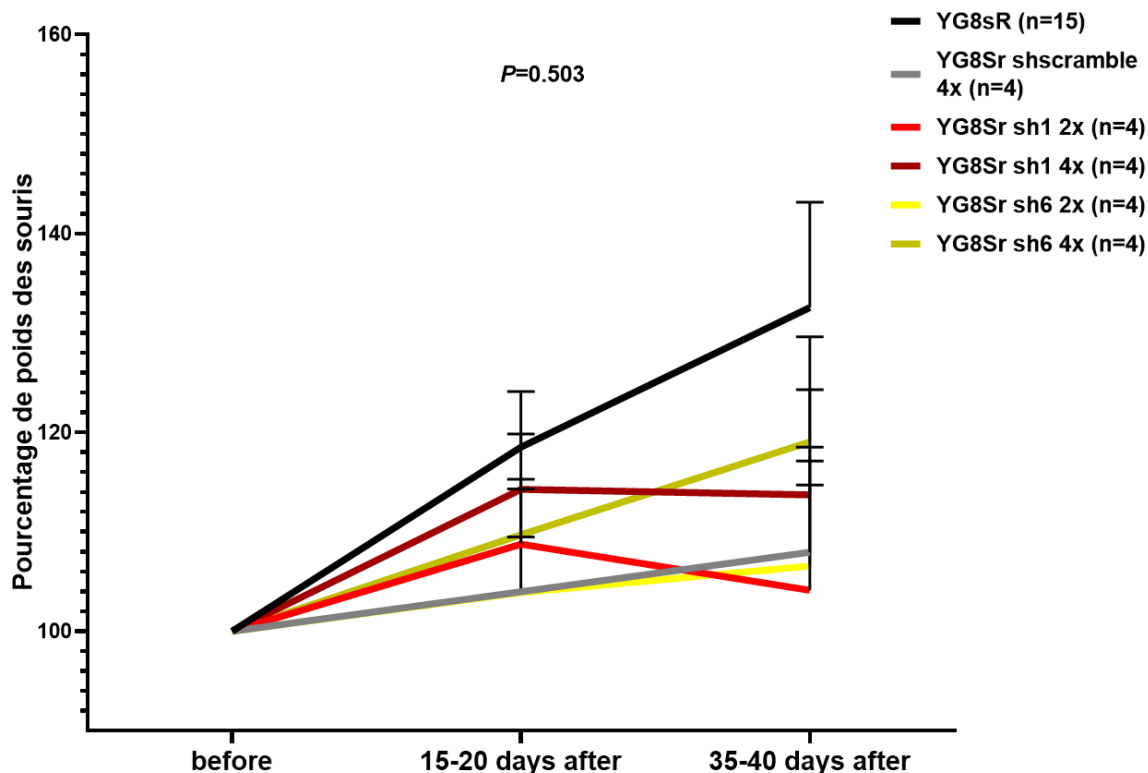


Figure 16: Effets des shARNs sur le poids des souris YG8sR.

Avant chaque test d'accrochage à la grille métallique, les souris ont été pesées. Les poids ont permis de faire la moyenne avant l'injection, entre les 15^{ème} et 20^{ème} jours après l'injection et la dernière pesée s'est faite entre les 35^{ème} et 40^{ème} jours. Nous avons pu observer que les courbes pondérales des groupes de souris prennent toutes une allure croissante allant d'avant l'injection jusqu'aux 15^{ème} et 20^{ème} jours pour tous les groupes de souris sans distinction. Nous observons des décroissances des courbes pondérales après les 15^{ème} et 20^{ème} jours chez les souris ayant reçu le shARN1 à 2X et à 4X, tandis que chez les souris ayant reçu la solution saline, le shARN-scramble ou le shARN6 nous avons observé des courbes croissantes non significatives avec un $P=0.503$.

4.2.3 Résultats de l'effet des shARNs évalué par le test de notched ou barre dentée

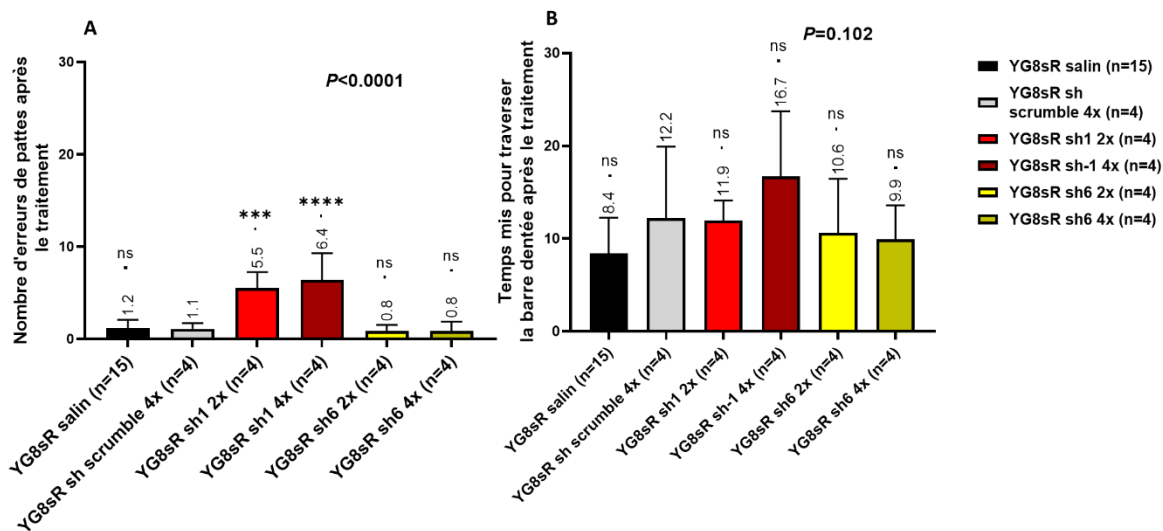


Figure 17: Effets des shARNs sur les erreurs des pattes et le temps mis pour traverser la barre dentée.

Les shARNs ont produit des augmentations significatives des erreurs de pattes pendant la traversée de la barre dentée (Figure 17A). Cette observation est faite chez les souris qui ont reçu du shARN1 à 2X et 4X par rapport au souris contrôle qui ont reçu du shARN-scramble ($P < 0.0001$). Pour le temps mis pour traverser la barre, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les groupes traités et le groupe contrôle (Figure 17B).

4.2.4 Résultats de l'effet des shARNs sur les souris YG8sR évalué par le test de T inverted

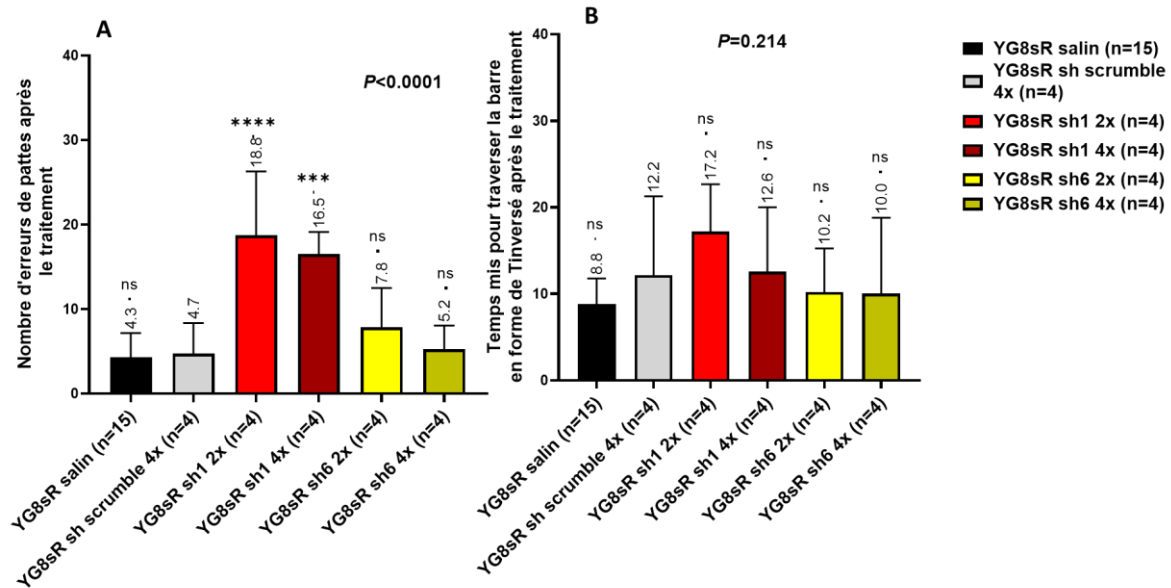


Figure 18: L'effet des shARNs sur le nombre d'erreurs de pattes et du temps mis pendant la traversée de la barre en T inversé.

