

Institut de **G**énétique et de **B**iologie **M**oléculaire et **C**ellulaire
CNRS - INSERM - Université Louis Pasteur de Strasbourg (Strasbourg I)
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur

Discipline : Sciences du Vivant

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Delphine Simon

Modèles murins pour l'ataxie de Friedreich :

De la caractérisation aux essais thérapeutiques

Soutenue publiquement le 8 décembre 2004 devant la commission d'examen :

Mr. Le Professeur Michel Koenig	Directeur de thèse
Mr. Le Professeur Alexis Brice	Rapporteur externe
Mr. Le Docteur Emmanuel Lesuisse	Rapporteur externe
Mr. Le Docteur Jean-Philippe Loeffler	Rapporteur interne
Mme. Le Docteur Hélène Puccio	Examineur
Mr. Le Docteur Pierre Rustin	Examineur

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	8
Liste des tableaux	9
Abréviations	10

.....

PARTIE I : INTRODUCTION	12
--------------------------------	----

Chapitre 1. L'ataxie de Friedreich, une maladie à multiple facettes	13
--	----

1) L'ataxie de Friedreich, une ataxie récessive	13
1.1) L'ataxie	13
1.2) Historique de l'identification clinique de l'ataxie de Friedreich	14
1.3) Fréquence	15
2) L'ataxie de Friedreich, une maladie neurodégénérative avec atteinte cardiaque	15
2.1) Clinique	15
a) Premiers symptômes	16
b) Signes neurologiques	16
c) Signes cardiaques	17
d) Autres atteintes cliniques	18
2.2) Variabilité clinique	18
Les formes atypiques de l'ataxie de Friedreich	19
2.3) Anatomopathologie	19
a) Atteintes du système nerveux central et périphérique	19
Système nerveux central	20
Système nerveux périphérique	21
b) Atteinte cardiaque	22
c) Atteinte pancréatique	23
3) L'ataxie de Friedreich, une maladie à expansion de triplets nucléotidiques	23
3.1) Découverte du gène FRDA	23
3.2) Structure du gène X25	24
3.3) Les mutations	24
a) L'expansion intronique de triplets GAA	24
Les maladies à expansion instable de séquences répétées	26

b) Conséquence transcriptionnelle de l'expansion	27
c) Les mutations ponctuelles	28
d) Corrélation génotype-phénotype	29
3.4) Expression du gène X25	30
4) L'ataxie de Friedreich : une maladie mitochondriale	31
4.1) La protéine responsable de l'AF : la frataxine	31
4.2) Localisation mitochondriale	32
4.3) Maturation de la frataxine	34
Chapitre 2. Fonction de la frataxine	35
1) Les principales hypothèses	35
2) Introduction générale	36
2.1) Le métabolisme du fer	36
a) Fonctions cellulaires du fer	36
b) Le cycle du fer	36
c) La régulation de l'homéostasie du fer	37
d) Régulation de l'homéostasie du fer chez la levure	38
2.2) Les noyaux Fer-Soufre et l'hème	38
a) Les noyaux Fe-S	38
b) L'hème	40
2.3) Le stress oxydatif et les mécanismes de régulation	41
a) Les radicaux libres	41
b) Le stress oxydatif	42
3) La fonction de la frataxine	45
3.1) La première hypothèse, Yfh1p et l'homéostasie mitochondriale du fer	45
3.2) Le tournant, défaut de l'activité des protéines à noyau Fe-S dans des biopsies cardiaques de patients	47
3.3) Une « nouvelle génération » de levures, Yfh1p et la biosynthèse des noyaux Fe-S	
3.4) Les modèles murins, déroulement des évènements élucidé	48
3.5) Yfh1p est remplacée dans la voie de biosynthèse des noyaux Fe-S	49
3.6) Rôle dans la biosynthèse de l'hème	51

3.7) Stress oxydatif : cause ou conséquence ?	52
a) Absence de stress oxydatif dans les tissus atteints des patients	52
b) Absence de stress oxydatif dans les tissus sans frataxine des différents modèles murins	53
c) Lignées cellulaires de patients, absence de stress oxydatif et perturbation du métabolisme des acides aminés soufrés	54
d) Lignées cellulaires de patients « stressées », défaut d'induction de la SOD2	55
4) Conclusions	56
5) Thérapie	58
5.1) Les chélateurs du fer	58
5.2) Les anti-oxydants	59
a) Le coenzyme Q10	60
b) L'idébénone	60
c) Autres antioxydants	62
5.3) Thérapie génique et autres perspectives thérapeutiques	62
.	
PARTIE II : RESULTATS	64
Création et caractérisation des modèles murins pour l'ataxie de Friedreich, études fonctionnelles et essais thérapeutiques	
1) Introduction sur les modèles murins par invalidation ciblée de gène	65
Knock-Out (KO), Knock-In (KI), Knock-Out conditionnel, Knock-Out conditionnel et inductible	67
2) A mon arrivée au laboratoire	69
3) Modèles murins conditionnels pour l'ataxie de Friedreich – publications 1, 2	70
3.1) Stratégie des KO conditionnels	70
3.2) Le modèle Frda/MCK, une avancée cruciale dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'AF – publications 1 et 2	71
a) Caractérisation du modèle Frda/MCK– publications 1 et 2	71
b) Essais thérapeutiques	72
c) Conclusions et perspectives	73
3.3) Le modèle Frda/NSE et les défauts du KO conditionnel – publi.1	74

a) Caractérisation du modèle Frda/NSE	74
b) Conclusions et perspectives	75
4) Modèles murins conditionnels et inductibles pour l'AF – publications 3 et 4	76
4.1) Caractérisation des lignées conditionnelles inductibles Cb et Br– publication 3	76
Conclusions et perspectives	78
4.2) Un modèle d'étude de la neurodégénérescence	79
a) Introduction sur les mécanismes de mort neuronale	79
L'apoptose	79
Apoptose caspase-indépendante	80
La nécrose	81
L'autophagie	82
Délimitation entre les types de mort cellulaire	83
b) Mécanisme autophagique dans les neurones proprioceptifs des ganglions rachidiens des mutants Br et Cb – publication 3	84
c) Mécanisme caspase-indépendant avec participation autophagique dans le cervelet des mutants Cb – publication 4	84
Etude ultrastructurale dans le cervelet des mutants Cb	84
Précision de la mort cellulaire par étude d'expression	85
c) Conclusions et perspectives	86
4.3) Essai thérapeutique sur le modèle Cb	87
a) Importance du modèle pour la réalisation d'essais thérapeutiques	87
b) Mise au point des conditions de l'essai thérapeutique	87
c) Essai thérapeutique et résultats préliminaires	88
5) Apport des modèles dans la compréhension de la fonction de la frataxine – publications 4 et 5	89
5.1) Absence de stress oxydatif	89
a) Approche thérapeutique – publication 5	90
b) Approche moléculaire – publication 5	91
c) Conclusions et perspectives	91
5.2) Etudes en cours	92
a) La voie des acides aminés soufrés - publication 5 et en cours	92
b) L'homéostasie du fer - publications 4 et 5	93
c) La biosynthèse des noyaux Fe-S dans le cervelet des mutants Cb	95

PUBLICATIONS

Publication 1 : 97

Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits.

Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P, Koenig M. Nat Genet. 2001 Feb;27(2):181-6.

Publication 2 : 98

Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia.

Seznec H, Simon D, Monassier L, Criqui-Filipe P, Gansmuller A, Rustin P, Koenig M, Puccio H. Hum Mol Genet. 2004 May 15;13(10):1017-24.

Publication 3 : 99

Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia.

Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, Rustin P, Koenig M, Puccio H. J Neurosci. 2004 Feb 25;24(8):1987-95.

Publication 4 (manuscrit en préparation) : 100

Frataxin-deficient cerebellum of a Friedreich ataxia neurological mouse model demonstrates caspase-independent neuronal death with autophagy and cathepsins induction

Simon D, Gansmuller A, Seznec H, Reutenauer L, Rustin P, Koenig M, Puccio H.

Publication 5 : 101

Friedreich ataxia, the oxidative stress paradox.

Seznec H, Simon D, Bouton C, Reutenauer L, Hertzog A, Drapier J.C, Procaccio V, Patel M, Koenig M, Puccio H. Hum Mol Genet. 2005

.....

PARTIE III : DISCUSSION	102
Les premiers modèles murins de l'AF	103
Importance des modèles murins dans la compréhension des maladies dégénératives	106
Le stress oxydatif : cause ou conséquence ?	107
La mitochondrie au centre des mécanismes de mort cellulaire	111
Importance des modèles murins dans la réalisation d'essais thérapeutiques	113
Intérêt des modèles murins pour la génération de modèles cellulaires	113
Vers de nouvelles pistes ...	113
Et maintenant ?	114
Dernières conclusions	115
.	
BIBLIOGRAPHIE	117

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Atteinte combinée du système nerveux central et du système nerveux périphérique	20
Figure 2 : Anatomopathologie du système nerveux	21
Figure 3 : Anatomopathologie cardiaque dans l'AF	22
Figure 4 : Structure génomique de X25 et carte transcriptionnelle	24
Figure 5 : Mutations répertoriées dans le gène X25	26
Figure 6 : Maladies associées à des expansions trinuécléotidiques	27
Figure 7 : Triple hélice formée par l'expansion GAA	28
Figure 8 : Alignement de la frataxine avec ses homologues eucaryotiques et bactériens	31
Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la frataxine	32
Figure 10 : Phosphorylation oxydative	33
Figure 11 : Cercle vicieux en absence de frataxine	35
Figure 12 : Homéostasie du fer	36
Figure 13 : Régulation de l'homéostasie du fer par le système IRE/IRP	37
Figure 14 : Noyaux Fer-Soufre	38
Figure 15 : Comparaison des gènes impliqués dans la biosynthèse des noyaux Fe-S chez la bactérie (<i>A. vinelaandi</i>), la levure (<i>S. cerevisiae</i>) et l'homme	39
Figure 16 : Biosynthèse des noyaux Fe-S dans la levure	40
Figure 17 : Etapes de la biosynthèse de l'hème	41
Figure 18 : Sources du stress oxydatif	42
Figure 19 : Origine mitochondriale des superoxydes	43
Figure 20 : Schéma récapitulatif	56
Figure 21 : Structures chimiques du coenzyme Q10, de l'idébénone et du MitoQ	60

Résultats

Figure 22 : Réalisation d'un KO de gène chez la souris	66
Figure 23 : Sites web répertoriant l'ensemble des lignées transgéniques présentant des Cre tissu ou cellule-spécifiques	68
Figure 24 : Stratégie d'obtention des différents allèles des modèles murins	69
Figure 25 : Stratégie des croisements pour l'obtention des mutants conditionnels <i>Frda/NSE</i> et <i>Frda/MCK</i>	70
Figure 26 : Lésions ultrastructurales observées dans le foie, les ganglions rachidiens, le cortex et le nerf sciatique des mutants <i>NSE</i>	75
Figure 27 : Mécanisme de la recombinaison réalisée par la recombinase <i>Prp-Cre-ER^T</i>	76
Figure 28 : Stratégie des croisements pour l'obtention des mutants <i>Br</i> et <i>Cb</i>	77
Figure 29 : Phénotype clinique d'une souris mutante <i>Cb</i> âgée de 34 semaines	suite page 77
Figure 30 : Ganglions rachidiens et moelle épinière de mutants <i>Br</i> et <i>Cb</i> âgés	suite page 77
Figure 31 : Ganglions rachidiens des mutants <i>Br</i>	suite page 77
Figure 32 : Voies d'induction et d'exécution de l'apoptose	79
Figure 33 : Mode d'action de AIF	80
Figure 34 : Distinction des différents types de mort cellulaire en fonction de l'état de condensation de la chromatine	81
Figure 35 : Différents types d'autophagie dans les cellules de mammifères	82
Figure 36 : Organisation du cervelet	85
Figure 37 : Mutants <i>Cb</i> injectés à 2 semaines, poids et analyse comportementale	87
Figure 38 : Caractérisation des souris <i>Cb</i> injectées à 2 semaines (coloration éosine hématoxyline)	88
Figure 39 : Effet positif de l'idébénone sur la performance réalisée au test du fil métallique	89
Figure 40 : Analogues de la SOD	90
Figure 41 : <i>Mthfd2</i> et <i>Atf4</i>	93
Figure 42 : Réaction catalytique réalisée par l'hème oxygénase 1 (<i>HO-1</i>)	94

Figure 43 : IscU et IscS 95

Discussion

Figure 44 : Induction des différents types de mort cellulaire par l'ouverture du PTPM 110

.....

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Ataxies récessives et liées à l'X avec un locus ou gène identifié 14

Tableau 2 : Critères diagnostiques de l'ataxie de Friedreich 16

Tableau 3 : Maladies neurodégénératives mitochondriales 34

Tableau 4 : Essais cliniques réalisés chez les patients avec l'idébénone (Mnesis) 61

Discussion

Tableau 5 : Observations biochimiques et moléculaires réalisées dans les tissus lésés de patients autopsiés atteints par différentes maladies neurodégénératives 105

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF	ataxie de Friedreich
ALAS	acide lévulonique synthétase
AMM	autorisation de mise sur le marché
apoTf	apo-transferrine
ARNm	acide ribonucléique messenger
AVED	« Ataxia with isolated vitamin E deficiency »
BAC	Bacterial artificial chromosome
BSO	l-buthionine-(S,R)-sulfoximine
CoQ 10	Coenzyme Q10
COX	cytochrome oxydase
Cu-ZnSOD	SOD à cuivre et zinc
Cyt c	cytochrome c
DMT1	« Divalent Metal Transporter 1 »
GAL	Galactose
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GPX	Glutathion-Peroxydase
GSH	Glutathion
HNE	4-hydroxy-2,3-nonenal
Hsp	« heat shock protein »
ICARS	« International Cooperative Ataxia Rating Scales »
IRE	« Iron Responsive Elements »
IRP	« Iron Regulatory Protein »
Isc (gènes)	« Iron sulfur cluster »
Kb	kilobase
KDa	kilodalton
MDA	malondialdéhyde
MnSOD	SOD à manganèse
MPP	« Mitochondrial Processing Peptidase »
NGF	« Nerve growth factor »
Nif (genes)	« Nitrogen fixation »
Noyau Fe-S	noyau fer-soufre
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PPIX	Protoporphyrine IX
RNS	« Reactive Nitrogen Species »
ROS	« Reactive Oxygen Species »
RT-PCR	Réverse transcription suivie d'une PCR
RTf	Récepteur de la transferrine
SDH	Succinate deshydrogénase
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOD	Superoxyde dismutase
SRM	Spectrométrie par resonance magnétique
T-OH	α -tocophérol
Tf	Transferrine

UTR	« Untranslated region »
XLSA/A	« X-linked sideroblastic anemia with ataxia »
YAC	« Yeast artificial chromosome »
YFH1	« Yeast Frataxin Homologue 1 »

INTRODUCTION

PARTIE I

INTRODUCTION

I. L'ataxie de Friedreich, une maladie à multiple facettes

L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie génétique à transmission autosomique récessive. C'est une maladie neurodégénérative touchant la moelle épinière et comme pour d'autres ataxies héréditaires, des atteintes extra-neurologiques y sont associées. La mutation majoritaire observée chez les patients atteints par l'AF est une expansion de triplets qui, par sa localisation intronique, se distingue de celles observées dans les autres maladies à expansions trinuécléotidiques. Enfin, de par la localisation mitochondriale de la protéine déficiente, l'AF est une maladie mitochondriale bien qu'il n'y ait aucune anomalie morphologique caractéristique de mitochondries défectueuses par étude histologique dans les tissus atteints des patients.

1) L'ataxie de Friedreich, une ataxie récessive

1.1) L'ataxie

Le terme ataxie vient du grec « taxis » qui veut dire « ordre » précédé du « a » privatif, « sans » (Berciano, Pascual and Polo 2000). L'ataxie définit un désordre du mouvement, sans perte de la force musculaire, appelé aussi incoordination. C'est en 1853 que ce terme apparaît pour la première fois dans un lexique médical. Il est employé de nos jours pour définir des signes cliniques (l'ataxie de la démarche, l'ataxie du langage ou dysarthrie), des syndromes (ex : les ataxies héréditaires, les ataxies cérébelleuses) et des maladies particulières (ex : l'ataxie de Friedreich).

Au niveau anatomopathologique, le syndrome ataxique est associé à une atteinte du cervelet et/ou de ses connexions. Ce syndrome comprend les ataxies héréditaires à

	Locus	Gène	Protéine
Ataxies sensibles et spino-cérébelleuses			
Ataxie de Friedreich (AF)	9q13	FRDA	Frataxine
Ataxie avec déficit en vitamine E (AVED)	8q13	α -TTP	Protéine de transfert de l' α -tocophérol
Abetalipoprotéïnémie (ABL)	4q22-24	MTP	Grande sous-unité de la protéine de transfert microsomale des triglycérides
Ataxie spino-cérébelleuse Infantile (IOSCA)	10q23	?	
Maladie de Refsum (RD)	10pter	PAHX PEX7	Phytanoyl-CoA hydroxylase Récepteur PTS2
Ataxie + surdité + atrophie optique	6p21-23	?	
Anémie sidéroblastique + ataxie (XLSA/A)	Xq13	ABC7	Transporteur mitochondrial du fer liant l'ATP
Ataxies sensibles et cérébelleuses			
Ataxie + apraxie oculomotrice (AOA 1)	9p13	APTX	Aprataxine (réparation)
Ataxie + apraxie oculomotrice tardive (AOA 2)	9q34	SETX	Senataxine (DNA/RNA hélicase)
Ataxie spino-cérébelleuses avec neuropathie axonale (SCAN1)	14q31	TDP1	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
Ataxies cérébelleuses			
Ataxie t�langectasie (AT)	11q22	ATM	Protéine ATM (kinase)
Ataxie type AT (ATLD)	11q21	MRE11	D�soxyribonucl�otidase activ�e par ATM
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)	13q11	SACS	Sacsine
Ataxie des �les Cayman	19p13	ATCAY	Caytaxine

Tableau 1 : Ataxies récessives et li es à l'X avec un locus ou g ne identifié

En rouge sont indiqu es les ataxies dont la protéine responsable est impliqu e dans des voies du métabolisme énergétique. Les ataxies indiqu es en bleu sont impliqu es dans la réparation ou la maintenance de l'ADN.

transmission autosomique récessive, dominante (ataxies spino-cérébelleuses et ataxies épisodiques) ou liées au chromosome X et les ataxies non héréditaires (ataxies dues aux effets de l'alcool ou autres agents toxiques, à des carences en vitamines ou défauts métaboliques...).

Les ataxies héréditaires représentent un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives progressives pour la grande majorité, caractérisées par une incoordination des membres et de la démarche souvent associée à des signes extra-neurologiques (Taroni and DiDonato 2004). Le tableau 1 répertorie les ataxies héréditaires récessives et les loci ou gènes associés (Tableau 1).

1.2) Historique de l'identification clinique de l'ataxie de Friedreich

Nicholaus Friedreich, Professeur de Médecine à Heidelberg, caractérisa l'ataxie de Friedreich en 1863, d'abord sous le terme d'ataxie héréditaire (Friedreich 1863a). Il est ainsi à l'origine de ce concept et est le premier à avoir réalisé une description anatomopathologique d'une dégénérescence spino-cérébelleuse.

Il décrivit chez neuf membres de trois familles, une maladie débutant à la puberté, caractérisée par des signes neurologiques regroupant une ataxie progressive, une dysarthrie, une perte de la sensibilité profonde, une faiblesse musculaire, souvent associés à une scoliose, à des déformations des pieds et à une cardiomyopathie. Ces signes cliniques s'accompagnent d'une atrophie dégénérative des colonnes postérieures de la moelle, plus prononcée dans la région lombaire, suggérant un processus dégénératif. Il compléta la caractérisation de ce syndrome en notant son caractère familial, la maladie pouvant atteindre plusieurs membres d'une même fratrie mais jamais les parents (Friedreich 1863a, Friedreich 1863b). En France, les patients étaient alors plutôt diagnostiqués comme porteurs d'une forme de neurosyphilis ou d'un variant de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type I. La publication par N. Friedreich de nouveaux cas en 1876 et 1877 conduira à l'acceptation finale de cette maladie comme une entité clinique à part entière (Friedreich 1876, Friedreich 1877). N. Friedreich a ainsi décrit la quasi-totalité des caractéristiques cliniques et anatomopathologiques de la maladie, à l'exception de l'absence de réflexes ostéotendineux aux membres inférieurs, observée par WH. Erb en 1878 (Erb 1878). Cette nouvelle pathologie fut nommée ataxie de Friedreich par P. Brousse en 1882.

Le concept d'hétérogénéité clinique pour les ataxies héréditaires a été abordé une vingtaine d'années plus tard car de nombreux patients diagnostiqués pour l'AF, étaient en fait cliniquement différents (Ladame 1890, Marie 1893). La présence de formes atypiques et la

grande variabilité clinique apportaient une certaine confusion dans la définition de l'ataxie de Friedreich, et ce pendant de nombreuses années.

Ce n'est qu'à la fin des années 1970 que de grandes séries de patients furent étudiées afin d'établir des critères diagnostiques clairs. La première étude a été réalisée en 1976 par le Groupe Collaboratif du Québec (Geoffroy 1976). Cependant, leurs critères cliniques, bien appropriés aux cas avancés, étaient trop stricts pour établir un diagnostic précoce en raison du caractère progressif de la maladie. En 1981, A.E. Harding analysa une cohorte de 115 patients issus de 90 familles et proposa de distinguer les critères diagnostiques précoces des critères secondaires (des critères qui peuvent être absents au début de la maladie mais qui apparaissent au cours de l'évolution). Le tableau clinique complet devait donc être constitué dans les cinq ans suivant les premiers symptômes (Tableau 2) (Harding 1981a).

L'hérédité autosomique récessive suggérée dès le début des années 1960 n'a été établie que 10 ans plus tard, par l'exclusion de patients présentant en fait d'autres pathologies, comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth ou les ataxies spino-cérébelleuses autosomiques dominantes (Skre 1975, Geoffroy 1976, Harding 1981a, Harding 1981b).

Dès la fin des années 1980, une approche de localisation par clonage positionnel a été entreprise afin d'identifier le gène défectueux dans cette maladie. Le gène responsable de l'ataxie de Friedreich et la mutation majoritaire par expansion ont été identifiés en 1996 (Campuzano 1996).

1.3) Fréquence

Dans la population caucasienne, l'AF est la plus fréquente des ataxies héréditaires, représentant la moitié des cas (Harding 1983a). Des études épidémiologiques menées avant l'identification du gène ont estimé la prévalence de la maladie à environ 1 sur 50 000 ; prévalence assez similaire dans les différentes populations européennes étudiées (Skre 1975, Harding 1983a, Romeo 1983, Leone 1990, Lopez-Arlandis 1995). L'AF est très rare dans les populations finlandaises (incidence de 1/1 000 000, Juvonen 2002) et dans les populations africaines sous-sahariennes (Labuda 2000), absente dans les populations chinoise et japonaise (Koenig and Dürr 2000), ce qui suggère la présence d'un effet fondateur.

2) L'ataxie de Friedreich, une maladie neurodégénérative avec atteinte cardiaque

2.1) Clinique

Critères primaires:

(essentiels pour le diagnostic)

- Hérité autosomique récessive
- Début avant 25 ans
- Ataxie progressive et permanente des membres et du tronc
- Abolition des réflexes ostéotendineux aux membres inférieurs
- Aspect électrophysiologique de neuropathie sensitive axonale

Critères secondaires:

(>90 % des cas, dans les 5 premières années d'évolution)

- Dysarthrie
- Aréflexie aux membres supérieurs
- Signes pyramidaux aux membres inférieurs
 - Réflexe cutané-plantaire en extension
 - Faiblesse musculaire
- Perte de la sensibilité profonde distale
 - Perte du sens de position des segments de membres
 - Perte de la sensibilité vibratoire

Critères additionnels

(non essentiels au diagnostic, présents dans plus de deux tiers des cas)

- Scoliose
- Signes ECG de cardiomyopathie

Autres signes

(présents dans moins de 50 % des cas)

- Nystagmus
- Atrophie optique
- Hypoacousie
- Amyotrophie spinale
- Pieds creux
- Diabète

Tableau 2 : Critères diagnostiques de l'ataxie de Friedreich

(d'après Harding 1981a)

a) Premiers symptômes

La maladie débute classiquement à l'adolescence avant l'âge de 20-25 ans (Geoffroy 1976, Harding 1981a) ce qui définit ainsi un critère diagnostique important. Cependant l'âge d'apparition des premiers symptômes peut varier de 2 ans à un âge adulte (Ulku 1988, De Michele 1996). Cette variabilité est plus marquée au niveau inter-familial qu'intra-familial, bien que de grandes différences au sein d'une même fratrie aient été observées (Harding 1981a, Winter 1981).

Le début de la maladie est progressif et insidieux. Les signes d'appel sont en général une instabilité à la marche qui devient chancelante et titubante (65%) ou une maladresse générale (25%). Plus rarement, des signes non neurologiques, comme une scoliose (5%) ou une cardiomyopathie (5%) précèdent le début de l'ataxie. D'après AE. Harding, le tableau complet de la maladie se constitue dans les cinq ans suivant l'apparition des premiers symptômes (Harding 1981a) (Tableau 2).

b) Signes neurologiques

Les manifestations cliniques sont dominées par l'ataxie due à la perte de coordination motrice (syndrome cérébelleux) et aux troubles de l'équilibre (perturbation de la sensibilité profonde) (Koenig and Pandolfo 1998). L'ataxie affecte d'abord les membres inférieurs au travers de la démarche, causant une instabilité avec des chutes fréquentes (atteinte du tronc et des membres inférieurs). Elle peut se manifester à la station debout (ataxie statique) ou lors de l'exécution d'un mouvement (ataxie cinétique). L'incoordination motrice s'aggrave ensuite progressivement et s'étend aux membres supérieurs puis à la tête. L'atteinte de l'extrémité céphalique se manifeste par une dysarthrie avec une parole lente et saccadée entrecoupée d'émissions explosives, et par des difficultés de déglutition. L'abolition des réflexes ostéotendineux observée dans la grande majorité des cas, constitue également un critère diagnostique essentiel. Au cours de l'évolution de la maladie, apparaissent fréquemment une hypotonie, une perte du réflexe abdominal et un signe de Babinski bilatéral, témoins d'une atteinte pyramidale des membres inférieurs. Des anomalies sensorielles, atrophie optique et hypoacousie neurosensitive se développent chez 18 % et 8 % des patients, respectivement. La poursuite oculaire peut être anormale (12 % des patients) et un nystagmus horizontal est observé dans 20% des cas. Le développement intellectuel est, en revanche, parfaitement normal.

Les études électromyographiques réalisées chez les patients démontrent une conduction sensitive des nerfs périphériques très réduite ou nulle sans atteinte de la conduction motrice (McLeod 1971, Ouvrier 1982, Ackroyd 1984, Said 1986, Zouari 1998), et mettent ainsi en évidence la neuropathie sensitive axonale. Ces observations sont en accord avec l'atteinte tardive voir absente de la force musculaire (résultant de l'immobilisation en fauteuil roulant).

c) Signes cardiaques

L'atteinte cardiaque est un signe cardinal de l'ataxie de Friedreich. La plupart des patients développent une cardiomyopathie hypertrophique (Geoffroy 1976, Harding 1981a, Gottdiener 1982, Pentland 1983, Alboliras 1986). Les signes cliniques sont dominés par la survenue d'une dyspnée d'effort, de palpitations et de douleurs rétrosternales. La cardiomyopathie évolue fréquemment vers une insuffisance cardiaque, souvent à l'origine du décès du patient sans prise en charge.

L'atteinte cardiaque est évaluée par électrocardiographie et échocardiographie, et permet de révéler des anomalies sans symptôme apparent car cette atteinte reste asymptomatique dans deux tiers des cas. Les altérations électrocardiographiques regroupent des troubles de la repolarisation, des signes d'hypertrophie ventriculaire ainsi que des troubles du rythme de gravité variable. Les études électrocardiographiques réalisées sur différents groupes de patients révèlent des paramètres anormaux pour 62 % (Klockgether 1993) à 100 % des patients étudiés (Pasternac 1980, Selitto 1986, Child 1986) pour les cas typiques de l'AF. En échocardiographie, une hypertrophie cardiaque est classiquement rencontrée avec un épaississement de la paroi ventriculaire gauche et/ou du septum interventriculaire. Selon les études, les patients démontrent des défauts échocardiographiques dans 28 % (Giunta 1988) à 100 % des cas (Alikasifoglu 1999, Selitto 1986, Pasternac 1980), avec une médiane autour de 50 % (Hernandez-Gonzalez 1997, De Michele 1996). Dans certains cas, la cardiomyopathie hypertrophique évolue en cardiomyopathie dilatée (17 %, 66 patients étudiés, Casazza 1996). Plus récemment, le Doppler cardiaque (mesure des flux sanguins cardiaques) a permis de mettre en évidence de nouveaux paramètres affectés. Ainsi pour un groupe de 29 patients, la vitesse des gradients du myocarde (MVG, « myocardial velocity gradients ») évaluée par Doppler est plus fidèlement corrélée avec la taille de la plus petite expansion que tout autre paramètre échocardiographique classique (Dutka 2000).

La cardiomyopathie est une atteinte primaire, au même titre que les atteintes neurologiques. L'association ataxie, cardiomyopathie et neuropathie sensitive suggère fortement le diagnostic d'ataxie de Friedreich.

d) Autres atteintes cliniques

Un diabète sucré ou une intolérance au glucose sont associés à l'AF, dans 10 et 20 % des cas respectivement (Finocchiarro 1988). Une étude clinique détaillée du métabolisme glucidique a révélé un déficit d'induction de la sécrétion d'insuline par l'arginine, y compris chez les patients normaux tolérants. Ceci suggère que les cellules β du pancréas sont invariablement affectées par le défaut génétique primaire de l'ataxie de Friedreich.

De nombreux patients présentent des déformations squelettiques, notamment dès les stades précoces de la maladie. Une scoliose puis une cyphoscoliose affectent entre 85 et 100 % des patients et peut être sévère dans 10 % des cas, entraînant une insuffisance respiratoire (Friedreich 1863b, Harding 1981a). Par ailleurs, plus de la moitié des patients souffrent de pied creux ou de pied bot varus équin. Ces anomalies squelettiques sont considérées comme la conséquence de l'atteinte neurologique et d'un déséquilibre du tonus musculaire (Geoffroy 1976).

Les patients souffrent souvent d'une sensation de froid aux extrémités avec acrocyanose (cyanose chronique des extrémités). Il s'agit de vasodilatations capillaires dues à un problème de « nervotrophicité », donc secondaires à une atteinte du système nerveux autonome.

2.2) Variabilité clinique

Le tableau clinique de l'AF présente une grande variabilité dans l'âge de début, la rapidité d'aggravation, la sévérité et l'étendue de l'atteinte (Geoffroy 1976, Harding 1981a, Harding 1983). Les patients peuvent être confinés en fauteuil roulant dès l'adolescence ou être encore capables de marcher au-delà de 40 ans. Les complications cardiaques peuvent être absentes, voire minimales ou très sévères et responsables d'un décès prématuré. La présence d'anomalies associées est également très variable. De plus, le tableau clinique peut être très différent au sein d'une même fratrie, cette variabilité intra-familiale étant particulièrement importante et remarquable dans une maladie récessive.

Les formes atypiques de l'ataxie de Friedreich

Le Groupe Collaboratif du Québec décrit des patients « incomplets » et « atypiques » mais ses travaux ne permirent pas de clarifier les relations entre ces formes particulières et l'AF classique (Geoffroy 1976). Ce n'est qu'après la localisation du gène de l'ataxie de Friedreich sur le chromosome 9 qu'une homogénéité de locus entre la forme classique et les variants cliniques tels que LOFA (« Late Onset Friedreich's Ataxia »), FARR (« Friedreich's Ataxia with Retained Reflexes »), l'ataxie de Friedreich des Acadiens ou la paraparésie spastique sans ataxie a pu être démontrée.

Le tableau LOFA comprend toutes les atteintes de l'ataxie de Friedreich mais le début des symptômes est tardif (après 26 ans) et l'évolution moins sévère et plus lente (Klockgether 1993, De Michele 1994, Montermini 1997a). Les patients atteints de FARR se différencient par la conservation des réflexes ostéotendineux des membres inférieurs, l'aréflexie étant un critère diagnostique essentiel de la forme classique de l'AF (Palau 1995, Montermini 1997a). Plusieurs formes atypiques liées au locus de l'AF ont aussi été décrites chez les Acadiens, population d'origine française vivant en Amérique du Nord, suggérant un effet fondateur (Chamberlain 1989, Keats 1989, Richter 1996). Certains patients acadiens présentent une atteinte plus modérée avec un âge de début un peu plus tardif, une progression particulièrement lente et une atteinte cardiaque rarement observée (Barbeau 1984). Un sous-groupe différent de patients présente une ataxie lentement progressive avec réflexes ostéotendineux préservés voire augmentés et une spasticité aux membres inférieurs, nommé ataxie spastique de type acadien (SPA-acadian) (Richter 1996), différente de l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay (autre région canadienne). Enfin, exceptionnellement, la maladie se présente sous la forme d'une paraparésie spastique sans ataxie. Dans ce cas, l'âge d'apparition des premiers symptômes est souvent tardif (Gates 1998, Castelnovo 2000).

L'analyse moléculaire du gène impliqué dans l'AF a permis de relier l'ensemble de ces variants à la forme classique de la maladie.

2.3) Anatomopathologie

a) Atteintes du système nerveux central et périphérique

L'AF est caractérisée par une atteinte combinée du système nerveux périphérique de type neuropathie axonale sensitive et du système nerveux central, dominée par une

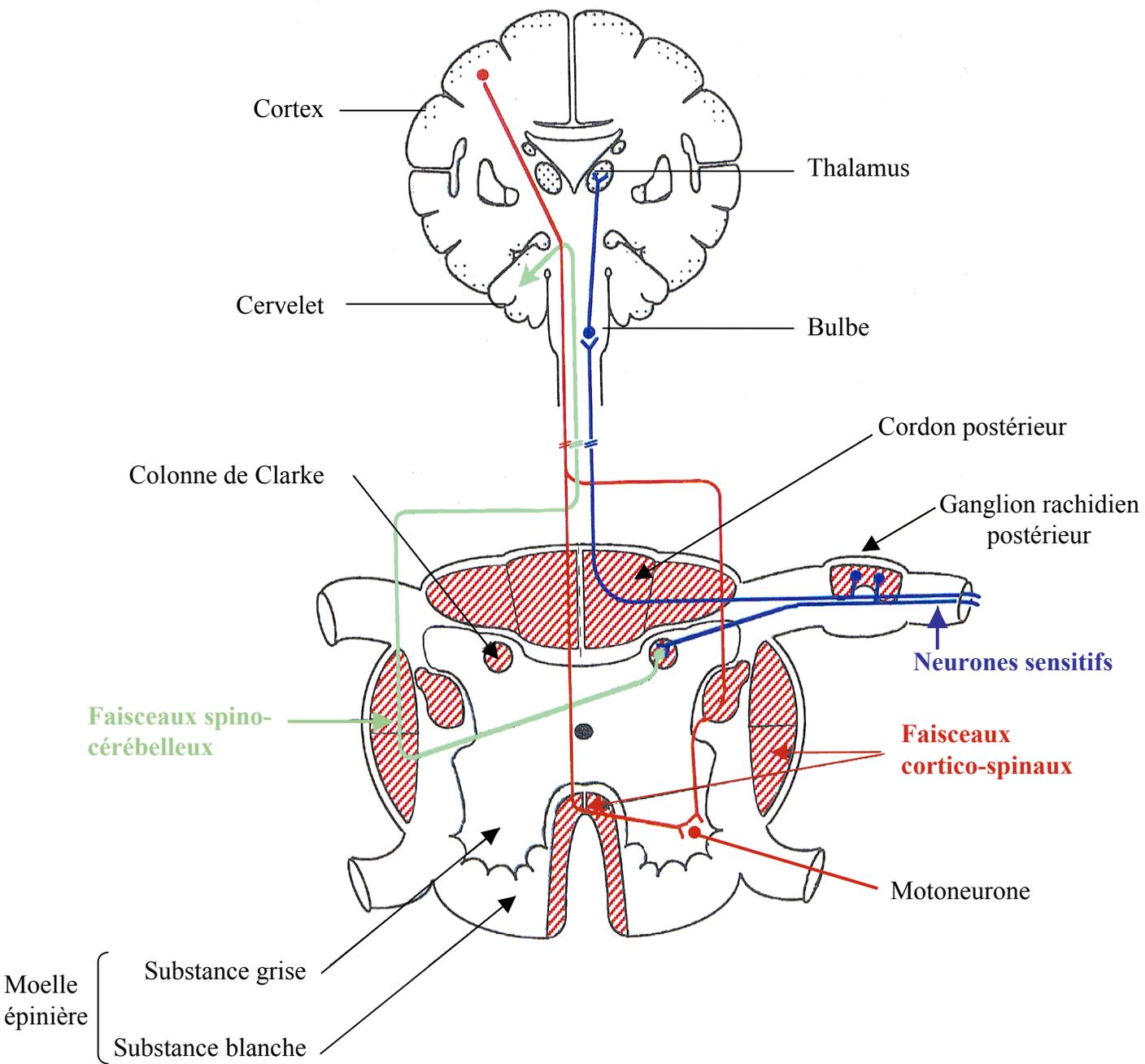


Figure 1 : Atteinte combinée du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP)

L'atteinte du SNC est caractérisée par une dégénérescence des cordons postérieurs de la moelle épinière, des colonnes de Clarke et des faisceaux spino-cérébelleux. Les faisceaux cortico-spinaux sont atrophiés mais les motoneurones de la corne antérieure sont indemnes. La neuropathie sensitive axonale traduit l'atteinte des neurones des ganglions rachidiens postérieurs.

(Modifié d'après Koutnikova H (1998), Identification du gène de l'Ataxie de Friedreich et caractérisation de sa protéine, la frataxine, Strasbourg, Université Louis Pasteur)

dégénérescence des cordons postérieurs de la moelle épinière, des colonnes de Clarke et des faisceaux spino-cérébelleux (Fig.1).

Système nerveux central

L'AF se caractérise par l'atrophie dégénérative des cordons postérieurs de la moelle épinière, décrite dès 1863 par N. Friedreich (Friedreich 1863a, Friedreich 1863b). Les cordons postérieurs sont constitués par les axones centraux des neurones sensitifs, dont les corps cellulaires sont localisés dans les ganglions rachidiens postérieurs. Ces axones s'étendent jusqu'au bulbe rachidien, constituant les faisceaux gracile (ou faisceau de Goll) et cunéiforme (ou faisceau de Burdach), le premier trouvant son origine au niveau lombo-sacré et le second au niveau cervico-thoracique. Les cordons postérieurs apparaissent rétrécis, grisés et translucides (Fig.2a). La démyélinisation, la perte de fibres et la gliose (colonisation par les cellules gliales suite à une perte de neurones) touchent plus sévèrement le faisceau de Goll que le faisceau de Burdach. La dégénérescence des cordons postérieurs de la moelle est à l'origine de l'ataxie sensitive.

L'atrophie atteint également les noyaux de la colonne de Clarke et les faisceaux spino-cérébelleux correspondants, formations du système proprioceptif inconscient, qui véhiculent les informations de la position dans l'espace du tronc et des membres vers le cervelet (Fig 2a).

Les motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière ne sont pas touchés mais les faisceaux moteurs cortico-spinaux sont atrophiés (Fig 2a), ce qui explique le syndrome pyramidal. Le faisceau pyramidal est constitué de fibres descendantes unissant de façon monosynaptique le cortex moteur aux motoneurons et interneurons de la moelle épinière destinés au contrôle du tronc et des membres. Le profil d'atrophie du faisceau cortico-spinal suggère un processus de mort rétrograde (Said 1986). En effet, ces fibres sont sévèrement atrophiées au niveau lombaire, beaucoup moins au niveau cervical et du tronc cérébral et semblent normales au niveau du cerveau. Ce processus implique que pour certains types de neurones, le défaut biochimique de l'AF atteint en premier ou de manière plus sévère les axones, puis s'étend aux corps cellulaires.