Le test de T inverted révèle des augmentations significatives des erreurs des pattes chez les souris shARN1 2X et shARN1 4X par rapport au groupe contrôle avec un $P < 0.0001$ (Figure 18A). Il n'y a pas d'augmentation significative observée chez les groupes de souris qui ont reçu le shARN6 à 2X ou 4 X.

Pour le temps que prennent les souris pour traverser la barre en forme de T inversé, nous avons vu que les augmentations ne sont pas significatives entre les groupes traités et le groupe contrôle (Figure 18B).

4.2.5 Résultats de l'effet des shARNs sur le test de parallel rod floor des souris YG8sR.

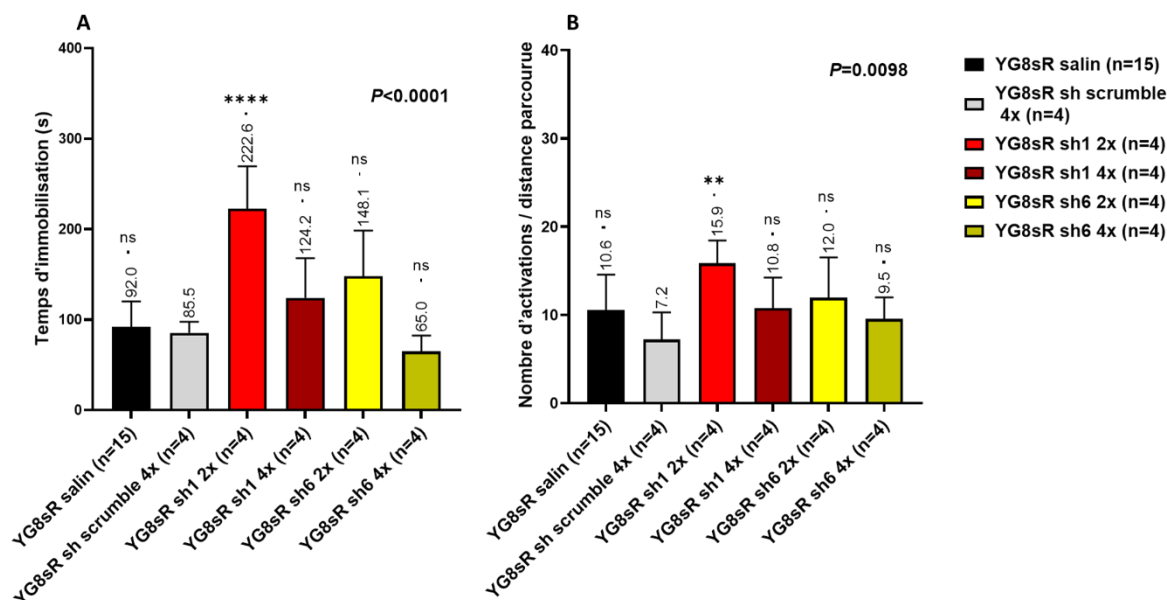


Figure 19: L'effet des shARNs sur le temps d'immobilisation et le rapport entre les nombres d'erreurs de pattes sur la distance parcourue pendant le test de parallel rod floor.

L'évaluation de la coordination motrice après l'injection des AAV-shARN-mCherry chez les souris a permis d'obtenir le temps d'immobilisation ainsi que le rapport du nombre des erreurs/la distance parcourue dans la cage.

Le total du temps d'immobilisation nous a permis d'observer une augmentation significative du temps d'immobilisation chez les souris ayant reçu le shARN1 2X ($P < 0.0001$; Figure 19A). Les souris qui présentent un déficit moteur ont tendance à être moins actives, car les souris perdent de la vitalité et on observe un ralentissement de la vitesse des mouvements.

Au niveau du rapport du nombre des erreurs de pattes sur la distance parcourue, on a observé une différence significative entre le groupe de souris ayant reçu le shARN1 à 2X par rapport aux contrôles ($P = 0.0098$; Figure 19B). L'injection des shARN entraîne donc des troubles de la coordination motrice.

4.2.6 Résultats de l'effet des shARNs sur le test de Hanging ou test d'accrochage des souris YG8sR.

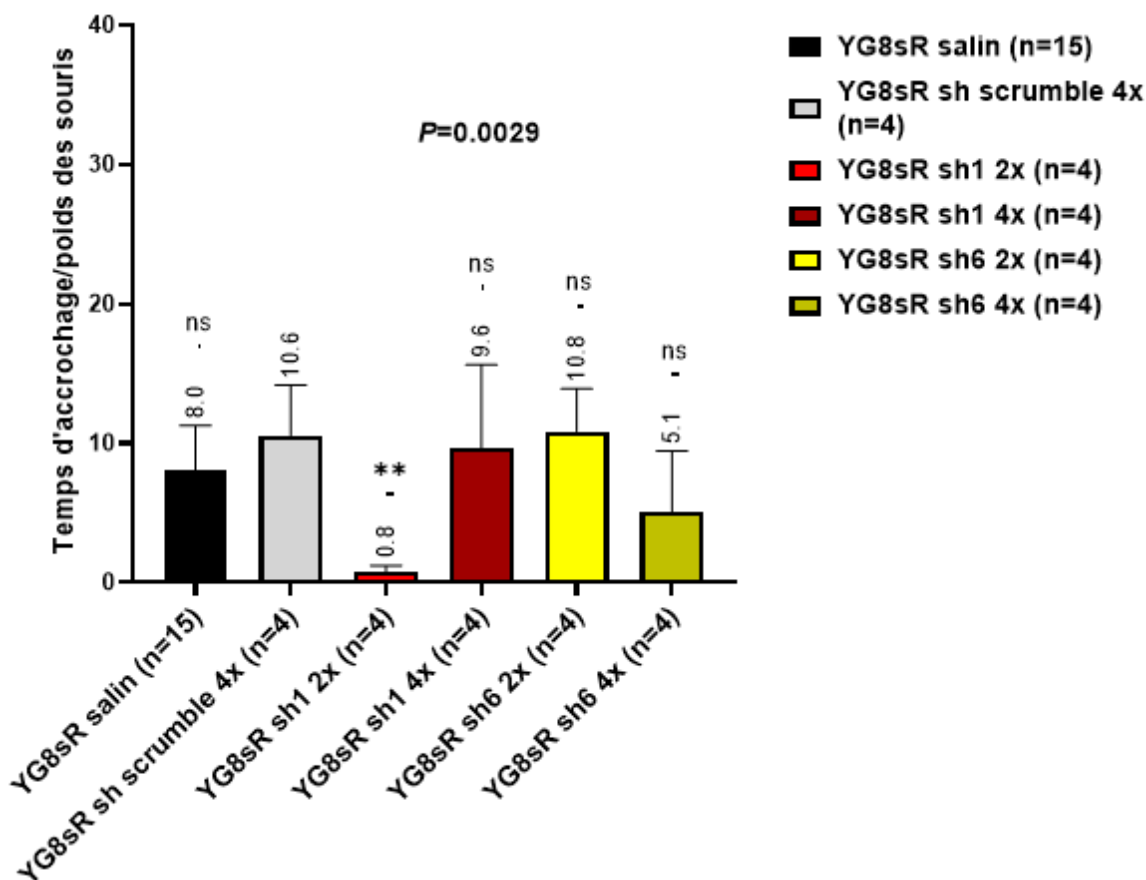


Figure 20: L'effet des shARNs sur le rapport temps d'accrochage/poids pendant le test de Hanging.