Des altérations dégénératives sont également présentes au niveau du tronc cérébral avec une gliose au niveau des noyaux gracile et cunéiforme localisés dans le bulbe rachidien, point d'arrivée des voies de la colonne dorsale. Le tractus du lemnisque médian, qui relie les noyaux gracile et cunéiforme à l'hypothalamus, est atrophié et démyélinisé. Dans la plupart des cas, les fibres sensibles qui prennent origine au niveau des noyaux des nerfs crâniens V,

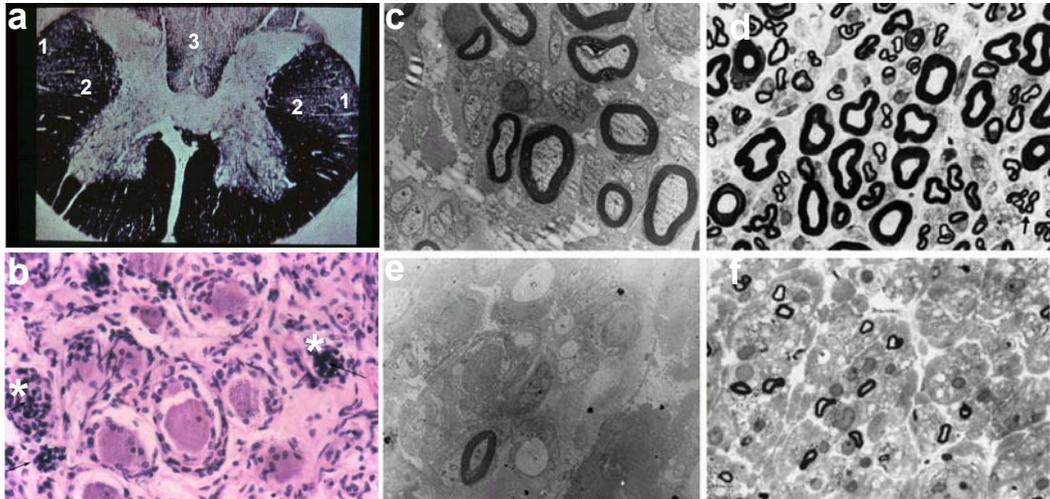


Figure 2 : Anatomopathologie du système nerveux

a-d : patients atteints par l'**ataxie de Friedreich**

e et f : patient atteint par l'**AVED** (« **ataxia with Vitamin E deficiency** »)

a. Section de moelle épinière provenant de l'autopsie d'une femme âgée de 70 ans. La démyélinisation est visible dans les voies spino-cérébelleuses (1), cortico-spinales (2), et dans les colonnes dorsales (3).

b. Section d'un ganglion rachidien coloré à l'éosine-hématoxyline avec une perte de neurones sensitifs. Noter aussi la prolifération de cellules satellites (exemples*).

c-d. Section semi-fine (c) et ultra-fine (d) d'une biopsie de nerf sural d'un patient âgé de 24 ans et diagnostiqué à 6 ans. Les larges fibres myélinisées ont disparu et la densité des petites fibres myélinisées est très diminuée.

e-f. Section semi-fine (e) et ultra-fine (f) d'une biopsie de nerf sural d'une patient âgé de 25 ans, diagnostiqué à 10 ans (e). Le nombre des larges fibres myélinisées est très légèrement diminué en comparaison avec le patient atteint par l'AF au même âge.

(a, photo issue de la collection d'images du site internet "Mount Alisson University" ; b, photo issue du congrès hispano-américain de pathologie humaine de 2004 (<http://conganat.uninet.edu/conferencias/C002/fig12.html>) ; c-f, photos de Zouari 1998)

IX et X, ainsi que les fibres des voies trigéminales et solitaires, montrent une pâleur de la myéline avec perte de fibres. Les lésions des nerfs crâniens V, IX, X, XI et XII ont pour conséquences l'atteinte faciale et les difficultés d'élocution et de déglutition.

Les atteintes cérébelleuse et cérébrale sont très modérées et tardives dans l'évolution de la maladie. La perte neuronale et la gliose concernent principalement le noyau dentelé du cervelet (Oppenheimer 1979, Caruso 1983), constituant l'origine des voies cérébelleuses efférentes. La diminution du nombre de cellules de Purkinje, la formation de gonflements axonaux focaux (« torpedoes ») et la gliose dans le cortex cérébelleux sont modérés et tardifs et pourraient être secondaires à l'atteinte du noyau dentelé (Jitpimolmard 1993). L'atteinte des voies spino-cérébelleuses, des colonnes de Clarke et du noyau dentelé est à l'origine de l'ataxie cérébelleuse.

Le cortex cérébral semble normal à l'exception d'une perte des cellules pyramidales de l'aire motrice primaire.

Enfin, une atrophie des nerfs optiques a été décrite pour un petit nombre de cas, cependant il est plus prudent de ne considérer que les cas décrits après l'identification du gène (Alldredge 2003).

En conclusion, le système sensitif délivrant au cerveau et au cervelet les informations concernant la position et les mouvements des membres (et en particulier des membres inférieurs) est sévèrement atteint dans l'ataxie de Friedreich.

Systeme nerveux périphérique

Les informations sensibles provenant de la peau, des muscles et des articulations des membres et du tronc sont véhiculées vers la moelle épinière par des cellules nerveuses sensibles dont les noyaux sont localisés dans les ganglions rachidiens postérieurs. Les neurones des ganglions possèdent un axone central pénétrant dans la moelle épinière par la racine dorsale et un axone périphérique innervant les différents organes et tissus. Les neurones sensitifs de gros diamètre avec des fibres myélinisées véhiculent la sensibilité proprioceptive consciente (sensibilité profonde) et tactile épicrotique (toucher discriminant) tandis que les neurones sensitifs de petit diamètre avec des fibres non myélinisées véhiculent la thermoception et la nociception (sensibilité protopathique).

L'AF se caractérise par une neuropathie sensitive axonale. Dans les ganglions rachidiens postérieurs, les études réalisées sur des autopsies par plusieurs groupes (Hughes 1968, bilan des études plus anciennes) aboutissent à l'observation d'une perte importante des

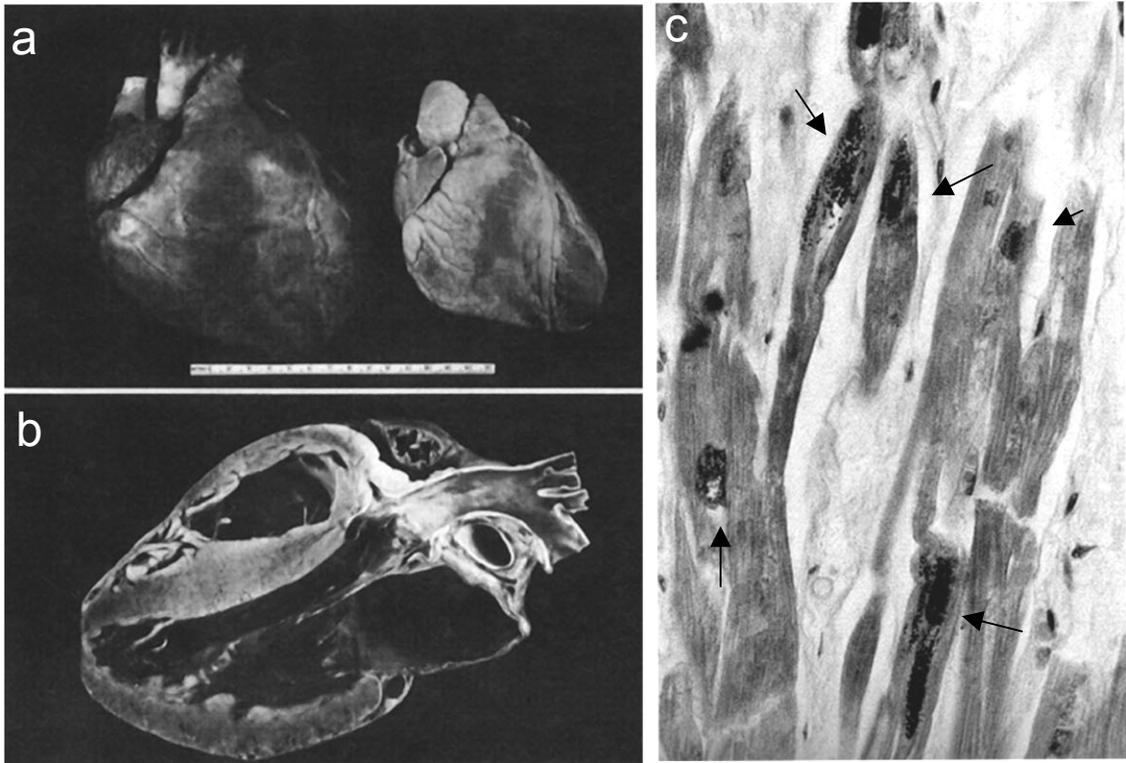


Figure 3 : Anatomopathologie cardiaque dans l'AF

- a. Coeur d'un patient présentant une cardiomyopathie dilatée comparé à un coeur normal au même âge.
- b. Coupe du coeur simulant l'axe parasternal montrant la dilatation du ventricule gauche avec une augmentation de la masse ventriculaire.
- c. Section longitudinale du ventricule gauche d'un coeur hypertrophié. Les points denses correspondent à des dépôts granulaires de fer mis en évidence par la coloration histologique du bleu de Prusse (flèches).

(Photos a, b issues de Manyam 1993 ; c issue de Lamarche 1993)

fibres myélinisées de gros diamètre (les fibres de petit diamètre sont épargnées) et d'une perte des corps cellulaires des neurones sensitifs de large diamètre (Fig.2b). Les corps cellulaires subsistant ont une morphologie anormale avec parfois une perturbation du corps de Nissl et un noyau en périphérie (chromatolyse). Une prolifération des cellules « satellites » entourant les neurones sensitifs (support structural et métabolique) et de tissus fibreux se produit avec une légère prolifération lymphocytaire dans de rares cas, démontrant la mort des neurones sensitifs (Fig.2b). Une biopsie d'un ganglion rachidien d'une patiente de 17 ans, diagnostiquée à 8 ans, a permis de confirmer les défauts observés sur autopsies avec cependant une perte très modérée de neurones sensitifs et une accumulation importante de granules de lipofuscine conduisant parfois au gonflement des neurones (Lamarche 1982).

L'atrophie des axones centraux est secondaire et se traduit par un amincissement des racines postérieures, surtout au niveau lombo-sacré, et l'atrophie des axones périphériques se manifeste par une perte très importante des fibres myélinisées de gros diamètre des nerfs périphériques (Fig.2c-f) (95 % dans certaines biopsies de nerf sural) (Hughes 1968, McLeod 1971, Said 1986, Caruso 1987). Une colonisation de tissus fibreux (collagène) suit la dégénérescence des fibres myélinisées et l'absence de produits de dégradation de la myéline par microscopie électronique, phagocyté dans les cellules de Schwann ou du matériel lysosomal extracellulaire, démontre que la dégénérescence de la fibre nerveuse est un phénomène lentement progressif. Quelques groupes ont aussi décrit une atteinte des petites fibres myélinisées notamment au niveau des biopsies de peau où une diminution importante de la densité des petites fibres nerveuses épidermiques sensitives et du système autonome a été observée (Nolano 2001).

b) Atteinte cardiaque

Les autopsies révèlent une atteinte cardiaque chez la plupart des patients analysés et répertoriés dans la littérature (Fig.3a-b). Une hypertrophie de la paroi du ventricule gauche est souvent observée (Sanchez-Casis 1976, Faivre 1978, Child 1986, Unverferth 1987, Casazza 1990, Kawai 2000). Quelques cas démontrent une cardiomyopathie dilatée affectant les quatre chambres cardiaques associée ou non à une hypertrophie des parois ventriculaires (Alborilas 1986, Vavilova 1978, Steinsapir 1985). Les tissus cardiaques analysés présentent une hypertrophie des cardiomyocytes et une fibrose interstitielle (Sanchez-Casis 1976, Faivre 1978, Vavilova 1978, James 1987, Unverferth 1987, Steinsapir 1985, Casazza 1990, Kawai 2000).

La présence d'une « mixture » de fer et de calcium dans les fibres cardiaques a été décrite pour la première fois en 1976 (Sanchez-Cassis 1976). Seule la présence de dépôts granulaires de fer a été confirmée par la suite dans le tissu cardiaque autopsié de 15 patients (Lamarche 1980 et 1982) (Fig.3c). La présence de granules de lipofuscine et de foyers de nécrose a aussi été décrite (Lamarche 1980) chez trois patients morts prématurément d'une cardiomyopathie avancée.

c) Atteinte pancréatique

Près de 10 % des patients présentent un diabète sucré associé à une perte de cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, sans signe d'atteinte auto-immune, classiquement retrouvée dans le diabète de type I (Schoenle 1989).

3) L'ataxie de Friedreich, une maladie à expansion de triplets nucléotidiques

3.1) Découverte du gène FRDA

Au cours des années 1970 et dans le début des années 1980, plusieurs études ont tenté de mettre en évidence l'anomalie biochimique responsable de l'ataxie de Friedreich. En absence d'un déficit évident, une approche de localisation par clonage positionnel a été entreprise dès la fin des années 1980. En 1988, l'étude de familles de patients répondant aux critères de AE. Harding démontra un lien entre le locus morbide et les marqueurs microsatellites D9S15 et D9S5 (Chamberlain 1988, Fujita 1989). La localisation physique de ces marqueurs en 9q13-q21 fut déterminée en 1990 par hybridation in situ (Hanauer 1990). L'étude de nouveaux marqueurs polymorphiques et la cartographie par recherche d'homozygotie ont ensuite permis de réduire progressivement l'intervalle critique à 240 kb puis 150 kb (Duclos 1994, Montermini 1995). A l'issue de l'étude des gènes candidats présents dans l'intervalle critique, le gène responsable de l'ataxie de Friedreich a été identifié en 1996 (Campuzano 1996). Baptisé « X25 » du nom du clone dont il a été isolé, ce gène est aussi appelé « FRDA » depuis que son implication dans l'AF a été démontrée.

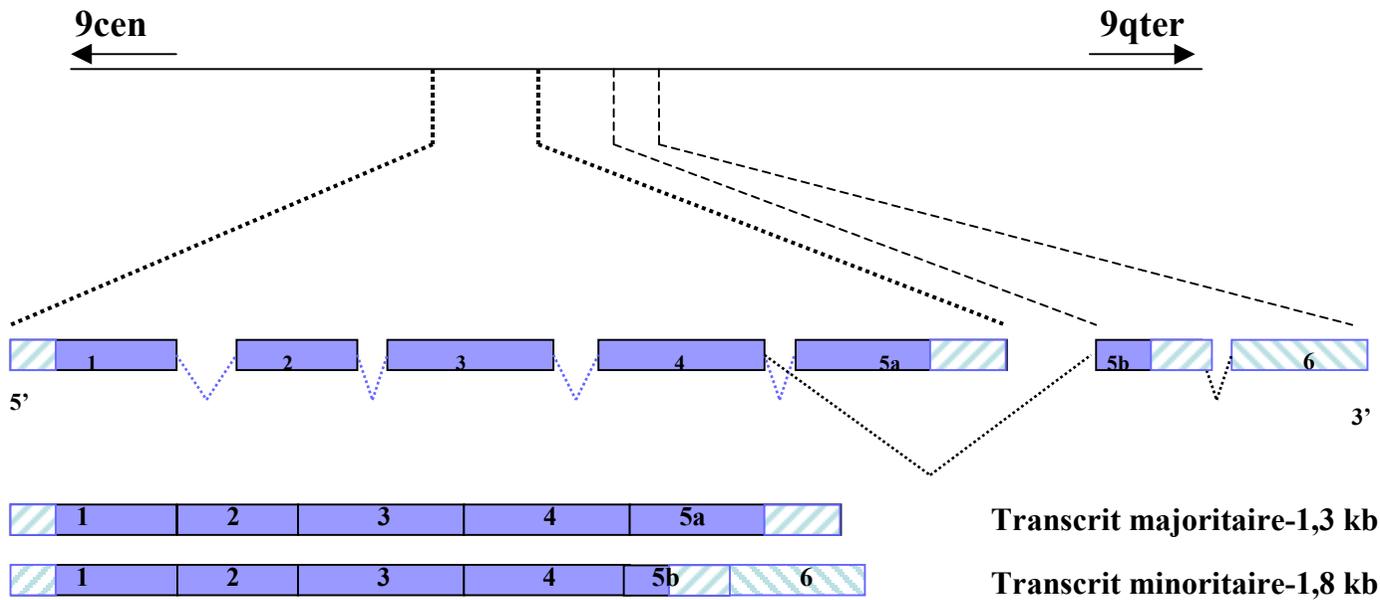


Figure 4 : Structure génomique de X25 et carte transcriptionnelle

L'organisation génomique du gène X25 est représentée schématiquement en haut de la figure. Les 7 exons s'étendent sur 85 kb. Un épissage alternatif conduit à la formation de deux transcrits. Les exons sont représentés par des rectangles, bleus pour la région codante et rayés pour la partie non codante. Les exons 1 à 5a du transcrit de 1,3 kb couvrent une région génomique de 40 kb. L'exon 5b du transcrit de 1,8 kb est précédé par un grand exon, le plaçant à environ 30 kb des exons 5a et 6. L'exon 6 situé en 3' de l'exon 5b est non codant. Les échelles ne sont pas respectées.

3.2) Structure du gène X25

Le gène X25 comporte 7 exons et s'étend sur plus de 85 kb d'ADN génomique. Les cinq premiers exons, 1 à 5a sont localisés dans un intervalle de 40 kb, puis un grand intron de 30 kb précède les exons 5b et 6 (Fig.4). Deux transcrits ont d'abord été mis en évidence, ils partagent les quatre premiers exons puis diffèrent par un épissage alternatif. Le transcrit majoritaire contient l'exon 5a et fait 1,3 kb. Le transcrit minoritaire de 1,8 kb contient les exons 5b et 6. Cependant, l'expression très faible de ce dernier transcrit par Northern Blot et l'absence de la protéine correspondante par Western Blot suggèrent qu'il constitue en fait un transcrit généré par épissage « illégitime », c'est-à-dire qu'il est présent à moins d'une espèce par cellule mais qu'il peut être amplifié par les techniques de PCR (Campuzano 1997, Cossée 1997a).

3.3) Les mutations

L'identification de mutations pour tous les patients dans le gène candidat X25 a permis de démontrer avec certitude son implication dans l'ataxie de Friedreich. Deux types de mutations ont été mises en évidence : une expansion trinuécléotidique majoritairement retrouvée (98 % des allèles pathogènes) ainsi que des mutations ponctuelles (2 % des allèles pathogènes) et de plus rares petites délétions ou insertions (Fig. 5).

a) L'expansion intronique de triplets GAA

L'identification de mutations causales dans l'ataxie de Friedreich a débuté par la recherche de mutations ponctuelles dans la séquence codante du gène FRDA. Devant les résultats infructueux de cette approche, l'hypothèse d'une mutation dans le promoteur du gène ou d'un remaniement génomique important a été posée. Le séquençage d'un fragment surnuméraire de taille variable obtenu par Southern Blot a permis de mettre en évidence chez les patients une répétition inhabituelle d'un trinuécléotide GAA localisée à 1,4 kb en aval de l'exon 1, au milieu d'une séquence Alu (Campuzano 1996) (Fig. 5).

L'identification de cette mutation a permis de déterminer la fréquence des hétérozygotes dans la population française, par détection directe de l'expansion dans une large population contrôle (851 individus) à 1/85 (Cossée 1997a et b), fréquence équivalente dans la

population allemande (178 individus contrôles) (Epplen 1997), confirmant une incidence à la naissance de 1/30 000 et donc une prévalence de la maladie d'environ 1/50 000.

La vaste majorité des patients (96 %) possède une expansion trinuécléotidique GAA dans l'intron 1 du gène de la frataxine, à l'état homozygote, avec des allèles de taille différente. Un allèle « normal » (non pathologique) compte entre 7 et 22 triplets GAA (Campuzano 1996), intervalle étendu à 29 triplets selon les études (Epplen 1997). La taille des allèles « normaux » répond à une distribution bimodale : 85 % des individus possèdent moins de 12 répétitions (petits allèles « normaux ») et les 15 % restants présentent entre 16 et 35 répétitions GAA (grands allèles « normaux »). Les allèles de plus de 27 répétitions sont le plus souvent interrompus par une séquence répétée hétéranuécléotidique (GAGGAA)_n (Montermini 1997, Cossée 1997a). Un allèle pathologique compte entre 100 et plus de 1000 répétitions, mais la majorité de ces allèles contiennent entre 600 et 1200 répétitions (Campuzano 1996). Les allèles possédant entre 34 et 100 répétitions GAA pures non interrompues sont appelés prémutations en raison de leur propension à l'expansion lors de leur transmission (Cossée 1997a, Epplen 1997, Montermini 1997) et seraient associés à un phénotype « normal » à l'état homozygote. En effet, les grandes expansions GAA présentent une instabilité intergénérationnelle qui tend aussi bien vers une augmentation que vers une diminution du nombre des répétitions d'une génération à l'autre (Campuzano 1996). Un net effet parental a cependant été observé : la transmission maternelle d'un allèle pathologique peut conduire soit à une diminution soit à une augmentation du nombre de répétitions alors que la transmission paternelle d'un allèle de grande taille conduit toujours à une contraction (Monros 1997, Pianese 1997, De Michele 1998).

La taille des allèles pathogéniques est aussi soumise à une instabilité somatique ; le nombre de triplets GAA chez les patients varie d'un tissu à l'autre, au sein d'un même tissu, mais également tout au long de la vie de l'individu, suggérant une participation de ce mosaïcisme à la variabilité phénotypique (Campuzano 1996, Montermini 1997, Machkhas 1998, Bidichandini 1999, Sharma 2002). Une biopsie du nerf sural d'une patiente avec une ataxie très légère démontre une taille d'expansion inférieure (655 GAA) à celle observée dans ses cellules sanguines (850 GAA) (Machkhas 1998). Cet exemple démontre également la difficulté à établir un diagnostic de l'évolution et de l'atteinte clinique sur la base d'un test génétique sur les cellules sanguines.

Les études sur l'origine et l'évolution de la mutation majoritaire ont mis en évidence un déséquilibre de liaison significatif entre la maladie et des marqueurs proches du locus, suggérant un effet fondateur limité, voire unique (Cossée 1997a, Labuda 2000). Les analyses

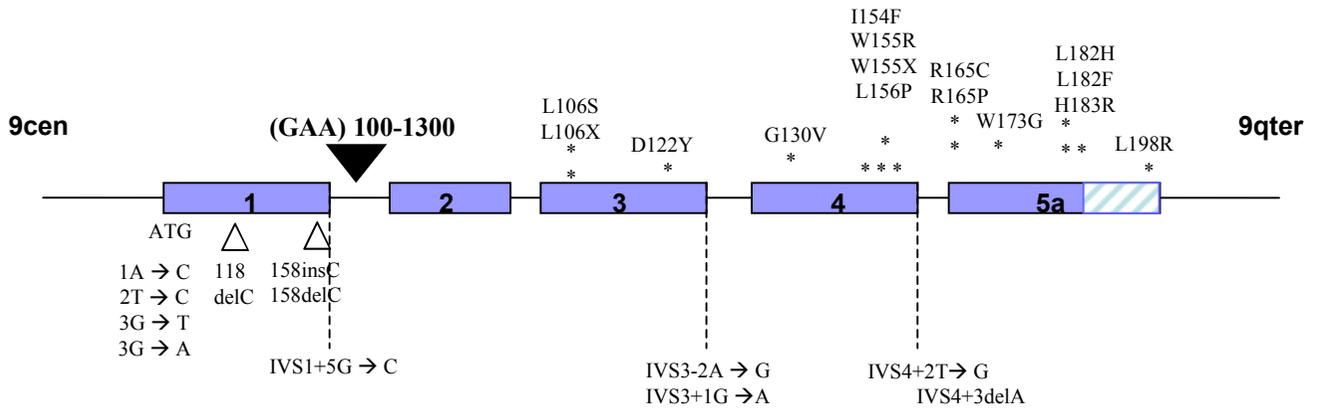


Figure 5 : Mutations répertoriées dans le gène X25

L'expansion trinuécléotidique dans l'intron 1 du gène est représentée par une flèche noire pleine. Les mutations ponctuelles regroupent des substitutions dans le codon initiateur de la traduction ATG, des mutations dans les sites introniques d'épissage (indiquées par un trait pointillé), des mutations faux sens et non sens (*), des délétions (del) et des insertions de petite taille (Δ).

Les échelles ne sont pas respectées.

d'haplotypes démontrent que les grands allèles normaux, les prémutations et les allèles pathologiques ont un ancêtre commun. Un mécanisme d'expansion en deux étapes a été proposé : les grands allèles normaux proviendrait de la duplication d'un petit allèle normal et les prémutations trouveraient ensuite leur origine dans l'instabilité croissante des grands allèles normaux. Cette transition des grands allèles normaux vers les prémutations puis les expansions pathogènes aurait eu lieu il y a environ 25 000 ans soit 682 générations (Labuda 2000, Colombo 2000) après une migration d'Afrique en Europe et/ou en Inde, mais pas en Asie du Sud-Est puisque aucun cas d'AF n'a été mis en évidence dans ces pays.

Les maladies par expansion instable de séquences répétées

L'AF appartient donc au groupe des maladies héréditaires par expansion de séquences trinuéotidiques répétées (Fig.6) (Cummings 2000). Ce mécanisme mutationnel a été identifié pour la première fois en 1991 dans le syndrome de l'X fragile (Oberle 1991) et la maladie de Kennedy (La Spada 1991, Fischbeck 1991). Depuis 15 maladies neurologiques avec des expansions variées de séquences répétées de type CGG, GAA, CAG, CTG ou GCG ont été identifiées. Ces mutations sont qualifiées de « dynamiques » ou « instables » car la taille des expansions peut varier au cours des générations et/ou au niveau somatique. Ces maladies peuvent être séparées en deux classes, selon le caractère codant ou non de l'expansion.

L'AF fait partie des maladies à expansion trinuéotidiques non codantes tout comme 3 autres syndromes : le syndrome X fragile (FRAXA), le retard mental associé au site fragile FRAXE et la dystrophie myotonique de Steinert (DM1). Le mode de transmission est variable : transmission dominante à pénétrance incomplète liée à l'X pour FRAXA et FRAXE, transmission autosomique dominante pour la DM1, transmission autosomique récessive pour l'AF. Les mutations dans les parties non codantes des gènes peuvent entraîner des pertes de fonction des protéines correspondantes ou bien des gains de fonction au travers d'un transcrit muté. Une autre caractéristique de ces maladies est l'existence d'expansions intermédiaires appelées prémutations, qui sont cliniquement silencieuses mais hautement instables lors de la transmission germinale entraînant l'apparition de la maladie dans la génération suivante.

Hormis l'amyotrophie spino-bulbaire (SBMA), la classe de maladies avec expansions codantes se transmettent pour la plupart de façon autosomique dominante. Ces maladies sont dues à un gain de fonction toxique des expansions polyglutamines (expansions CAG) et

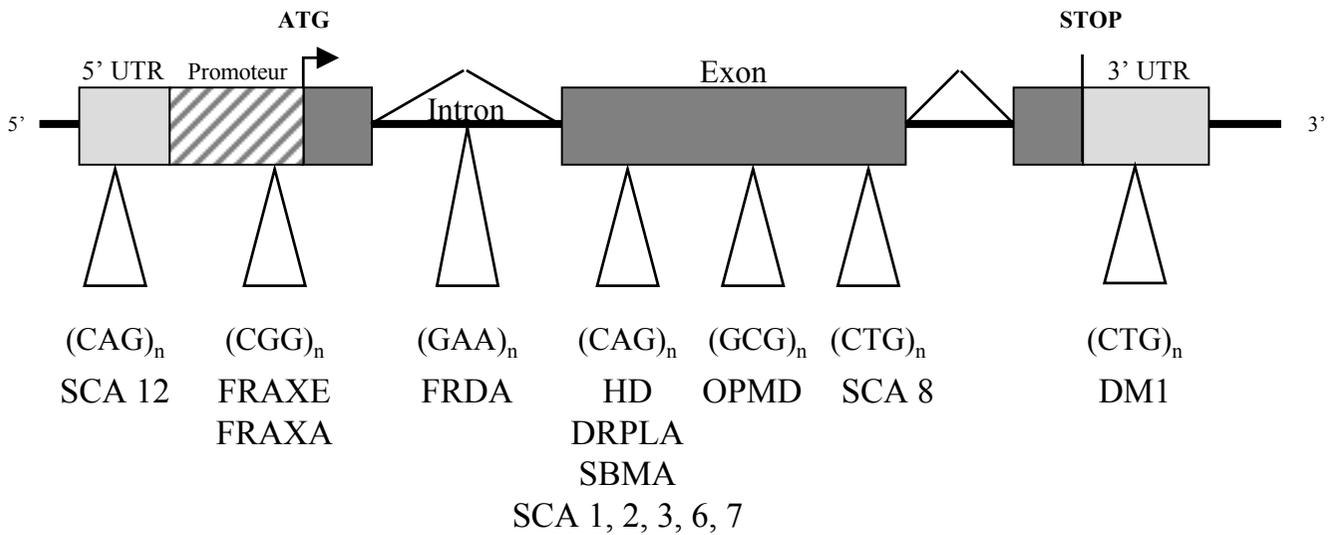


Figure 6 : Maladies associées à des expansions trinuécléotidiques

Le schéma représente la localisation et la séquence du motif répété.

SCA, ataxies spinocérébelleuses ; FRAXA, syndrome de l'X fragile ; FRAXE, retard mental associé au site fragile XE ; FRDA, ataxie de Friedreich ; HD, chorée de Huntington ; DRPLA, atrophie dentatorubropallidoluysienne ; SBMA, amyotrophie spinobulbaire ; OPMD, dystrophie musculaire oculo-pharyngée ; DM1, dystrophie myotonique de Steinert.

polyalanines (expansions GCG) qui induisent la formation d'inclusions cellulaires pathologiques. Il n'existe pas de stade intermédiaire de prémutations pour ces maladies (taille de l'expansion trop petite).

Les maladies à expansion avec transmission autosomique dominante ou liées à l'X se caractérisent par un phénomène d'anticipation c'est-à-dire à l'apparition de plus en plus précoce avec une aggravation des symptômes au cours des générations successives, due à l'allongement progressif des expansions au fur et à mesure des générations. Ce phénomène ne s'observe pas dans l'AF, ni dans les maladies par expansion dont la transmission est autosomique récessive car la maladie n'apparaît en général qu'au niveau d'une génération.

b) Conséquence transcriptionnelle de l'expansion

L'expansion GAA est à l'origine d'une diminution partielle du taux d'expression de l'ARNm et de la protéine impliqués dans l'AF (Campuzano 1996, Cossée 1997a). En effet, une diminution d'environ 20 fois de la quantité d'ARNm a été mesurée par RT-PCR et « RNase protection » (Campuzano 1996, Cossée 1997a). D'autre part, des expériences de Western blot ont permis de confirmer un déficit sévère en protéine chez les patients avec un taux résiduel estimé entre 4 et 29 % dans neuf lignées lymphoblastoïdes, taux inversement proportionnel à la taille de la plus petite expansion (Campuzano 1997). De façon intéressante, un taux de protéine supérieur à celui attendu a été retrouvé chez un patient pratiquement asymptomatique présentant de grandes expansions démontrant ainsi que le niveau d'expression protéique se trouve être à la base moléculaire de la variabilité clinique et donc de la sévérité.

La réduction du taux d'ARNm chez les porteurs d'expansion GAA suggère un mécanisme d'inhibition de la machinerie transcriptionnelle. Il s'agit plus précisément d'une inhibition partielle de l'élongation de la transcription, l'initiation se faisant normalement. Cette hypothèse a été confirmée *in vitro* et *in vivo* par la démonstration de la formation au niveau de l'expansion d'une structure d'ADN en triple hélice ou triplex, interférant avec l'élongation de la transcription de façon proportionnelle au nombre de répétition GAA (Bidichandani 1998, Ohshima 1998). La triple hélice est composée par l'association intramoléculaire de 2 brins GAA et d'un brin TTC (Fig.7a), par la formation de classiques liaisons Hoogsteen entre les paires de base (Fig.7b). Sakamoto N. nomme la structure d'ADN formée par auto-assemblage « sticky DNA » dû à son aspect visqueux en solution et sa migration altérée sur gel, sans correspondance avec sa taille effective (Sakamoto 1999).

a



b

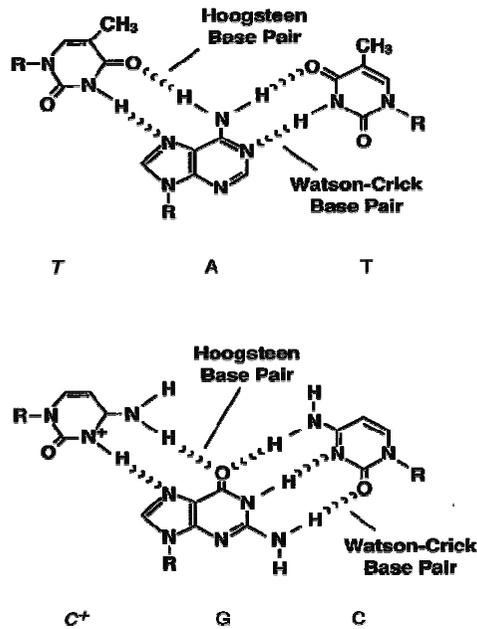


Figure 7 : Triple hélice formée par l'expansion GAA

a. Triple hélice formée par le repliement intramoléculaire de l'ADN permettant l'appariement de deux brins avec répétitions GAA.

b. Les liaisons entre les 3 brins se font par la formation d'interactions de type Watson-Crick et Hoogsteen.

(D'après RD. Wells, 2003 Second Friedreich's Ataxia Research Alliance International Conference)

D'autres hypothèses expliquant la diminution de l'expression transcriptionnelle par l'expansion ont été évoquées depuis, comme la formation d'hybrides ARN/ADN, empêchant la progression de l'ARN polymérase (communication de E. Grabczyk, 2003 *International Friedreich's Ataxia Research Conference, U.S.A.*, revue *Seznec* 2004a) ou une condensation de la chromatine au niveau des GAA, formant de l'hétérochromatine et entraînant l'absence d'expression du gène adjacent dans une proportion de cellules (variégation par effet de position) (Saveliev 2003).

L'expansion des allèles est expliquée *in vitro* par la formation de structures en « épingle à cheveux » par le repliement de l'ADN simple brin sur lui-même lors de la réplication ou de la réparation de l'ADN (Heidenfelder 2003). Ces structures secondaires anormales entraînent un glissement du brin d'ADN néoformé générant des synthèses itératives de la séquence répétée.

c) Les mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles dans le gène *FRDA* sont une cause rare d'AF (Campuzano 1996, Cossée 1999). Seuls 4% des patients sont hétérozygotes composites pour l'expansion trinuécléotidique dans l'intron 1 et une mutation dans la séquence codante du gène. La mutation peut aboutir à l'absence de synthèse protéique, à la synthèse d'une frataxine tronquée ou bien à un changement d'acide aminé. A ce jour, une trentaine de mutations ponctuelles différentes (11 tronquantes et 17 faux-sens) ont été identifiées (HGMD Human Genome Mutation Database <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>) (Fig.5).

Les mutations tronquantes répertoriées dans le gène *FRDA* regroupent des substitutions au niveau du codon d'initiation AUG, des décalages du cadre de lecture par insertion ou délétion d'un nucléotide, des substitutions au niveau des sites d'épissage et des mutations non-sens. Les mutations faux-sens sont à l'origine de la substitution d'un nucléotide et sont localisées dans des zones conservées de la frataxine (voir 4.1).

Aucun patient homozygote pour une mutation ponctuelle n'a pu être identifié à ce jour, dû à la faible probabilité génétique d'obtenir ce cas de figure considérant la fréquence des mutations ponctuelles. Il est aussi possible que l'absence complète de protéine résultant de deux mutations ponctuelles entraîne un phénotype embryonnaire léthal. Cette dernière hypothèse est appuyée par le fait que les plus petites expansions sont observées chez les patients hétérozygotes pour une mutation ponctuelle et par la létalité embryonnaire du modèle murin avec une invalidation totale du gène de la frataxine (Cossée 2000).

d) Corrélation génotype-phénotype

La nature dynamique de l'expansion GAA et la découverte de mutations ponctuelles dans le gène de la frataxine ont permis d'expliquer l'hétérogénéité phénotypique initialement attribuée à l'hétérogénéité des mutations en cause ou à une influence de gènes modificateurs ou de facteurs environnementaux. Ainsi, après la découverte de la mutation, de nombreuses équipes ont rapidement cherché à déterminer des corrélations entre la taille des allèles GAA et différents aspects cliniques. Les études dans la littérature sur des populations d'origines variées sont très nombreuses. La première corrélation mise en évidence concerne l'âge de début des premiers symptômes. Dès 1996, A. Filla démontre, pour des patients homozygotes, une corrélation inverse entre l'âge de début et la taille des 2 allèles, avec une meilleure corrélation pour l'allèle de plus petite taille (Filla 1996). Il remarque aussi que la taille moyenne des 2 allèles est plus grande chez les patients présentant une cardiomyopathie ou un diabète. Les études de A. Dürr et E. Monros, en 1996 et 1997 respectivement, apportent les mêmes conclusions (excepté pour l'association avec un diabète dans l'étude de A. Dürr) et mettent de plus en évidence une association entre la taille du plus petit allèle et la fréquence de la perte des réflexes dans les membres supérieurs (Dürr 1996, Monros 1997). Les plus petits allèles possédant moins de 500 répétitions semblent être associés à un début tardif des symptômes, comme la dysarthrie et à une progression plus lente (Schöls 1997). Ont suivi des études qui démontrent une corrélation significative entre la taille de l'expansion sur le plus petit allèle et i) des paramètres échocardiographiques caractéristiques de la cardiomyopathie (Isnard 1997, Dutka 1999 et 2000, Bit-Avragim 2001), ii) l'âge auquel les patients se trouvent confinés en chaise roulante, iii) la scoliose (Delatycki 1999a), iv) la présence de déformations des pieds (Delatycki 1999a), v) l'amplitude du potentiel d'action sensitif (électrophysiologie) ainsi que vi) le pourcentage de fibres myélinisées sur des biopsies de nerf sural (12 patients), déterminant la sévérité de la neuropathie sensitive (Santoro 1999). Cependant, ces corrélations statistiquement significatives à l'échelle de populations sont difficilement applicables comme critère strict de pronostic pour un individu. Il est plus évident de lier certains paramètres au phénotype comme la sévérité de l'atteinte (confinement en chaise roulante, cardiomyopathie) et l'âge d'apparition des premiers symptômes (Montermini 1997, De Michele 1996).

Une grande partie des patients hétérozygotes composites est cliniquement indiscernable des patients homozygotes. Cependant, certaines mutations ponctuelles sont liées à des tableaux atypiques (Campuzano 1996, Filla 1996, Cossée 1999). Les mutations

tronquantes sont toujours associées à un phénotype classique mais les mutations faux sens peuvent conduire à un phénotype typique ou atypique, selon la localisation de la mutation au niveau de la protéine. Les trois mutations répertoriées dans la partie N-terminale de la frataxine (L106S, D122Y, G130V) sont responsables d'un phénotype de gravité atténuée avec une progression lente (Bidichandani 1997, Bartolo 1998, Cossée 1999). Par contre, les présentations cliniques des mutations de la partie C-terminale sont en général sévères. En conclusion, en présence d'une nouvelle mutation identifiée chez un patient, il est quasiment impossible de prévoir la sévérité des symptômes.

3.4) Expression du gène X25

L'expression du transcrite du gène X25 est ubiquitaire dans les tissus humains adultes ; son taux d'expression est le plus fort dans le cœur, moindre dans le foie, le muscle squelettique et le pancréas, et très faible ou nulle dans les autres tissus dont le cerveau. L'analyse isolée des différentes parties du système nerveux central a cependant montré une forte expression du transcrite dans la moelle épinière, moindre dans le cervelet et très faible dans le cortex cérébral (Campuzano 1996). La corrélation entre l'anatomopathologie et le niveau d'expression du transcrite est donc partielle.