L'évaluation comportementale des souris pendant le test d'accrochage à la grille métallique nous a permis d'obtenir le temps d'accrochage ainsi que les poids des souris. Le temps accroché à la grille par rapport au poids de la souris est significativement différent entre les souris YG8sR traitées avec les AAV-shARN-mCherry par rapport aux souris contrôles (shARN-scramble) avec un $P=0.0029$ (Figure 20). Cette différence est visible entre les souris qui ont reçu du shARN1 à 2X et les souris contrôles qui ont reçu un shRNA-scramble ou une solution saline. Il n'y a pas de différence significative dans les autres groupes de souris traitées avec le salin et le shARN6 à 2X ou 4X.

Chapitre 5 : Discussion

La FRDA est une anomalie due à une mutation par insertion. Dans l'intron 1 du gène *FXN*, on retrouve une répétition du trinucléotide GAA. Il est confirmé que la symptomatologie varie et est étroitement liée au nombre de GAA présents dans le gène des patients (8).

Le développement d'une thérapie nécessite un modèle animal reproduisant des symptômes similaires à ceux des patients FRDA pour pouvoir évaluer l'efficacité du traitement (19, 68, 116). Ces recherches thérapeutiques peuvent se classer en 2 grands groupes. Des thérapies intervenant en aval pour corriger, stabiliser ou activer le gène de la frataxine et d'autres visant un remplacement, une induction de la synthèse ou une supplémentation de la protéine frataxine. Pour ce faire, plusieurs modèles différents de souris ont été développés pour étudier les traitements potentiels, chacun de ces modèles présente des avantages et des inconvénients (116). Cependant, jusqu'à présent, aucun de ces modèles n'est proche du phénotype réel de la FRDA. L'alternative que propose notre étude est un modèle de souris YG8sR amélioré, Imp-YG8sR, que nous avons développé en réduisant davantage l'expression de la frataxine avec un shARN ciblant le gène de la frataxine.

Les études précédentes ont proposé différents modèles. Puccio et coll. ont mis au point le modèle de souris MCK-Cre pour reproduire les problèmes cardiaques. Ce modèle de souris viable utilise le système Cre-recombinase sous le promoteur de la créatine kinase pour diminuer la frataxine uniquement dans le cœur et les muscles squelettiques. La suppression de la frataxine dans le cœur entraîne une cardiomyopathie après l'âge de 5 semaines (17). Le modèle neurologique (NSE-Cre) exprimant la recombinaison Cre sous le promoteur spécifique des neurones, l'énolase, a aussi été créé (17). Le modèle NSE-Cre a montré non seulement des déficits neurologiques dus à l'absence de frataxine, mais aussi des déficits cardiaques entraînant des symptômes dans les deux systèmes (68).

L'équipe du Dr Jacques P. Tremblay a déjà utilisé ces modèles, mais la mort des souris est survenue entre 30 et 90 jours pour NSE-Cre et MCK-Cre, respectivement (53, 117). Récemment, Puccio et coll. ont généré un nouveau modèle conditionnel appelé Pvalbtm1 (Cre) *Arbr/J* utilisant le promoteur de la parvalbumine. Ce mécanisme cible les neurones sensoriels afférents proprioceptifs dans le DRG, les cellules de Purkinje cérébelleuses et les interneurons dans le cerveau. L'allèle de knock-in Pvalbtm1 (Cre) *Arbr/J* possède le promoteur endogène de la parvalbumine et les éléments activateurs qui dirigent l'expression de la recombinaison Cre (55).

Le modèle KIKO (*Fxn* (tm1Mkn/J) présente une expansion de 230 GAA dans un gène et une délétion de l'exon 4 dans l'autre gène *Fxn*, ce qui entraîne un phénotype neurocomportemental robuste(18). En 2017, Chandran et coll. ont créé un modèle de souris FRDAkd inducible et réversible. Ils ont intégré un transgène contenant un shARN contre la frataxine de souris sous un promoteur H1 qui était inducible par la doxycycline. Ceci a permis une réduction significative de la protéine frataxine dans tous les tissus. La forte diminution de la protéine frataxine observée sous traitement par la doxycycline était associée à un phénotype sévère. Les souris ont montré une activité locomotrice réduite, moins de coordination et une force musculaire plus faible. Ces souris ont développé un phénotype qui se rapproche des patients atteints d'ataxie de Friedreich, en réduisant l'expression du gène de la frataxine de la souris (21).

Le groupe de Pook a mis au point deux modèles de souris atteintes d'ataxie de Friedreich. Les souris YG8R et YG8sR, dans lesquelles les deux gènes de la frataxine de la souris sont désactivés, mais qui possèdent un transgène de la frataxine humaine obtenu à partir d'un patient atteint de l'ataxie de Friedreich. La souris YG8R originale contenait un transgène humain contenant en tandem deux répétitions de GAA, l'une de 90 et l'autre de 190 répétitions GAA alors que la souris témoin Y47 ne contenait que 9 répétitions GAA. La souris YG8sR amélioré contenait un transgène humain avec une seule répétition de 250-300 GAA (19) . Cependant, même ce modèle YG8sR n'exprime qu'un faible phénotype (19).

Nous avons donc supposé que le faible phénotype des souris YG8sR est dû à une réduction insuffisante de la frataxine. Nous avons décidé d'accentuer le phénotype du modèle YG8sR en utilisant un shARN contre la frataxine humaine, une approche similaire à celle utilisée par Chandran et coll. pour réduire le gène de la frataxine de la souris (21). Nous avons d'abord sélectionné les shARNs en testant leur efficacité à réduire la frataxine dans deux lignées cellulaires différentes (HeLa et HEK 293T). Puis nous sommes passés aux tests *in vivo*.

5.1 Les tests d'efficacité de shARNs *in vitro* :

5.1.1 Les shARNs diminuent les ARNm de la frataxine dans les cellules HeLa et HEK 293T

Dans la perspective d'évaluer l'effet des shARNs sur l'ARNm de la frataxine, nous avons transfecté les cellules HeLa avec 1 µg de chaque type de shARNs, puis extrait les ARNm. Sans effet des shARNs,

il devrait y avoir la même quantité d'ARNm que dans les cellules contrôles traitées avec du shARN-scramble, qu'il faut rappeler n'a aucune complémentarité avec l'ARNm de la frataxine.

Nos résultats de PCR quantitatif en temps réel démontrent une diminution de la quantité des ARNm de la frataxine, indépendamment de leurs sites de complémentarité. Le shARN1 ayant son site de complémentarité sur l'exon 3 et le shARN3 ayant son site de complémentarité sur l'exon 2 étaient capables de réduire significativement le taux de frataxine dans les lignées cellulaires HeLa et HEK 293T. Cette efficacité de diminution a aussi été observée par Chandran et coll. en 2017, qui ont démontré l'effet réducteur des shARNs sur les ARNm de la frataxine dans les cellules N2a (21). Les mêmes effets ont été retrouvés par Loria et coll. en 2015 en employant un shARN (shARN37) sur les astrocytes humains (118).

On peut donc en déduire que les shARNs réduisaient efficacement l'ARNm de la frataxine et que leur efficacité était étroitement liée à leurs sites de complémentarité.

5.1.2 Les shARNs réduisent les taux de frataxine dans les cellules HeLa et HEK 293T

Le dosage de la frataxine par les tests ELISA quantitatif a permis d'évaluer l'effet des shARNs sur le taux de frataxine dans les cellules HeLa et HEK 293T. Nous avons noté une baisse du taux de frataxine allant de 5 à 70 % dans les cellules traitées. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Guccini et coll. en 2011 (28). Après avoir interféré avec l'expression de la frataxine à l'aide d'une approche basée sur les shARNs dans les lignées cellulaires HeLa et U118, ces chercheurs ont obtenu une réduction de 60 à 70 % de la frataxine (28). Loria et coll. ont aussi retrouvé une réduction entre 40 et 60 % dans les astrocytes après 72 h de transduction avec des lentivirus (shRNA37) sous le promoteur H1 (118). Dans notre étude, le grand intervalle de taux de réduction de la frataxine pourrait s'expliquer par le choix des lignées cellulaires qui diffèrent des autres études, car le taux de frataxine varie d'une lignée à l'autre. Il faut aussi noter que l'efficacité des shARNs varie selon les sites de complémentarité, car en effectuant la co-transfection de nos shARNs, nous avons pu remarquer que l'efficacité de réduction de l'ARNm de la frataxine reste toujours liée aux shARN1 et shARN3.

5.2 Test *in vivo* dans les souris YG8sR

Pour évaluer l'impact des shARNs sur le comportement, des souris YG8sR ont reçu des injections allant de $1,2 \times 10^{12}$ à $2,4 \times 10^{12}$ copies d'AAV-shARN-mCherry, puis les comportements ont été suivis

pendant un intervalle de 45 jours. Les résultats obtenus pour le dernier comportement après l'injection ont révélé l'effet des shARNs sur le poids, le nombre d'erreurs des pattes, le rapport erreurs de pattes/distance parcourue et le rapport poids/temps d'accrochage. Nous avons observé des effets plus marqués chez les souris ayant reçu le shARN1 à 2X par rapport à celles du groupe traité avec du 4X. Cette différence pourrait s'expliquer par le nombre limité de souris par groupe et les larges déviations standards dûes à certains comportements anormaux des souris lors d'un test. Des investigations plus poussées pourraient aider à amender cette observation.

5.2.1 Les shARNs entraînent la perte de poids chez les souris YG8sR

Le poids des souris relevé pendant le suivi nous ont permis d'avoir des courbes pondérales et d'observer leurs tendances. Normalement, sans l'effet d'un traitement, la courbe de la moyenne des poids de toutes les souris en santé doit être croissante. L'effet des shARNs entraîne une chute de la courbe pondérale chez les souris traitées avec le shARN1. Cette chute pourrait s'expliquer par le fait que les souris présentant les signes de la maladie s'affaiblissent progressivement et s'alimentent moins bien. La même tendance a été observée par Chandran et coll. après un knockdown de la frataxine. Ils ont utilisé un shARN ciblant le gène de la frataxine sous l'influence du promoteur H1 inductible par la doxycycline chez les souris C57BL/6 (21). Puccio et coll. en 2001 ont démontré une réduction de poids de 18 % lors du suivi et une réduction de poids de 41 % à la mort (17). Nos résultats diffèrent du gain pondéral retrouvé par Anjomani et coll. en 2015 chez les souris YG8sR (19). Cette différence pourrait s'expliquer par le plus jeune âge de nos souris ne permettant pas le développement d'une intolérance au glucose qui entrainera une obésité.

5.2.2 Les shARNs entraînent des erreurs des pattes pendant les traversées des barres dentées et en T inversée.

En évaluant la motricité et l'équilibre des souris avec les tests des barres, nous avons observé des augmentations des erreurs des pattes durant le test de notched et aussi du T inversé. Les erreurs de pattes confirment un trouble de motricité et de perte d'équilibre chez nos souris modèles. Ces résultats ont été retrouvés chez quelques modèles, à savoir les modèles Pvalb cKO et shARN inductible ULCA (21, 55). Ces symptômes sont un exemple de troubles neurologiques chez les patients FRDA (44, 47).

Nous avons aussi observé que le temps mis pour traverser la barre dans les deux tests n'étaient pas significativement différents. Il faut noter que ces résultats pourraient s'expliquer par le petit nombre

de souris dans notre échantillon. Ils peuvent aussi être dus à la spécificité de ce paramètre pour l'évaluation de ces signes.

5.2.3 Les shARNs prolongent le temps d'immobilisation et augmentent le rapport du nombre d'erreurs de pattes sur la distance parcourue pendant le test de parallel rod floor.

Le test de parallel rod floor conçu pour évaluer les différences de coordination motrice nous a révélé une augmentation très significative du temps d'immobilisation. Cette augmentation a été observée chez les souris ayant reçu le shARN1 2X. Les souris présentant un déficit moteur ont tendance à être moins actives, car les souris perdent de la vitalité et on observe un ralentissement de la vitesse des mouvements. Ces résultats sont comparables à ceux de Piquet et coll. en 2018 et de Chandran et coll. en 2017, qui ont observé respectivement chez Pvalb cKO et FRDAkd une apparition progressive de troubles de la coordination(21, 55), ainsi qu'à ceux observés par Anjomani et coll. en 2015, qui ont rapporté un manque de contrôle moteur coordonné chez les souris YG8sR par rapport aux contrôles (19). Ce trouble fait partie intégrante du cortège des signes retrouvés chez l'humain (45, 47).

5.2.4 Les shARNs diminuent le rapport temps d'accrochage/poids pendant le test de Hanging

Les résultats obtenus nous ont révélé que l'effet des shARNs a entraîné une perte de la force musculaire qui s'est traduite par une diminution des temps d'accrochage. Nos résultats sont comparables à ceux de Chandran et coll. qui ont rapporté une baisse du rapport temps d'accrochage/poids des souris chez les souris FRDAkd (21). Chez le modèle KIKO de McMackin et coll., des diminutions significatives de la force et de l'endurance par le test de l'écran inversé ont aussi été rapportées (119). L'analyse des résultats des souris YG8sR a révélé une altération de la force neuromusculaire; cette même observation a été faite par Anjomani et coll. en 2015 (19). Normalement, les souris doivent avoir un poids assez normal et tenir plus longtemps agrippées à la grille métallique. Ce qui nous donne un rapport temps sur le poids corporel équilibré. Mais quand les souris commencent à présenter des symptômes, elles perdent du poids, ainsi qu'une perte de la force musculaire, ce qui réduit considérablement leur temps d'accrochage. Ces symptômes sont similaires à la perte de la force musculaire retrouvée chez les patients FRDA (21, 120).

En conclusion, nos souris ont montré une activité locomotrice réduite, un trouble de coordination et une force musculaire plus faible. Notre modèle de souris amélioré, Imp-YG8sR, présente un phénotype plus sévère, qui se rapproche davantage de celui des patients atteints d'ataxie de Friedreich que le

modèle de souris YG8sR original. Ce nouveau modèle est d'abord proche sur le plan génotypique avec des expansions de GAA de 250 à 300. Il offre la possibilité de tester les deux grands groupes de thérapies.

Le nouveau modèle Imp-YG8sR présente plusieurs caractéristiques uniques qui représentent des avantages pour les tests thérapeutiques. En outre, la réduction de la frataxine chez le modèle YG8sR peut fournir des informations supplémentaires sur la séquence de la vulnérabilité des tissus au cours de la progression de la maladie. Par conséquent, ce modèle sera d'une importance capitale pour mieux tester des agents thérapeutiques visant à activer ou reconduire la production endogène ou l'apport exogène de la frataxine. Les études ultérieures ont démontré qu'une augmentation minime du taux de frataxine pourrait être bénéfique pour le patient (12, 13, 48, 51). De plus, la réduction de l'expression a été possible en utilisant des shARNs de différentes efficacités. Ces différentes efficacités de diminutions de la frataxine permettront d'estimer le seuil critique du niveau de frataxine nécessaire pour induire un dysfonctionnement sélectif dans le système nerveux (DRGs et moelle épinière) et pour comprendre l'apparition d'un dysfonctionnement spécifique au tissu dans la FRDA.