Chez la souris adulte, l'expression de l'homologue du transcrite humain (transcrite murin de 1,2 kb) étudiée par Northern Blot est la plus forte dans le cœur, le foie, le muscle squelettique, le rein, la rate et le thymus (Koutnikova 1997). L'expression dans le poumon et le système nerveux est en revanche beaucoup plus faible. Une analyse plus détaillée par hybridation *in situ* sur des sections de cerveau révèle un signal important autour des ventricules latéraux cérébraux, à la fois dans le plexus choroïde et dans la couche de cellules épendymaires. Cette technique a aussi permis de détecter le transcrite exprimé à plus faible niveau dans la couche granulaire du cervelet. Au cours du développement embryonnaire, l'expression est négligeable avant le 10ème jour embryonnaire (E10), puis augmente progressivement (Koutnikova 1997, Jiralerspong 1997) jusqu'aux jours E14 à E16. Le gène est exprimé dans la zone ventriculaire et le mésencéphale postérieur et à niveau inférieur, détecté dans la moelle épinière, la medulla oblongata, la rétine et les ganglions rachidiens. Au jour E14, le gène est particulièrement bien exprimé dans la région corticale des ganglions rachidiens correspondant aux corps cellulaires des neurones sensitifs, spécifiquement atteints dans l'AF. Au niveau extra-neurologique, le gène est aussi exprimé, au cours du développement, dans le cœur, la graisse brune, le foie, l'intestin, le thymus et les reins.

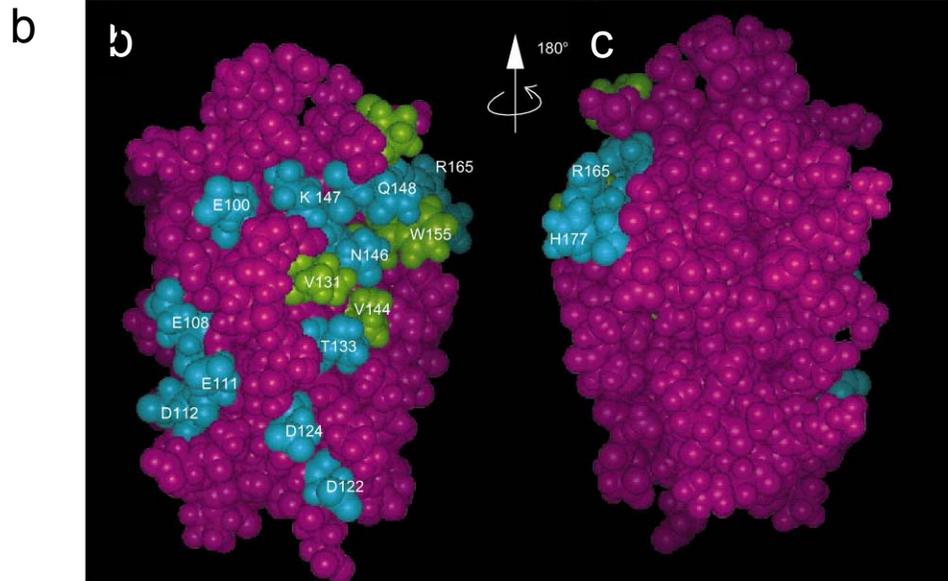
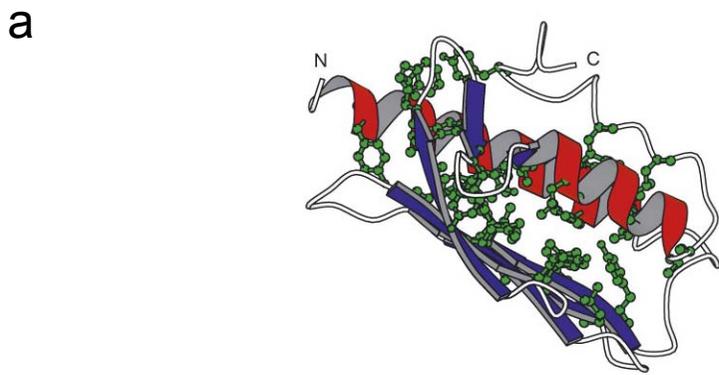
On peut remarquer une expression forte du gène X25 dans les tissus avec une activité métabolique élevée (foie, muscle, pancréas, cœur, système nerveux, graisse brune), or seuls le cœur, certaines parties spécifiques du système nerveux et dans une moindre mesure le pancréas, sont atteints chez les patients. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules touchées (neurones, cardiomyocytes, cellules β du pancréas) sont des cellules post-mitotiques, n'ayant pas de capacité illimitée de régénération tissulaire.

4) L'ataxie de Friedreich : une maladie mitochondriale

4.1) La protéine responsable de l'AF : la frataxine

Le transcrit de 1,3 kb du gène X25 code pour une protéine de 210 acides aminés, appelée frataxine, ne présentant aucune homologie de séquence, ni de structure avec une protéine de fonction connue (Campuzano 1996). La séquence protéique est fortement conservée au cours de l'évolution, depuis certaines bactéries Gram négatives jusqu'à l'Homme, en passant par la levure et le nématode *C. elegans*, et ce en particulier au niveau des acides aminés 141 à 167, codés par 16 acides aminés de l'exon 4 et 10 acides aminés de l'exon 5a (Fig.8). La frataxine humaine présente 73 % d'homologie avec la frataxine murine qui comporte 207 acides aminés, avec une homologie plus forte dans les exons 3 à 5a, correspondant à la protéine mature. En effet, les analyses bio-informatiques de la séquence peptidique de la frataxine et de ses homologues murin et de levure ont prédit une séquence d'adressage mitochondrial dans la région N-terminale, avec une prédiction forte pour la levure et la souris et plus faible pour la protéine humaine (Koutnikova 1997).

La découverte de la structure tridimensionnelle de la frataxine par trois groupes indépendants par cristallographie (Dhe-Paganon 2000, Cho 2000) ou en solution par RMN (Musco 2000), n'a pas permis d'avancer dans la compréhension de sa fonction. La frataxine présente une structure monomérique globulaire, sans cavité ou sillons. Elle comprend deux régions distinctes : une région N-terminale de 15 résidus (qui est absente de la frataxine bactérienne) contenant le peptide de localisation mitochondriale, et un bloc C-terminal conservé et compact, constitué de 7 feuillets β antiparallèles et d'une paire d'hélices α parallèles formant une structure globulaire (Fig.9a). Les acides aminés localisés à l'intérieur de la structure sont hydrophobes et importants pour la stabilité de la protéine. Les résidus conservés sont localisés en partie entre le brin β 2 et l'hélice α 1, et forment par leur caractère



c

Lys106→Ser, Trp173→Gly : « Intérieur » de la protéines avec perte de l'énergie de repliement	His183→Arg : Perturbation électrostatique, remplacement d'un AA intérieur par un AA chargé encombrant
Ile154→Phe, Leu182→Phe: Gène stérique, remplacement d'un AA hydrophobe par un plus encombrant	Asp122→Tyr : Changement d'identité d'un AA chargé négativement à la surface
Leu156→Phe : Perturbation des liaisons hydrogènes dans le brin β en introduisant une proline	Trp155→Arg : Remplacement d'un AA très conservé, aromatique, et encombrant par un AA chargé positivement
Gly130→Val : Gène stérique, la valine n'est pas autorisée par la conformation des AA voisins	Arg165→Cys : Remplacement d'un AA conservé chargé positivement par une cystéine exposée pouvant former des ponts dissulfures
Leu182→His : Perturbation électrostatique par le remplacement d'un AA intérieur (hydrophobe), par un AA chargé	

Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la frataxine

a. Représentation de la structure tertiaire de la frataxine avec les hélices représentées en rouge et les brins en bleu. Les acides aminés (AA) hydrophobes conservés impliqués dans la formation de la structure secondaire sont représentés en vert.

b. Les acides aminés avec une conservation phylogénétique sont tous localisés sur la même face (bleu : AA hydrophiles, vert : AA hydrophobes). Sur la structure de gauche sont représentés, à gauche les acides aminés conservés formant l'arête négative et en haut à droite les acides aminés formant la zone hydrophobe.

c. Principales mutations ponctuelles retrouvées chez les patients et localisation structurale.

(Figures issues de Musco 2000)

hydrophile une « arête négative » rendant possible une liaison à des ions chargés positivement de par l'exposition de ce site (Fig.9b). On retrouve d'autres résidus conservés (141 à 167), au niveau des feuillets $\beta 3$, $\beta 4$ et $\beta 5$, composés d'une alternance d'acides aminés hydrophobes et hydrophiles. Curieusement, les acides aminés conservés hydrophobes sont localisés à la surface de la protéine suggérant une interaction avec un partenaire protéique. Les mutations ponctuelles observées chez les patients affectent les acides aminés conservés (formant la face hydrophobe et « l'arête négative ») ou importants pour le repliement et la stabilisation de la structure (Fig.9c).

4.2) Localisation mitochondriale

Une implication mitochondriale dans l'AF a rapidement été suggérée car les tissus atteints dans la pathologie (cœur, pancréas, système nerveux) sont particulièrement riches en mitochondrie.

La mitochondrie est un organelle essentiel dans la cellule puisque son rôle principal est la génération d'ATP par phosphorylation oxydative. La phosphorylation oxydative est réalisée par la chaîne respiratoire dont les différents complexes sont présentés sur la figure 10. Les cinq complexes localisés dans la membrane interne sont appelés : la NADH ubiquinone oxydoréductase (complexe I), la succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II), l'ubiquinone-cytochrome c réductase (complexe III), la cytochrome c oxydase ou COX (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V). La chaîne respiratoire comporte également deux transporteurs d'électrons : l'ubiquinone ou coenzyme Q dans la membrane interne et le cytochrome c dans l'espace intermembranaire. Ces organelles réalisent aussi d'autres réactions métaboliques comme le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, le cycle de l'urée, la dégradation des acides gras par la β -oxydation, la biosynthèse d'acides aminés et de plusieurs cofacteurs (hème et noyaux Fer-Soufre (Fe-S)) nécessaires entre autres à l'activité des complexes de la chaîne respiratoire.

La définition des maladies mitochondriales inclut à la fois les maladies dues à des mutations dans le génome mitochondrial et celles dues à des déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale. La mitochondrie est le seul organelle qui possède son propre génome (ADN mitochondrial), 16,6 Kb d'ADN double-brin en cercle. Il code pour 13 polypeptides, constituants des composants de la chaîne respiratoire (Fig.10) et 24 autres gènes (2 ARN ribosomiaux, et 22 ARN de transfert) qui permettent la synthèse de ces 13 polypeptides. Mais pour réaliser toutes ses tâches, la mitochondrie fait appel à 850 protéines qui sont codées par

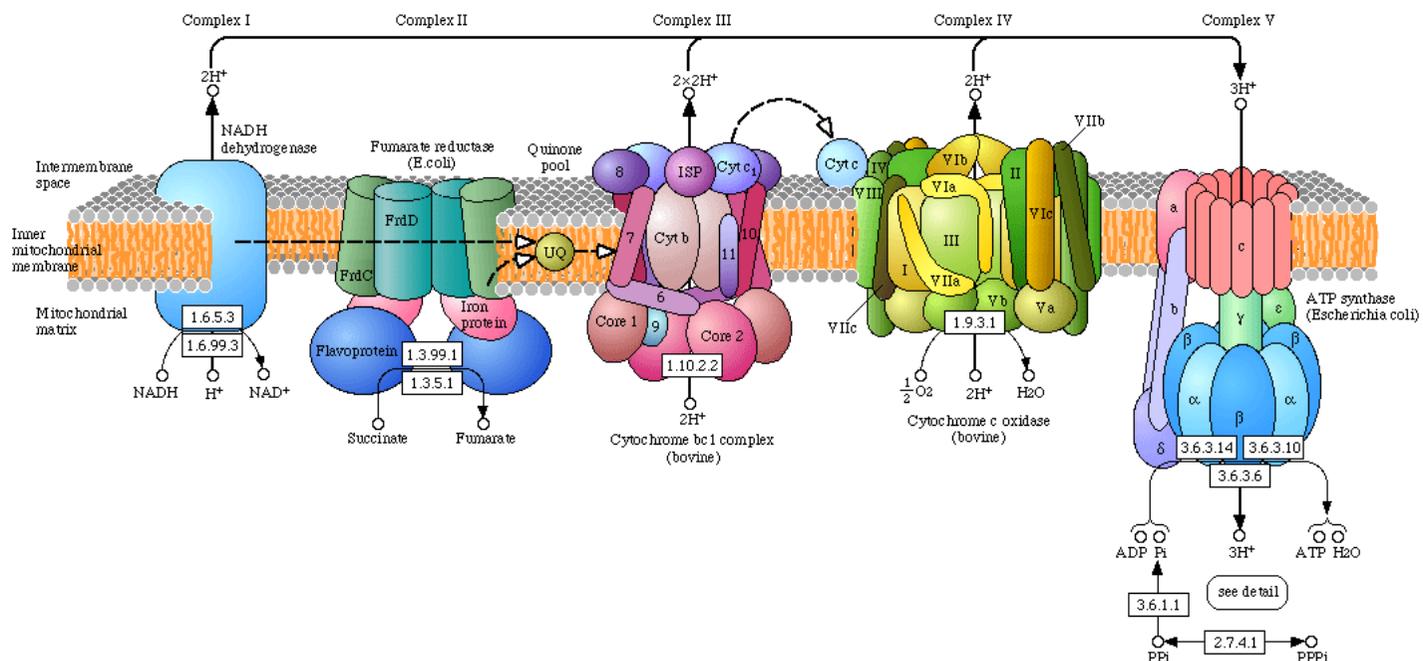


Figure 10 : Phosphorylation oxydative

Principales réactions impliquant les accepteurs d'électrons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. Parallèlement au transport des électrons, des protons sont pompés dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. C'est à partir de ce gradient chimique que l'ATP est produit par phosphorylation oxydative.

Le NADH et le $FADH_2$ proviennent de la glycolyse et du cycle de l'acide citrique.

Le premier complexe oxyde $NADH + H^+$, se réduit, en prenant deux électrons au cofacteur. L'énergie de cette oxydoréduction permet d'éjecter deux protons hors de la matrice mitochondriale. Le complexe I retrouve son état d'oxydation antérieur en transmettant un électron à l'ubiquinone (UQ).

Le complexe II oxyde alors $FADH_2$ en FAD (interne au complexe) qui oxyde ensuite le succinate en fumarate (réaction du cycle de krebs) et les électrons récupérés réduisent FAD. Le complexe II est commun au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire. Le complexe II retrouve son état antérieur en réduisant l'ubiquinone (UQ). L'UQ réduite, va transporter ses électrons à travers la membrane jusqu'au complexe III, le réduisant. Puis le complexe III s'oxyde en transmettant les électrons au cytochrome c. Cette oxydation fournit l'énergie nécessaire pour éjecter 4 protons hors de la matrice mitochondriale.

Le cytochrome c transporte les électrons jusqu'au complexe IV. L'oxydant qui va permettre au complexe IV de retrouver son état antérieur et d'éjecter deux protons est l'oxygène. L'oxygène réduit va former, avec des protons de la matrice, une molécule d'eau, ce qui va encore augmenter le gradient de proton.

(Image provenant du projet KEGG (Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00190.html>))

le génome nucléaire et importées dans un des quatre compartiments de la mitochondrie : membrane externe, espace intermembranaire, membrane interne et matrice. Sur ces 850 polypeptides, 75 sont des composants des cinq complexes de la chaîne respiratoire et 20 autres permettent leur assemblage et leur fonctionnement.

Ainsi, certaines maladies mitochondriales partagent des points communs avec l'AF par leur atteinte multi-systémique et les symptômes cliniques (Tableau 3) (Zeviani 2003, Schon 2003). En effet, comme le cœur, le système nerveux et le muscle sont des tissus qui nécessitent beaucoup d'énergie, la plupart des maladies mitochondriales se traduisent par des encéphalo-cardiomyopathies.

La première preuve, bien que indirecte, d'une localisation mitochondriale de la frataxine est issue des études phylogénétiques menées par T. J. Gibson en 1996 : des séquences homologues à la frataxine sont présentes dans le génome des bactéries Gram négatives, mais absentes chez les bactéries Gram positive (Gibson 1996). Or, les bactéries Gram négatives ont le même ancêtre commun que le précurseur de la mitochondrie. Le gène de la frataxine dériverait ainsi du génome mitochondrial ancestral commun aux bactéries Gram négatives et aux eucaryotes, puis aurait subi une translocation vers le génome nucléaire pendant l'endosymbiose mitochondriale, comme une grande partie des gènes mitochondriaux.

La confirmation de la localisation mitochondriale de la frataxine provient finalement d'expériences de transfections de constructions de la frataxine fusionnée à la GFP (« green fluorescent protein ») ou à la β -galactosidase dans différents types cellulaires dont la levure (Babcock 1997, Priller 1997, Wilson 1997, Koutnikova 1997). Le marquage cytoplasmique et granulaire de la frataxine co-localisant avec des marqueurs mitochondriaux, révèle dans ces systèmes, une localisation mitochondriale. Un marquage semblable a été obtenu par l'utilisation d'anticorps monoclonaux synthétisés à partir de la protéine humaine (anticorps 1G2) sur cellules HeLa transfectées démontrant un marquage des membranes et des crêtes mitochondriales suggérant en surexpression, une localisation au niveau de la membrane interne ou dans l'espace intermembranaire (Campuzano 1997). De plus, dans des cultures de neurones et d'astrocytes murins provenant du striatum, le marquage de la frataxine est particulièrement important au niveau des axones, particulièrement riches en mitochondries. Ce même anticorps a également permis de localiser précisément le signal d'adressage mitochondrial aux 20 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la frataxine correspondant à l'exon 1, par des expériences de transfection cellulaire de formes tronquées de la frataxine. Enfin, des expériences de fractionnement sub-cellulaires sur des lignées

<p>Mutation dans un gène de l'ADN mitochondrial</p> <p>Encéphalomyopathie avec acidose lactique et stroke (MELAS) Ophthalmoplégie externe progressive (PEO) Syndrome de Leigh Neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON)/Parkinson/Dystonie Maladie des motoneurones NARP (neuropathie, ataxie, rétinite pigmentosa)/MILS (Syndrome de Leigh maternel) Forme familiale de Parkinson/surdité induite par les macrolides</p>	<p>ARNt^{Leu} ARNt^{Lys} Cytochrome c oxydase (CCO) III, ND5, ARNt^{Trp}, ARNt^{Val} Sous-unités du complexe I CCO I ATPase 6 (sous-unité 6 du complexe V) ARNr 12S</p>
<p>Mutation dans un gène nucléaire codant pour des protéines mitochondriale de la phosphorylation oxydative</p> <p>Syndrome de Leigh avec déficience du complexe I Syndrome de Leigh avec déficience du complexe II Syndrome de Leigh avec déficience du complexe IV Syndrome de Leigh avec déficience de PDH</p>	<p>Sous-unités du complexe I SDH SURF1, SCO2 Sous-unité E1-alpha de PDH</p>
<p>Mutation dans un gène nucléaire codant pour des autres protéines mitochondriale</p> <p>Ataxie de Friedreich Paraplégie spastique héréditaire Syndrome de Mohr-Tranebjaerg ou DDS (Dystonie Deafness Syndrome) Maladie de Wilson</p>	<p>Frataxine Paraplégine, HSP 60 TIMM8A ATPase avec transport de Cu</p>

Tableau 3 : Maladies neurodégénératives mitochondriales

lymphoblastoïdes de patients suivies de Western Blot ont confirmé la localisation mitochondriale dans des lignées cellulaires humaines (Campuzano 1997).

4.3) Maturation de la frataxine

Lors d'études d'interaction protéique (double-hybride de levure) dans le laboratoire, H. Koutnikova a mis évidence une interaction entre la frataxine et la sous-unité β d'une peptidase nommée la MPP (peptidase de clivage mitochondrial, « Mitochondrial Processing Peptidase »), au niveau des acides aminés 4 à 87 de la partie N-terminale de la frataxine (Koutnikova 1998). Les tests de clivage *in vitro* par la MPP, donnent cependant lieu à une protéine de 20 KDa, plus grande que la forme mature de 18 KDa (acides aminés 55 à 210 codés par les exons 2 à 5a). Il a été ensuite précisé que, lors du clivage *in vitro* de la frataxine humaine et murine en présence de la MPP, deux produits se formaient : une forme intermédiaire de 21 KDa et la protéine mature de 18 KDa (Branda 1999). Un clivage en deux étapes par la MPP est finalement démontré pour la frataxine humaine, fait relativement rare car la plupart des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire sont clivées par la MPP en une seule étape (Cavadini 2000).

Dans la levure, deux protéines « chaperones » de la famille des protéines « heat-shock 70 » (Hsp70) localisées dans la matrice mitochondriale participent au clivage (Knight 1998, Voisine 2000). Ceci avait déjà été observé pour d'autres protéines mitochondriales de levure, localisées dans des compartiments variés (Kalousek 1988, Schneider 1991). Le premier clivage permet l'entrée dans la mitochondrie et le deuxième clivage permet le positionnement au sein de la mitochondrie.

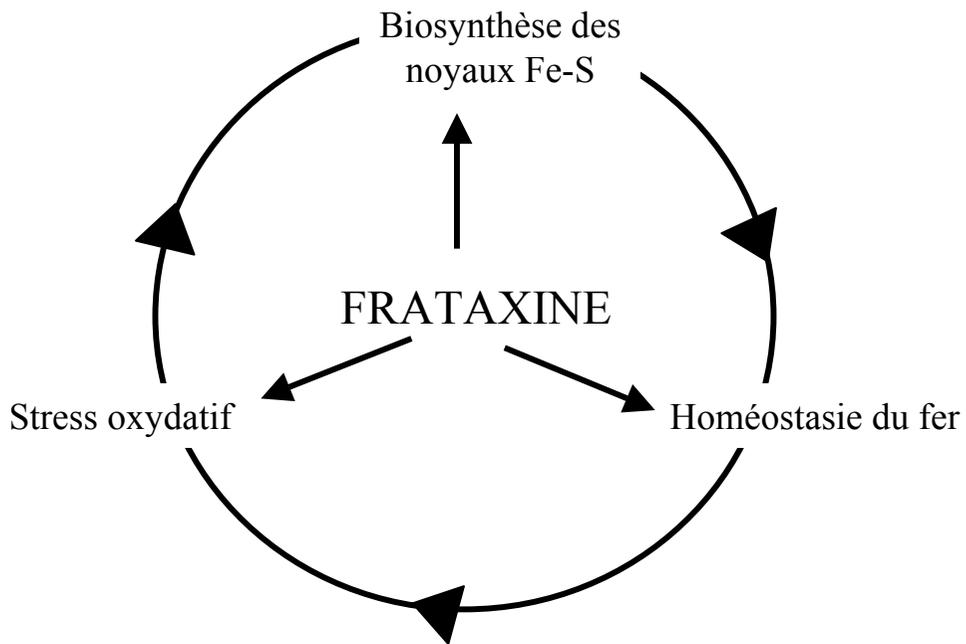


Figure 11 : Cercle vicieux en absence de frataxine

Les trois hypothèses de la fonction de la frataxine proposées initialement sont reliées entre elles par un cercle vicieux compliquant la détermination de la lésion initiale. En effet, la déstabilisation des noyaux Fe-S peut conduire à une libération de fer qui, par la réaction de Fenton produit du stress oxydatif, capable d'accentuer l'atteinte des noyaux Fe-S.

II. Fonction de la frataxine

1) Les principales hypothèses

L'AF démontre l'intérêt d'approches multiples pour la compréhension d'une pathologie humaine. En effet, la découverte de la fonction de la frataxine résulte des efforts de chercheurs dans des domaines variés, par des études *in vitro* et des modèles de levures, cellulaires et murins de l'AF. Ces études ont apporté des informations parfois contradictoires mais toutes cruciales, orientant à plusieurs reprises les chercheurs vers de nouvelles pistes.

Le gène YFH1 (« yeast frataxin homologue 1»), homologue levure du gène de la frataxine, encore non identifié, a été initialement cloné lors d'un test de complémentation génétique visant à supprimer les effets délétères d'un mutant ne pouvant se développer sur un milieu pauvre en fer (Askwith 1994). Un rôle de YFH1 dans l'homéostasie du fer a été rapidement suspecté. En 1997, l'inactivation du gène homologue de la frataxine chez la levure entraîne une importante accumulation mitochondriale de fer associée à une sensibilité accrue aux agents oxydants, ce qui a confirmé un lien étroit entre la frataxine et l'homéostasie mitochondriale du fer (Babcock 1997, Foury 1997). Ces données étaient en accord avec les dépôts granulaires de fer observés dans les fibres cardiaques des patients, spécifiques de l'AF car d'autres ataxies tout comme d'autres maladies mitochondriales présentent une cardiomyopathie associée, or l'accumulation de fer semble directement reliée à l'absence de frataxine (Lamarche 1980). Cependant la même année, de nouveaux indices sont apportés par l'étude biochimique de biopsies cardiaques de deux patients atteints par l'AF démontrant un défaut spécifique de l'activité des complexes I, II, III de la chaîne respiratoire et des aconitases, qui sont toutes des enzymes à noyau Fe-S (Rötig 1997). Les noyaux Fe-S sont particulièrement sensibles aux radicaux libres (Keyer 1996) et une déstabilisation secondaire de ces structures via un stress oxydatif secondaire à un défaut dans l'homéostasie du fer ou primaire, a été proposé. Les hypothèses principales concernent alors l'homéostasie du fer, le stress oxydatif et les noyaux Fe-S, toutes trois reliées par un cercle vicieux (Fig.11).

Je me propose de présenter brièvement les métabolismes étroitement liés du fer, des noyaux Fe-S et de l'hème, ainsi que du stress oxydatif. Je présenterai ce que les différents modèles et études ont apporté.

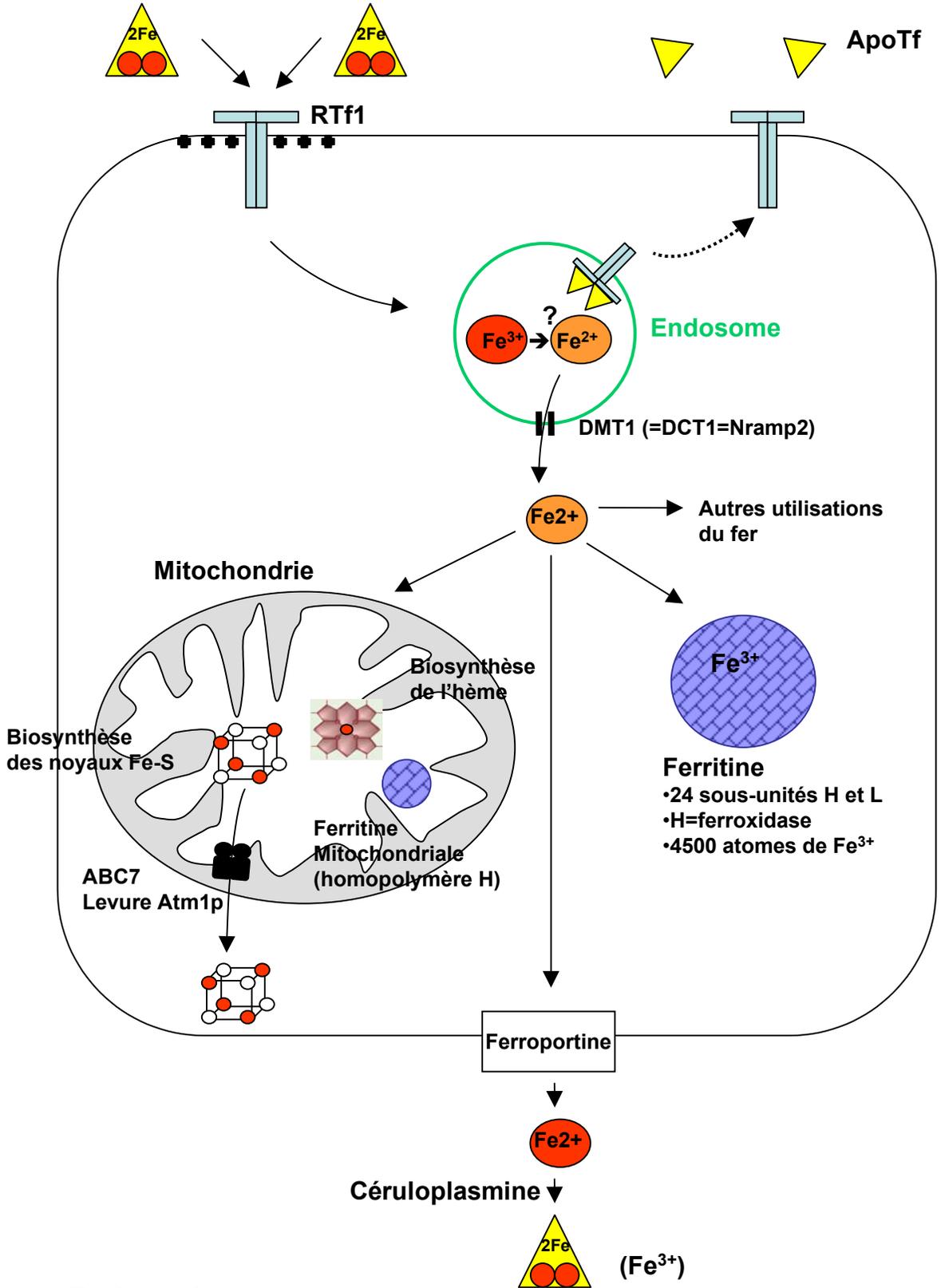


Figure 12 : Homéostasie du fer

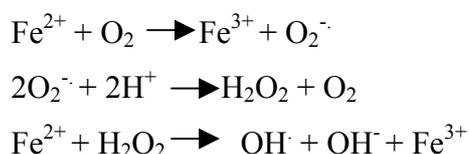
Le fer lié à la transferrine (Tf) rentre dans la cellule par endocytose dépendante de la clathrine (croix noires), après fixation sur des récepteurs spécifiques (RTf). Après réduction intra-endosomale, le fer libéré par un transporteur particulier (DMT1), est en grande partie dirigé vers la mitochondrie (pour la synthèse de l'hème et des noyaux Fe-S), ou stocké dans la ferritine et le RTf est recyclé vers la membrane plasmique. Les noyaux Fe-S sont exportés de la mitochondrie par le transporteur ABC7. Le seul exportateur de fer connu est la ferroportine dans certains types cellulaires (les entérocytes du duodénum, les macrophages, les hépatocytes, les syncytiotrophoblastes du placenta et les cellules du système nerveux central). La céruloplasmine (ou l'hémaphéistine dans l'intestin) oxyde le Fe^{3+} pour permettre son chargement sur la Tf.

2) Introduction générale

2.1) Le métabolisme du fer

a) Fonctions cellulaires du fer

La régulation du métabolisme du fer est hautement contrôlée car cet élément est essentiel à la survie des cellules eucaryotes, à leur prolifération et à l'activité de nombreuses enzymes, comme les enzymes à noyau Fe-S, les hémoprotéines, en particulier l'hémoglobine (80 % de la demande en fer), et à la constitution du centre actif de certaines protéines (Hentze 2004). Les propriétés physico-chimiques de métal de transition permettent au fer d'exercer un large spectre d'activités : le fer peut ainsi passer en une étape d'oxydo-réduction de l'état ferreux (Fe^{2+}) à ferrique (Fe^{3+}) et inversement. Cependant, ces propriétés physico-chimiques excessivement labiles peuvent donner au fer un caractère hyper-réactif notamment à l'état libre, et peuvent conduire à la formation de radicaux libres hautement toxiques ($\text{OH}\cdot$) en réagissant essentiellement avec l'oxygène moléculaire au travers de la réaction de Fenton :



b) Le cycle du fer

Le fer provient de l'absorption intestinale à partir des aliments et du recyclage de l'hémoglobine par les macrophages. Le fer circulant du plasma se lie avec une très forte affinité à la transferrine (Tf), se trouvant ainsi sous une forme non réactive (Fig.12). Sous forme diférique, la Tf est ensuite internalisée par endocytose au niveau de son récepteur (RTf1). Une fois internalisée, une modification conformationnelle de la Tf suite à l'acidification de l'endosome (par une pompe à protons) permet la libération du fer. Ce dernier est immédiatement réduit grâce à l'intervention d'une ferriréductase (non identifiée) et pris en charge par DMT1 (« Divalent Metal Transporter 1 »), un transporteur de métaux divalents. L'apoTf et son récepteur sont recyclés vers la surface de la cellule (exocytose).

Une fois dans la cellule, le fer non utilisé est stocké au sein de la ferritine, dont la quantité dépend du tissu et de l'état physiologique. La ferritine est une protéine multimérique

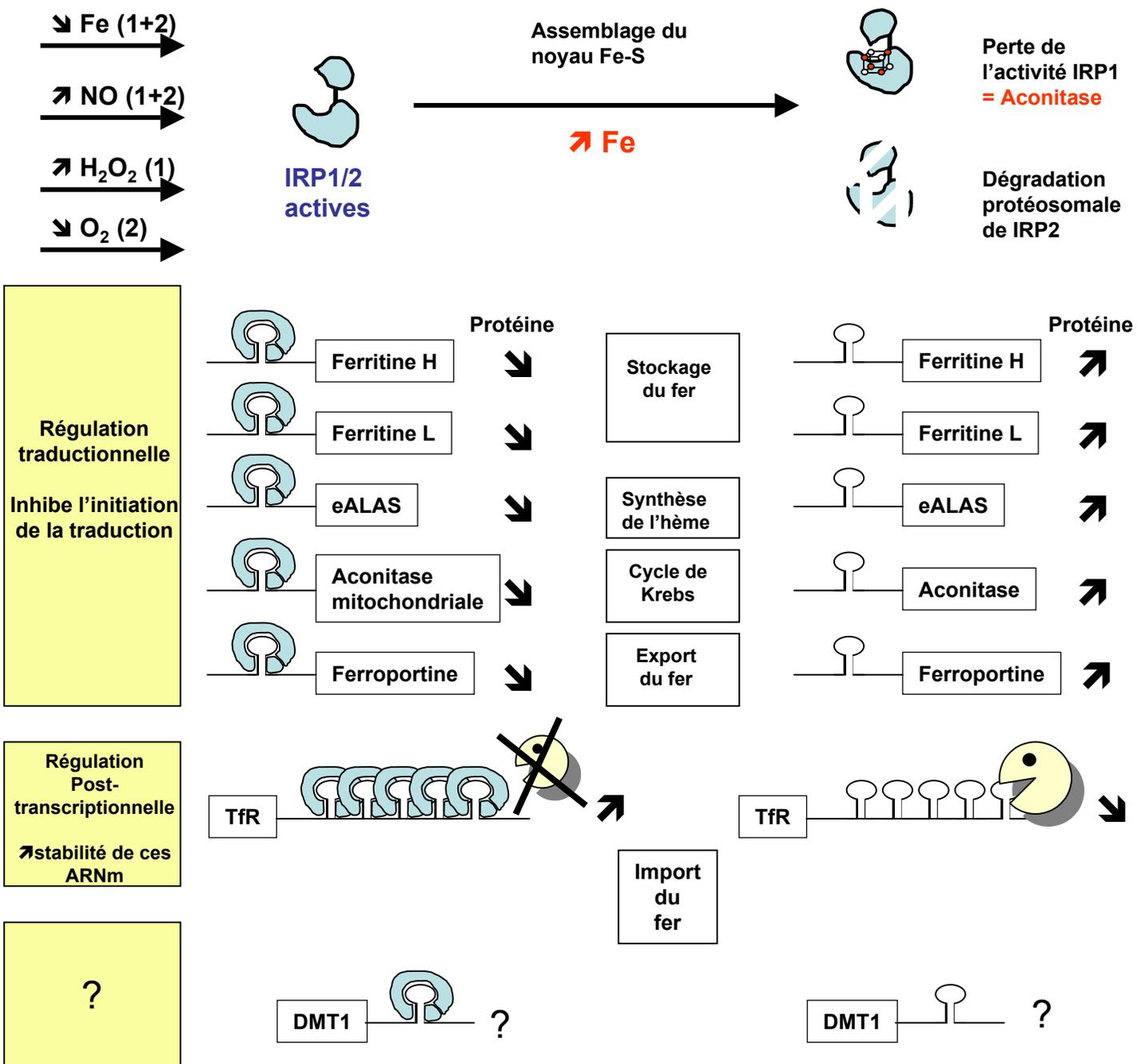


Figure 13 : Régulation de l'homéostasie du fer par le système IRE/IRP

Certaines protéines impliquées dans le stockage, l'export, l'import du fer, le cycle de Krebs ou la synthèse d'hème des érythroïdes sont régulées par l'interaction entre des séquences secondaires de leur ARNm, conservées, appelées les éléments de réponse au fer (IRE, iron responsive element) et les protéines IRPs (protéines régulatrices du fer, Iron regulatory protein). La liaison des IRPs aux IREs dans la région non traduite 5'-UTR bloque la traduction et la liaison en 3'-UTR stabilise l'ARNm.

Il existe deux formes de IRP : IRP1 et 2. Une concentration élevée en fer entraîne la conversion de IRP1 en aconitase, avec présence d'un noyau Fe-S, qui n'a plus la capacité de lier les IREs et IRP2 est dégradée via le protéasome (1+2). Une concentration faible en fer (ou l'action de NO) entraîne une accumulation de IRP1 et une stabilisation de IRP2 (1+2). H₂O₂ active uniquement IRP1 (1), et l'hypoxie peut stimuler la dégradation de IRP2 (2).

(D'après Hentze 2004)

constituée de 24 sous-unités H (« heavy », lourde) et L (« light », légère). La sous-unité H a une activité enzymatique ferroxidase permettant le stockage du fer sous forme Fe^{3+} hydroxylée et la sous-unité L est catalytiquement inactive. Récemment, une ferritine localisée spécifiquement dans la matrice mitochondriale a été identifiée chez l'homme et la souris (Levi 2001). Il s'agit d'un homopolymère composé uniquement de sous-unités H avec une activité ferroxidase. Bien que la fonction de cette ferritine mitochondriale n'ait pas encore été mise clairement en évidence, sa présence apporte des éclaircissements quant à la régulation du fer au sein de la mitochondrie dont peu d'éléments sont connus. En effet, la mitochondrie est un environnement excessivement oxydant vers lequel la plus grande partie du fer cellulaire est redirigé pour les voies de biosynthèse de l'hème et des protéines Fe-S.

c) La régulation de l'homéostasie du fer

Le métabolisme du fer se caractérise par une régulation moléculaire finement coordonnée et hautement contrôlée des protéines impliquées dans son importation, son stockage, son utilisation et son export. Ces différents mécanismes moléculaires reposent sur des modulations transcriptionnelles, post-transcriptionnelles, traductionnelles, et post-traductionnelles (Fig.13).

La régulation post-transcriptionnelle est bien connue et implique des séquences très conservées capables de générer des structures dites en « épingle à cheveux » (« Hairpin») et présentes au niveau des régions 5' et 3' non traduites (UTR, « untranslated region»). Ces séquences baptisées IREs pour « Iron Responsive Elements » peuvent être reconnues par des protéines régulatrices nommées IRPs (« Iron Regulatory Proteins »). Les complexes IRE/IRP ainsi formés vont, dans les régions 5'UTR, empêcher l'initiation de la traduction, alors que ces mêmes complexes positionnés en 3' UTR, vont stabiliser l'ARNm. La figure 13 précise les conséquences de ces régulations pour les différentes protéines impliquées dans l'homéostasie du fer. Ce mode de régulation est remarquable de par son aptitude à réguler non seulement l'homéostasie du fer au niveau cellulaire mais également au niveau systémique, notamment au travers des régulations des transporteurs DMT1 et Ferroportine.