Conclusion

L'ataxie de Friedreich est une pathologie neurodégénérative et héréditaire invalidante. En plus du défi de trouver un traitement curatif, se pose un problème de modèle reproduisant une symptomatologie proche des patients FRDA. Les modèles existants présentent soit un phénotype trop sévère de la maladie ou un phénotype plutôt léger. Notre étude propose une nouvelle stratégie pour obtenir un modèle plus proche des patients FRDA reproduisant des signes de la maladie. Les modèles les plus récents, plus proches sur le plan génotypique, présentent un léger phénotype. Ce sont les souris YG8sR qui ont un transgène humain avec une expansion de 250 à 300 GAA. Nous avons donc choisi d'accentuer le phénotype de ce modèle en utilisant un shARN ciblant le gène de la frataxine.

Les shARNs sont capables d'interférer avec l'ARNm de la frataxine pour réprimer le gène. La première partie de cette étude s'est focalisée sur la construction et le test d'efficacité des shARNs. Nous sommes arrivés à construire 4 shARNs différents par leurs sites de complémentarité sur l'ARNm de la frataxine. Un shARN-scramble a aussi été produit comme contrôle négatif. Nous avons pu évaluer l'efficacité de réduction du taux de frataxine dans les cellules HeLa et HEK 293T. Les shARNs réduisent le niveau des ARNm de la frataxine ainsi que le taux de la protéine frataxine *in vitro*. Après ce test, nous avons porté notre choix sur deux shARNs. Le premier est le shARN1 qui a réduit de plus de 70 % le taux de la frataxine et l'autre le shARN6 qui a réduit d'environ 40% le taux de la frataxine.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons injecté les shARNs sélectionnés aux souris YG8sR. Nous avons pu démontrer que le shARN1 injecté à 1.2×10^{12} AAV-shARN-mCherry a entraîné une perte de poids chez les souris YG8sR. Les souris ont présenté un trouble de motricité et de perte d'équilibre confirmé par l'augmentation des erreurs des pattes pendant les tests de notched et T inverted. Nous avons aussi relevé une perte de la coordination par une augmentation du rapport erreurs de pattes/distance parcourue et de la motricité par l'augmentation du temps d'immobilisation, ainsi qu'une réduction de la force musculaire confirmée par une diminution du temps d'accrochage.

Nous avons donc obtenu un modèle YG8sR amélioré (Imp-YG8sR) qui présente un phénotype plus accentué que l'original YG8sR et plus proche du patient FRDA. En revanche, dans cette section de notre étude, nous n'avons pas encore intégré les résultats du dosage de frataxine dans les différents organes. Les tests *in vivo* avec le shARN3 qui sont en cours feront l'objet d'une publication à venir. Nos prochains travaux permettront d'explorer les atteintes des autres organes et de tester l'efficacité

des thérapies en développement dans notre laboratoire afin de pouvoir proposer ce modèle comme l'un des meilleurs pour l'étude de la FRDA.

Bibliographie

1. Kumari D, Usdin K. Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clinical Epigenetics*. 2012 2012/01/30;4(1):2.
2. Delatycki MB, Bidichandani SI. Friedreich ataxia- pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiology of disease*. 2019;132:104606.
3. Castro IH, Pignataro MF, Sewell KE, Espeche LD, Herrera MG, Noguera ME, et al. Frataxin Structure and Function. *Subcell Biochem*. 2019;93:393-438. PubMed PMID: 31939159. Epub 2020/01/16. eng.
4. Koeppen AH. Nikolaus Friedreich and degenerative atrophy of the dorsal columns of the spinal cord. *J Neurochem*. 2013 2013/08//;126 Suppl 1:4-10. PubMed PMID: 23859337. eng.
5. Bürk K. Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum Ataxias*. 2017;4:4. PubMed PMID: 28405347. PMCID: PMC5383992. Epub 2017/04/14. eng.
6. Koeppen AH, Becker AB, Qian J, Feustel PJ. Friedreich Ataxia: Hypoplasia of Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2017;76(2):101-8.
7. Tsou AY, Paulsen EK, Lagedrost SJ, Perlman SL, Mathews KD, Wilmot GR, et al. Mortality in Friedreich ataxia. *J Neurol Sci*. 2011 Aug 15;307(1-2):46-9. PubMed PMID: 21652007. Epub 2011/06/10. eng.
8. Palomo GM, Cerrato T, Gargini R, Diaz-Nido J. Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Human Molecular Genetics*. 2011;20(14):2807-22.
9. Pandolfo M. Friedreich ataxia: The clinical picture. *Journal of Neurology*. 2009 2009/03/01;256(1):3-8.
10. Zhang S, Napierala M, Napierala JS. Therapeutic Prospects for Friedreich's Ataxia. *Trends Pharmacol Sci*. 2019 Apr;40(4):229-33. PubMed PMID: 30905359. PMCID: PMC6826337. Epub 2019/03/25. eng.
11. Chapdelaine P, Gerard C, Sanchez N, Cherif K, Rousseau J, Ouellet DL, et al. Development of an AAV9 coding for a 3XFLAG-TALEfrat#8-VP64 able to increase in vivo the human frataxin in YG8R mice. *Gene Ther*. 2016 Jul;23(7):606-14. PubMed PMID: 27082765. PMCID: PMC4940929. Epub 2016/04/16.
12. Cherif K, Gerard C, Rousseau J, Ouellet DL, Chapdelaine P, Tremblay JP. Increased Frataxin Expression Induced in Friedreich Ataxia Cells by Platinum TALE-VP64s or Platinum TALE-SunTag. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018 Sep 7;12:19-32. PubMed PMID: 30195758. PMCID: PMC6019861. Epub 2018/09/10.
13. Li Y, Polak U, Bhalla AD, Rozwadowska N, Butler JS, Lynch DR, et al. Excision of Expanded GAA Repeats Alleviates the Molecular Phenotype of Friedreich's Ataxia. *Mol Ther*. 2015 Jun;23(6):1055-65. PubMed PMID: 25758173. PMCID: PMC4817761. Epub 2015/03/12. eng.
14. Ouellet DL, Cherif K, Rousseau J, Tremblay JP. 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.* 2017 May;24(5):265-74. PubMed PMID: 28024081. Epub 2016/12/27. eng.

15. Groh M, Lufino MM, Wade-Martins R, Gromak N. R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in Friedreich ataxia and fragile X syndrome. *PLoS Genet.* 2014 May;10(5):e1004318. PubMed PMID: 24787137. PMCID: PMC4006715. Epub 2014/05/03.

16. Cossée M, Puccio H, Gansmuller A, Koutnikova H, Dierich A, LeMeur M, et al. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet.* 2000 May 1;9(8):1219-26. PubMed PMID: 10767347. Epub 2000/04/18. eng.

17. Puccio H, Simon D, Cossée M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, et al. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet.* 2001 Feb;27(2):181-6. PubMed PMID: 11175786. Epub 2001/02/15. eng.

18. McMackin MZ, Henderson CK, Cortopassi GA. Neurobehavioral deficits in the KIKO mouse model of Friedreich's ataxia. *Behav Brain Res.* 2017 Jan 1;316:183-8. PubMed PMID: 27575947. PMCID: PMC5051948. Epub 2016/08/31.

19. Anjomani Virmouni S, Ezzatizadeh V, Sandi C, Sandi M, Al-Mahdawi S, Chutake Y, et al. A novel GAA-repeat-expansion-based mouse model of Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech.* 2015 Mar;8(3):225-35. PubMed PMID: 25681319. PMCID: PMC4348561. Epub 2015/02/15. eng.

20. Ocana-Santero G, Díaz-Nido J, Herranz-Martín S. Future Prospects of Gene Therapy for Friedreich's Ataxia. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 11;22(4). PubMed PMID: 33670433. PMCID: PMC7918362. Epub 2021/03/07. eng.