Il existe deux IRPs (IRP1 et IRP2) dont la fixation sur les IREs dépend du taux cellulaire labile de fer. Lorsque la cellule contient un taux de fer cellulaire normal ou élevé, la protéine IRP1 se trouve complexée à un noyau (4Fe-4S) lui conférant une activité aconitase au niveau cytosolique mais lui interdisant toute interaction avec les séquences consensus IREs. En revanche, lorsque le taux de fer cellulaire s'appauvrit, ceci provoque la perte du

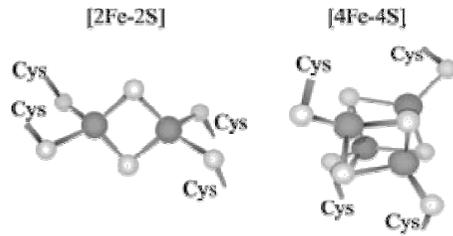


Figure 14 : Noyaux Fer-Soufre

Les noyaux Fe-S les plus simples sont les plus couramment retrouvés au sein des protéines : noyau rhombique (2Fe-2S) et cubane (4Fe-4S). $\text{Fe}^{2+/3+}$ est indiqué en gris foncé et S^{2-} en gris clair. Les ions $\text{Fe}^{2+/3+}$ sont le plus souvent liés aux atomes de soufre des résidus cystéines.

(Issu de Balk and Lill 2004)

noyau (4Fe-4S) et IRP1 peut ainsi interagir avec les séquences IREs. La protéine IRP2 présente un mode de régulation complètement différent, toujours fonction du taux de fer présent mais sans l'intermédiaire d'un noyau Fe-S. En effet, une déficience en fer induit une accumulation de la protéine, alors qu'une surcharge en fer provoquera la dégradation de la protéine IRP2. IRP1 et 2 sont très homologues à l'exception de l'addition de 73 acides aminés en N-terminal de IRP2, séquence qui semble être non seulement impliquée dans la réponse au fer mais qui pourrait également lier l'hème (Yamanaka 2003). C'est l'hème qui une fois oxydé, va être le signal déclencheur de l'ubiquitinylation conduisant à la dégradation de IRP2 par le protéasome.

De nombreux autres effecteurs comme les radicaux libres, la phosphorylation d'une sérine de IRP1 (entraînant une déstabilisation du noyau Fe-S), le NO ou l'O₂ peuvent également interférer dans ces voies de régulation, indépendamment du fer.

d) Régulation de l'homéostasie du fer chez la levure *S.cerevisiae*

Bien que la levure ne produise pas ses propres sidérophores, elle possède des transporteurs pouvant exploiter les sidérophores bactériens permettant l'import de fer ferrique (mécanismes non réducteurs). Par ailleurs, la levure peut importer son fer par deux autres mécanismes réducteurs, dits de « forte » ou de « faible affinité ». Le système « de forte affinité » commence par la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺ par des réductases membranaires (Fre1p et Fre2p) permettant son passage dans la cellule par un système comprenant une oxydase (Fet3p) qui réoxyde le fer et une perméase transmembranaire (Ftr1p). Tous ces gènes sont sous le contrôle de Aft1p, un facteur de transcription activé en cas de déficit en fer. Le système dit de « faible affinité » implique la perméase transmembranaire Fet4p, qui permet aussi l'import d'autres métaux de transition (manganèse, zinc, cobalt).

2.2) Les noyaux Fer-Soufre et l'hème

La plus grande partie du fer cellulaire est dirigé vers la mitochondrie pour les voies de biosynthèse de l'hème et des noyaux Fe-S.

a) Les noyaux Fe-S

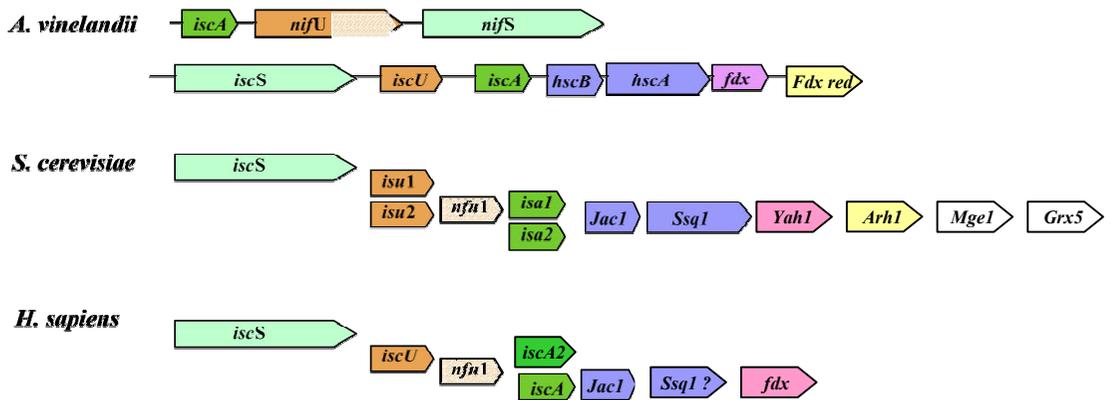


Figure 15 : Comparaison des gènes impliqués dans la biosynthèse des noyaux Fe-S chez la bactérie (*A. vinelandii*), la levure (*S. cerevisiae*) et l’homme

- : gènes de la cystéine désulfurase
- : gènes des protéines chaperons
- : gènes correspondant aux protéines constituant l’échaffaudage sur lequel se construit le noyau Fe-S
- : gènes homologues de *iscA* (non essentiels à la viabilité de la levure)
- : gènes de la ferredoxine
- : gènes de la ferredoxine réductase
- : gènes homologues de *nifU* (non essentiels à la viabilité de la levure)
- : gènes présents dans la levure, sans homologues bactériens

(D’après Frazzon and Dean 2003)

Ces noyaux sont présents dans toutes les formes de vie et participent à des fonctions essentielles comme la respiration, la photosynthèse ou la fixation de l'azote (Rouault and Klausner 1996). Ils ont été identifiés depuis plus de quarante ans mais ce n'est que depuis les années 1990 que les différentes étapes des voies de biosynthèse mitochondriales ont commencé à être décomposées. Les noyaux les plus courants comportent deux atomes de fer et deux atomes de soufre (2Fe-2S), ou quatre atomes de fer et quatre de soufre (4Fe-4S) (Fig.14). Chez les mammifères, la plupart des protéines contenant ces noyaux sont localisées dans la mitochondrie et en particulier dans les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire (avec 10 à 11 noyaux Fe-S permettant le transfert d'électrons) ou dans la ferrochelatase (un noyau impliqué dans l'activation et la dimérisation de l'enzyme). Dans le cytosol, le noyau Fe-S de l'aconitase constitue son site catalytique et en carence de fer, sa perte entraîne la formation de l'IRP1 (voir régulation IRP1). De nombreuses protéines à noyau Fe-S isolées chez les bactéries, chez les levures ou les plantes n'ont pas d'équivalent chez les mammifères comme par exemple la glutamate synthase (Nachin 2003).

Les difficultés rencontrées lors de la compréhension des mécanismes de la biosynthèse des noyaux Fe-S résident dans le fait que ces éléments sont capables de se former spontanément en présence de fer et de sulfide, en conditions réductrices. D'une manière très succincte, les premiers gènes impliqués dans l'assemblage des noyaux Fe-S ont été découverts chez les bactéries, et plus précisément lors d'étude sur la formation de la nitrogénase d'une bactérie fixant l'azote (*A. vinelandii*). Parmi ces gènes regroupés en opéron se trouvent les gènes Nif (NifS, NifA et NifU). NifS est une cystéine désulfurase, capable de libérer du soufre à partir d'une cystéine, NifU et NifA participent quant à eux à l'incorporation du noyau Fe-S dans l'apoprotéine (ici, la nitrogénase) (Frazzon and Dean 2003). La recherche d'autres gènes impliqués dans l'assemblage des noyaux Fe-S chez cette même bactérie a finalement conduit à l'identification des gènes isc (« iron-sulfur cluster assembly ») et notamment les gènes iscS, iscU, iscA, mais aussi des gènes de protéines « heat shock » et une ferredoxine (Fig. 15). Par la suite, des homologues de la plupart des gènes des opérons isc et nif ont été trouvés chez la levure *S.cerevisiae* et les mammifères (Fig.15) (Strain 1998, Kispal 1999, Lill 1999, Craig and Marszalek 2002).

Les premières données concernant la biosynthèse des noyaux Fe-S chez la levure datent de 1998, par la découverte de trois protéines, Nfs1p et deux protéines « heat shock » Jac1p et Ssq1p, nécessaires à l'activité de l'aconitase et de la succinate déshydrogénase Sdh2p (Strain 1998). Les différentes étapes de la biosynthèse des noyaux Fe-S sont aujourd'hui

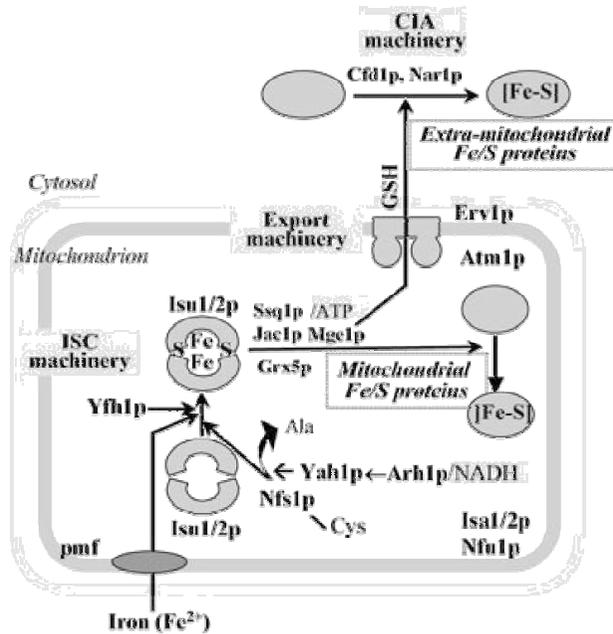


Figure 16 : Biosynthèse des noyaux Fe-S dans la levure

Modèle de la biosynthèse des noyaux Fe-S chez la levure. Un noyau Fe-S est assemblé et inséré dans l'apoprotéine mitochondriale par la machinerie ISC (« iron sulfur cluster »). Le transporteur ABC Atm1p et la sulfhydryl oxydase (Erv1p) sont nécessaires à la maturation des protéines à noyau Fe-S extramitochondriales. L'ATPase Cfd1p et la fer-hydrogénase Nar1p sont les premières protéines cytosoliques connues à ce jour et impliquées dans la biosynthèse des protéines à noyau Fe-S cytosoliques.

(pmf : proton motive force)

(D'après Balk and Lill 2004)

identifiées et impliquent 12 protéines localisées dans la matrice mitochondriale (Fig.16) (Balk and Lill, 2004).

L'assemblage des noyaux Fe-S implique avant tout un donneur de soufre, un donneur de fer et des protéines de structure sur lesquelles le noyau va s'assembler. Ainsi, le soufre libéré à partir d'une cystéine par Nfs1p (cystéine désulfurase) et le fer, probablement apporté par la protéine Yfh1p (homologue de la frataxine humaine), s'assemblent grâce aux protéines homologues Isu1p et Isu2p. En effet, une interaction physique a été démontrée entre Nfs1p, Yfh1p et Isu1p/2p en présence de fer (Gerber 2003, Ramazzotti 2004) (voir II.3.6). Au cours de cette étape, la réduction du soufre est nécessaire et probablement réalisée par une chaîne de transport d'électrons comprenant Arh1p (adrénodoxine réductase), Yah1p (ferredoxine) et du NADH. La participation de protéines « chaperonnes » Ssq1p, Jac1p (toutes deux de la famille hsp70), et Mge1p est ensuite essentielle. Leur rôle exact n'est pas connu mais est probablement lié à l'association et la dissociation des protéines Isu, Nfs1p et Yfh1p ainsi qu'à l'incorporation du noyau Fe-S dans l'apoprotéine. Jac1p faciliterait l'interaction de Ssq1p et Isu1p, activant ainsi son activité ATPase. La fonction d'autres protéines, comme Isa1p, Isa2p et Nfulp (également homologues des opérons *isc* et *nif* de bactéries), n'est pas encore déterminée et leur absence n'affecte pas la viabilité de la levure. Plus récemment, une implication de Grx5p, une glutarédoxine, a été démontrée mais semble intervenir après l'assemblage sur Isu1p. La plupart de ces protéines mitochondriales sont nécessaires à l'activité des protéines à noyau Fe-S mitochondriales et cytosoliques. Trois protéines ont un rôle tout particulier dans la biosynthèse des protéines Fe-S cytosoliques : Atm1p, Cfd1p et Nar1p. En effet, les levures délétées pour ATM1 présentent une auxotrophie sur leucine due à la perte d'un noyau Fe-S dans l'enzyme cytosolique du métabolisme de la leucine (Leu1p) (Kispal 1999) et l'absence de Cfd1p ou Nar1p conduit à une activité diminuée de Leu1p, Rli1p et de l'aconitase, trois protéines cytosoliques à noyau Fe-S (Roy 2003, Balk and Lill 2004). L'hypothèse actuelle est que Atm1p serait l'exportateur du noyau Fe-S puis Cfd1p et Nar1p faciliteraient son incorporation dans l'apoprotéine cytosolique.

b) L'hème

Au même titre que les noyaux Fe-S, l'hème est un cofacteur essentiel à un grand nombre de réactions comme la liaison de l'oxygène (hémoglobine), le métabolisme de l'oxygène (oxydases, peroxydases, catalases, hydroxylases) et le transfert des électrons (cytochromes). Quatre types d'hèmes existent chez les eucaryotes : le protohème, les hèmes a,

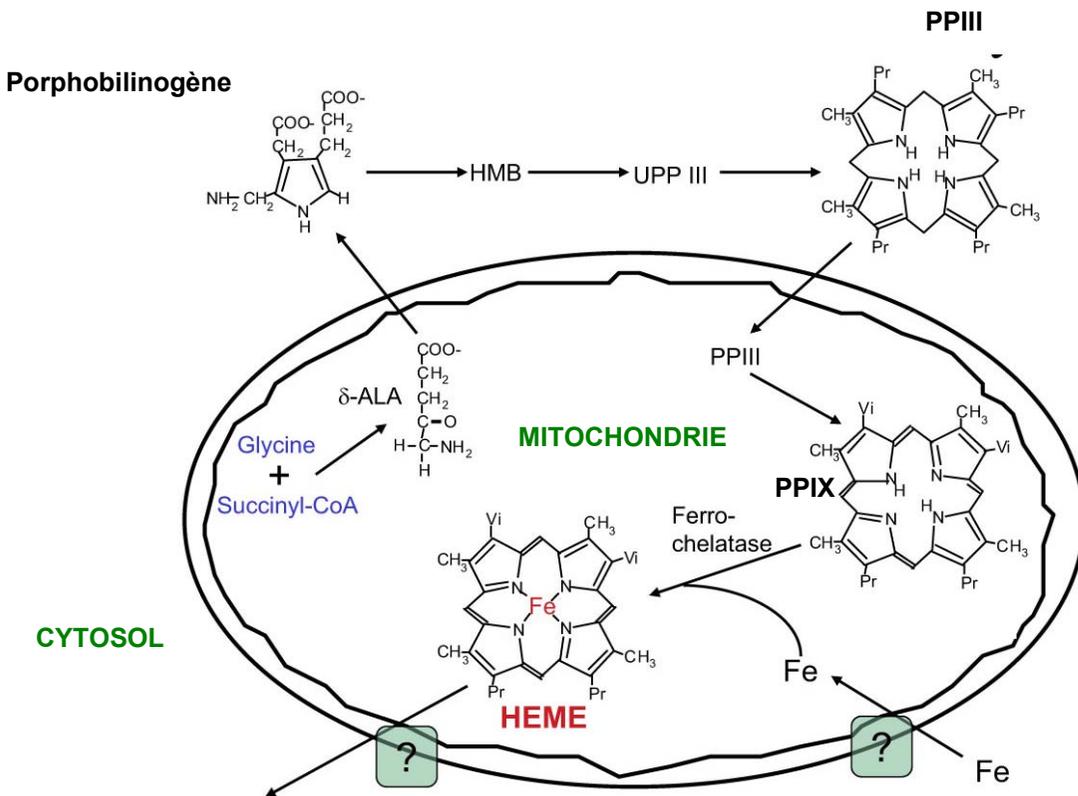


Figure 17 : Etapes de la biosynthèse de l'hème

La biosynthèse de l'hème se produit dans le cytosol et dans la mitochondrie. Les premières étapes ont lieu dans la mitochondrie. Le δ -aminolévulinate (δ -ALA) est ensuite exporté dans le cytosol, il est successivement transformé en porphobilinogène, hydroxyméthylbilane (HMB), uroporphyrinogène III (UPP III) puis en coproporphyrinogène III (PPIII) avant de retourner dans la mitochondrie. La dernière molécule avant l'incorporation de fer est la protoporphyrine IX. Enfin, le fer est incorporé par la ferrochelatase pour former l'hème. La protéine qui apporte le fer à la ferrochelatase n'est pas connue de même que le transporteur permettant l'export de l'hème.

(D'après A. Dancis, 2003 Second Friedreich's Ataxia Research Alliance International Conference)

b et c. Le protohème constitue le réservoir d'hème libre, non associé aux protéines et est le précurseur de synthèse des trois autres types d'hèmes. Les hèmes b et c sont très similaires au protohème mais sont associés à une protéine. L'hème a est modifié par ajout d'un groupe formyl et farnésylation. L'hème c se retrouve dans le cytochrome c et le cytochrome c1 du complexe III de la chaîne respiratoire, et dans les NO-synthétases. L'hème b est présent dans la catalase, les cytochromes P450, l'hémoglobine et les complexes II et III. Deux hèmes a (a et a3) sont présents dans le complexe IV (cytochrome c oxydase). La chaîne de transport des électrons compte donc huit molécules de trois types différents d'hème.

La synthèse de l'hème comprend huit étapes partagées entre le cytosol et la mitochondrie, et comme pour les noyaux Fe-S, l'incorporation de fer se fait dans la mitochondrie (Fig.17). La première étape est la condensation du succinyl-coenzyme A avec la glycine pour donner l'acide δ -aminolévulinique. Cette réaction est catalysée par une synthétase (acide aminolévulinique synthétase : ALAS) nécessitant comme cofacteur, un pyridoxal-phosphate. L'acide δ -aminolévulinique passe alors dans le cytosol et subit plusieurs réactions pour aboutir à une coproporphyrine qui repasse dans la mitochondrie où elle est oxydée en protoporphyrine IX (PPIX). Les transporteurs permettant ces passages sont encore inconnus. La dernière étape est l'assimilation d'un atome de fer dont l'origine n'est pas connue, et est catalysée par la ferrochelatase située dans la membrane interne de la mitochondrie. Des données récentes suggèrent que la frataxine apporterait le fer à la ferrochelatase (voir II.3.6) (Yoon and Cowan 2004).

Les voies de biosynthèse de l'hème et des noyaux Fe-S présentent des connexions importantes (Atamna 2002). Dans la levure, l'adrénodoxine réductase (Arh1p) participe à la maturation de l'hème et des noyaux Fe-S, en tant qu'agent réducteur, et le coenzyme pyridoxal phosphate (vitamine B6) est nécessaire à la formation de PPIX ainsi qu'au relargage du soufre de la cystéine. Il est également intéressant de noter que chez les mammifères, la ferrochelatase contient aussi un noyau Fe-S, essentiel à son activité.

2.3) Le stress oxydatif et les mécanismes de régulation

a) Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules toxiques, hautement réactives par la présence d'un ou plusieurs électrons célibataires sur l'orbitale atomique externe d'un ou plusieurs atomes (Finkel and Holbrook 2000, Dröge 2002). Les principaux types de radicaux libres

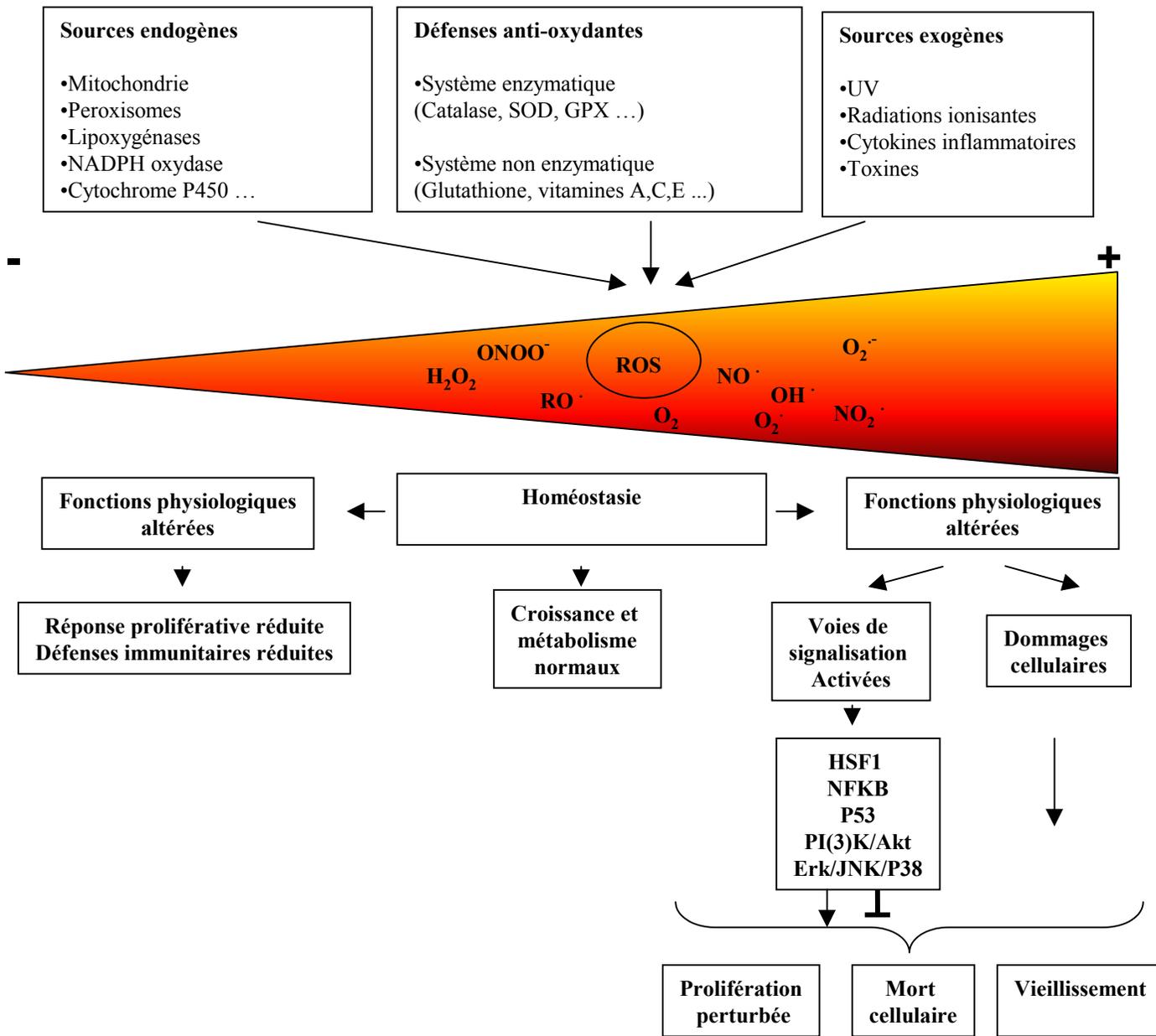


Figure 18 : Sources du stress oxydatif

Les espèces oxydantes proviennent du métabolisme intracellulaire, enzymatique ou d'agents exogènes. Les ROS produits par les NADPH oxydases des macrophages et neutrophiles constituent la première ligne de défense contre des agents pathogènes. Le taux de ROS produit par les NAD(P)H oxydases situées dans d'autres cellules (cardiomyocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, du muscle lisse et de la thyroïde) est de 2/3 inférieur. La 5-lipoxygénase est une source de ROS dans les lymphocytes par l'oxydation des lipides poly-insaturés. Les enzymes cytochrome P450 sont impliquées dans la détoxification des toxines. Un équilibre physiologique est maintenu par l'intervention de défenses anti-oxydantes sophistiquées. Une perturbation de cet équilibre dans un sens ou un autre conduit à des lésions. Les dommages cellulaires comprennent des lésions au niveau des protéines, lipides, ADN. De plus, les ROS peuvent activer des voies de signalisation sensibles au stress protectrices ou entraînant des dommages. HSF1 (« heat shock transcription factor 1 »), NFKB et P53 sont eux-mêmes des facteurs de transcription et les voies PI3K/Akt et MAP Kinases régulent des facteurs de transcription par phosphorylation. (SOD : superoxyde dismutase, GPX : glutathione peroxydase, ROS : « reactive oxygen species ») (D'après Finkel and Holbrook 2000)

comprennent des espèces actives dérivées de l'oxygène (espèces réactives oxygénées, « reactive oxygen species », ROS) ou de l'azote (espèces réactives azotées, « reactive nitrogen species », RNS), produites dans la cellule ou provenant de sources exogènes (Fig.18).

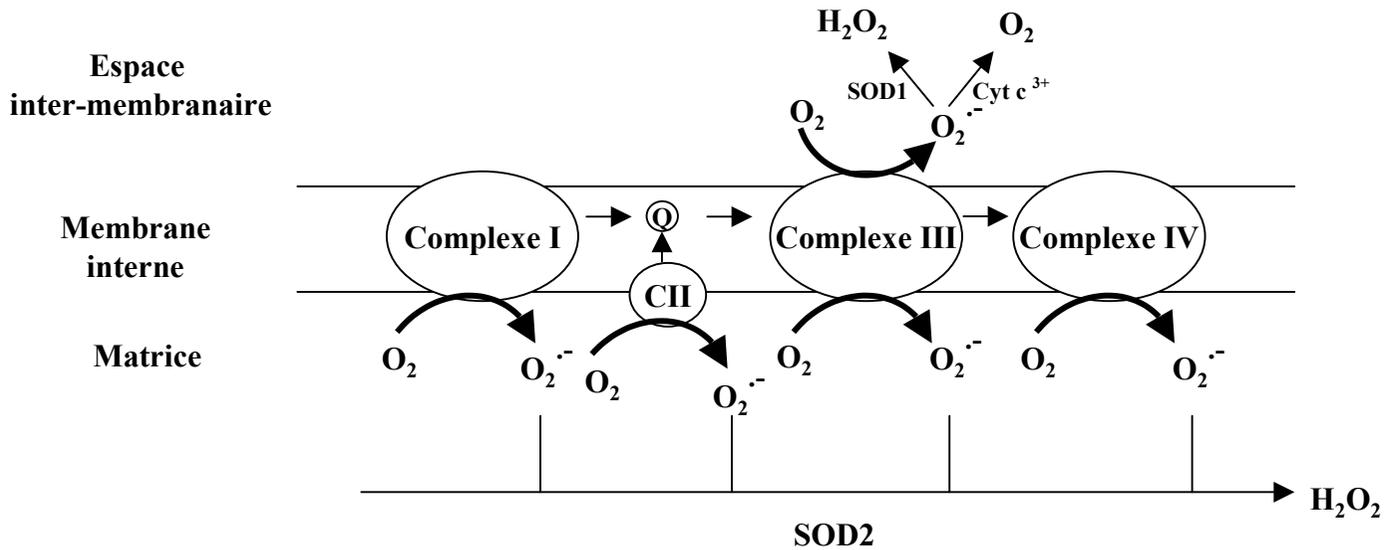
Les anions superoxydes (O_2^-) issus de l'oxydation de l'oxygène par la perte d'un électron, correspondent aux précurseurs de la plupart des radicaux libres et sont les médiateurs des réactions oxydatives en chaîne. La dismutation des superoxydes conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut être complètement réduit en eau (H_2O) ou réduit partiellement pour former les radicaux hydroxyls (OH \cdot) (réaction catalysée par les métaux de transition, voir II.2.1). Ces derniers font partie des radicaux les plus oxydants connus et sont donc extrêmement toxiques. Par ailleurs, O_2^- peut aussi réagir avec d'autres radicaux comme l'oxyde nitrique NO \cdot , dans une réaction contrôlée par le taux de diffusion des deux espèces radicalaires, menant à la synthèse de peroxydinitrite, un autre oxydant très puissant.

La plus grande partie des ROS est produite dans la mitochondrie (Fig.19). On estime que 1 à 2 % des molécules d'oxygène consommées par la chaîne respiratoire sont converties en O_2^- . De plus, les voies de biosynthèse des noyaux Fe-S et de l'hème impliquent un haut niveau de fer labile réduit pouvant participer à la production de stress oxydatif. Les radicaux superoxydes proviennent essentiellement des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire avec des variations selon l'état métabolique et les tissus (Turrens 2003). Le complexe III est à l'origine de la plus grande partie des O_2^- (par le cycle Q, Fig. 19) dans le cœur et les poumons, alors que le complexe I semble être la source primaire de production dans le cerveau.

b) Le stress oxydatif

Pour faire face à ces radicaux libres, plusieurs lignes de défense existent dans la cellule. L'équilibre entre la production de radicaux libres et les défenses anti-oxydantes définit le degré de stress oxydatif. De ce stress résultent des modifications de l'ADN, des protéines et des lipides. La principale modification des protéines est la carbonylation réalisée par l'oxydation directe de certains acides aminés (essentiellement Pro, Arg, Lys et Thr) par les ROS ou par clivage oxydatif par exemple (Dalle-Donne 2003). Au niveau de l'ADN, les quatre bases sont essentiellement soumises à l'hydroxylation et des marqueurs de stress oxydatif courant comprennent la 8-hydroxy-2-déoxyguanosine ou la 8-hydroxyguanine.

a



b

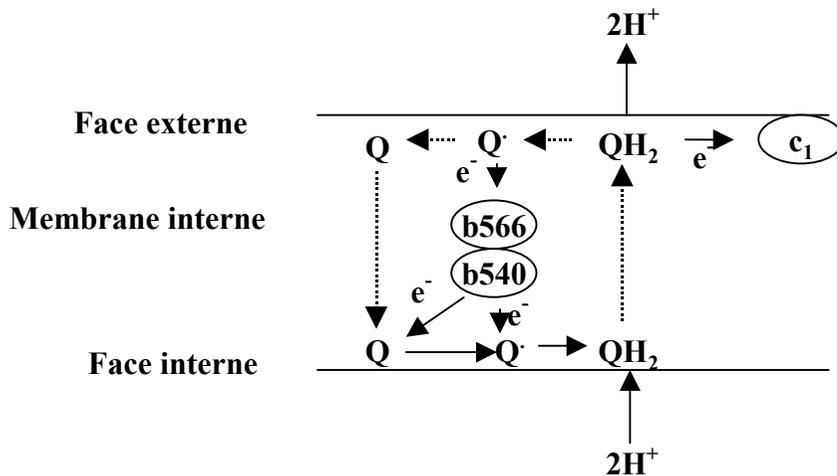


Figure 19 : Origine mitochondriale des superoxydes

a. La mitochondrie est la source principale de superoxydes dans la plupart des tissus.

Ces espèces peuvent réduire le cytochrome c dans l'espace inter-membranaire ou être converties en H_2O_2 et O_2 dans la matrice et dans cet espace. Si les superoxydes produits dans la matrice sont éliminés dans ce compartiment, ceux formés dans l'espace inter-membranaire peuvent être transportés vers le cytoplasme par des canaux anioniques voltage-dépendants.

b. La plupart des superoxydes sont formés au niveau du complexe III lors de l'auto-oxydation de l'ubisemiquinone des deux côtés de la membrane interne, par le cycle Q. L'ubiquinone (Q) est réduite par les complexes I, II ou par des électrons transférés du cytochrome b (cyt b) vers la face interne de la membrane produisant l'ubiquinol QH_2 . Ainsi, l'ubiquinol entièrement réduit du côté interne migre du côté externe, portant deux protons pour la phosphorylation de l'ADP. Une fois du côté externe, un électron est transféré au cytochrome c_1 , formant ainsi un radical Q. Le deuxième électrons réduit le cytochrome b. Des électrons peuvent donc s'échapper et produire des superoxydes par action avec l'oxygène. De plus, en conditions normales, la réduction du cyt b n'est pas possible à moins de transférer un électron à l'oxygène, l'oxydant nécessaire à la réduction de ce cytochrome.

(D'après Turrens 2003)

L'oxygène moléculaire ou singulet réagit aussi avec la guanine pour former un autre dérivé oxydé, la 8-oxo-7,8-dihydroguanine. Les lipides insaturés sont particulièrement sensibles et la peroxydation lipidique résulte de l'attaque d'un radical sur une double liaison des acides gras formant des radicaux peroxylipidiques pouvant initier des réactions en chaîne. Ces réactions entraînent la formation de HNE (4-hydroxy-2,3-nonenal), d'acroléine ou de malondialdéhyde (MDA) qui peuvent induire de graves troubles du métabolisme nucléotidique, protéique et lipidique et conduisent le plus souvent à une dégradation massive des composés oxydés.

Trois mécanismes cellulaires de détoxification sont présents dans la cellule et agissent en continu ou bien en réponse à une attaque ponctuelle.

La prévention à plein temps est assurée par des enzymes DT-diaphorase, des ferroxidases ainsi que des protéines chélatrices du fer (transferrine, hémosidérine, ferritine) et du cuivre (albumine, céruloplasmine). Ces enzymes préviennent la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (Fe^{2+} , Cu^+) ou exogènes (substances organiques de type quinone) susceptibles de les générer.

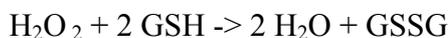
La détoxification active (présente à un niveau basal) se produit suite à l'induction d'un stress oxydatif et implique des enzymes comme les superoxyde dismutases (SOD), la catalase, et les enzymes à activité glutathion-peroxydase (GPX) qui transforment l'anion superoxyde (O_2^-) et les peroxydes formés en excès en produits non toxiques. La disponibilité du glutathion sous forme réduite étant primordiale pour la réduction des peroxydes par les enzymes à activité GPX, les molécules de glutathion disulphide issus de l'activité de ces dernières sont réduits par la GPX grâce au NADPH. La transformation du NADP^+ formé en NADPH se fait par la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Chez les mammifères, la majorité des anions superoxydes est transformée en peroxydes d'hydrogène par les SOD à cuivre et zinc (CuZnSOD ou SOD1) ou à manganèse (MnSOD ou SOD2) selon leur localisation cytosolique ou mitochondriale respectivement et suivant la réaction : $2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$. C'est le cuivre dans le premier cas et le manganèse, dans le second, qui sont impliqués dans la catalyse. Récemment, une localisation mitochondriale de la SOD1 a également été démontrée. Le milieu extracellulaire est pourvu d'une superoxyde-dismutase de forme CuZn (SOD3).

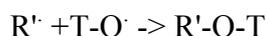
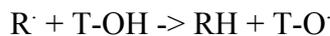
La catalase est une peroxydase hémique qui se trouve principalement dans les peroxysomes des hématies, des hépatocytes et des cellules rénales, ainsi que dans les

microperoxysomes des autres tissus. Le substrat oxydant de cette enzyme est le peroxyde d'hydrogène selon la réaction : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.

L'activité GPX permet l'élimination des peroxydes d'hydrogène et des peroxydes organiques présents dans le cytosol ou dans les mitochondries des cellules, en oxydant le glutathion (GSH) en bisulfure (GSSG). Deux types d'enzymes ont cette activité : la glutathion-peroxydase sélénium-dépendante (Se-GPX) et les glutathion-S-transférases (GST). Ces dernières ne dépendent pas du sélénium, sont nécessaires pour la détoxification des xénobiotiques et ne transforment que les hydroperoxydes organiques. La Se-GPX existe sous une forme hydrosoluble (dans le cytosol et matrice mitochondriale) et sous une forme lipophile (dans les membranes mitochondriales, nucléaires et du réticulum endoplasmiques) avec une sélénio-cystéine (site actif) au centre de la catalyse :



La détoxification passive constitue la dernière ligne de défense et inclut l' α -tocophérol, le β -carotène et l'acide ascorbique. Elle permet la réduction des radicaux libres oxygénés qui ont pu passer à travers les deux premières lignes de défense. L' α -tocophérol, aussi appelé vitamine E, est une molécule liposoluble qui se localise surtout dans la membrane externe des mitochondries et dans celle du réticulum endoplasmique. Elle est présente dans tous les organes, à l'exception du cerveau. Son activité enzymatique est la plus forte dans le foie, le coeur, les reins, les poumons, la rate, les muscles squelettiques et les tissus adipeux. Une molécule d' α -tocophérol (T-OH) est capable d'éliminer deux molécules de radicaux libres de la façon suivante :



Son activité antioxydante comprend entre autres i) la protonation des radicaux peroxydes et alcoxydes des acides gras membranaires, permettant ainsi la terminaison du mécanisme de peroxydation des lipides ; (ii) la réduction des radicaux libres carbonyles, thiyles et oxydes d'acides aminés, préservant ainsi la structure des protéines membranaires ; (iii) la réduction des radicaux libres des semi-quinones de xénobiotiques se trouvant à proximité de la membrane ou qui s'y sont insérés.

L'acide ascorbique (ou vitamine C) est une molécule hydrosoluble ayant à la fois un rôle pro-oxydant et antioxydant. Son activité antioxydante est comparable à celle de l' α -tocophérol dans les compartiments hydrophiles de la cellule. L'acide ascorbique est capable

de réduire l'anion superoxyde ainsi que les radicaux hydroxyles, perhydroxyles et peroxydes. C'est le principal antioxydant de la troisième ligne de défense dans le cerveau, où l' α -tocophérol est absent. Dans les autres tissus, il soutient l'activité de ce dernier en réduisant le radical α -tocophéryle en α -tocophérol ; c'est aussi le réducteur privilégié du radical cystéinyloxy du glutathion. Dans la ferritine, il permet la conversion de l'ion ferrique en ion ferreux, qui est la forme pro-oxydante du fer dans les conditions physiologiques. L'acide *L*-ascorbique provoque également la libération, et par conséquent, la biodisposition dans le plasma du fer et du cuivre retenus dans les protéines sanguines de stockage (transferrine) sous une forme inactive.

3) La fonction de la frataxine

3.1) La première hypothèse, Yfh1p et l'homéostasie mitochondriale du fer

Le premier modèle de l'absence de frataxine chez les eucaryotes a été réalisé chez la levure qui a joué un rôle très important au travers de différents types de modèles i) par délétion totale de YFH1 (Δ Yfh1) (Babcock 1997, Foury 1997, Wilson 1997, Karthikeyan 2002, Lesuisse 2003, Desmyter 2004, Campanella 2004) ; ii) par expression de formes humaines mutées sur un fond KO (Wilson 1997, Cavadini 2000, Karthikeyan 2002) ; iii) par mutagenèse dirigée de YFH1 (Ramazzotti 2004, Aloria 2004) ; iv) par induction/répression sous le contrôle de promoteurs inductibles par la présence de galactose (GAL-Yfh1) (Mülhenhoff 2002, Lesuisse 2003).

La frataxine humaine et son homologue de levure présentent en plus d'une grande homologie de séquence, une homologie de fonction illustrée par la complémentation de formes humaines dans des souches de levure invalidées pour le gène YFH1, homologue de la frataxine humaine (« Yeast Frataxin Homologue1 ») (Wilson 1997, Cavadini 2000, Karthikeyan 2002). Le gène YFH1 ayant été initialement identifié et cloné lors d'un test de complémentation génétique visant à supprimer les effets délétères d'un mutant ne pouvant se développer sur un milieu pauvre en fer (Askwith 1994), un rôle de YFH1 dans l'homéostasie du fer a été suspecté. Des études complémentaires ont par la suite montré que sur milieu carboné fermentable (glucose), l'invalidation de YFH1 entraîne une accumulation intramitochondriale de fer dix fois supérieure à la normale (Babcock 1997, Wilson 1997, Koutnikova 1997, Foury 1997). De plus, et ce malgré cette surcharge intramitochondriale de

fer, les levures déficientes pour le gène YFH1 ($\Delta Yfh1$) maintiennent l'import de fer suggérant une « anémie » cytosolique (Knight 1998). Cette « anémie » cytosolique se traduit notamment par une surexpression de 10 à 50 fois des ARNm de FET3 et FTR1 dans la souche $\Delta Yfh1$ (Babcock 1997). Une étude complète du transcriptome de $\Delta Yfh1$ a démontré plus précisément une induction de 70 gènes, dont la plupart sont des gènes régulés par le facteur de transcription sensible au fer Aft1p (Foury 2001). Cette dernière étude a aussi permis de démontrer une mobilisation du fer à partir de tous les compartiments de la levure (transporteurs des vacuoles, du réticulum endoplasmique, de la mitochondrie ...) (Foury 2001). Un rôle plus précis de la frataxine dans la participation de l'export du fer mitochondrial vers le cytosol a ensuite été proposé par la démonstration d'une réversibilité de l'accumulation mitochondriale de fer associée à une diminution totale de FET3 par Northern Blot, lors de l'induction de l'expression de Yfh1p dans une souche $\Delta Yfh1$ (Radisky 1999).