21. Chandran V, Gao K, Swarup V, Versano R, Dong H, Jordan MC, et al. Inducible and reversible phenotypes in a novel mouse model of Friedreich's Ataxia. *Elife.* 2017 Dec 19;6. PubMed PMID: 29257745. PMCID: PMC5736353. Epub 2017/12/20. eng.

22. Chamberlain S, Shaw J, Rowland A, Wallis J, South S, Nakamura Y, et al. Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature.* 1988 1988/07/01;334(6179):248-50.

23. Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science.* 1996 Mar 8;271(5254):1423-7. PubMed PMID: 8596916. Epub 1996/03/08. eng.

24. Pandolfo M. Friedreich ataxia: Detection of GAA repeat expansions and frataxin point mutations. *Methods Mol Med.* 2006;126:197-216. PubMed PMID: 16930014. Epub 2006/08/26. eng.

25. Patel PI, Isaya G. Friedreich ataxia: from GAA triplet-repeat expansion to frataxin deficiency. *Am J Hum Genet.* 2001 2001/07//;69(1):15-24. PubMed PMID: 11391483. eng.

26. Yoon T, Cowan JA. 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.* 2003 May 21;125(20):6078-84. PubMed PMID: 12785837. Epub 2003/06/06. eng.

27. González-Cabo P, Vázquez-Manrique RP, García-Gimeno MA, Sanz P, Palau F. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum Mol Genet.* 2005 Aug 1;14(15):2091-8. PubMed PMID: 15961414. Epub 2005/06/18. eng.

28. Guccini I, Serio D, Condò I, Rufini A, Tomassini B, Mangiola A, et al. Frataxin participates to the hypoxia-induced response in tumors. *Cell Death Dis.* 2011 Feb 24;2(2):e123. PubMed PMID: 21368894. PMCID: PMC3101705. Epub 2011/03/04. eng.
29. Pastore A, Puccio H. Frataxin: a protein in search for a function. *J Neurochem.* 2013 Aug;126 Suppl 1:43-52. PubMed PMID: 23859340. Epub 2013/07/24. eng.
30. Shan Y, Schoenfeld RA, Hayashi G, Napoli E, Akiyama T, Iodi Carstens M, et al. 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.* 2013 Nov 1;19(13):1481-93. PubMed PMID: 23350650. PMCID: PMC3797453. Epub 2013/01/29. eng.
31. Stemmler TL, Lesuisse E, Pain D, Dancis A. Frataxin and mitochondrial FeS cluster biogenesis. *J Biol Chem.* 2010 Aug 27;285(35):26737-43. PubMed PMID: 20522547. PMCID: PMC2930671. Epub 2010/06/05. eng.
32. Richardson DR, Huang ML, Whitnall M, Becker EM, Ponka P, Suryo Rahmanto Y. The ins and outs of mitochondrial iron-loading: the metabolic defect in Friedreich's ataxia. *J Mol Med (Berl).* 2010 Apr;88(4):323-9. PubMed PMID: 19997898. Epub 2009/12/10. eng.
33. Marmolino D, Acquaviva F, Pinelli M, Monticelli A, Castaldo I, Filla A, et al. PPAR-gamma agonist Azelaoyl PAF increases frataxin protein and mRNA expression: new implications for the Friedreich's ataxia therapy. *Cerebellum.* 2009 Jun;8(2):98-103. PubMed PMID: 19104905. Epub 2008/12/24. eng.
34. Clark E, Johnson J, Dong Yi N, Mercado-Ayon E, Warren N, Zhai M, et al. Role of frataxin protein deficiency and metabolic dysfunction in Friedreich ataxia, an autosomal recessive mitochondrial disease. *Neuronal Signaling.* 2018;2(4).
35. González-Cabo P, Palau F. Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia. *J Neurochem.* 2013 Aug;126 Suppl 1:53-64. PubMed PMID: 23859341. Epub 2013/07/24. eng.
36. Evans OB. Human muscle pyruvate dehydrogenase activity. *Neurology.* 1983 Jan;33(1):51-6. PubMed PMID: 6687364. Epub 1983/01/01. eng.
37. Vázquez-Manrique RP, González-Cabo P, Ros S, Aziz H, Baylis HA, Palau F. Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *Faseb j.* 2006 Jan;20(1):172-4. PubMed PMID: 16293572. Epub 2005/11/19. eng.
38. Schmucker S, Martelli A, Colin F, Page A, Wattenhofer-Donzé M, Reutenauer L, et al. Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One.* 2011 Jan 26;6(1):e16199. PubMed PMID: 21298097. PMCID: PMC3027643. Epub 2011/02/08. eng.
39. Lin H, Magrane J, Rattelle A, Stepanova A, Galkin A, Clark EM, et al. Early cerebellar deficits in mitochondrial biogenesis and respiratory chain complexes in the KIKO mouse model of Friedreich ataxia. *Dis Model Mech.* 2017 Nov 1;10(11):1343-52. PubMed PMID: 29125827. PMCID: PMC5719255. Epub 2017/11/11. eng.
40. Lewerenz J, Ates G, Methner A, Conrad M, Maher P. Oxytosis/Ferroptosis-(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in Diseases of the Central

Nervous System. *Front Neurosci.* 2018;12:214. PubMed PMID: 29731704. PMCID: PMC5920049. Epub 2018/05/08. eng.

41. Guiney SJ, Adlard PA, Bush AI, Finkelstein DI, Ayton S. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2017 Mar;104:34-48. PubMed PMID: 28082232. Epub 2017/01/14. eng.

42. Igoillo-Esteve M, Gurgul-Convey E, Hu A, Romagueira Bichara Dos Santos L, Abdulkarim B, Chintawar S, et al. Unveiling a common mechanism of apoptosis in β -cells and neurons in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet.* 2015 Apr 15;24(8):2274-86. PubMed PMID: 25552656. Epub 2015/01/02. eng.

43. Harding AE. 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.* 1981 Sep;104(3):589-620. PubMed PMID: 7272714. Epub 1981/09/01. eng.

44. Kuo SH. Ataxia. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. 2019 Aug;25(4):1036-54. PubMed PMID: 31356292. PMCID: PMC7339377. Epub 2019/07/30. eng.

45. Zesiewicz TA, Hancock J, Ghanekar SD, Kuo S-H, Dohse CA, Vega J. Emerging therapies in Friedreich's Ataxia. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2020 2020/12/01;20(12):1215-28.

46. Cook A, Giunti P. Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management. *British Medical Bulletin.* 2017;124(1):19-30.

47. Aranca TV, Jones TM, Shaw JD, Staffetti JS, Ashizawa T, Kuo SH, et al. Emerging therapies in Friedreich's ataxia. *Neurodegener Dis Manag.* 2016;6(1):49-65. PubMed PMID: 26782317. PMCID: PMC4768799. Epub 2016/01/20. eng.

48. Clay A, Hearle P, Schadt K, Lynch DR. New developments in pharmacotherapy for Friedreich ataxia. *Expert Opin Pharmacother.* 2019 Oct;20(15):1855-67. PubMed PMID: 31311349. Epub 2019/07/18. eng.

49. Ferreira GC, McKenna MC. L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochem Res.* 2017 Jun;42(6):1661-75. PubMed PMID: 28508995. PMCID: PMC5621476. Epub 2017/05/17. eng.

50. Zesiewicz T, Heerinckx F, De Jager R, Omidvar O, Kilpatrick M, Shaw J, et al. Randomized, clinical trial of RT001: Early signals of efficacy in Friedreich's ataxia. *Mov Disord.* 2018 Jul;33(6):1000-5. PubMed PMID: 29624723. Epub 2018/04/07. eng.

51. Lynch DR, Chin MP, Delatycki MB, Subramony SH, Corti M, Hoyle JC, et al. Safety and Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia (MOXIe Study). *Ann Neurol.* 2021 Feb;89(2):212-25. PubMed PMID: 33068037. PMCID: PMC7894504 omaveloxolone for clinical applications. M.P.C., C.J.M., M.O., and A.G. are employees of Reata Pharmaceuticals. Epub 2020/10/18. eng.

52. Kemp KC, Cerminara N, Hares K, Redondo J, Cook AJ, Haynes HR, et al. Cytokine therapy-mediated neuroprotection in a Friedreich's ataxia mouse model. *Ann Neurol.* 2017 Feb;81(2):212-26. PubMed PMID: 28009062. PMCID: PMC5324580. Epub 2016/12/23. eng.

53. Gérard C, Xiao X, Filali M, Coulombe Z, Arsenault M, Couet J, et al. An AAV9 coding for frataxin clearly improved the symptoms and prolonged the life of Friedreich ataxia mouse models.

Mol Ther Methods Clin Dev. 2014;1:14044. PubMed PMID: 26015982. PMCID: PMC4362356. Epub 2014/01/01. eng.

54. Perdomini M, Belbellaa B, Monassier L, Reutenauer L, Messaddeq N, Cartier N, et al. Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat Med*. 2014 May;20(5):542-7. PubMed PMID: 24705334. Epub 2014/04/08. eng.

55. Piguet F, de Montigny C, Vaucamps N, Reutenauer L, Eisenmann A, Puccio H. Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia. *Mol Ther*. 2018 Aug 1;26(8):1940-52. PubMed PMID: 29853274. PMCID: PMC6094869. Epub 2018/06/02. eng.

56. Evans-Galea MV, Pébay A, Dottori M, Corben LA, Ong SH, Lockhart PJ, et al. Cell and gene therapy for Friedreich ataxia: progress to date. *Hum Gene Ther*. 2014 Aug;25(8):684-93. PubMed PMID: 24749505. Epub 2014/04/23. eng.

57. Adinolfi S, Nair M, Politou A, Bayer E, Martin S, Temussi P, et al. The factors governing the thermal stability of frataxin orthologues: how to increase a protein's stability. *Biochemistry*. 2004 Jun 1;43(21):6511-8. PubMed PMID: 15157084. Epub 2004/05/26. eng.

58. Soragni E, Miao W, Iudicello M, Jacoby D, De Mercanti S, Clerico M, et al. Epigenetic therapy for Friedreich ataxia. *Ann Neurol*. 2014 Oct;76(4):489-508. PubMed PMID: 25159818. PMCID: PMC4361037. Epub 2014/08/28. eng.

59. Martin AS, Abraham DM, Hershberger KA, Bhatt DP, Mao L, Cui H, et al. Nicotinamide mononucleotide requires SIRT3 to improve cardiac function and bioenergetics in a Friedreich's ataxia cardiomyopathy model. *JCI Insight*. 2017 Jul 20;2(14). PubMed PMID: 28724806. PMCID: PMC5518566. Epub 2017/07/21. eng.

60. Reetz K, Hilgers RD, Isfort S, Dohmen M, Didszun C, Fedosov K, et al. Protocol of a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicentre study of the efficacy and safety of nicotinamide in patients with Friedreich ataxia (NICOFA). *Neurol Res Pract*. 2019;1:33. PubMed PMID: 33324899. PMCID: PMC7650055. Epub 2019/10/15. eng.

61. Tsou AY, Friedman LS, Wilson RB, Lynch DR. Pharmacotherapy for Friedreich ataxia. *CNS Drugs*. 2009;23(3):213-23. PubMed PMID: 19320530. Epub 2009/03/27. eng.

62. Lynch DR, Hauser L, McCormick A, Wells M, Dong YN, McCormack S, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon- γ 1b in Friedreich Ataxia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019 Mar;6(3):546-53. PubMed PMID: 30911578. PMCID: PMC6414489 employees of Horizon Pharmaceutical. David Lynch also receives grants from the MDA, FDA, NIH, FARA, and Reata Pharmaceutical. Epub 2019/03/27. eng.

63. La Rosa P, Petrillo S, Turchi R, Berardinelli F, Schirinzi T, Vasco G, et al. The Nrf2 induction prevents ferroptosis in Friedreich's Ataxia. *Redox Biol*. 2021 Jan;38:101791. PubMed PMID: 33197769. PMCID: PMC7677700. Epub 2020/11/17. eng.

64. Yiu EM, Tai G, Peverill RE, Lee KJ, Croft KD, Mori TA, et al. An open-label trial in Friedreich ataxia suggests clinical benefit with high-dose resveratrol, without effect on frataxin levels. *J Neurol*. 2015 May;262(5):1344-53. PubMed PMID: 25845763. Epub 2015/04/08. eng.

65. Wang H, Norton J, Xu L, DeMartinis N, Sen R, Shah A, et al. Results of a randomized double-blind study evaluating luvadaxistat in adults with Friedreich ataxia. *Ann Clin Transl Neurol*. 2021

Jun;8(6):1343-52. PubMed PMID: 34018342. PMCID: PMC8164851 Inc. L.X. and N.D. were employed by Takeda at the time of the study. J.F. is an employee of the Friedreich's Ataxia Research Alliance (FARA). D.L. receives grants from the National Institutes of Health, Muscular Dystrophy Association, FARA, Reata Pharmaceuticals, Takeda, BioElectron Technology Corporation, Stealth BioTherapeutics Inc., and Minorix Therapeutics. Epub 2021/05/22. eng.

66. Patel M, Schadt K, McCormick A, Isaacs C, Dong YN, Lynch DR. Open-label pilot study of oral methylprednisolone for the treatment of patients with friedreich ataxia. *Muscle Nerve*. 2019 Nov;60(5):571-5. PubMed PMID: 31206761. Epub 2019/06/18. eng.

67. Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, et al. Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci*. 2004 Feb 25;24(8):1987-95. PubMed PMID: 14985441. PMCID: PMC6730414. Epub 2004/02/27. eng.

68. Miranda CJ, Santos MM, Ohshima K, Smith J, Li L, Bunting M, et al. Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett*. 2002 Feb 13;512(1-3):291-7. PubMed PMID: 11852098. Epub 2002/02/20. eng.

69. Lin H, Magrane J, Clark EM, Halawani SM, Warren N, Rattelle A, et al. Early VGLUT1-specific parallel fiber synaptic deficits and dysregulated cerebellar circuit in the KIKO mouse model of Friedreich ataxia. *Dis Model Mech*. 2017 Dec 19;10(12):1529-38. PubMed PMID: 29259026. PMCID: PMC5769605. Epub 2017/12/21. eng.

70. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ruddle P, Carroll C, Webster Z, Pook M. GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics*. 2004 Aug;84(2):301-10. PubMed PMID: 15233994. Epub 2004/07/06. eng.

71. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Varshney D, Lawrence L, Lowrie MB, Hughes S, et al. GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics*. 2006 Nov;88(5):580-90. PubMed PMID: 16919418. PMCID: PMC2842930. Epub 2006/08/22. eng.

72. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54. PubMed PMID: 8252621. Epub 1993/12/03. eng.

73. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855-62. PubMed PMID: 8252622. Epub 1993/12/03. eng.

74. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86-9. PubMed PMID: 11081512. Epub 2000/11/18. eng.

75. Béthune J, Artus-Revel CG, Filipowicz W. Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA mediated silencing in mammalian cells. *EMBO reports*. 2012;13.

76. Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, et al. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nature Biotechnology*. 2005 2005/02/01;23(2):227-31.

77. Paddison PJ, Caudy AA, Sachidanandam R, Hannon GJ. Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol Biol*. 2004;265:85-100. PubMed PMID: 15103070. Epub 2004/04/23. eng.