Les levures $\Delta Yfh1$ présentent en plus de l'accumulation de fer, des déficiences multiples avec i) une sensibilité accrue aux agents oxydants comme le peroxyde d'hydrogène, le fer ou le cuivre (Babcock 1997, Foury 1997), ii) un phénotype « petite » (colonies de petite taille) caractéristique d'un déficit de la respiration cellulaire (Koutnikova 1997, Wilson 1997, Babcock 1997, Foury 1997), iii) des dommages au niveau de l'ADN mitochondrial et nucléaire (Karthikeyan 2002 et 2003). Le déficit respiratoire a été évalué à 10 % de celui des souches sauvages et les mesures d'activités enzymatiques ont montré une déficience de la NADH cytochrome c réductase (complexe I et III), la cytochrome c oxydase (complexe IV) et de l'ATPase (complexe V) (Foury 1997), puis dans deux autres souches $\Delta Yfh1$, les complexes II, III, IV ainsi que les aconitases cytosolique et mitochondriale (Rötig 1997). Cependant, il est difficile de définir si ces déficiences résultent de l'absence de frataxine ou si elles sont secondaires à la forte accumulation mitochondriale de fer. En effet, des gènes limitant la concentration mitochondriale en fer, mis en évidence lors de cribles de complémentation, améliorent le phénotype « petite » (Chen 2001, Chen 2002, Kucej 2003). De même, la chélation directe du fer dans la mitochondrie (Desmyter 2004, Campanella 2004) et la présence d'anti-oxydants (Santos 2004) restaurent une partie du phénotype en améliorant la croissance et en diminuant les dommages liés au stress oxydatif.

3.2) Le tournant, défaut de l'activité des protéines à noyau Fe-S dans des biopsies cardiaques de patients

De nouveaux indices concernant la fonction de la frataxine sont apportés par des mesures réalisées sur des extraits de cœur des patients atteints par l'AF. A. Rötig et P. Rustin mesurent en effet, pour la première fois en 1997, dans des biopsies cardiaques de deux patients atteints par l'AF, une déficience de l'activité des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire ainsi que des aconitases (activités additionnées des aconitases cytosolique et mitochondriale) contenant toutes des noyaux Fe-S (Rötig 1997). Cette déficience enzymatique particulière n'était associée à aucune autre cardiomyopathie mitochondriale connue. Ces résultats ont été confirmés sur des autopsies cardiaques (Bradley 2000). Au contraire, les tissus non atteints ne présentent pas de déficience à l'exception de l'aconitase dans le muscle squelettique (Rötig 1997, Bradley 2000, Chantrel-Groussard 2001). Parmi les tissus nerveux étudiés, seul le cervelet révèle une diminution significative de l'activité du complexe I et les ganglions rachidiens, un défaut des aconitases, mais ces dernières mesures ont été réalisées sur autopsies et sur un nombre très restreint de tissus (n=2 ou 3) (Bradley 2000).

Ces déficiences enzymatiques sont en accord avec un déficit énergétique mitochondrial mesuré chez les patients, par les techniques de spectrométrie par résonance magnétique (SRM) *in vivo*. De façon non invasive et non traumatique, la concentration de certains composés phosphorés comme la phosphocréatine et l'ATP, révélateurs du métabolisme énergétique cellulaire sont obtenus par des études de SRM en phosphore 31. Un retard dans la re-synthèse de phosphocréatine et d'ATP mitochondrial après exercice, et un ratio phosphocréatine/ATP réduit ont été mesurés dans le muscle (Lodi 1999, Vorgerd 2000) et le cœur (patients avec ou sans cardiomyopathie hypertrophique) (Lodi 2001), respectivement. Plus récemment, par spectroscopie proche infrarouge (méthode optique permettant de mesurer les échanges d'oxygène dans les tissus), une durée plus longue de retour à un niveau d'oxygène normal après effort dans le muscle gastrocnemius des patients relié à un défaut de la phosphorylation oxydative mitochondriale, a été observé (Lynch 2002).

3.3) Une « nouvelle génération » de levure, Yfh1p et la biosynthèse des noyaux Fe-S

Les données apportées par les mesures des activités enzymatiques réalisées dans les biopsies cardiaques limitent l'importance du fer et conduisent certains « levuristes » à abandonner le milieu glucose sur lequel les défauts des levures résultaient probablement d'un effet combiné de la répression de la respiration et de la toxicité liée à l'accumulation de fer, au profit de milieux raffinose ou glycérol. Ces milieux parfois combinés à des chélateurs de fer, offrent d'excellents substrats carbonés de respiration et une concentration plus faible en fer (Foury 1999). Dans ces conditions, la concentration mitochondriale de fer dans la souche $\Delta Yfh1$ retrouve une valeur normale associée à la restauration de l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire (Cytochrome oxydase, NADH cytochrome c réductase, ATPase), hormis celle des aconitases (Foury 1999). L'absence de frataxine n'induit donc pas en soi la diminution d'activité de la chaîne respiratoire, résultat de l'accumulation toxique de fer, par contre la diminution des aconitases est indépendante de l'accumulation massive de fer. Il est intéressant de noter que chez les patients, l'activité des aconitases est la plus diminuée. De plus, quand sur milieu glycérol, une carence supplémentaire en fer est induite par l'invalidation de deux gènes impliqués dans l'import mitochondrial de fer (MRS3 et MRS4), la diminution de l'activité de l'aconitase est plus prononcée dans la souche $\Delta Yfh1$ et une diminution de la cytochrome oxydase est observée (Foury 2002). Ces données démontrent donc aussi que l'absence de yfh1p entraîne une demande en fer plus importante pour la synthèse des noyaux Fe-S et les cytochromes, suggérant un rôle de yfh1p dans la distribution du fer aux noyaux Fe-S et à l'hème.

3.4) Les modèles murins, déroulement des évènements élucidé

Ce sont finalement les études réalisées dans les modèles murins conditionnels qui ont permis de démontrer que l'absence de frataxine conduisait de façon primaire à un défaut de l'activité des protéines à noyau Fe-S suivi tardivement par une accumulation de fer.

En effet, le premier modèle souris généré correspondant à une inactivation totale et constitutionnelle du gène de la frataxine, est létal très tôt pendant le développement embryonnaire sans détection d'une accumulation en fer par des colorations histologiques et une étude de microscopie électronique sur les embryons (Cossée 2000). La dégénérescence embryonnaire de ce KO se produit à partir de 6,5 jours de développement, conduisant à une

résorption complète de l'embryon à E8,5. Le stock de mitochondries maternelles contenant un niveau normal de frataxine, permet certainement l'implantation de l'embryon, puis la mort cellulaire principalement nécrotique, se produit au moment de la gastrulation, phase caractérisée par une haute demande en énergie pour la mise en place des feuilletts embryonnaires. Ces données sous-entendent donc qu'en absence de frataxine, la létalité des embryons est dû à un défaut énergétique indépendant de toute accumulation de fer.

Pour pallier à la létalité embryonnaire de ce premier modèle, de nouveaux modèles murins basés sur la technique d'inactivation conditionnelle de manière tissu-spécifique ont été générés. La caractérisation de ces modèles a constitué la partie principale de mon travail de thèse. Brièvement, un de ces modèles murins présente une délétion spécifique de la frataxine dans le muscle cardiaque et squelettique reproduisant la pathologie cardiaque de l'AF et les déficiences biochimiques associées (Puccio 2001). L'étude de l'évolution de la concentration mitochondriale de fer et de l'activité des protéines à noyau Fe-S dans les tissus cardiaques murins à différents âges, a démontré une diminution primaire de l'activité des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire et des aconitases, suivie par une accumulation mitochondriale de fer secondaire en fin de pathologie (Seznec 2004b).

3.5) Yfh1p est remplacée dans la voie de biosynthèse des noyaux Fe-S

La fonction précise de Yfh1p dans la biosynthèse des noyaux Fe-S est finalement déterminée en grande partie par le groupe de R. Lill et de G. Kispal, spécialistes de la biosynthèse des noyaux Fe-S chez la levure, qui commencent alors à s'intéresser à cette protéine. En effet, plusieurs souches de levure mutantes présentent un phénotype similaire à la souche $\Delta Yfh1$. Ces souches mutantes invalidées pour les gènes de la voie de biosynthèse des noyaux Fe-S avec des déficits en Nfs1p (Li 1999a, Kispal 1999), Arh1p (Li 2001), Ssq1p (Knight 1998), Yah1p (Lange 2000) et Atm1p (Kispal 1997 et 1999), présentent toutes une importante accumulation intramitochondriale de fer. Les mutants $\Delta Nfs1$ ont également un défaut de l'activité de l'aconitase et un défaut plus modéré de sdh2p (succinate déshydrogénase, protéine à noyau Fe-S du complexe II de la chaîne respiratoire) (Strain 1998, Kispal 1999). La souche $\Delta Atm1p$ présente un défaut de la biosynthèse des cytochromes, des niveaux de glutathion élevés et une respiration nulle. $\Delta Jac1p$ et $\Delta Ssq1$ n'accumulent pas de fer mais l'activité de Sdh2p est très diminuée (Lutz 2001).

La première preuve directe d'un rôle de Yfh1p dans la biosynthèse des noyaux Fe-S est apportée en 2001, par la mesure de l'incorporation *in vivo* de noyaux Fe-S marqués au ^{35}S dans la ferredoxine Yah1p. En effet, la souche ΔYfh1 , en plus d'une diminution de l'activité enzymatique des protéines à noyau Fe-S, présente aussi un défaut d'incorporation du noyau Fe-S dans Yah1p (Lutz 2001). Une étude plus détaillée est ensuite réalisée en utilisant un mutant Gal-YFH1 permettant d'induire l'absence de Yfh1p, en présence de galactose dans le milieu, limitant ainsi les phénotypes secondaires ou de suppression (Mühlenhoff 2002a). Dans ce système, la diminution de Yfh1p entraîne rapidement une déficience en aconitase et *sdh2p* sans sensibilité accrue de la souche au stress oxydatif (H_2O_2). Une technique puissante a ensuite permis d'étudier la maturation d'une apoprotéine (en présence d'un extrait de mitochondries isolées, de $^{55}\text{Fe}(\text{II})$, d'ATP, de cystéine et de NADH), démontrant un défaut d'incorporation de ^{55}Fe dans la biotine synthase (enzyme à noyau Fe-S mitochondriale) et dans *Leu1p* (enzyme à noyau Fe-S cytosolique) (Mühlenhoff 2002b, 2003). Yfh1p est donc nécessaire à l'assemblage des noyaux Fe-S des protéines mitochondriales et cytosoliques de levure. Une synthèse résiduelle de noyau Fe-S est cependant démontrée dans une souche ΔYfh1 par la détection d'un niveau résiduel de l'holoprotéine ferredoxine, précisant que Yfh1p est nécessaire mais non essentielle à cette voie de biosynthèse (Duby 2002).

Enfin, un lien entre YFH1 et ISU1/2 suggéré par une étude du transcriptome sur ΔYfh1 (Foury 2001) est confirmée en 2003 (Gerber 2003). En effet, une recherche d'interacteurs parmi les acteurs de la biosynthèse des noyaux Fe-S démontre une liaison de Yfh1p au complexe d'assemblage des noyaux Fe-S, constitué de la protéine *Isu1p* et de la cystéine désulfurase *Nfs1p* (GST pull-down et coimmunoprécipitations). La liaison de Yfh1p facilitée en présence de fer et se faisant sur la forme apo et holo de *Isu1p* suggère un rôle de Yfh1p dans l'apport du fer pour la construction du noyau Fe-S avant son transfert sur la protéine cible. De plus, l'absence de Yfh1p diminue de 4 fois, l'incorporation de ^{55}Fe dans *Isu1p*. En parallèle, un crible réalisé pour provoquer la létalité d'une souche *Yfh1* avec phénotype modéré (mutation dans YFH1) a permis de mettre en évidence un effet létal de mutations dans ISU1 démontrant un rôle clé de l'interaction Yfh1p/*Isu1p* (Ramazotti 2004). Les mutations dans YFH1 et ISU1 agissent en synergie : Yfh1p est essentielle quand les niveaux de *Isu1p* sont bas et inversement. Des expériences de cross-linking sur des mitochondries isolées ont montré une interaction entre les deux protéines prouvée par la présence d'un complexe de taille égale aux deux protéines. Yfh1p participe donc activement à la biosynthèse des noyaux Fe-S par une interaction avec *Isu1p* et *Nfs1p*.

D'autre part, l'interaction observée entre la frataxine et Isu1p chez la levure a été confirmée *in vitro* par la démonstration d'un transfert de fer entre la frataxine humaine et la forme humaine de Isu1p (Yoon and Cowan 2003). Les auteurs rapportent une liaison stable de 6 à 7 atomes de fer par molécule de frataxine.

3.6) Rôle dans la biosynthèse de l'hème

L'hème étant un cofacteur contenant du fer synthétisé dans la mitochondrie et essentiel au même titre que les noyaux Fe-S, un rôle de Yfh1p dans cette voie de biosynthèse a été suspecté donnant lieu à des études contradictoires.

Un des premiers modèles de levure $\Delta Yfh1$ montrait, sur milieu raffinose, une diminution de l'activité de la COX et du contenu en cytochromes a (Foury 1997). Aucune perturbation de l'incorporation du fer ^{55}Fe dans l'hème n'a pourtant été mesurée dans la levure GAL-Yfh1, au contraire d'un défaut évident de l'incorporation de fer dans la biotine synthase (enzyme à noyau Fe-S mitochondriale) et dans Leu1p (enzyme à noyau Fe-S cytosolique) (Mühlenhoff 2002a). Plus récemment, une diminution de la concentration totale en hème et des différents types de cytochromes a été mise en évidence dans une souche $\Delta Yfh1$ sur milieu avec substrat non-fermentable (Lesuisse 2003). D'après les auteurs, l'absence de phénotype de déficience en hème et en cytochromes dans certaines souches $\Delta Yfh1$, est dû à la présence de mutations nucléaires avec un effet suppresseur. Dans ce dernier modèle, le métal contenu dans la PPIX est un atome de zinc remplaçant l'atome de fer et l'expression de la ferrochelatase Hem15p est diminuée au contraire d'autres enzymes de la voie de synthèse de l'hème. Cependant, la transfection de Hem15p n'est pas capable de restaurer le phénotype de $\Delta Yfh1$, ni le contenu en hème et cytochromes. En accord avec l'accumulation de particules ferriques insolubles dans $\Delta Yfh1$, Yfh1p pourrait donc participer à l'incorporation du fer au sein de Hem15p ou à son activation directe (par participation à son repliement tridimensionnel), suggérés par la démonstration de l'interaction *in vitro* de Yfh1p et Hem15p (technique Biacore). Cette hypothèse est pourtant invalidée par une autre étude démontrant que toutes les souches de levure avec inactivation des gènes de la biosynthèse des noyaux Fe-S présentent une diminution du niveau des cytochromes mitochondriaux et de l'activité de la COX (Lange 2004). Cependant, les mutants de composants non essentiels à la machinerie Fe-S (Isa1p et Yfh1p) n'ont une synthèse de l'hème que faiblement affectée. Les souches mutantes pour les composants essentiels présentent un niveau normal de PPIX

suggérant une inhibition dans la dernière étape de la biosynthèse de l'hème réalisée par Hem15p. Par fractionnement des extraits mitochondriaux de ces souches, les auteurs démontrent la présence d'un composé de haut poids moléculaire, supérieur à 10 kDa insensible aux protéases, non identifié à ce jour, semblant donc inhiber l'activité de Hem15p.

Le groupe qui avait confirmé *in vitro* l'interaction entre la frataxine humaine et Isu1p, démontre dans un système *in vitro* équivalent, que la frataxine est également capable de favoriser l'incorporation du fer dans la synthèse de l'hème en coopérant avec la ferrochelatase humaine (Yoon and Cowan 2004). L'interaction frataxine-ferrochelatase semble dépendante de la concentration en fer avec une affinité d'interaction 28 fois supérieure de la frataxine pour la ferrochelatase par comparaison à son affinité d'interaction pour Isu1p. Cette différence d'affinité permettrait d'expliquer en partie pourquoi la déficience en frataxine affecte plus fortement la biosynthèse des noyaux Fe-S.

3.7) Stress oxydatif : cause ou conséquence ?

a) Absence de stress oxydatif dans les tissus atteints des patients

Chez les patients, une accumulation de fer a été démontrée par la coloration histologique de Perl's sur des tissus autopsiés de cœur (soit à un stade pathologie avancé) (Lamarche 1980). Une étude décrit également une accumulation dans la rate et le foie mais très peu de tissus ont été étudiés et la coloration était négative pour certains patients (Bradley 2000). De plus, aucune accumulation de fer n'a été décrite par histologie ou par mesure directe dans le système nerveux (moelle épinière (n=4), ganglions rachidiens (n=1), cervelet (n=3), nerf périphérique (n=2)) et le pancréas, pourtant affectés dans l'AF (Bradley 2000). Un seul article mentionne une accumulation de fer dans le noyau dentelé du cervelet (Waldvogel 1999, 12 patients) suggérée indirectement par une inhomogénéité par résonance échomagnétique, inhomogénéité principalement due au fer en cas d'absence d'hémorragies. Enfin, les niveaux sériques du fer, de la ferritine, de la transferrine et de son récepteur ne sont pas altérés (Wilson 1998 (10 patients), Scarano 2001 (13 patients)).

De plus, malgré les similarités entre l'AF et l'ataxie avec déficience de vitamine E (« Ataxia with isolated vitamine E deficiency » : AVED) causée par des mutations dans la protéine de transfert de l' α -tocophérol, la forme biologiquement active de la vitamine E (Ouahchi 1995), aucune mesure directe d'une présence de stress oxydatif n'a été réalisée dans les tissus atteints des patients. En effet, le niveau de malondialdéhyde (MDA), marqueur de

l'oxydation des lipides, est normal dans le cerveau de patients (MacEvilly 1997) et l'ADN mitochondrial ne subit aucun réarrangement détectable par Southern Blot dans différents tissus étudiés (muscle, cœur, cervelet, ganglions rachidiens) (Bradley 2000). Seules des mesures indirectes dans le sang et les urines démontrent respectivement, une augmentation du MDA (Emond 2000) et de la 8-hydroxy-2'-guanosine, marqueur de l'oxydation de l'ADN (Schulz 2000, 33 patients). Or ces augmentations sont faibles pouvant donc être dues à un phénomène de dégénérescence classique ou à un état général altéré des patients, et d'autres marqueurs comme l'acide dihydrobenzoïque dans le plasma (marqueur d'attaque par les radicaux hydroxyls) se sont révélés inchangés. Par ailleurs, le sang de patients démontre aussi un taux de glutathion total inchangé, mais une diminution du taux de glutathion libre (réduit) associée à une augmentation du glutathion lié (oxydé) aux protéines (hémoglobine) (Piemonte 2001, 14 patients). Une perturbation du métabolisme du glutathion peut entraîner ou résulter de la présence de stress oxydatif car le glutathion libre est le co-substrat de la GPX et des glutathion-transférases ou peut agir directement comme anti-oxydant. Un déséquilibre a déjà été décrit dans les tissus atteints à un stade pré-clinique de la maladie de Parkinson (Sofic 1992), ou dans les lymphoblastes de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Cecchi 1999) mais dans ces maladies neurodégénératives, le niveau total de glutathion est diminué. Là encore, il ne s'agit pas de mesures tissulaires directes et ces déséquilibres peuvent aussi résulter de phénomènes de dégénérescence secondaires. Enfin, une seule étude décrit une augmentation de l'activité de la SOD et la GST sans variation de la GPX dans des cellules érythrocytaires provenant du sang de 14 patients (Tozzi 2002). La GPX qui agit normalement en aval de la SOD n'est pas augmentée, augmentant le ratio SOD/GPX, ratio critique de la détoxification cellulaire (De Haan 1995).

b) Absence de stress oxydatif dans les tissus sans frataxine des différents modèles murins

Aucune trace de stress oxydatif lié à l'oxydation lipidique ou protéique n'a été détectée dans le cœur dans le modèle murin conditionnel cardiaque (Seznec 2003, Seznec 2004c soumis). De plus, même en fin d'évolution de la pathologie, en présence d'une augmentation significative de la concentration mitochondriale de fer et de la présence de nombreux dépôts par coloration histologique, aucune augmentation significative n'a été mesurée.

c) Lignées cellulaires de patients, perturbation du métabolisme des acides aminés soufrés

Les lignées de fibroblastes et lymphoblastes de patients ne présentent pas de phénotype en conditions normales de culture. La concentration mitochondriale de fer n'est pas augmentée (Tan 2001) hormis pour une étude (4 lignées fibroblastiques, Delaticky 1999b) et l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire (complexes II à IV) et du cycle de Krebs (aconitase, isocitrate deshydrogénase, la citrate synthase et la fumarase) sont normales (Rötig 1997, Chantrel-Groussard 2001).

La seule observation indirecte d'un stress oxydatif en conditions basales de culture concerne le glutathion lié aux protéines qui est augmenté dans neuf lignées fibroblastiques, en parallèle d'une diminution de glutathion libre (Pastore 2003), entraînant une apparente normalité du taux de glutathion total (Bradley 2004). Une des protéines glutathionylée est l'actine, entraînant une désorganisation du cytosquelette et expliquant la forme anormale des cellules observée par les auteurs. Le rôle de la glutathionylation sur les cystéines des protéines est décrit depuis peu dans des processus pathologiques et peut modifier la fonction de protéines (pour revue Giustarini 2004). Il semble que H₂O₂ puisse stimuler la formation d'hémoglobine glutathionylée, seule démonstration d'un lien direct entre ce phénomène et la présence de stress oxydatif (Niwa 2000, Murakami 2003). L'augmentation de la glutathionylation de l'actine a également déjà été décrite dans plusieurs modèles cellulaires subissant des conditions variées de stress oxydatif et dans des tissus nerveux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Aksenov 2001).

Cependant, ces données constituent le seul rapport d'un phénotype morphologique des fibroblastes de patients atteints par l'AF soulevant la question de la spécificité de ce phénotype. D'autant plus qu'aucun gène impliqué dans la synthèse du glutathion ou dans la régulation du stress oxydatif n'est induit par analyse transcriptionnelle réalisée sur différents modèles cellulaires (lignées de fibroblastes, lymphoblastes issus de patients et lignée de cellules neuronales humaines avec un niveau diminué de frataxine par ARN interférence (cellules NT2)) (Tan 2003). De façon intéressante, le seul déficit marquant de ces lignées cellulaires concerne le taux diminué d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés soufrés, associé à une diminution de la concentration cellulaire de ces acides aminés. Une diminution du taux d'expression de IscU également mesurée, suggère une altération de la biosynthèse des noyaux Fe-S, en accord avec les données provenant des modèles levure, souris et des études *in vitro*. Une faible interaction entre la frataxine et IscU a

également été observée par immunoprécipitation et expliquerait la diminution d'expression de cette protéine, confirmant ainsi dans des lignées cellulaires de mammifères une interaction observée jusqu'alors uniquement chez la levure.

c) Lignées cellulaires de patients « stressées », défaut d'induction de la SOD2

Afin de provoquer un phénotype dans les lignées cellulaires de patients, certaines équipes ont appliqué des stress d'origines variées : concentrations élevées en fer ou autres agents oxydants et blocage de la chaîne respiratoire à différents niveaux. Les cellules démontrent une sensibilité accrue à H_2O_2 , au paraquat, au fer ferrique ($FeCl_3$), à l'oligomycine et au BSO (l-buthionine-(S,R)-sulfoximine, inhibiteur de la synthèse du glutathion) (Wong 1999, Wong 2000, Chantrel-Groussard 2001, Tan 2001, Jauslin 2002, Bradley 2004) qui entraînent tous une augmentation de la mort cellulaire. En bloquant l'ATPase par l'oligomycine, l'expression des enzymes impliquées dans l'homéostasie du fer est modifiée (Chantrel-Groussard 2001). Au contraire des cellules contrôles dans lesquelles l'oligomycine entraîne un import de fer en réponse normale à une chaîne respiratoire bloquée (pour la biosynthèse de noyaux Fe-S et d'hème), les fibroblastes de patients traités, répondent en diminuant l'import de fer (IRP1 et RTf), et en augmentant son stockage (ferritine H et L). Le blocage de l'ATPase conduit aussi à la production de superoxydes sans augmentation associée de l'activité des SODs (Chantrel-Groussard 2001). Ce défaut d'induction est aussi décrit dans une étude soumettant les fibroblastes de patients à des concentrations de fer, mais dans ce système, les fortes concentrations de fer sont capables d'induire l'expression de la SOD2 (Jiralerspong 2001).

En absence de stress oxydatif, le défaut d'induction de la SOD2 peut être également dû à un défaut de régulation de cette enzyme dont les mécanismes sont peu connus. Il est possible par exemple qu'une protéine impliquée contienne un noyau Fe-S. Il semble cependant que le défaut de réponse de la SOD2 soit obtenu spécifiquement dans certains modèles modèles, suite à l'induction de stress oxydatif particulier. Ce défaut d'induction n'a pas été reproduit dans d'autres modèles cellulaires avec une diminution de frataxine (Santos 2001) et dans les modèles murins conditionnels, point que je discuterai dans la partie résultat.

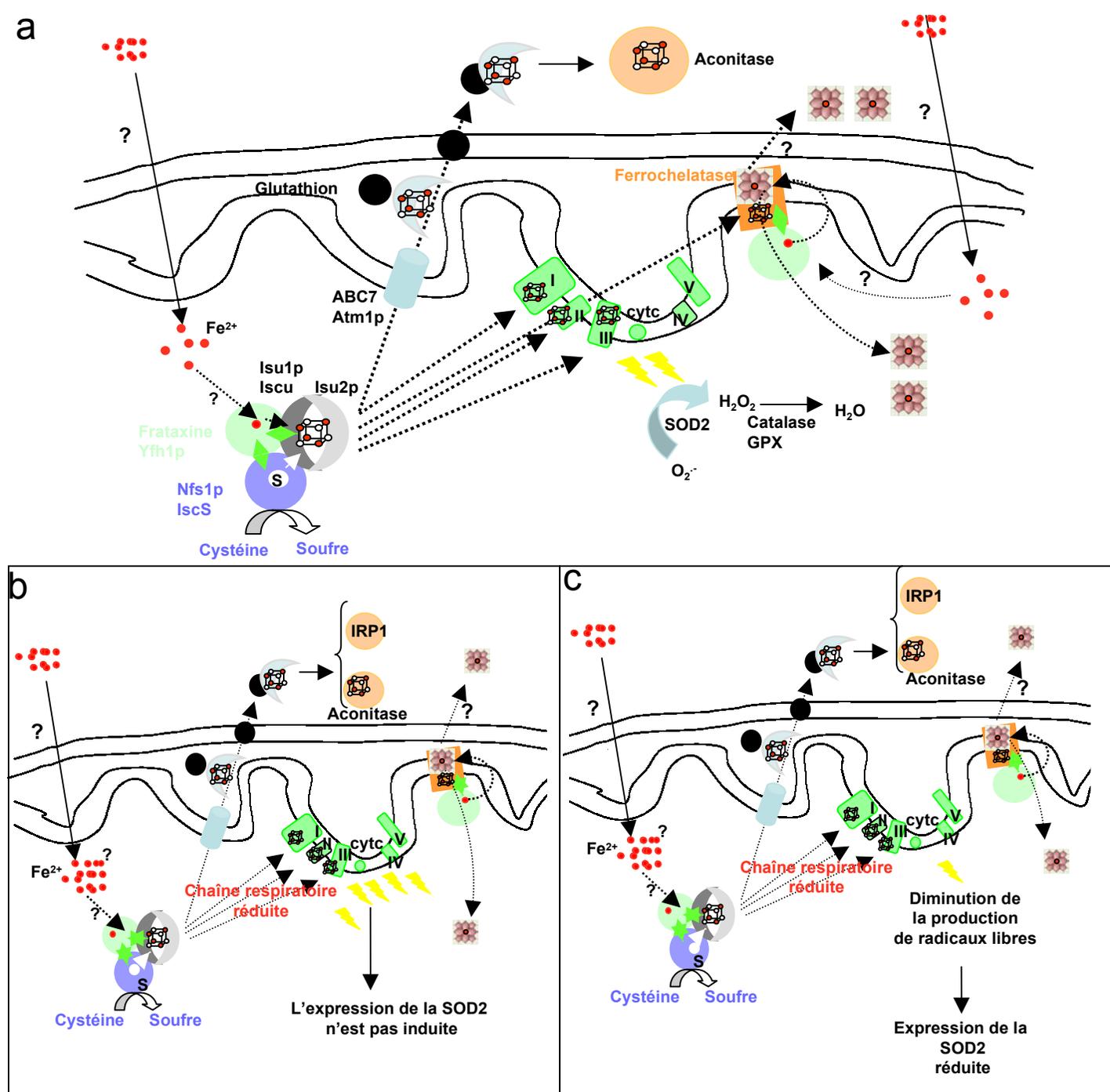


Figure 20 : Schéma récapitulatif

a. La frataxine est impliquée dans la biosynthèse des noyaux Fe-S. Elle interagit avec Isu1p (ou IscU) et Nfs1p (ou IscS). Sa fonction exacte n'est pas définie et un rôle de donneur de fer au noyau Fe-S a été proposé. L'export cytosolique du noyau Fe-S stabilisé se fait par Atm1p (ou ABC7) avec l'intervention proposée du glutathion pour stabiliser ces noyaux et probablement d'autres protéines encore non déterminées. Les mécanismes d'entrée du fer dans la mitochondrie ne sont pas élucidés. Une interaction avec la ferrochelatase a également été démontrée dans certains systèmes. La frataxine apporterait le fer à la ferrochelatase pour l'importation dans la protoporphyrine IX, étape finale de la biosynthèse de l'hème. L'exportateur d'hème n'est pas connu.

b et c. En présence d'un taux résiduel de frataxine ou en absence de frataxine, moins de noyaux Fe-S sont synthétisés entraînant une diminution de l'activité des protéines à noyau Fe-S. Moins d'hème est synthétisé et une partie de l'aconitase cytosolique est sous la forme IRP1. Deux hypothèses sont alors envisageables :

b. la chaîne respiratoire est perturbée entraînant la fuite de plus d'électrons. Une accumulation de stress se produit et comme aucune augmentation de la SOD2 n'a été observée, ce phénomène s'aggrave.

c. la chaîne respiratoire est réduite produisant moins de radicaux libres expliquant la diminution de la SOD2.

4) Conclusions

L'ensemble de ces données suggèrent fortement que la frataxine est étroitement impliquée dans la biosynthèse des noyaux Fe-S. Une étude phylogénétique de la distribution de la frataxine chez 56 organismes différents appuie aussi cette hypothèse. Des orthologues du gène de la frataxine humaine sont retrouvés dans tous les génomes eucaryotiques séquencés et dans les protéobactéries présentant les gènes *hscA* (orthologue bactérien de SSQ1) et *hscB* (orthologue bactérien de JAC1) nécessaires à la biosynthèse du noyau 2Fe-2S de la ferredoxine de protéobactérie (Huynen 2001). Cette co-occurrence suggère fortement la participation des trois protéines correspondantes, à des processus communs.

L'état secondaire de l'accumulation mitochondriale du fer semble aujourd'hui définitivement accepté, conséquence d'une mauvaise incorporation du fer au sein des noyaux Fe-S et de leur déstabilisation. Seule une équipe, dirigée par G. Isaya, maintient l'hypothèse d'une implication primaire de la frataxine dans le stockage du fer, par la formation *in vitro* d'une frataxine multimérique permettant de lier le fer et de le maintenir dans une forme soluble et biodisponible, au sein d'un noyau similaire mais non identique à celui de la ferritine (Nichol 2003). En présence de fer Fe^{2+} et d'oxygène, la frataxine recombinante de levure exprimée dans *E. coli* forme des trimères qui, en concentration élevée de fer s'assemblent pour former des oligomères de haut poids moléculaire allant jusqu'à 48 sous-unités, chacune d'entre elle pouvant fixer jusqu'à 50 atomes de fer (Adamec 2000, Gakh 2002, Park 2002, Nichol 2003, Park 2002 et 2003). La frataxine humaine exprimée dans *E. coli* (forme mature) s'assemble directement en une structure filamenteuse composée de particules individuelles de haut poids moléculaire qui peut subir une nouvelle polymérisation en présence de fer et fixer dix atomes de fer par sous-unité (Cavadini 2002). Cependant, ces résultats sont très controversés car non reproduits par d'autres équipes (Mühlhoff 2002a, Gerber 2003, Aloria 2004). Par ailleurs une étude très récente a démontré qu'un plasmide comprenant YFH1 muté telle que l'oligomérisation de Yfh1p en présence de fer soit empêchée, est capable de restaurer le phénotype des souches $\Delta Yfh1$ (Aloria 2004). Il semble donc définitivement que l'oligomérisation de la frataxine et donc le stockage du fer, se produisent uniquement dans des conditions expérimentales très particulières. Ces propriétés pourraient cependant se limiter en conditions physiologiques, à un rôle de donneur de fer pour la synthèse des noyaux Fe-S, de l'hème ou à d'autres usages au sein de la mitochondrie.

En effet, la frataxine pourrait être une « chaperone » du fer dans les voies mitochondriales de biosynthèse ou de réparation. En ce sens, très récemment, une liaison de la

frataxine et de l'aconitase associée à un transfert de fer a été démontrée dans des extraits purifiés de mitochondries provenant de cœur de rat et de levure $\Delta Yfh1$ (Bulteau 2004). Ces expériences ont cependant été réalisées en présence de fortes concentrations de H_2O_2 appliquées sur des extraits mitochondriaux purifiés et nécessitent une confirmation dans des conditions plus physiologiques. D'autre part, l'interaction observée entre la frataxine et Isu1p dans la levure a été confirmée *in vitro* par la démonstration d'un transfert de fer entre la frataxine humaine et la forme humaine de Isu1p (Yoon and Cowan 2003). Ce groupe a également démontré en 2004, que la frataxine était capable de favoriser l'incorporation du fer dans la synthèse de l'hème en coopérant avec la ferrochelatase humaine (Yoon and Cowan 2004). Ces dernières données n'ont cependant pas encore été confirmées *in vivo* et certains auteurs considèrent le défaut de biosynthèse de l'hème comme un événement secondaire au défaut de biosynthèse des noyaux Fe-S (Lange 2004). De plus, aucun défaut en relation avec le métabolisme de l'hème n'a été mesuré dans le sang et la moelle osseuse des patients. Seule une étude antérieure au clonage du gène relate un niveau supérieur de protoporphyrines érythrocytaires libres dans le sang de 13 patients, suggérant une déficience au niveau de la dernière étape de la biosynthèse de l'hème réalisée par la ferrochelatase (Morgan 1979). Cependant, il est possible que cette étude inclue des patients présentant un tableau clinique de l'AF non génétiquement confirmé. Par ailleurs, un groupe de recherche a étudié un modèle cellulaire original mimant la différenciation érythrocytaire de cellules murines et humaines (Becker 2002). Ainsi, la différenciation érythrocytaire induite provoque une augmentation de l'expression des gènes responsables de la synthèse d'hémoglobine (mécanisme d'import du fer, β globine ...) associée à une diminution du taux d'expression de la frataxine. Ces résultats suggèrent que la diminution de frataxine dans les cellules sanguines des patients n'est pas néfaste aux processus de biosynthèse de l'hème et permettraient d'expliquer l'absence de troubles du métabolisme de l'hème chez les patients AF. Il faut également noter que des mesures de métabolisme de l'hème n'ont jamais été réalisées dans d'autres tissus.

Outre les différences inter-espèces entre la levure et les mammifères, il est important de souligner des différences fondamentales dans les métabolismes et les modes de régulation. Ainsi, chez les mammifères, la régulation de l'activité de la ferrochelatase dépend de la présence d'un noyau Fe-S sensible aux variations des concentrations de fer, mais absent chez la levure dont la ferrochelatase possède uniquement un atome de fer (Taketani 2000, Ferreira 1999). Les modèles levure de l'anémie sidérolastique avec ataxie liée à l'X (XLSA/A) (levure $\Delta Atm1$) illustrent ces différences (Allikmets 1999). En effet, la mutation de ABC7

(homologue de ATM1) responsable de XLSA/A entraîne dans les érythroïdes des patients, des niveaux de PPIX très élevés et une diminution du niveau d'hémoglobine, au contraire de la levure ΔAtm1 qui n'a pas de défaut de l'hème. Ceci est en raison d'une interaction entre la ferrochelatase et ABC7 uniquement démontrée chez les mammifères (Taketani 2003).

L'absence de stress oxydatif primaire dans les modèles levure et murins, démontre que la déstabilisation des noyaux Fe-S résulte uniquement de l'absence de frataxine. En effet, aucun gène impliqué dans la détoxification des radicaux libres n'est induit lors de l'analyse transcriptionnelle sur les souches ΔYfh1 en condition d'import extrême de fer (Foury and Talibi 2001). De plus, une synthèse résiduelle d'un niveau de protéines contenant des noyaux Fe-S stable est réalisée dans des souches ΔYfh1 , suggérant une absence de déstabilisation radicalaire de la quantité résiduelle de noyaux synthétisés (Duby 2002). De même, aucune augmentation significative de la production de radicaux libres n'a été observée dans le cœur des souris en absence de frataxine et en présence d'une accumulation de fer (Seznec 2003, Seznec 2004c article soumis). Ces données soulèvent la question de la toxicité liée au fer et de sa forme de stockage appuyée par l'inactivation du gène homologue à la frataxine chez *E. coli* (CyaY) (Li 1999b) et *C. albicans* (Santos 2004) ne conduisant pas à une sensibilité accrue aux agents oxydants.

5) Thérapie

L'ataxie de Friedreich est une pathologie gravement invalidante et toujours incurable à ce jour. Différentes voies thérapeutiques sont envisagées et testées d'après les observations réalisées notamment chez les patients et les avancées apportées par les différents modèles expérimentaux. Les approches thérapeutiques visent à palier ou à circonvenir les défauts métaboliques liés à l'absence de frataxine et reposent sur l'utilisation de chélateurs de fer et d'anti-oxydants.

5.1) Les chélateurs du fer

L'observation de dépôts de fer chez les patients et dans les modèles de levures a rapidement conduit à l'utilisation de chélateurs du fer, comme la déféroxamine. Cependant, cette molécule et les chélateurs du fer en général présentent de nombreux effets secondaires. De plus, la déféroxamine diminue la concentration sérique de fer, normale chez les patients

souffrant de l'AF, mais atteint beaucoup plus difficilement la mitochondrie (Wilson 1998). Or, les cellules avec un niveau réduit en frataxine sont en situation d'import de fer suggérant une carence cytosolique de fer. Enfin, l'utilisation d'un modèle expérimental *in vitro* mimant les anomalies cardiaques rencontrées chez les patients révèle que ce chélateur protège le complexe II de la chaîne respiratoire ainsi que les lipides de l'oxydation induite par les ions ferreux (composants membranaires) mais conduit à une forte diminution de l'activité totale des aconitases (composants solubles) (Rustin 1999a).

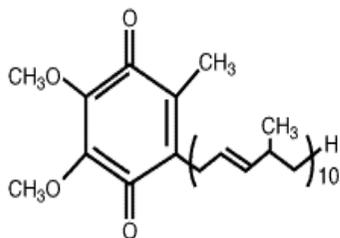
Certains chercheurs ayant persévéré dans cette voie thérapeutique ont suggéré l'utilisation de chélateurs spécifiques du fer mitochondrial : une nouvelle classe de chélateurs, les analogues de la 2-pyridylcarboxaldéhyde isonicotinyldiazone (PCIH), ont récemment été testés avec succès sur un modèle cellulaire de surcharge mitochondriale en fer (Richardson 2001, Richardson 2003). Les tests de l'efficacité de ces molécules sur les modèles murins de l'ataxie de Friedreich sont actuellement en cours.