78. Yuan J, Wang X, Zhang Y, Hu X, Deng X, Fei J, et al. shRNA Transcribed by RNA Pol II Promoter Induce RNA Interference in Mammalian Cell. *Molecular Biology Reports*. 2006 2006/03/01;33(1):43-9.
79. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Reviews Genetics*. 2007 2007/03/01;8(3):173-84.
80. Bobbin M, Burnett J, Rossi J. RNA interference approaches for treatment of HIV-1 infection. *Genome Medicine*. 2015 05/28;7.
81. Ouellet DL, Perron MP, Gobeil LA, Plante P, Provost P. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006(4):69616. PubMed PMID: 17057368. PMCID: PMC1559927. Epub 2006/10/24. eng.
82. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11. PubMed PMID: 9486653. Epub 1998/03/05. eng.
83. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Dec;67(4):657-85. PubMed PMID: 14665679. PMCID: PMC309050. Epub 2003/12/11. eng.
84. Abedini F, Ebrahimi M, Hosseinkhani H. Technology of RNA Interference in Advanced Medicine. *Microna*. 2018;7(2):74-84. PubMed PMID: 29380708. Epub 2018/01/31. eng.
85. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*. 2010;629:141-58. PubMed PMID: 20387148. PMCID: PMC3679364. Epub 2010/04/14. eng.
86. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014 2014/08/01;15(8):509-24.
87. Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*. 2012 Jun;85(2):187-200. PubMed PMID: 22737048. PMCID: PMC3375670. Epub 2012/06/28. eng.
88. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642-55. PubMed PMID: 19239886. PMCID: PMC2675692. Epub 2009/02/26. eng.
89. Bénard J, Douc-Rasy S. [Micro-RNA and oncogenesis]. *Bull Cancer*. 2005 Sep;92(9):757-62. PubMed PMID: 16203264. Epub 2005/10/06. Micro-ARN et oncogénèse. fre.
90. Volinia S, Croce CM. Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 30;110(18):7413-7. PubMed PMID: 23589849. PMCID: PMC3645522. Epub 2013/04/17. eng.
91. Shah MY, Ferrajoli A, Sood AK, Lopez-Berestein G, Calin GA. microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept. *EBioMedicine*. 2016 Oct;12:34-42. PubMed PMID: 27720213. PMCID: PMC5078622. Epub 2016/10/26. eng.
92. Pan Q, van der Laan LJW, Janssen HLA, Peppelenbosch MP. A dynamic perspective of RNAi library development. *Trends in Biotechnology*. 2012 2012/04/01;30(4):206-15.
93. Bofill-De Ros X, Gu S. Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods*. 2016 04/01;103.

94. Fu X, Zhu W, Cai L, Liao B, Peng L, Chen Y, et al. Improved Pre-miRNAs Identification Through Mutual Information of Pre-miRNA Sequences and Structures. *Frontiers in Genetics*. 2019-February-25;10(119). English.
95. Bofill-De Ros X, Kasprzak WK, Bhandari Y, Fan L, Cavanaugh Q, Jiang M, et al. Structural Differences between Pri-miRNA Paralogs Promote Alternative Drosha Cleavage and Expand Target Repertoires. *Cell Reports*. 2019 2019/01/08;26(2):447-59.e4.
96. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2010 2010/11/01;1803(11):1231-43.
97. Sheng P, Flood KA, Xie M. Short Hairpin RNAs for Strand-Specific Small Interfering RNA Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020 2020-August-07;8(940). English.
98. Gu S, Jin L, Zhang F, Sarnow P, Kay MA. Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Feb;16(2):144-50. PubMed PMID: 19182800. PMCID: PMC2713750. Epub 2009/02/03. eng.
99. Ma H, Wu Y, Dang Y, Choi JG, Zhang J, Wu H. Pol III Promoters to Express Small RNAs: Delineation of Transcription Initiation. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 May 6;3(5):e161. PubMed PMID: 24803291. PMCID: PMC4040628. Epub 2014/05/08. eng.
100. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):550-3. PubMed PMID: 11910072. Epub 2002/03/23. eng.
101. Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5515-20. PubMed PMID: 11960009. PMCID: PMC122801. Epub 2002/04/18. eng.
102. Czauderna F, Santel A, Hinz M, Fechtner M, Durieux B, Fisch G, et al. Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res*. 2003 Nov 1;31(21):e127. PubMed PMID: 14576327. PMCID: PMC275484. Epub 2003/10/25. eng.
103. Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*. 2002 Oct;20(10):1006-10. PubMed PMID: 12244328. Epub 2002/09/24. eng.
104. Denti MA, Rosa A, Sthandier O, De Angelis FG, Bozzoni I. A new vector, based on the PolIII promoter of the U1 snRNA gene, for the expression of siRNAs in mammalian cells. *Mol Ther*. 2004 Jul;10(1):191-9. PubMed PMID: 15272480. Epub 2004/07/27. eng.
105. Lebbink RJ, Lowe M, Chan T, Khine H, Wang X, McManus MT. Polymerase II promoter strength determines efficacy of microRNA adapted shRNAs. *PLoS One*. 2011;6(10):e26213. PubMed PMID: 22031824. PMCID: PMC3198731. Epub 2011/10/28. eng.
106. Lambeth LS, Smith CA. Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods Mol Biol*. 2013;942:205-32. PubMed PMID: 23027054. Epub 2012/10/03. eng.
107. McCaffrey AP, Meuse L, Pham T-TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature*. 2002 2002/07/01;418(6893):38-9.
108. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nature Biotechnology*. 2003 2003/06/01;21(6):639-44.

109. Ponnazhagan S, Curiel DT, Shaw DR, Alvarez RD, Siegal GP. Adeno-associated virus for cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2001 Sep 1;61(17):6313-21. PubMed PMID: 11522617. Epub 2001/08/28. eng.
110. Hardcastle N, Boulis NM, Federici T. AAV gene delivery to the spinal cord: serotypes, methods, candidate diseases, and clinical trials. *Expert Opin Biol Ther.* 2018 Mar;18(3):293-307. PubMed PMID: 29249183. Epub 2017/12/19. eng.
111. Mathiesen SN, Lock JL, Schoderboeck L, Abraham WC, Hughes SM. CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development.* 2020 2020/12/11;19:447-58.
112. Di Bonito M, Boulland JL, Krezel W, Setti E, Studer M, Glover JC. Loss of Projections, Functional Compensation, and Residual Deficits in the Mammalian Vestibulospinal System of Hoxb1-Deficient Mice. *eNeuro.* 2015 Nov-Dec;2(6). PubMed PMID: 26730404. PMCID: PMC4697082. Epub 2016/01/06. eng.
113. Deacon RM. Measuring the strength of mice. *J Vis Exp.* 2013 Jun 2(76). PubMed PMID: 23770643. PMCID: PMC3725666. Epub 2013/06/19. eng.
114. Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp.* 2011 Mar 10(49). PubMed PMID: 21445033. PMCID: PMC3197288. Epub 2011/03/30. eng.
115. Kamens HM, Crabbe JC. The parallel rod floor test: a measure of ataxia in mice. *Nat Protoc.* 2007;2(2):277-81. PubMed PMID: 17406586. Epub 2007/04/05. eng.
116. Perdomini M, Hick A, Puccio H, Pook MA. Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *J Neurochem.* 2013 Aug;126 Suppl 1:65-79. PubMed PMID: 23859342. Epub 2013/07/24. eng.
117. Filali M, Lalonde R, Gerard C, Tremblay J. 389. Assessment of Sensorimotor Skills of the MCK Model of Friedreich Ataxia. *Molecular Therapy.* 2015 05/31;23.
118. Loría F, Díaz-Nido J. Frataxin knockdown in human astrocytes triggers cell death and the release of factors that cause neuronal toxicity. *Neurobiol Dis.* 2015 Apr;76:1-12. PubMed PMID: 25554687. Epub 2015/01/03. eng.
119. McMackin MZ, Henderson CK, Cortopassi GA. Neurobehavioral deficits in the KIKO mouse model of Friedreich's ataxia. *Behavioural Brain Research.* 2017 2017/01/01;316:183-8.
120. Richards C, Bouchard JP, Bouchard R, Barbeau H. A preliminary study of dynamic muscle function in hereditary ataxia. *Can J Neurol Sci.* 1980 Nov;7(4):367-77. PubMed PMID: 7214252. Epub 1980/11/01. eng.