5.2) Les anti-oxydants

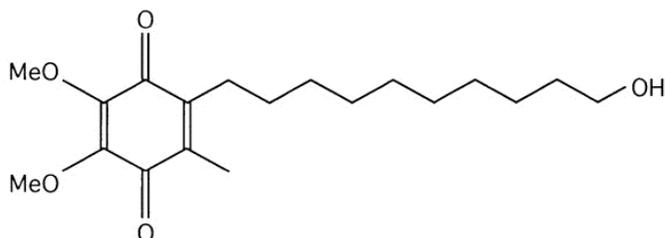
Les molécules anti-oxydantes ont également été considérées. Ces molécules ont rarement des effets secondaires et sont très utilisées dans le cadre de traitements contre le vieillissement et d'autres pathologies neurodégénératives.

Certaines de ces molécules peuvent protéger les enzymes à noyau Fe-S. L'efficacité de ces molécules sur le complexe II et l'aconitase a tout d'abord été testée *in vitro* sur des homogénats de cœur (contrôles) en présence de Fe^{2+} conduisant à la production de superoxydes (Rustin 1999a et b). En effet, l'état d'oxydation des molécules anti-oxydantes est cruciale, une molécule anti-oxydante doit être sous forme oxydée pour pouvoir s'emparer des superoxydes par sa réduction. Toute molécule anti-oxydante peut avoir également un rôle pro-oxydant selon les conditions utilisées. Ces études sur homogénats de cœur, ont révélé par exemple l'absence d'effet protecteur de l'acide ascorbique, réduisant les ions ferriques Fe^{3+} en leur forme toxique pour la cellule Fe^{2+} . A l'inverse, les analogues de la quinone, comme le coenzyme Q10 ou l'idébonone, sont bénéfiques, protégeant les lipides et les protéines à noyaux Fe-S des dommages induits par le fer. Plus récemment, l'action des quinones a été démontrée *in vitro* sur une biopsie endomyocardiaque d'une patiente atteinte d'une cardiomyopathie mitochondriale restaurant la déficience spécifique des complexes I, II et III (Lerman-Sagie 2001).

Coenzyme Q10



Idébénone



MitoQ

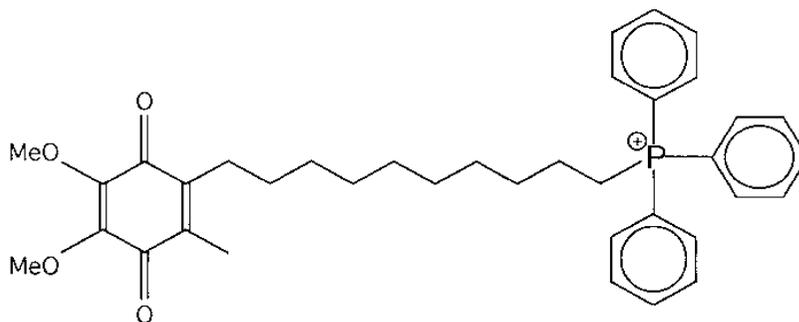


Figure 21 : Structures chimiques du coenzyme Q10, de l'idébénone et du MitoQ

La chaîne latérale plus courte et saturée de l'idébénone (10 atomes de carbone contre 50 pour le coenzyme Q10), le groupement terminal hydroxyl et les résidus méthyl et méthoxy sur le noyau aromatique concourent à la plus faible hydrophobicité de l'idébénone par rapport au coenzyme Q10. Cette propriété a pour conséquences une meilleure diffusion de la molécule au travers des membranes biologiques.

La chaîne latérale du MitoQ est couplée à un cation lipophile triphénylphosphonium. Ce groupement favorise le passage des membranes lipophiles et notamment des membranes mitochondriales

a) Le coenzyme Q10

Le coenzyme Q10 (CoQ10) est une quinone naturelle très hydrophobe (Fig.21), présentant une localisation ubiquitaire au sein des différents organes. Elle joue un rôle majeur dans la chaîne respiratoire mitochondriale en transférant les électrons des différentes déshydrogénases vers le cytochrome c. Par ailleurs, elle peut agir comme molécule pro- ou anti-oxydante, selon son statut d'oxydoréduction. Le coenzyme Q10 est indiqué dans le traitement des atteintes cardiaques ischémiques aiguës ou chroniques, en association avec d'autres traitements.

Suite aux résultats *in vitro* encourageants, l'efficacité de l'association du CoQ10 (400 mg/j) avec une autre molécule anti-oxydante, la vitamine E (2100 UI/j) a été testée sur le métabolisme énergétique musculaire, lors d'un essai clinique ouvert chez 10 patients atteints par l'AF (Lodi 2001). Après 3 et 6 mois de traitement, la production d'ATP mitochondrial est significativement augmentée dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique. Après 4 années de traitement, ces effets sont maintenus, la fraction d'éjection systolique est améliorée et les symptômes neurologiques évalués par les échelles de tests ICARS (« International Cooperative Ataxia Rating Scales ») ne sont pas aggravés (communication de R. Lodi, 2003 *International Friedreich's Ataxia Research Conference, U.S.A*, revue Seznec 2004a). Deux essais prospectifs randomisés en double aveugle sont actuellement en cours : le premier, mené sur 50 patients, compare l'efficacité de l'association CoQ10 (600 mg/j) + Vitamine E (2100 UI/j) par rapport au CoQ10 (30 mg/j) seul (communication de A. Schapira, 2003 *International Friedreich's Ataxia Research Conference, U.S.A*, Revue Seznec 2004a) et le second compare l'efficacité du CoQ10 (400 mg/j) à un placebo chez 40 patients (communication de L. Schöls, 2003 *International Friedreich's Ataxia Research Conference, U.S.A*, revue Seznec 2004a).

b) L'idébénone

L'idébénone (Mnésis[®]) ou 2,3-Diméthoxy-5-méthyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone est un analogue synthétique à courte chaîne du CoQ10 (Gillis 1994, Mordente 1998). La présence d'une chaîne carbonée plus courte, saturée, et terminée par un groupement hydroxyl, ainsi que des résidus méthoxy et méthyl sur le noyau aromatique, concourent une hydrophobicité moindre par rapport au CoQ10 (Fig.21). Cette propriété permet à l'idébénone de franchir aisément la barrière hémato-encéphalique et facilite également le passage des

Auteurs	Durée de l'essai	Nombres et âges des patients	Effets cardiaques (échocardiographie)	Mesures enzymatiques (complexes I, II, III et aconitases dans cœur)	Autres mesures	Effets neurologiques
Rustin 1999 France	4-9 mois	Etude préliminaire 3 patients 11, 19, 21 ans	Réduction du septum et de la paroi ventriculaire gauche, et de la masse du ventricule gauche	-Un patient : traitement pendant 5 ans, normalisation des activités (2 biopsies cardiaques à 5 ans d'intervalle) (Rustin 2004)	-	- Pas d'amélioration de l'ataxie ou des réflexes - Amélioration qualitative de la force et des mvts fins
Schöls 2001 Allemagne Double-aveugle	6 sem.	9 patients	Pas d'amélioration	-	Pas d'effet sur le temps de recouvrement de P.créatine après effort	Pas d'amélioration (échelle ICARS)
Hausse Rustin 2002 France		38 patients 4 à 22 ans	<u>Après 6 mois</u> : -Réduction de la masse ventriculaire gauche (>20%) chez la moitié des patients et stabilisation de l'hypertrophie pour l'autre moitié <u>Après 3 ans</u> : confirmation de l'amélioration cardiaque	-	-	-Pas d'amélioration de l'ataxie ou des réflexes -Pour certains patients, amélioration de la maladresse, du langage, de la déglutition, des mvts fins et de la force (qualitatif)
Artuch 2002 Espagne	12 mois	9 patients 11 à 19 ans	Pas d'amélioration	-	-	Diminution significative des symptômes ataxiques (échelle ICARS)
Mariotti 2003 Italie Double-aveugle	12 mois	29 patients 22 à 30 ans	Réduction 4-5 % de l'épaisseur du septum interventriculaire, de la masse ventriculaire gauche (6 %) et de la paroi du ventricule (4 et 8 %) (à 6 et 12 mois)	-	-	Pas d'amélioration (par échelle ICARS)
Buyse 2003 Belgique	12 mois	8 patients 8 à 27 ans	-Réduction de la masse ventriculaire gauche (6/8 patients : 8 à 45 % de réduction) -Amélioration de la fonction du ventricule gauche	-	Mesure de la protoporphyrine érythrocytaire (fluorimétrie) : réduction chez 6/8 patients (29 à 47 %)	Pas d'amélioration (par échelle ICARS)
En cours 2002-2005 France	3 ans	122 patients	Diminution de l'hypertrophie cardiaque	-	-	-Pas d'amélioration (par échelle ICARS) -Amélioration mvts fins et voix

Tableau 4 : Essais cliniques réalisés chez les patients avec l'idébénone (Mnesis)

Tous ces essais ont été réalisés à la dose de 5mg/kg/jour. Les lignes grisées du tableau correspondent aux essais démontrant un effet positif sur la cardiomyopathie. Les deux essais réalisés en double-aveugle sont indiqués (1^{ère} colonne).

(échelle ICARS : International Cooperative Ataxia Rating Scales, P.créatine : phosphocréatine, mvts : mouvements)

membranes plasmique et mitochondriales. Breveté par Takeda Chemical Industries (Osaka, Japon), cette molécule fut introduite en 1986 sur le marché japonais dans le traitement des troubles cognitifs et comportementaux du sujet âgé. Il avait été montré chez le rat que l'idébénone diminuait la peroxydation lipidique, stabilisant ainsi les membranes, et améliorait la synthèse des neurotransmetteurs et des facteurs de croissance (NGF, « nerve growth factor ») ainsi que le métabolisme cérébral. Mais, l'efficacité modérée de l'idébénone dans cette indication chez les patients a conduit à l'arrêt de sa commercialisation au Japon depuis 1998. Elle reste disponible pour cette indication en Italie, au Portugal, en Espagne, en Equateur et en Argentine.

Le tableau 4 répertorie les essais cliniques réalisés avec l'idébénone. La plupart de ces essais n'ont pas été réalisés en double-aveugle pour des raisons simples d'éthique (les deux essais réalisés en double-aveugle sont mentionnés sur le tableau), un effet placebo n'est donc pas exclu, surtout sur les symptômes neurologiques. L'effet bénéfique de l'idébénone sur la cardiomyopathie de l'AF est maintenant accepté et aucune intolérance n'a été rapportée permettant ainsi d'interrompre le traitement par les β -bloquants chez de nombreux patients. L'effet sur l'atteinte neurologique n'est pas démontrée, hormis pour une étude espagnole sur 9 patients jeunes (tableau 4), car l'hétérogénéité clinique rend difficile les observations à ce niveau. L'absence d'échelle de la progression des symptômes rend aussi difficile le jugement d'un éventuel effet sur le ralentissement de l'évolution de la maladie. Une étude en cours sur un grand nombre de patients (122 patients), réalisée à l'hôpital Necker sur une durée de 3 ans, permettra peut-être de mettre en évidence un effet à long terme sur les symptômes neurologiques et leur progression. De plus, l'amélioration des échelles d'évaluation est en cours, concernant entre autres la parole, la coordination et la démarche (tests ICARS, international cooperative ataxia rating scale), et permettront de déterminer l'état de l'avancée des symptômes pour chaque patient, à n'importe quel moment de la progression de la maladie, en fonction de la taille de la plus petite des expansions (75 patients, suivis pendant 4 ans, communication de M. Cooper, 2003 *International Friedreich's Ataxia Research Conference, U.S.A*, Revue Seznec 2003). Compte tenu de l'absence d'effets secondaires graves, ce traitement est donc maintenant préconisé chez tous les patients à la dose de 5 à 7,5 mg/kg/jour mais certains patients ne répondent pas au traitement à une dose inférieure 15 mg/kg/j. En France, cette molécule peut être obtenue grâce à une ATU (Autorisation temporaire d'utilisation) nominative accordée par l'AFSSaPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé). L'idébénone a récemment été reconnue médicament orphelin

en Europe (EU/3/01/062) et une demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans l'ataxie de Friedreich est en cours dans différents pays européens.

Il est maintenant admis que la frataxine a un rôle équivalent dans les neurones et les cardiomyocytes mais il est possible que cet antioxydant soit moins puissant dans les neurones ou moins concentré dans le système nerveux, puisqu'il doit traverser la barrière hémato-encéphalique.

c) Autres antioxydants

Différentes molécules candidates ont été testées sur un modèle cellulaire de fibroblastes de patients traités au BSO (inhibiteur de la synthèse de glutathion générant une augmentation endogène de stress oxydatif) (Jauslin 2002). La viabilité cellulaire est augmentée par traitement à l'idébénone et des analogues (décylubiquinone), la vitamine E ou le coenzyme Q10. Mais, les auteurs démontrent également que le sélénium, élément indispensable à l'activité optimale d'enzymes de détoxification comme la GPX, ainsi que de petites molécules mimant la GPX ont un effet bénéfique sur la viabilité de ces cellules.

Enfin, le ciblage des dérivés de l'ubiquinone et de la vitamine E vers les mitochondries a été entrepris pour augmenter l'efficacité de ces molécules (Murphy 2001). L'association d'un cation lipophile triphénylphosphonium à ces molécules améliore le passage des membranes et conduit à leur accumulation intramitochondriale avec une efficacité 100 à 500 fois supérieure (MitoQ pour l'antioxydant ciblé dérivé du coenzyme Q10 et MitoVitE pour la vitamine E) (Fig.21). Des expériences menées sur les fibroblastes de patients montrent que le MitoQ serait 800 fois plus efficace que l'idébénone aux mêmes doses, pour lutter contre le stress cellulaire induit par le BSO (Jauslin 2003). Il nécessite cependant, pour atteindre l'intérieur de la mitochondrie, un potentiel de membrane non affecté.

5.3) Thérapie génique et autres perspectives thérapeutiques

Une voie thérapeutique consisterait à remplacer le gène non fonctionnel de la frataxine dans les cellules et notamment dans les cellules cardiaques et les neurones. Les avancées actuelles ne permettent pas encore de cibler ces cellules différenciées avec une efficacité suffisante. Cependant, compte tenu du taux résiduel de frataxine chez les patients, on peut espérer qu'une augmentation même faible de l'expression de la frataxine dans quelques

cellules soit bénéfique. Une équipe australienne dirigée par J. Fleming tente de mettre au point chez la souris, une thérapie génique ciblée vers les ganglions rachidiens postérieurs grâce à des virus recombinants (communication de J. Fleming, 2003 *International Friedreich's Ataxia Research Conference, U.S.A*, revue Seznec 2004a).

Une autre stratégie thérapeutique dans l'AF pourrait être de stimuler la production de frataxine résiduelle en intervenant sur la régulation de l'expression du gène FRDA. Ceci a été réalisé *in vitro* par transfection cellulaire de plasmides comprenant des BACs de la frataxine humaine entière fusionnée à la GFP et a conduit à l'observation d'un effet positif de l'acide butyrique (inducteur de l'expression des gènes par désacétylation des histones) et de fortes doses d'hémine (composé contenant du fer synthétisé dans la mitochondrie, pouvant entrer en compétition avec les noyaux Fe-S) (Sarsero 2003). Les effets des transfusions de ces constructions sur des cellules humaines sont en cours d'étude.

Enfin, il est également envisageable d'essayer d'agir directement sur la conséquence de l'expansion trinuécléotidique, la formation de la structure en triple hélice d'ADN à l'origine de la diminution de la transcription du gène.

RESULTATS

PARTIE II

RESULTATS

Création et caractérisation de modèles murins pour l'ataxie de Friedreich, études fonctionnelles et essais thérapeutiques

1) Introduction sur les modèles murins par invalidation ciblée de gène

La souris est un organisme idéal pour étudier la fonction de gènes humains (Cox and Brown 2003). 80 % des gènes murins ont un gène orthologue humain et seul 1 % des gènes murins n'a aucun équivalent chez l'homme. De plus, le séquençage complet du génome murin offre, depuis fin 2002, des cartes génétiques complètes. Le développement de techniques de transfert de gènes chez la souris, autrefois limitées à des organismes moins évolués, sont autant d'outils rendant possible la compréhension de la fonction de gènes. Enfin, les études sont facilitées par la petite taille des animaux, leur rapide temps de gestation (21 jours), les grandes portées générées (jusqu'à 12 animaux), sans oublier le faible coût d'utilisation par rapport aux autres mammifères.

La transgénèse consiste le plus souvent en la micro-injection de fragments d'ADN étrangers dans le noyau d'un ovocyte tout juste fécondé (pro-nuclei au stade 1 cellule) puis à sa réimplantation dans les oviductes de femelles pseudo-gestantes. L'ADN s'intègre de façon stable et aléatoire dans le génome et en général, un nombre élevé de copies s'insèrent en tandem au sein d'un seul locus. Les premières souris transgéniques ont été obtenues en 1982 par l'injection du gène d'une hormone de croissance de rat dans des pro-noyaux de souris (Palmiter 1982). Cette technique ne permet pas de maîtriser le site d'intégration ou le nombre de copies du transgène intégrées. La « non-maîtrise » du site d'intégration associée à la possible apparition de remaniements de l'ADN de l'hôte lors de l'intégration peut conduire à l'inactivation fortuite de gènes endogènes. Ce dernier phénomène affecte moins de 5% des lignées obtenues mais peut avoir des conséquences sur la viabilité et l'intérêt des animaux. D'autre part, l'expression du transgène peut être affectée par son environnement chromatinien, mécanisme appelé « effet de position ». De même, le nombre de copies du transgène intégrées peut influencer sur son expression. Cette technique permet d'étudier entre autres, la fonction de

REALISATION D'UN KNOCK-OUT DE GENE CHEZ LA SOURIS

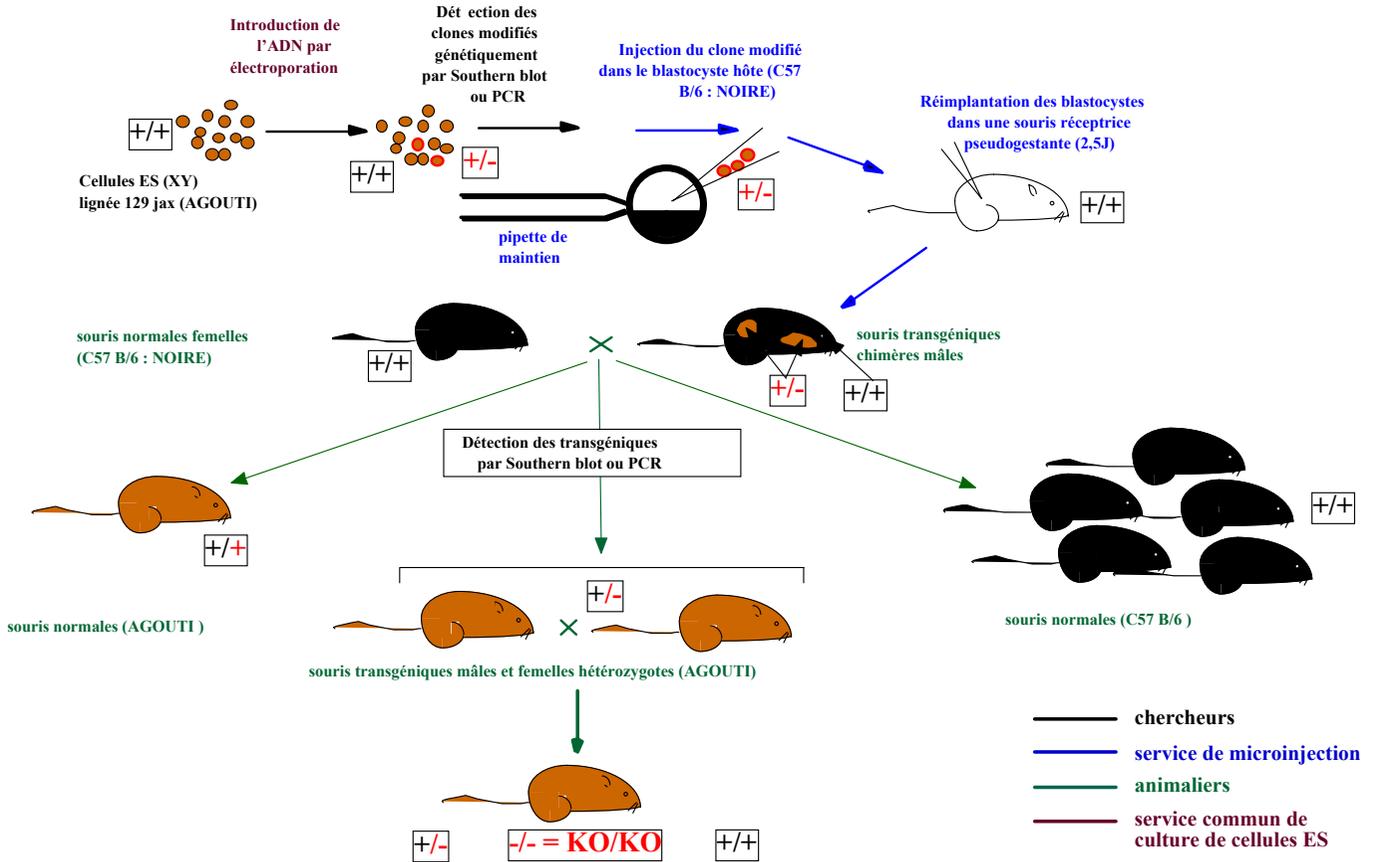


Figure 22 : Réalisation d'un Knock-Out (KO) de gène chez la souris

gènes, leur régulation et est notamment particulièrement adaptée pour la création de modèles murins de maladies humaines avec gain-de-fonction des mutations causales conduisant généralement à des phénotypes dominants, car l'expression des formes ADNc mutées suffit à entraîner la pathogénèse. Une mutation avec gain-de-fonction entraîne généralement l'acquisition d'une nouvelle fonction délétère (altération de la fonction initiale).

La modélisation de mutations avec perte-de-fonction chez la souris se fait par l'inactivation ciblée de gènes à un locus déterminé par recombinaison homologue (Fig.22). Le premier modèle murin obtenu par inactivation de gène est celui de la maladie de Leysch-Nyhan par inactivation du gène endogène HPRT (hypoxanthine phosphohorybosyltransférase) (Doetschman 1987). La plupart des maladies héréditaires récessives, comme l'AF, et de nombreuses maladies héréditaires dominantes résultent d'une perte-de-fonction du gène. Le ciblage de gènes repose sur deux points essentiels : la recombinaison homologue et les cellules souches embryonnaires (cellules ES), totipotentes et obtenues par culture de blastocystes *in vitro* (Capecchi 1989a et b). Les cellules ES, après réinjection dans la cavité d'un blastocyste hôte se divisent et sont capables de se différencier en tissus hautement spécialisés chez la souris. Le vecteur de recombinaison homologue comportant la séquence à remplacer ou à insérer et des séquences homologues au locus ciblé est introduit par électroporation dans les cellules ES. La taille des séquences homologues entourant la séquence à modifier détermine l'efficacité de la recombinaison homologue qui augmente de 100 fois quand la séquence d'homologie passe de 1,3 Kb (taille minimale nécessaire) à 14 Kb et atteint un plateau au-delà (Hasty 1991). Ce vecteur comporte aussi un marqueur de sélection positive qui code pour le gène de la néomycine phosphotransférase dans notre cas (cassette neo) et confère une résistance à la néomycine aux cellules transformées permettant ainsi de sélectionner les clones ayant intégré le vecteur. Les clones cellulaires démontrant un remplacement de la séquence endogène sont amplifiés *in vitro* et introduits par micro-injection dans la cavité d'un blastocyste hôte de 3,5 jours. Les cellules ES sont des cellules mâles de lignée 129/Sv-ter (dans notre cas) dont les souris ont un pelage agouti (dominant). Pour déterminer si les cellules modifiées ont bien colonisé le blastocyste, celui-ci provient d'une lignée de couleur noire (C57 B1/6). Après réimplantation des blastocystes dans des femelles pseudo-gestantes, les souris nouveau-né avec un pelage bi-couleur (les chimères) sont sélectionnées et croisées avec des souris noires C57 B1/6. La moitié des descendants agoutis seront hétérozygotes pour la mutation introduite.

Knock-Out (KO), Knock-In (KI), Knock-Out conditionnel, Knock-Out conditionnel et inductible

Une mutation correspondant à une interruption du cadre de lecture dans la séquence codante et à l'absence de protéine correspondante est une mutation nulle, générant un modèle murin appelé aussi Knock-Out (KO). Le KO peut présenter des inconvénients majeurs. En effet, l'inactivation de gènes au cours du développement n'est pas sans conséquence et une létalité embryonnaire, la perte d'une population de cellules précurseurs, une altération fonctionnelle du tissu non lié au défaut fonctionnel retrouvé quand le gène est altéré dans un tissu normalement construit, une infertilité ou la compensation systémique au défaut génétique mais non spécifique, ont été fréquemment décrites (Albanese 2002).

Pour faire face en partie à ces difficultés, des variantes technologiques permettent d'inactiver un gène dans un tissu donné (KO conditionnel) et/ou de façon contrôlable dans le temps (KO conditionnel et inductible). Ces systèmes sont basés sur la capacité de l'enzyme CRE-recombinase (Cre) du bactériophage P1 de permettre l'incorporation de l'ADN du phage, au sein du génome bactérien (Sternberg and Hamilton 1981) en catalysant la recombinaison spécifique entre deux sites loxP (séquences de 34 nucléotides) dans la même orientation. Le site LoxP est formé de deux séquences palindromiques de 13 pb séparées par une région dite « espaceur » de 8 pb. A l'issue de la recombinaison, les séquences comprises entre ces deux sites sont excisées sous la forme d'un ADN circulaire tandis qu'il ne subsiste sur l'ADN cible qu'un seul site LoxP. La recombinaison est aussi active chez les eucaryotes (Sauer 1987) mais comme les séquences exactes des sites LoxP sont absentes des génomes eucaryotiques, l'expression de la recombinaison est possible sans risque de recombinaison intra- ou inter-chromosomique. Une activité non spécifique de la recombinaison a été parfois décrite et peut être due à la présence de séquences génomiques ayant une homologie partielle avec les séquences LoxP. Ces sites cryptiques sont alors des substrats potentiels de la Cre et un effet cytolytique induit par une expression prolongée de la Cre dans des fibroblastes a été expliqué par cette action (Thyagarajan 2000).

Le vecteur de recombinaison homologue comporte donc au sein des séquences homologues au gène endogène, la séquence à éliminer flanquée de 2 sites LoxP dans la même orientation. Après électroporation de ce vecteur dans les cellules ES, la séquence « floxée » est insérée par recombinaison homologue à la place de la séquence endogène, sans modification notable induite par les sites LoxP sur l'expression du gène (conservation du cadre de lecture). Un des principaux problèmes des recombinaisons est la difficulté à obtenir

The Jackson Laboratory
MMHCC Mouse repository
Nagy Lab Cre Database
Mouse knockout and Mutation Database (MKMD)

http://jaxmice.jax.org/models/research_tools.html
<http://mouse.ncifcrf.gov/>
<http://www.mshri.on.ca/nagy/>
<http://research.bmn.com/mkmd/>

Figure 23 : Sites web répertorient l'ensemble des lignées transgéniques présentant des Cre tissu- ou cellule-spécifiques

une bonne efficacité d'excision pouvant être expliquée par l'excision partielle due aux effets de positions (variégation), la distance entre les deux sites LoxP et la conformation de la chromatine induisant des différences d'accessibilité des sites LoxP en fonction du locus d'insertion (Zheng 2000).

Dans le cas du KO conditionnel, les souris présentant les séquences dites « floxées » sont croisées avec des souris transgéniques pour la Cre sous le contrôle de promoteurs tissu-spécifique (Sauer 1988) permettant la délétion de la séquence « floxée » *in vivo* (Orban 1992). Cet évènement de recombinaison ne pourra se produire uniquement dans les cellules où la Cre s'exprime. La collection de souris transgéniques pour la Cre et la spécificité d'action des transgènes ne cessent d'augmenter (Lee and Threadgill 2004). Pour ne citer qu'un exemple de cette spécificité, il est maintenant possible de restreindre l'inactivation d'un gène aux seuls neurones nociceptifs des ganglions rachidiens et des ganglions de la base (Agarwal 2004). Les souris disponibles à ce jour sont répertoriées sur plusieurs banques de données disponibles sur internet (Fig.23). L'inactivation de gène par le principe du KO conditionnel repose essentiellement sur la fiabilité des séquences promotrices contrôlant de façon tissu-spécifique l'expression de la recombinase et ses sites d'intégration entraînant des variations d'expression importantes (inconvenients de la transgénèse).

La stratégie du KO conditionnel et inductible, permet d'induire l'activité de la Cre de manière contrôlée dans le temps, et notamment chez la souris adulte. Différents systèmes permettent de réaliser une mutagenèse conditionnelle et inductible dans la souris (Albanese 2002). Les deux techniques les plus couramment rapportées font intervenir la tétracycline (Utomo 1999) ou des ligands hormonaux. Cette dernière méthode est basée sur la fusion du gène de la Cre au domaine de fixation du ligand (LBD, « ligand binding domain ») de récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Cette astuce technologique permet de contrôler l'activité de protéines variées de façon ligand-dépendante (oncoprotéines, facteurs de transcription, kinases ...) (Beato 1991). La translocation nucléaire de la Cre, permettant l'excision au niveau des sites LoxP, est conditionnée par la fixation du ligand. Les ligands utilisés les plus couramment sont l'œstrogène et la progestérone. Une récente amélioration de ce système a permis la réalisation d'une Cre fusionnée au récepteur de l'œstrogène muté, appelée Cre-ER^T, permettant l'activation sélective par une hormone de synthèse, le tamoxifène, sans activation par l'œstrogène endogène (Feil 1997, Kellendonk 1999, Metzger and Chambon 2001). Les Cre inductibles présentent deux désavantages majeurs. Premièrement, une fuite d'activité a été observée en absence de ligand inducteur (endogène ou exogène). L'une des raisons de cette fuite d'activité semble être liée à l'action probable de

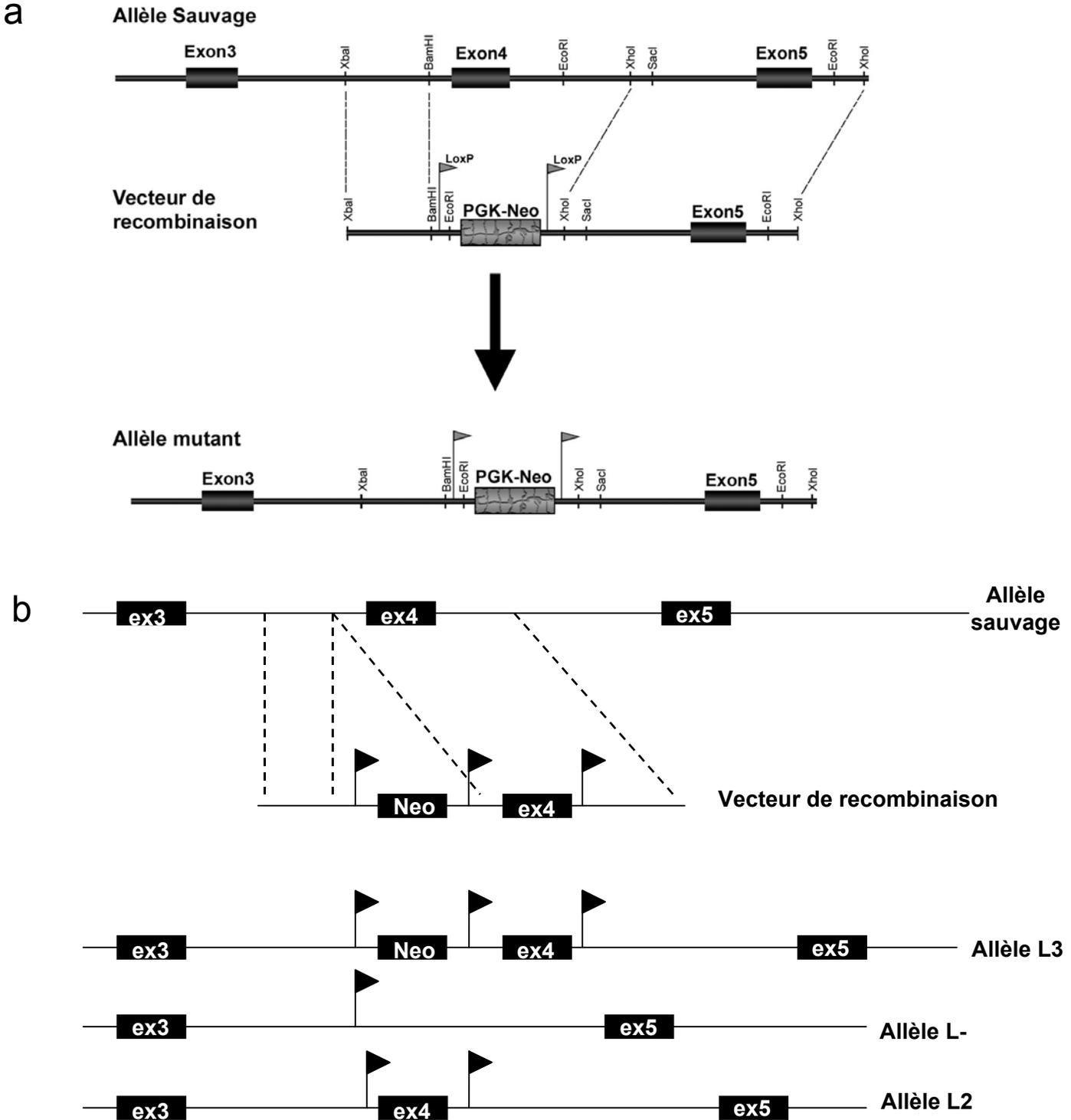


Figure 24 : Stratégie d'obtention des différents allèles des modèles murins

a. Vecteur de remplacement et allèle obtenu pour le KO total.

b. Vecteur de remplacement et allèles obtenus pour le KO conditionnel.

Les exons sont indiqués par des rectangles noirs. Les « drapeaux » correspondent aux sites LoxP.

protéases intracellulaires qui induiraient une protéolyse entre la séquence de la protéine Cre et celle du domaine liant le ligand ce qui libérerait une portion de protéine de fusion avec une activité Cre constitutive (Zhang 1996). Deuxièmement, une toxicité du ligand peut se produire et il a ainsi été démontré que le tamoxifène injecté à long terme possédait des propriétés anti-œstrogéniques induisant la formation de tumeur gonadique chez la souris, ou avait une action néfaste sur la chaîne respiratoire à forte dose (diminution de la phosphorylation oxydative) (Cardoso 2001).

Cependant, dans certaines maladies, les mutations n'entraînent pas une inactivation génique totale comme certaines mutations ponctuelles faux-sens ou certains types d'expansions de triplets trinuécléotidiques. Ainsi, pour reproduire plus fidèlement les mécanismes de ces mutations, le « Knock-In » (KI) permet l'introduction d'une mutation particulière par recombinaison homologue. L'introduction de la mutation humaine en lieu et place du gène considéré chez la souris ne suffit cependant pas toujours à reproduire fidèlement les caractéristiques de la pathologie retrouvée chez l'homme. De nombreuses raisons peuvent expliquer ce phénomène. Aux différences inter-espèces reposant entre autres sur des divergences au niveau des voies métaboliques et des mécanismes de régulation de l'expression des gènes ou la présence de redondances fonctionnelles, viennent s'ajouter les altérations génétiques liées à l'expression et à l'intégration de séquences d'ADN exogènes.

2) A mon arrivée au laboratoire

La stratégie des modèles murins a donc été choisie par le laboratoire dans le but de comprendre la fonction de la frataxine, de préciser la physiopathologie de l'AF et de réaliser des essais thérapeutiques.

A mon arrivée au laboratoire en 1999, le KO total de la frataxine par stratégie d'inactivation totale et constitutive du gène murin *Frda*, était obtenu et caractérisé (Cossée 2000). L'exon 4 du gène de la frataxine a été excisé produisant l'épissage des exons 3 et 5a et un décalage du cadre de lecture avec l'apparition d'un codon stop (Fig.24a). L'exon 4 du gène *Frda* est l'exon le plus conservé au cours de l'évolution suggérant un aspect fonctionnel important du domaine protéique correspondant. La protéine résultante est alors tronquée pour sa moitié C-terminale. L'invalidation du gène murin s'est avérée être létale pendant le développement embryonnaire (E6,5) soulignant le rôle primordial de la frataxine au cours du développement chez la souris. Ce premier modèle murin de l'AF a permis d'apporter de

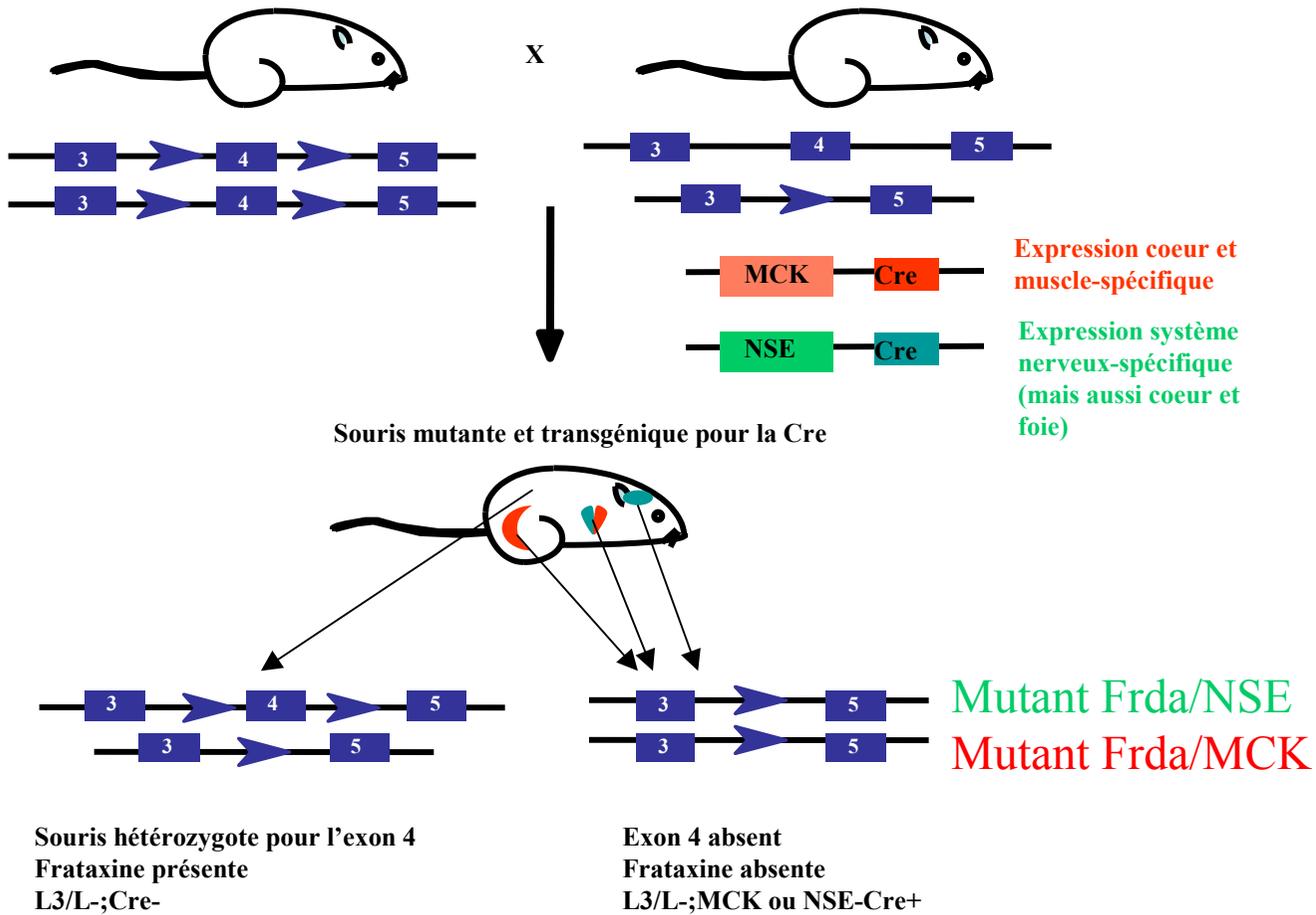


Figure 25 : Stratégie des croisements pour l'obtention des mutants conditionnels *Frda*/NSE et *Frda*/MCK

Une souris homozygote pour l'allèle L3 (la cassette néo n'est pas représentée) est croisée avec un souris hétérozygote pour la délétion de l'exon 4 (+/L-) et exprimant un des deux transgènes de la Cre, sous le contrôle des promoteurs de la MCK ou de la NSE.

Les souris mutantes issues de ce croisement démontrent une absence de frataxine dans les tissus exprimant la Cre.

Les sites LoxP sont représentés par des flèches bleues.

nouvelles indications concernant la fonction de la frataxine, comme l'absence d'accumulation de fer décelée dans les embryons, et une mort embryonnaire au moment de la gastrulation (phase caractérisée par une haute demande énergétique) mais n'a pas permis d'obtenir une quantité suffisante de tissus pour des analyses biochimiques (notamment les activités des enzymes à noyaux Fe-S).

La délétion de l'exon 4 ne permettant pas de synthèse résiduelle de frataxine, l'éventualité d'une létalité embryonnaire avait été considérée et M. Cossée avait entrepris les constructions nécessaires à la génération de KO conditionnels (délétion tissu-spécifique). Le vecteur de remplacement construit contient l'exon 4 et ses séquences introniques flanquantes entourés de 2 sites loxP, la cassette néo également flanquée de deux sites LoxP et les régions d'homologie au gène *Frda* sauvage en 5' et en 3' (3 sites LoxP, allèle L3) (Fig.24b). La micro-injection de cette construction dans les cellules ES a permis de générer 7 mâles chimériques dont deux transmettaient la construction avec les trois sites LoxP (allèle L3) dans la lignée germinale. Des souris hétérozygotes pour l'allèle L3 ont ainsi été obtenues.

La première partie de mon travail de thèse a donc consisté, en étroite collaboration avec H. Puccio, à générer et caractériser les premiers modèles murins conditionnels pour l'AF.

3) Modèles murins conditionnels pour l'ataxie de Friedreich – publications 1 et 2

3.1) Stratégie des KO conditionnels

Deux lignées transgéniques exprimant la Cre ont été choisies : une lignée où la Cre est sous le contrôle du promoteur de la kinase musculaire de la créatine (MCK, « Muscle Creatine Kinase »), pour étudier la composante cardiaque de l'AF et une lignée NSE où la Cre est sous le contrôle du promoteur de l'énolase neuronale (NSE, « Neuron Specific Enolase ») pour étudier la composante neurologique. La stratégie des croisements ayant permis d'obtenir les souris mutantes *Frda*/MCK (L3/L- ;MCK-Cre+) et *Frda*/NSE (L3/L- ;MCK-Cre+) est présentée sur la figure 25. Au cours des deux premières années au laboratoire, j'ai participé à la caractérisation moléculaire, histologique et phénotypique des modèles murins *Frda*/MCK et *Frda*/NSE. L'étude de la fonction cardiaque a été réalisée par L. Monnassier et les essais thérapeutiques ont été suivis par l'ensemble de l'équipe. Les résultats de cette caractérisation font l'objet des publications 1 et 2.

3.2) Le modèle Frda/MCK, une avancée cruciale dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'AF – publications 1 et 2

a) Caractérisation du modèle Frda/MCK – publications 1 et 2

L'utilisation d'une Cre sous le contrôle du promoteur de la protéine MCK permet un fort taux d'expression du transgène restreint aux cellules du muscle squelettique et aux cardiomyocytes (Johnson 1989). La frataxine n'est plus détectée par Western Blot et RT-PCR quantitative en temps réel à la naissance dans les tissus musculaires cardiaques de ces mutants (L3/L- ; MCK-Cre⁺). L'absence de frataxine dans le cœur et le muscle squelettique des souris Frda/MCK se traduit par une mort précoce à l'âge de 10 semaines. Cette mort est la conséquence d'une hypertrophie cardiaque sévère, pathologie cardiaque spécifique de l'AF. Il est intéressant de noter que ces souris, bien que complètement déficientes en frataxine dans le muscle squelettique, ne développent aucune atteinte pathologique dans ce tissu à 10 semaines. Ce point illustre une sensibilité tissulaire à l'absence de frataxine et est en accord avec l'absence d'altération musculaire histologique chez les patients.

Une étude très approfondie a été réalisée dans le tissu cardiaque, aux niveaux ultrastructural, histologique, biochimique et fonctionnel. La séquence des événements pathologiques a pu être ainsi déterminée avec et contre toutes attentes : i) une altération de l'activité des protéines à noyau Fe-S, ii) une atteinte cardiaque morphologique (hypertrophie et dilatation) associée à des altérations fonctionnelles, iii) une accumulation mitochondriale de fer secondaire, iv) une absence d'augmentation significative de radicaux libres.

Très succinctement, nous avons pu définir trois grandes phases dans la progression de la pathologie cardiaque. La première phase, de 2 à 5 semaines, démontre une diminution de l'activité progressive des protéines à noyau Fe-S sans accumulation de fer ni présence de radicaux libres avec un déficit cardiaque fonctionnel mesurable à partir de 5 semaines. Pendant, la deuxième phase, de 5 à 7 semaines, l'activité enzymatique s'effondre, le fer commence à s'accumuler et les paramètres échocardiographiques altérés démontrent une dilatation progressive associée à une hypertrophie. A partir de 8 semaines, l'activité des protéines à noyau Fe-S atteint un plateau (20 % d'activité résiduelle), l'accumulation mitochondriale de fer est significative sans augmentation concomitante de radicaux libres et les souris développent une cardiomyopathie décompensée avec un tissu cardiaque totalement remanié (fibrose). Ainsi, pendant la première phase, en absence de frataxine, l'activité des protéines à noyau Fe-S diminue progressivement, sans défaut fonctionnel associé, suggérant

un rôle de la frataxine important mais non essentiel à la biosynthèse des noyaux Fe-S. En phase 2, l'altération des métabolismes s'accroît avec une activité résiduelle des protéines à noyau Fe-S mais celle-ci est insuffisante à la survie des cardiomyocytes et conduit finalement à leur mort en phase 3.

Ce modèle est le seul modèle murin reproduisant la pathophysiologie cardiaque de l'AF. La caractérisation détaillée nous a permis de mettre en évidence la séquence des événements conduisant à la pathologie. Avec ce modèle, nous avons remis en cause les hypothèses initialement avancées pour tenter d'expliquer la pathologie chez l'homme. Le défaut enzymatique des protéines à noyau Fe-S est primaire et strictement dû à l'absence de frataxine sans participation majeure du stress oxydatif dans la déstabilisation des noyaux et donc l'aggravation du phénomène. La spécificité et la progression de ce modèle nous ont permis d'entreprendre des essais thérapeutiques.

b) Essais thérapeutiques

L'évolution des différents paramètres mise en évidence lors de la caractérisation du modèle *Frda/MCK* nous a donné les bases nécessaires à la réalisation d'essais thérapeutiques. L'effet thérapeutique potentiel d'une molécule sur ce modèle est évalué par sa capacité à améliorer d'une part la fonction cardiaque par échocardiographie et d'autre part la survie.

La première molécule testée correspond à l'idébénone, un anti-oxydant qui a un effet positif démontré sur la cardiomyopathie humaine (Tableau 4). L'absence d'essais réalisés en double-aveugle ralentit cependant l'autorisation de mise sur le marché de ce produit. Les souris *MCK* offrent un bon modèle pour juger de l'efficacité de l'idébénone et ce, en double-aveugle. Après un essai préliminaire réalisé par injection abdominale, nous avons fait le choix d'incorporer l'idébénone dans la nourriture permettant une libération continue. En effet, la demi-vie de l'idébénone est évaluée à 16 heures et deux injections journalières sont à la fois lourdes à supporter pour les animaux et difficilement réalisables par les membres de l'équipe. A la dose de 90 mg/kg/jour, nous avons observé une augmentation de 10 % de la survie, associée par exploration fonctionnelle, à un retard d'apparition du défaut échocardiographique avec un décalage de la semaine 5 à la semaine 6. Un effet de l'idébénone à 5 semaines démontre un maintien prolongé en première phase de la progression pathologique. De plus, l'idébénone ne restaure pas l'activité des protéines à noyau Fe-S et aucune variation de la quantité de marqueurs de stress oxydatif n'a été observée. L'idébénone est donc capable

d'entraîner une amélioration de la fonction cardiaque, sans agir de façon mesurable sur le déficit primaire de l'AF.

L'absence d'augmentation significative des marqueurs de stress oxydatif dans le tissu cardiaque suggère plutôt un mode d'action de l'idébénone indépendant de ses fonctions anti-oxydantes. Nous avons cependant observé une légère augmentation non significative du niveau de protéines oxydées à 5 semaines et nous ne pouvons pas exclure une action anti-oxydante de l'idébénone à cet âge. D'autre part, l'idébénone étant un analogue du coenzyme Q10, un maintien de la chaîne respiratoire par une participation au passage des électrons est aussi envisageable. En effet, l'idébénone a eu un effet positif sur les symptômes cardiaques d'une patiente présentant une cardiomyopathie mitochondriale avec atteinte spécifique de l'activité des complexes I, II et III (biopsie endomyocardique), atteinte rétablie *in vitro* par l'ajout de quinone (Lerman-Sagie 2001). Ceci suggère une déficience de biosynthèse des quinones, d'origine inconnue. Or, aucune augmentation du niveau de superoxydes ou de la peroxydation lipidique n'a été observée chez des patients présentant un niveau réduit d'ubiquinone.

Considérant l'absence de frataxine dans le tissu cardiaque des mutants MCK, la sévérité de la pathologie cardiaque développée, et bien que le mode d'action de l'idébénone ne soit pas clairement défini, cet essai révèle de façon certaine une action positive de l'idébénone. Nous avons pu appuyer la nécessité pour tous les patients de bénéficier de l'idébénone.

c) Conclusions et perspectives

Le modèle Frda/MCK est le premier modèle murin reproduisant la pathophysiologie cardiaque de l'AF dont nous avons disséqué la séquence des événements conduisant à la dégénérescence. Malgré la relative sévérité du modèle (effondrement de l'activité des protéines à noyau Fe-S à partir de 5 semaines et remaniement non négligeable du tissu au-delà de 7 semaines), nous avons pu concevoir et réaliser des essais thérapeutiques. Il n'est cependant pas étonnant que l'effet de l'idébénone soit particulièrement observable à 5 semaines et il est probable que d'autres drogues agiront aussi sur cette fenêtre temporelle. L'absence de stress oxydatif mesuré dans le tissu cardiaque soulève la question du mode d'action de l'idébénone. Il est possible que l'idébénone agisse sur l'activité de la chaîne respiratoire en participant au transport des électrons en leur permettant par exemple de passer directement au complexe IV. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de l'idébénone

sur l'expression de certains gènes. En effet, il a été récemment montré que l'acide ascorbique était capable de stimuler la synthèse de myéline dans un modèle murin de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, en agissant non pas comme anti-oxydant mais en régulant (directement ou indirectement) l'expression de certains gènes (Passage 2004).

De plus, un mystère reste entier car même en présence d'une accumulation mitochondriale de fer significative, une diminution de la quantité de marqueurs de stress oxydatif est mesurée. La forme selon laquelle le fer est stocké reste à définir. Une collaboration avec le laboratoire de S. Levi est engagée afin de mettre en évidence un éventuel stockage au sein de la ferritine mitochondriale dans les cardiomyocytes.

Par ailleurs, ce modèle ouvre les portes sur la compréhension de la spécificité fonctionnelle de la frataxine puisque dans le contexte d'une absence totale en frataxine, le muscle est épargné. Un projet d'étude transcriptionnelle sur tissus musculaires et cardiaques de souris mutantes *Frda/MCK* et contrôles a été réalisé en collaboration avec V. Procaccio, afin d'observer une éventuelle expression différentielle de gènes expliquant l'absence de phénotype musculaire. Ce projet mené en partie par A. Hertzog, a permis de démontrer que l'expression de certains gènes modifiés précocement dans le coeur est également modifiée à 10 semaines dans le tissu musculaire suggérant un déficit musculaire tardif. Un nouveau projet actuellement en cours dans le laboratoire basé sur l'utilisation d'une recombinaise avec une expression restreinte au niveau musculaire (promoteur HSA, « human skeletal α actin »), a permis d'obtenir des souris sans atteinte cardiaque vivant plus longtemps et développant ainsi des atteintes musculaires fonctionnelles et histologiques. Ce modèle est actuellement en cours de caractérisation.

3.3) Le modèle *Frda/NSE* et les défauts du KO conditionnel – publication 1

a) Caractérisation du modèle *Frda/NSE*

Au contraire des mutants *Frda/MCK*, les mutants *Frda/NSE* présentent un phénotype à la naissance avec une taille réduite. Ceci peut être dû à une absence de frataxine se produisant de façon plus précoce que celle prédite par l'expression de la *NSE-Cre* utilisée (18^{ème} jour) (J. Melki, communication personnelle). Les mutants *Frda/NSE* développent une atteinte multi-systémique en accord avec la délétion étendue de la frataxine dans différents tissus entraînant un phénotype sévère et une espérance de vie de 25 jours en moyenne. Des tissus non atteints dans l'AF dégénèrent : les hépatocytes présentent notamment une augmentation du nombre de

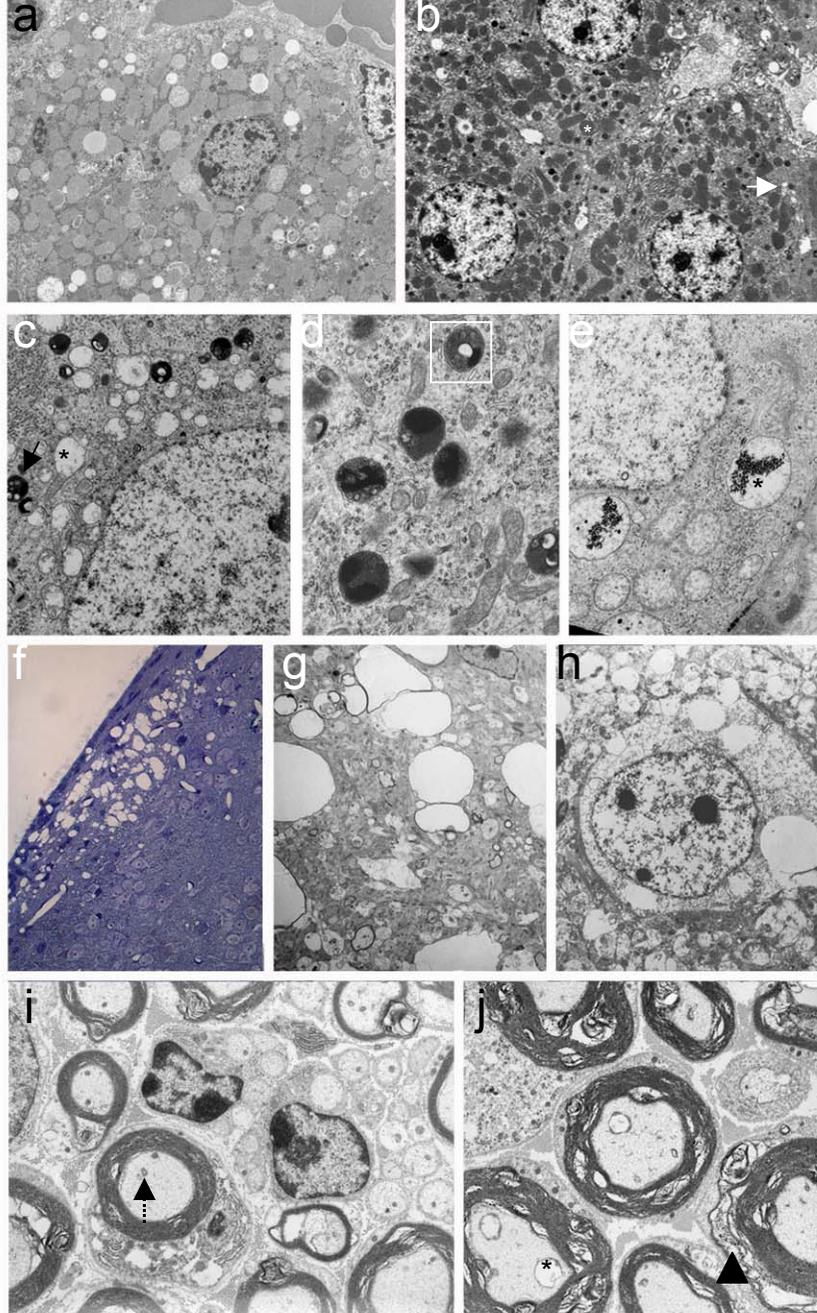


Figure 26 : Lésions ultrastructurales observées dans le foie, les ganglions rachidiens, le cortex et le nerf sciatique des mutants NSE

a-b. Foie a. Hépatocytes d'une souris contrôlée. b. Hépatocytes du mutant correspondant, avec densification des mitochondries (*) et prolifération de lysosomes (flèche blanche) dans les hépatocytes.

c-e. Ganglions rachidiens. c. Neurone sensitif d'un mutant NSE avec de nombreuses mitochondries présentant une désintégration des crêtes et une perte de matériel matriciel (*) associée à la présence de corps autophagiques (flèche noire). d. Agrandissement de corps autophagiques multi-vésiculaires (voir encadré). e. Le précipité dense à l'intérieur de deux mitochondries gonflées (*) correspond à une accumulation intramitochondriale de fer. Noter la présence de mitochondries sans dépôt.

f-h. Cortex. f. Section semi-fine (coloration bleu de toluidine) avec des zones de dégénérescence spongieuses. g. Les trous observés en f correspondent à de larges vacuoles de dégénérescence, qui peuvent fusionner ensemble, conduisant à la nécrose. h. Neurone situé dans cette zone de dégénérescence présentant de larges vacuoles cytoplasmiques.

i-j. Nerf sciatique. i. Section provenant d'un animal contrôlé. Les mitochondries sont indiquées par une flèche en pointillé. j. Le mutant correspondant présente un gonflement mitochondrial (*) avec désintégration des crêtes et perte du matériel. Le cytoplasme encore visible d'une cellule de Schwann démontre une dégénérescence (tête de flèche noire).

Les animaux étudiés ont une semaine.

1 cm = 3,3µm pour a,b ; 2,8µm pour c,e,h ; 0,5 µm pour d ; 5 µm pour g et 2 µm pour i,j.

lysosomes et une dégénérescence de type nécrotique a été observée dans le cortex (Fig.26f-h) (analyse ultrastructurale réalisée en collaboration avec A. Gansmuller).

Malgré cette sévérité, nous avons démontré que l'absence de la frataxine dans le système nerveux de la souris permet de reproduire par analyse clinique, électromyographique et histologique, certains aspects de l'AF : i) une perte de la proprioception, ii) des lésions dans les ganglions rachidiens (Fig.26a-b) et iii) une diminution progressive de l'onde réflexe sans atteinte motrice ou sensitive. Cependant, les lésions dans le système nerveux central et périphérique sont très étendues déjà à la naissance, touchant de plus, des régions non atteintes chez les patients, ce qui rend difficile l'attribution des symptômes et l'étude de la neurodégénérescence. La nature primaire ou secondaire de la dégénérescence des fibres myélinisées de gros diamètre observée dans le nerf sciatique (Fig.i-j) et des lésions dans les ganglions rachidiens (Fig.26c-e), est ainsi difficilement définissable. De plus, la sévérité de ce modèle empêche la conception d'un essai thérapeutique. Il serait en effet trop dangereux de juger de l'effet d'une molécule sur l'AF considérant l'important nombre de sites lésés dans ce modèle et ne présentant aucun signe de dégénérescence chez les patients.

b) Conclusions et perspectives

La technique du KO conditionnel est une technique puissante mais elle dépend fortement de la spécificité d'expression de la recombinaison et du fond génétique des souris (Linder 2001). Le transgène s'intègre au hasard, entraînant un mosaïcisme d'expression au sein d'un tissu ou une expression non attendue dans d'autres tissus. Ainsi, malgré l'expression strictement neuronale de la protéine NSE (Forss-Petter 1986) et de la Cre dans les lignées NSE (J. Melki, communication personnelle), un des premiers modèles animaux d'une maladie génétique humaine (amyotrophie spinale) généré en utilisant une lignée NSE identique, présente également une délétion non strictement restreinte au système nerveux, avec 30 % de délétion dans le cœur, le foie et le rein (Frugier 2000). De plus, l'expression de la NSE-Cre dans notre modèle interfère avec le développement du système nerveux, donnant lieu à des lésions présentes à la naissance ne reproduisant pas la neurodégénérescence de l'AF. Il faut trouver un compromis entre le développement d'un phénotype et une sévérité spécifique. En 1999, la plupart des lignées transgéniques disponibles présentaient une expression précoce de la Cre, dès le 9^{ème} jour de développement embryonnaire (par ex : En2-Cre (promoteur du gène *Engrailed-2*) (Zinyk 1998), Foxg-1-Cre (promoteur du gène *BF-1*) (Hebert and McConnell 2000)) hormis la CaMKII-Cre (expression au 18^{ème} jour) présentant cependant une

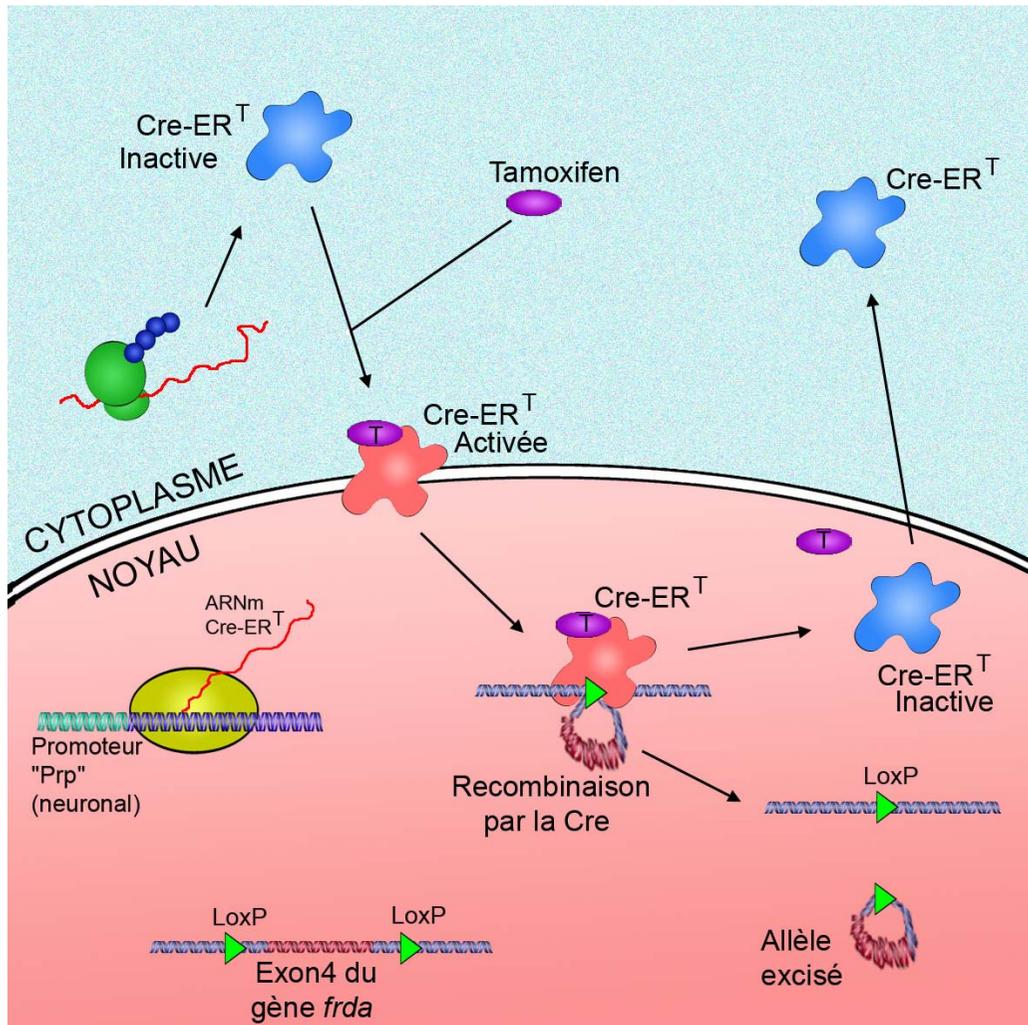


Figure 27 : Mécanisme de la recombinaison réalisée par la recombinase Prp-Cre-ER^T

L'injection de tamoxifène entraîne la translocation nucléaire de la Cre-ER^T, qui dans son état inactif est cytoplasmique. Une fois dans le noyau, elle réalise l'excision de l'exon 4 du gène de la frataxine, placé entre deux sites LoxP.

expression restreinte au cortex et à l'hippocampe (non atteints dans l'AF) (Tsien 1996, Dragatsis and Zeitlin 2000).

4) Modèles murins conditionnels et inductibles pour l'ataxie de Friedreich – publications 3 et 4

4.1) Caractérisation des lignées conditionnelles inductibles Cb et Br – publication 3

La sévérité du modèle NSE due à une atteinte multi-systémique, nous a conduit à générer un nouveau modèle murin neurologique de l'AF basé sur l'inactivation tissu-spécifique et inductible de la frataxine, c'est-à-dire à un moment défini dans le temps. Pour être sûr de ne pas interférer avec le développement du système nerveux des souris, nous avons induit la délétion dans un premier temps à l'âge adulte (4 semaines). A cet âge, le développement du système nerveux est achevé, y compris le cervelet dont le développement est post-natal.

La Cre fusionnée au domaine de liaison au ligand du récepteur aux œstrogènes, domaine muté afin de ne reconnaître spécifiquement que le tamoxifène (Cre-ER^T), est sous le contrôle du promoteur de la protéine du prion (Prp-Cre-ER^T) (Weber 2001). L'injection de tamoxifène permet la translocation nucléaire de la recombinaise, autorisant son action de recombinaison (Fig.27). Deux lignées Prp-Cre-ER^T (lignées 28.4 et 28.6) avec des sites d'intégration différents de la Cre entraînant une expression différentielle du transgène dans le système nerveux, ont été utilisées. La stratégie des croisements ayant permis d'obtenir les souris mutantes, est résumée sur la figure 28. Considérant la mise au point réalisée par l'équipe de D. Metzger (IGBMC) à l'origine de ces deux lignées, nous avons décidé de réaliser une injection de tamoxifène quotidienne, pendant 5 jours de suite. Les mutants issus de ces croisements sont appelés Br et Cb, résultant respectivement du croisement avec les lignées Prp-Cre-ER^T 28.4 et 28.6. La génération et la caractérisation des mutants Cb et Br a constitué la majeure partie de mon travail de thèse.

Le promoteur de la protéine du prion a permis d'obtenir pour les deux modèles Br et Cb, une délétion restreinte au système nerveux sans délétion mesurable dans les tissus non neurologiques, par PCR en temps réel, Western Blot et Southern Blot. L'abréviation Br fait référence à une délétion étendue dans tout le système nerveux de ces mutants (« Brain », Br) et l'abréviation Cb fait référence à une délétion plus restreinte au cervelet (« Cerebellum »,

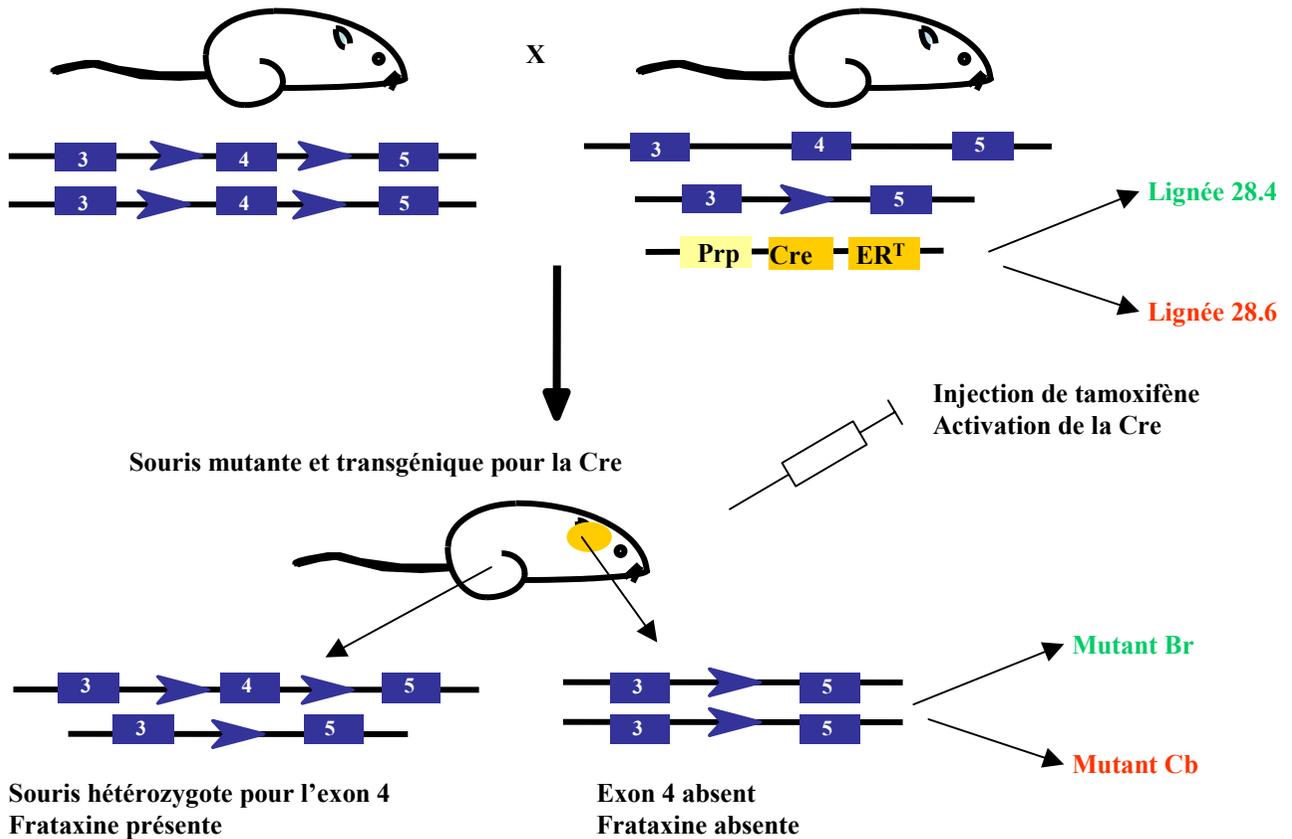


Figure 28 : Stratégie des croisements pour l'obtention des mutants conditionnels et inducibles Br et Cb

Une souris homozygote pour l'allèle L2 (présentant l'exon 4 entre 2 sites LoxP représentés par des flèches) est croisée avec un souris hétérozygote pour la délétion de l'exon 4 sur un allèle (+/L-) et exprimant la Cre. Les animaux +/L- expriment deux recombinaisons avec des profils d'expression distincts suite au croisement avec des animaux transgéniques pour la Cre (lignées 28.4 ou 28.6). Les souris mutantes issues de ce croisement (L2/L-;Prp-Cre-ER^T) sont injectées avec le tamoxifène à 4 semaines, pendant 5 jours consécutifs et présentent une absence de la frataxine dans les tissus exprimant la Cre.

Les souris mutantes exprimant la Cre spécifique de la lignée 28.6 et 28.4 sont nommées Cb et Br, respectivement.

Cb). Ces différents mutants (Fig.29) développent une atteinte neurologique progressive avec des altérations de la coordination, de l'équilibre (test du « rotarod ») et des troubles de la démarche (test du « footprint ») associés à une diminution progressive de l'onde réflexe sans atteinte motrice ou sensitive (électromyographie). Ces mutants peuvent donc être considérés comme « de bons modèles » de l'AF, la diminution de l'onde réflexe étant un point cardinal de la maladie. Une analyse anatomopathologique détaillée m'a permis d'attribuer ces différents symptômes à une atteinte du système nerveux central et du système nerveux périphérique, spécifiques de l'AF. Les lésions responsables sont localisées dans la moelle épinière et dans les larges neurones sensitifs des ganglions rachidiens (neurones proprioceptifs) conduisant finalement à une perte importante de neurones démontrée par une gliose et par la prolifération de collagène observée par microscopie électronique à des stades avancés (au-delà de 1 an) (Fig.30). On peut noter que dans les ganglions rachidiens, les anomalies histologiques observées dans les cellules proprioceptives des mutants Cb et Br sont différentes, conduisant respectivement à la présence de vacuoles et une importante désorganisation cytoplasmique (Fig.31a-b).

Des dégénérescences neuronales moins spécifiques de l'AF ont également été observées dans la moelle épinière et le cervelet. Ces atteintes peuvent être dues à la délétion totale de frataxine dans certains types neuronaux (par rapport aux patients), à une dégénérescence secondaire suite à une perte de connexions, à une réaction inflammatoire environnante suite à la perte de neurones voisins, ou à une combinaison de plusieurs phénomènes. Expérimentalement, il est difficile de conclure en raison de la non-spécificité de l'anticorps anti-frataxine pour certains neurones, du pourcentage de cellules délétées et non délétées, de la susceptibilité plus ou moins forte de certains neurones à l'absence de frataxine entraînant leur disparition plus ou moins rapide ou du travail sur coupe rendant difficile la détermination de la localisation exacte entre contrôle et mutant notamment sur la longueur de la moelle épinière. L'absence de frataxine dans les cellules granulaires a ainsi été montrée de façon indirecte par la mesure de l'expression au niveau protéique et ARNm, en parallèle d'une étude histologique détaillée démontrant le retour progressif de la frataxine à un niveau « normal » parallèlement à la disparition des cellules granulaires probablement délétées pour la frataxine. Le nombre réduit de types cellulaires dans le cervelet dont la plus grande proportion correspond aux cellules granulaires (ratio de 1 cellule de Purkinje pour 175 cellules granulaires, (Wetts and Herrup 1983)) présentant de plus, une absence de frataxine, rend ce tissu particulièrement intéressant pour des études plus approfondies des mécanismes de neurodégénérescence.

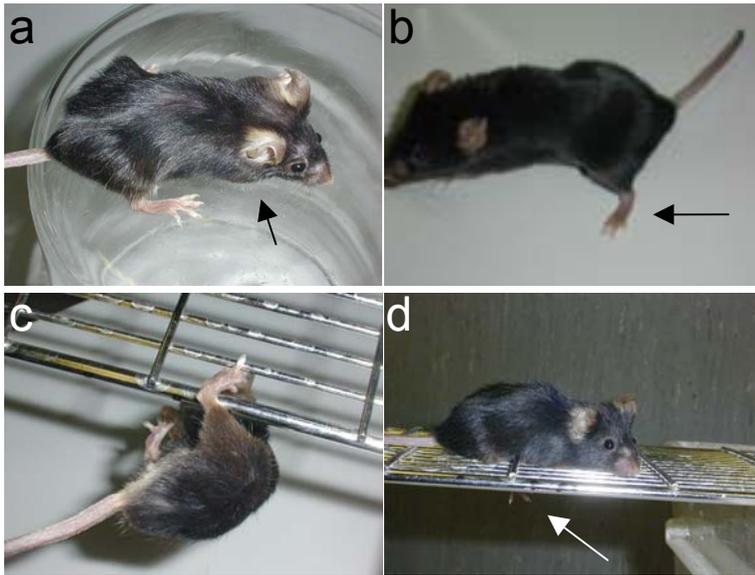


Figure 29 : Phénotype clinique d'une souris mutante Cb âgée de 34 semaines (soit 30 semaines après l'injection de tamoxifène)

a et b. Atteinte de la proprioception. a. La souris posée dans un nouvel environnement ne place pas ses pattes de façon réflexe dans une bonne position. La patte avant est placée sous son corps (flèche). b. Le manipulateur a déplacé la patte arrière de l'animal qui la maintient dans cette mauvaise position un temps supérieur à l'animal contrôle.

c et d. Défaut de coordination. c. La souris placée en bordure de la grille, accrochée par ses pattes avant éprouve beaucoup de difficultés à remonter sur la grille. d. Lorsqu'elle se déplace sur la grille, elle manque régulièrement les barreaux (flèche).

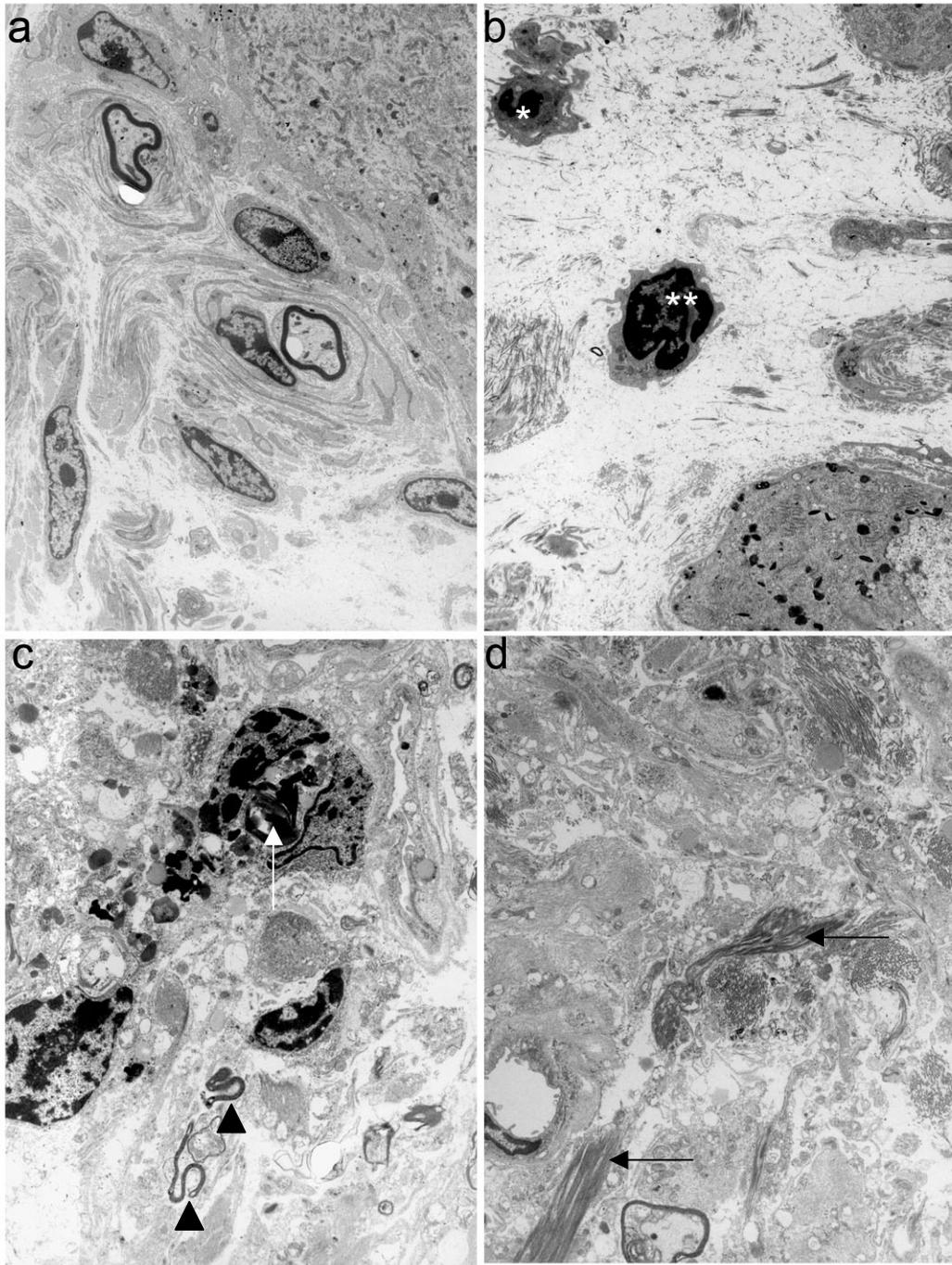


Figure 30 : Ganglions rachidiens et moelle épinière provenant de mutants Br et Cb âgés (>1 an) (microscopie électronique)

a-b. Ganglions rachidiens. a. Importante perte de cellules sensibles à 1 an chez un mutant Cb. Situation semblable à 18 mois chez un mutant Br avec la présence d'une inflammation. Noter la présence d'un macrophage (*) et d'un lymphocyte (**).

c-d. Moelle épinière (corne dorsale) d'un mutant Br à 2 ans démontrant un fort remaniement du tissu. c. Présence de zones de dégénérescence étendues avec une importante colonisation de lipofuscine et de dépôts d'aspect minéralisé (flèche blanche). Certains axones ont perdu toute structure (tête de flèche noire). d. Infiltrations de collagène mature (flèches noires).

1 cm = 2,8 µm pour a ; 2,2 µm pour b ; 1,5 µm pour c ; 1,8 µm pour d.

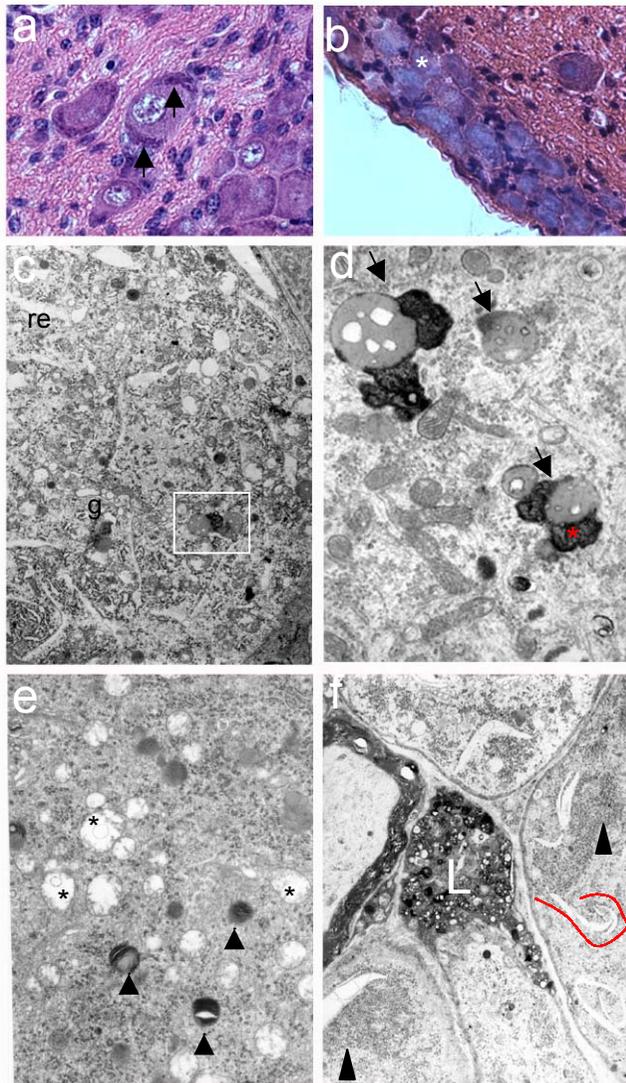


Figure 31 : Ganglions rachidiens des mutants Br

a-b. Coloration éosine hématoxyline (x 100). a. Ganglion rachidien à 40 semaines. Noter le corps de Nissl poussé en périphérie (flèche). b. Ganglion rachidien à 1,5 ans. De nombreuses cellules apparaissent « fantomatiques » et rétractées avec conservation de leur forme, trait nécrotique (étoile). c-f. Microscopie électronique d'un ganglion rachidien provenant d'un souris à 40 semaines. c. Le cytoplasme de ce neurone proprioceptif présente des mitochondries avec perte du matériel intramitochondrial, un appareil de Golgi (g) et un réticulum endoplasmique (re) gonflés. De plus, des structures autophagiques sont présentes (encadré). d. Agrandissement des corps lysosomiaux associés à des gouttelettes lipidiques. e. Vacuoles intramitochondriales (étoiles) et structures avec empilements de membrane correspondant à des mitochondries intralysosomales (têtes de flèches). f. Isolement de zones cytoplasmiques par le réticulum endoplasmique gonflé et rigidifié (trait rouge). Accumulation de lipofuscine, ici dans une cellule satellite. Noter aussi la perte de ribosomes du réticulum endoplasmique, repoussés en périphérie (têtes de flèches noires).

1 cm = 3,3 μ m pour c et f ; 1,5 μ m pour e.

Conclusions et perspectives

La technique du KO conditionnel et inductible a permis de développer les deux premiers modèles reproduisant les symptômes neurologiques progressifs de l'AF avec une atteinte restreinte au système nerveux. La délétion réalisée à 4 semaines permet de s'assurer d'un développement normal du système nerveux et conduit à l'apparition de symptômes progressifs qui sont développés par la souris dans un temps raisonnable (« de laboratoire ») avec les premiers symptômes neurologiques observés à 10 semaines après l'injection de tamoxifène (comme tous les âges mentionnés). Au contraire du modèle Frda/NSE dans lequel une dégénérescence spongiforme était observée quelques jours après la naissance dans le cortex, la neurodégénérescence observée dans ces deux nouveaux modèles est lente et progressive et des neurones sans frataxine sont encore détectés à 40 semaines autorisant la dissection des différentes étapes mécanistiques impliquées dans la mort neuronale.

Je me suis ensuite particulièrement concentrée sur la compréhension des mécanismes de dégénérescence dans le modèle Cb, modèle le plus sévèrement atteint (voir 4.2). Un tel modèle était également très attendu pour la réalisation d'essais thérapeutiques car la composante neurologique de l'AF est la plus invalidante. J'ai ainsi pu entreprendre un essai thérapeutique permettant d'évaluer l'effet de l'idébénone au niveau neurologique, difficilement démontrable chez les patients en raison de l'hétérogénéité des symptômes et de l'évolution (voir 4.3).

De plus, les délétions se produisant dans ces deux modèles permettent de couvrir différents types de neurones et peuvent être utilisés pour leur mise en culture dans le but de comprendre la sensibilité neuronale à l'absence de frataxine.

Plusieurs points restent encore sans réponse notamment au niveau des différences entre les deux lignées. Si l'absence de lésions dans les structures cérébrales du mutant Br (même à 2 ans) montrant pourtant une délétion importante est en accord avec l'absence de lésions majeures de ces tissus chez les patients, l'absence de lésions cérébelleuses est plus étonnante. En effet, le taux de délétion dans le cervelet entre les mutants Br et Cb est équivalent sans phénotype associé dans le mutant Br. Ces différences peuvent être dues à des expressions de la recombinaison dans des types cellulaires différents. En effet, d'après la caractérisation initiale des lignées transgéniques pour la Prp-Cre-ER^T 28.4 et 28.6, la lignée 28.4 démontre une expression préférentielle dans les cellules de Purkinje et la lignée 28.6 dans les cellules granulaires (Weber 2001). De même, le phénotype de dégénérescence des neurones proprioceptifs des deux lignées est différent avec la présence de vacuoles dans la

Dommages

P53/P73

Voies de signalisation

- Diminution d'ATP ou ADP
- Diminution de NAD(P)H
- Diminution de GSH
- Haute concentration en Ca²⁺
- Diminution du potentiel de membrane

Espèces oxygénées réactives

Céramides et Dérivés

Transcription et traduction de protéines homologues ou interagissant avec Bcl-2

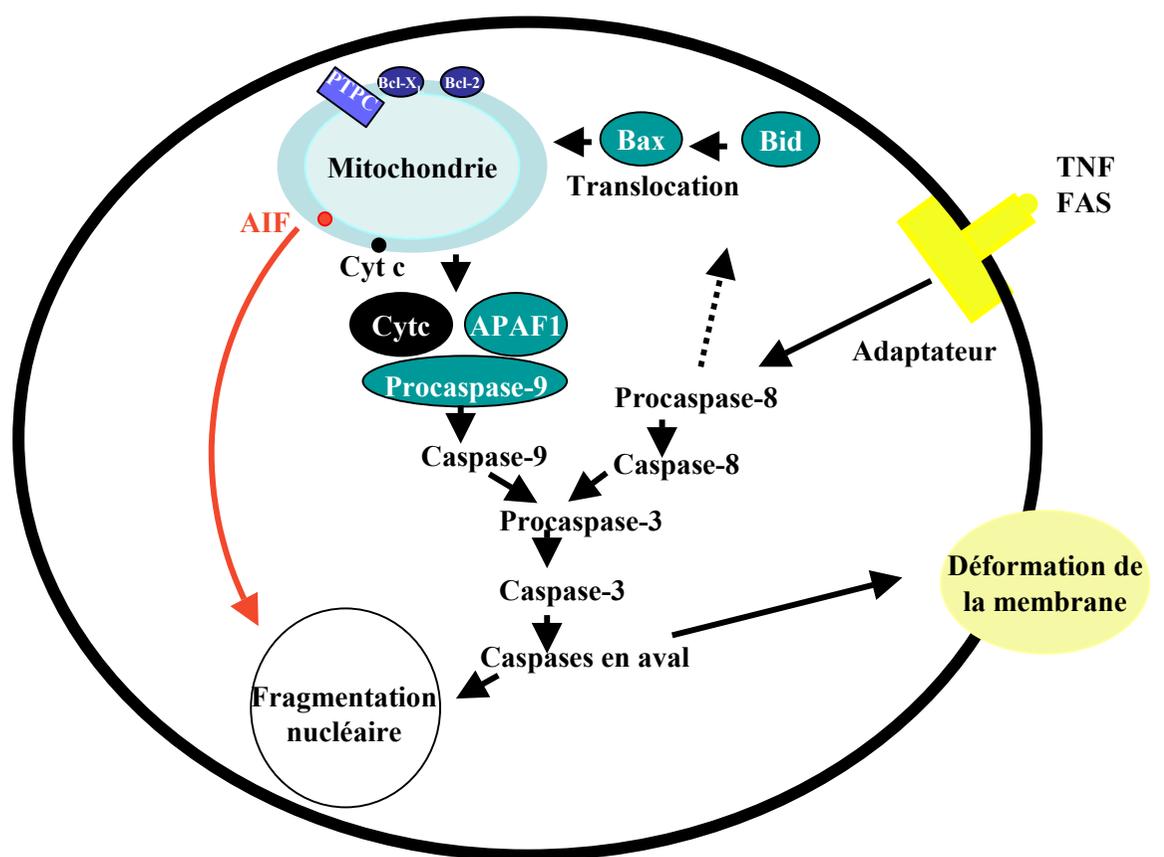


Figure 32 : Voies d'induction et d'exécution de l'apoptose

L'apoptose est induite par des dommages cellulaires variés ou par l'activation de voies de signalisation. Trois conséquences principales sont observées :

- la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale libérant ainsi le cytochrome c (cyt c). Celui-ci interagit avec Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) et la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome, permettant l'activation des caspases en aval
- l'activation primaire des caspases par les récepteurs de mort (Fas ou TNFR1), recrutant des molécules adaptatrices

Dans certaines circonstances, les deux voies peuvent se produire simultanément : la caspase 8 est en effet capable de cliver Bid et stimuler le relargage du cyt c.

Des protéines pro (Bax et Bak) ou anti-apoptotique (Bcl-2 et Bcl-xL) contrôlent la compartimentalisation du cyt c, favorisant ou empêchant respectivement, le relargage cytosolique.

lignée Cb associée à une diminution plus précoce de l'onde réflexe. Il semble que par immunohistologie moins de neurones sensitifs soient marqués dans les ganglions rachidiens des mutants Br, en accord avec la diminution plus tardive de l'onde H par électromyographie. Cependant, considérant les limitations techniques mentionnées plus haut, il est difficile d'attribuer l'absence de vacuoles dans les cellules proprioceptives à une participation des voies afférentes ou efférentes dans le mutant Cb ou encore à la dégénérescence des cellules environnantes plus importante.

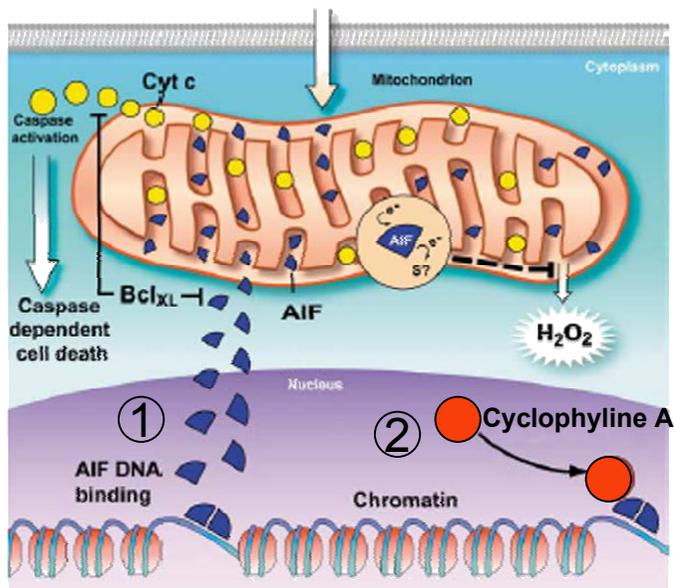
4.2) Un modèle d'étude de la neurodégénérescence

a) Introduction sur les mécanismes de mort neuronale

La plupart des maladies neurodégénératives se caractérise par une perte focale d'un groupe ou type de neurones mais les neurones subsistant présentent des morphologies variées au niveau de la forme ou taille du noyau ou du cytoplasme, de l'organisation et aspect des organelles et du corps de Nissl, de la vacuolisation du cytoplasme et de la condensation de la chromatine. Une étude classique datant de 1973 basée sur la morphologie ultrastructurale a permis de diviser la mort cellulaire en trois catégories (Schweichel and Merker 1973) : la mort cellulaire de type I ou apoptose, la mort cellulaire de type II ou autophagie et la mort cellulaire de type III ou nécrose. Les aspects morphologiques des neurones sont relativement différents et seront décrits ci-après mais il existe aussi des traits communs qui rendent parfois difficile la délimitation stricte entre ces 3 mécanismes dans les pathologies (Yuan 2003). Les approches ultrastructurales doivent pour cela être complétées par des mesures d'expression ou des marquages d'acteurs de ces mécanismes de mort cellulaire.

L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme hautement régulé, appelée aussi mort cellulaire programmée, essentiel pendant le développement mais intervenant aussi au cours de la vie pour éliminer des cellules en surnombre ou suite à des stress variés (Fig.32) (Lockshin and Zakeri 2004). La cellule se suicide en démantelant son cytosquelette, son ADN et sa production d'ATP. Au niveau morphologique, elle se caractérise par une condensation du cytoplasme et de la chromatine, son clivage et par une dégradation cellulaire sous la forme de vésicules multiples digérées par les macrophages ou les cellules environnantes. L'intégrité de



③ Fragmentation en larges fragments



Figure 33 : Mode d'action de AIF

Dans certaines conditions, AIF est libéré de la mitochondrie et redirigé vers le noyau où il se lie à l'ADN par des interactions électrostatiques. Il a été récemment démontré dans les cellules de mammifères que AIF coopérait ensuite avec la cyclophyline A, pour former un trimère ADN/AIF/Cyclophyline A avec une activité nucléase. L'ADN est ainsi clivé en larges fragments. Comme pour le cytochrome c (Cyt c), la fonction apoptotique de AIF ne dépend pas de ses fonctions oxydo-réductives (NADH oxydase).

La fonction physiologique de AIF (non-apoptotique) vient d'être élucidée : il est impliqué dans la maintenance et/ou la biogénèse du complexe I de la chaîne respiratoire (Vahsen 2004).

La libération de AIF, tout comme celle du cytochrome c peut être inhibée par la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L.

(D'après Lipton and Bossy-Wetzel 2002)

la membrane plasmique empêche l'action de facteurs qui pourraient entraîner à leur tour, la mort des cellules voisines ou une réponse inflammatoire.

L'apoptose se fait par deux voies principales (Fig.32) conduisant à l'activation des caspases, des protéases à sérine dont la caspase 3 est l'effecteur impliqué dans la phase de protéolyse finale (Haeberlein 2004). La caspase 3 activée permet en effet de cliver l'inhibiteur de la CAD (« caspase-activated DNase », DNase activée par les caspases), pouvant alors exercer son action de fragmentation oligonucléosomale et la condensation de la chromatine. La première voie fait intervenir des récepteurs membranaires de la mort cellulaire qui recrutent des molécules appelées « adaptateur » par des domaines spécifiques (« death domains »), comme le récepteur TNF (« Tumor Necrosis Factor ») de type I ou Fas, pouvant se lier directement aux caspases. La seconde voie implique la mitochondrie et la perméabilisation de la membrane externe provoquant un gonflement mitochondrial et la libération de molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c (cyt c) ou AIF (voir ci-dessous), de l'espace intermembranaire vers le cytosol. Le cyt c dirige alors la formation d'un apoptosome entraînant l'activation des caspases. Les mécanismes de perméabilisation externe ne sont pas totalement définis et deux mécanismes principaux ont été décrits impliquant uniquement la membrane externe par l'action directe de Bax et Bak (protéines de la famille Bcl-2,) ou avec une participation de la membrane interne impliquant au moins 6 protéines différentes formant un pore de perméabilisation (PTPM, pore de transition de la perméabilité mitochondriale) (voir discussion) (Green and Kroemer 2004). Un relargage du cyt c a également été décrit sans gonflement mitochondrial, c'est-à-dire sans ouverture du PTPM, par l'action de tBid, capable d'entraîner une restructuration des crêtes mitochondriales (Scorrano 2002, Kroemer 2004).

Apoptose caspase-indépendante

Depuis peu, une mort cellulaire programmée caspase-indépendante est aussi considérée puisque des inhibiteurs de caspases ou des KO des caspases mènent à une mort cellulaire de « type apoptotique ». Ainsi, de nouvelles molécules ont été identifiées comme AIF (apoptosis-inducing factor) et EndoG (endonucléase G), deux protéines mitochondriales localisées dans l'espace inter-membranaire. Leur translocation nucléaire induit la condensation périphérique et la fragmentation de l'ADN en larges fragments (50 paires de base), soit un aspect de la chromatine différent de l'apoptose classique, de façon caspase-indépendante mais aussi caspase-dépendante au même titre que le cyt c (Penninger and

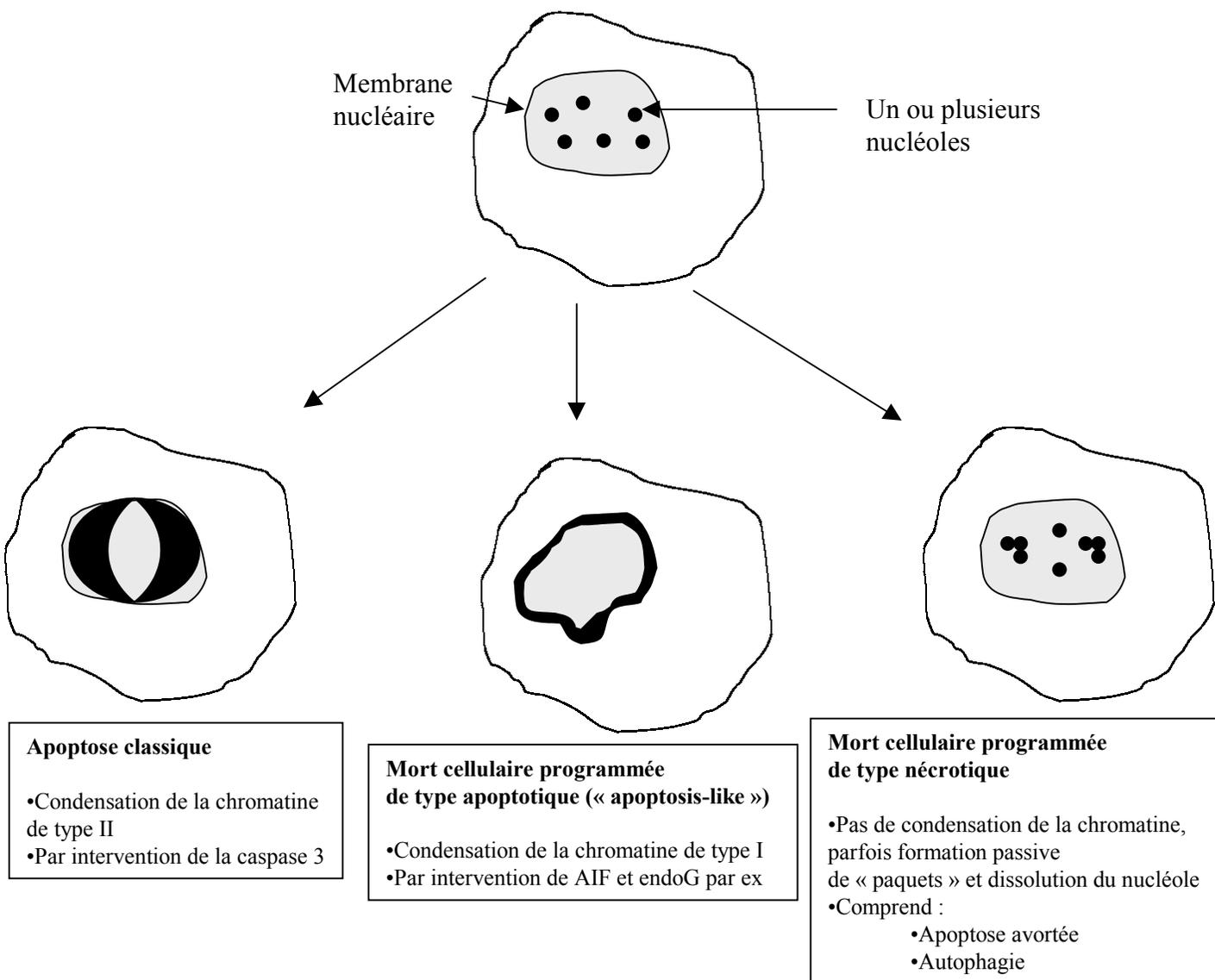


Figure 34 : Distinction des différents types de mort cellulaire en fonction de l'état de condensation de la chromatine

L'apoptose classique entraîne une compaction et un clivage de l'ADN générant deux grosses masses sphériques à la périphérie du noyau. La mort programmée caspase-indépendante mène à une chromatine localisée en périphérie de la membrane nucléaire. Dans les morphologies nécrotiques, aucune condensation de la chromatine n'est observée.

(D'après Jäättelä and Tschopp 2004)

Kroemer 2003, Cande 2004a). Chez *C. elegans* leur translocation est couplée. Dans les cellules de mammifères, seul AIF est dirigé vers le noyau où il se lie à l'ADN et induit son clivage en interagissant et coopérant avec la cyclophiline A, devenant ainsi une DNase active (Fig.33) (Cande 2004b). AIF est une flavoprotéine possédant également une fonction NADH oxydase indépendante de sa fonction pro-apoptotique (Hong 2004). Sa fonction physiologique a été découverte très récemment démontrant un rôle dans la maintenance et/ou la biogénèse du complexe I de la chaîne respiratoire (Vahsen 2004).

De plus en plus d'études *in vitro* et *in vivo* démontrent l'implication de la translocation nucléaire de AIF dans la mort cellulaire, notamment i) lors d'une diminution d'ATP entraînant alors une cytolysse finale non-apoptotique (Daugas 2000), ii) par l'action de différentes protéines pro-apoptotiques (céramides, la staurosporine, c-Myc ...) (Daugas 2000), iii) dans des conditions d'ischémie/hypoxie chez le rat (Zhu 2003), iv) d'infection par HIV-1 (Cande 2004a), v) par la cathepsine D (Jäättelä 2004) ou vi) par le stress oxydatif (via des agents neurotoxiques) (Fonfria 2002, Zhang 2002). Concernant ce dernier point, il a été en effet démontré que des dommages de l'ADN pouvait induire la translocation de AIF via la suractivation de PARP-1 (poly-ADP ribose synthétase) impliquée dans la réparation de l'ADN par l'excision de bases (Yu 2002, Hong 2004) ou via P53 (Cregan 2002).

La nécrose

La nécrose est considérée la plupart du temps, comme une mort « non intentionnelle », conduisant au gonflement des mitochondries, du réticulum endoplasmique, et autres organites, générant des espaces vides (pouvant fusionner) dans le cytoplasme suivi d'une destruction de l'ADN, d'une précipitation des macromolécules et d'une perte de l'intégrité membranaire. La nécrose est induite suite à des stress d'origines variées : une hypoxie, des agents toxiques, un traumatisme mécanique, la présence de stress oxydatif ... Le gonflement des organelles et du cytoplasme révèle une perte du contrôle de l'équilibre ionique, entraînant l'entrée d'eau et la lyse cellulaire conduisant ainsi à la libération de composants cellulaires et à une réaction inflammatoire. Le terme de nécrose est souvent utilisé dans la littérature pour définir toute mort cellulaire non identifiée.

Certaines classifications basées sur l'état de condensation de la chromatine distinguent en fait trois types de mort cellulaire : l'apoptose classique, la mort cellulaire programmée de type apoptotique et la mort programmée de type nécrotique (Jäättelä and Tschopp 2004). Cette classification sous-entend qu'il y a au moins deux types de nécrose : la nécrose

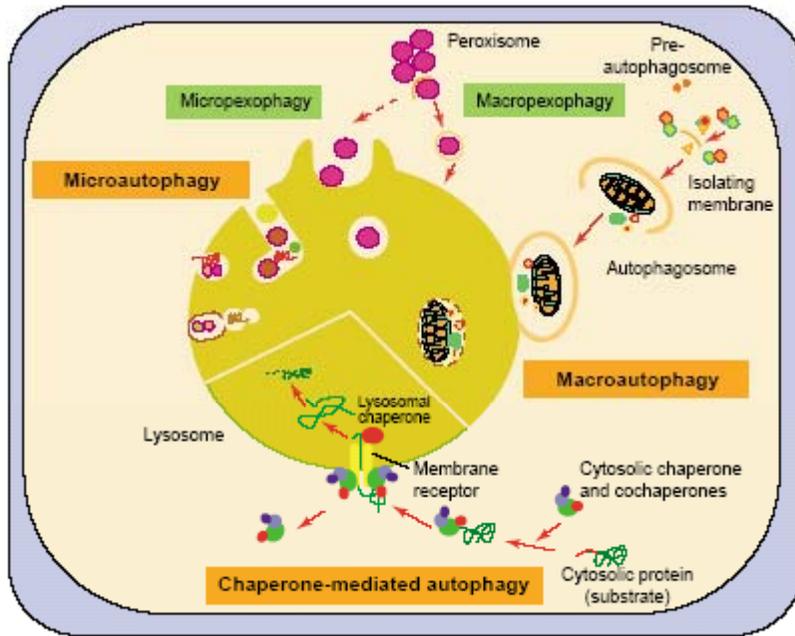


Figure 35 : Différents types d'autophagie dans les cellules de mammifères

Trois types d'autophagies existent : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines « chaperones ». Les peroxisomes sont dégradés par une voie spécifique appelée la macropexophagie. La micropexophagie est uniquement décrite chez la levure.

Les échelles ne sont respectées pour permettre la visualisation de l'autophagie médiée par les protéines « chaperones » démontrant la participation de protéines de la membrane lysosomale pour permettre l'internalisation du substrat.

La macroautophagie comprend d'abord l'isolement de cytoplasme par des membranes d'origine non déterminée (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi proposés), formant des autophagosomes puis la dégradation du contenu se fait par fusion avec les lysosomes préexistants. Ces derniers déversent leurs enzymes (hydrolases acides) permettant de dégrader le contenu de l'autophagosome, formant ainsi un autophagolysosome actif.

(Schéma issu de « TRENDS in Cell Biology », Cuervo 2004)

« accidentelle » et la nécrose suite à un avortement d'un mécanisme apoptotique ou à un mécanisme autophagique (Fig.34). En effet, dans certains cas, les auteurs décrivent un engagement des voies d'apoptose aboutissant finalement à une nécrose (Lockshin and Zakeri 2004). Un facteur clé déterminant un destin nécrotique ou apoptotique semble être le niveau d'ATP de la cellule (Nicotera 2000). L'apoptose est en effet un mécanisme nécessitant de l'énergie à différents niveaux (par exemple lors de l'activation de l'apoptosome par la pro-caspase 9) et un rapide déclin énergétique favorise donc plutôt une mort par nécrose (Leist 1997, Leist 1999).

L'autophagie

L'autophagie est avant tout un mécanisme physiologique permettant le renouvellement de macromolécules et des organelles, notamment des mitochondries, mais est aussi stimulée dans différentes conditions de stress comme une déprivation en acides aminés, une modification du volume cellulaire, un stress oxydatif, l'accumulation de protéines avec une altération conformationnelle ou d'organelles endommagés, un signal hormonal ou une exposition à des agents toxiques (UV, agents xénobiotiques...) (Reggiori and Klionsky 2002). Trois catégories d'autophagie sont décrites, la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines « chaperonnes » et la macroautophagie qui est la principale voie autophagique dans la cellule, plus communément appelée, par abus de langage, l'autophagie (Fig.35) (Meijer and Codogno 2004, Massey 2004). La macroautophagie ou l'autophagie est un mécanisme de dégradation vacuolaire, débutant à partir de membranes dont l'origine est inconnue, délimitant un compartiment appelé l'autophagosome, séquestrant des portions du cytoplasme. Les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes dont les enzymes (hydrolases acides) participent à la dégradation du contenu de la vacuole autophagolysosomale formée (Marino and Lopez-Otin 2004). L'autophagie conduit de façon ultime à l'accumulation de matériel non digérable, la lipofuscine composée de lipides, protéines, carbohydrates et traces de métaux (fer essentiellement), qui résulte d'une oxydation intensive réalisée au sein du compartiment lysosomal notamment par le biais du fer contenu dans les macromolécules dégradées (Brunk and Terman 2002, Terman and Brunk 2004). Si l'implication d'une augmentation de l'activité lysosomale a été décrite dans les maladies neurodégénératives depuis de nombreuses années (Nixon and Cataldo 1995), l'autophagie n'a été associée avec des maladies neurodégénératives que récemment (Petersen 2001). La régulation de l'autophagie semble très complexe et hautement régulée mais a été surtout étudiée chez la

levure (Ohsumi 2001), expliquant l'absence de marqueurs permettant des études plus approfondies dans les cellules de mammifères. Ainsi, le seul marqueur strict d'autophagie disponible à ce jour (pour les mammifères) est un anticorps dirigé contre LC3, une protéine contenue dans la membrane des autophagosomes (Kabeya 2003).

Délimitation entre les différents types de mort cellulaire

La délimitation entre les différents types de mort cellulaires est très difficile et il y a beaucoup plus de connexions entre ces mécanismes que celles généralement reconnues. J'aborderai ce point également dans la discussion. Ainsi, des neurones en nécrose et en autophagie démontrent également une ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (Lemasters 1998a et b, 2002). De plus, des neurones en nécrose peuvent présenter des marques d'apoptose (Bonetti 1997, Wyllie 1998) ou inversement, les cellules apoptotiques qui sont normalement éliminées par phagocytose, peuvent subir une nécrose secondaire (Sperandio 2000). Par ailleurs, des cellules peuvent être protégées d'une nécrose proche, par bcl-2 (Kroemer 1998). Ainsi, bcl-2 considérée comme une molécule anti-apoptotique serait un protecteur cellulaire plus général où la nécrose et l'apoptose partageraient des étapes mécanistiques. Il a également été montré que certaines caspases pouvaient induire la nécrose (Syntichaki and Tavernarakis 2003). Enfin, l'autophagie peut être induite avant une apoptose pour réduire le volume cytoplasmique (Lockshin and Zakeri 2004), tout comme l'apoptose peut entraîner une induction de l'autophagie soit par une diminution du potentiel de membrane de la mitochondrie (Lemasters 2002) soit là encore, par la participation d'acteurs communs aux deux voies (Xue 1999).

Les enzymes lysosomales, les cathepsines, font partie des acteurs connus partagés par les différents types de mort cellulaire. Une fois relarguées dans le cytosol, suite à différents stimuli (P53, radicaux libres, via une activation des récepteurs TNF ...), ce sont en effet des signaux de mort cellulaire. Ainsi les cathepsines B, D, L participent à la mort apoptotique caspase-dépendante, caspase-indépendante, à l'autophagie et à la nécrose. Dans le cas de l'apoptose classique, les cathepsines agissent en amont ou en aval des caspases, selon le type cellulaire ou le stimulus (Jäättelä and Tschopp 2003). Par ailleurs, le relarguage de AIF caspase-indépendant peut être induit par une activation de Bax suite à l'intervention de la cathepsine D (mécanisme inconnu) (Jäättelä 2004). Cependant, hormis l'étape de dégradation par fusion des lysosomes et des autophagosomes, le rôle des cathepsines dans l'exécution de la mort par autophagie n'est pas connu (voies de signalisation dans le cytosol).

Il semble donc en réalité que la plupart du temps, plusieurs voies de mort cellulaire soient activées en parallèle avec une participation, dans les trois types de mécanismes, des mêmes organelles incluant la mitochondrie, les lysosomes et le réticulum endoplasmique (non détaillé ici).

b) Mécanisme autophagique dans les neurones proprioceptifs des ganglions rachidiens des mutants Br et Cb – publication 3

L'activation d'un processus autophagique a été observé par étude ultrastructurale dans les cellules proprioceptives des deux lignées mutantes Br et Cb. Une étude cinétique ultrastructurale particulièrement détaillée a été réalisée pour le mutant Cb me permettant de déterminer l'origine des vacuoles, dérivant de membranes issues du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi. Des structures autophagiques multi-vésiculaires associées à des altérations mitochondriales et à une augmentation du nombre de lysosomes, ont aussi été observées dans les ganglions rachidiens des mutants Br à partir de 20 semaines mais aucune structure typique de macroautophagie n'a été observée (Fig.31c-f). Ces processus conduisent finalement à une accumulation de lipofuscine. En plus de la lipofuscine, les cellules proprioceptives des mutants Cb présentent plus tardivement des dépôts de structure cristalline qui remplissent totalement les vacuoles autophagiques.

Nous avons proposé que dans notre modèle, l'activation de l'autophagie permet initialement de protéger les neurones de l'accumulation de mitochondries défectueuses suite au défaut de biosynthèse des noyaux Fe-S. Les mitochondries avec un potentiel de membrane diminué ou produisant des radicaux libres sont en effet éliminées préférentiellement par séquestration autophagique (de Grey 1997, Lemasters 1998a et b, Lockshin et Zakeri 2004). Puis, l'importante dégradation de mitochondries particulièrement riches en fer (cytochromes, noyaux Fe-S) conduit finalement à l'accumulation de matériel non digérable et à un essoufflement de la dégradation lysosomale (Brunk and Terman 2002).

c) Mécanisme caspase-indépendant avec participation autophagique dans le cervelet des mutants Cb – publication 4

Etude ultrastructurale dans le cervelet des mutants Cb, coexistence de traits correspondant aux trois mécanismes de mort neuronale

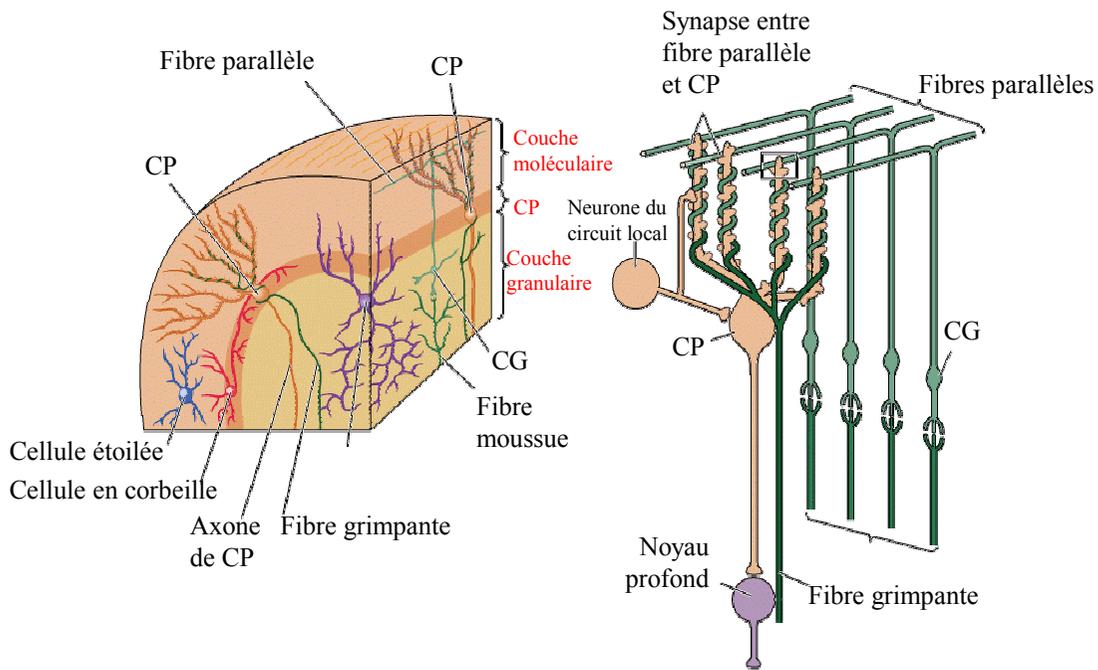


Figure 36 : Organisation du cervelet

Le cortex cérébelleux comprend 4 types majeurs de neurones : les cellules granulaires (CG), les cellules de Purkinje (CP) et deux catégories d'interneurones (inhibiteurs), les cellules de Golgi et les cellules étoilées/en corbeille. Les informations arrivent au cervelet par les fibres moussues et grimpantes. Les fibres moussues en provenance de la moelle épinière et du tronc cérébral innervent les CG, seules cellules excitatrices, et les fibres grimpantes issues de l'olive inférieure innervent les CP. Les CP constituent la seule efference du cervelet. Leurs ramifications atteignent les noyaux cérébelleux et certains noyaux du tronc cérébral.

Dans le cervelet des mutants Cb, un gonflement mitochondrial progressif des cellules granulaires, associé à un gonflement cytoplasmique, constitue la première lésion observée. L'analyse ultrastructurale nous a permis de montrer l'absence de lésions à cet âge, au niveau des fibres ascendantes, des fibres descendantes et des cellules de Purkinje (Fig.36). Le gonflement des mitochondries est ensuite associé à la présence de dépôts appelés les « dépôts floconneux » provenant de la désintégration du contenu protéique des mitochondries, décrits comme étant le point de non retour de la nécrose. D'un autre côté, certaines cellules présentent une chromatine périphérique, décrite dans certains types d'apoptose non classique (Zhang 2002), et de rares cellules avec une condensation importante de la chromatine sans dégradation finale par la formation de vésicules. Par ailleurs, la présence de structures autophagiques difficilement appréciables en raison de l'importante extraction de matériel dans le cytoplasme des cellules granulaires, la présence de nombreuses structures autophagiques dans le neuropil et l'accumulation de lipofuscine observée à la fois dans certaines cellules granulaires et dans le neuropil, impliquent une activation des processus autophagiques.

Des caractéristiques correspondant aux trois types de mort cellulaires ont ainsi été observées avec une exécution finale semblant être de type nécrotique. Nous avons proposé que les mécanismes initiaux pouvaient être de type apoptotique jusqu'à un niveau seuil d'ATP (par la diminution de l'activité de la chaîne respiratoire), où la nécrose est alors enclenchée, une fois l'activité de la chaîne respiratoire diminuée plus intensément. L'autophagie peut dans un premier temps, comme dans les neurones proprioceptifs, participer à l'élimination des mitochondries défectueuses. Une induction primaire de l'autophagie est en accord avec l'absence d'apoptose classique car la séquestration des mitochondries défectueuses permet de limiter le relargage cytosolique du cyt c (Lemasters 2002).

Précision de la mort cellulaire dans le cervelet par étude d'expression

La progression de la mort cellulaire dans le cervelet est un atout majeur du modèle Cb et a permis de réaliser une étude cinétique de l'expression des caspases à la fois initiatrice (caspase 9, qui intervient après le relargage du cytochrome c pour former l'apoptosome) et effectrices (caspases 7 et 3) démontrant une absence d'activation de ces caspases suggérant un mécanisme de mort neuronale caspase-indépendant (par Western Blot et marquages immunohistologiques).

Au contraire, une activation des processus autophagiques a été démontrée par l'augmentation de l'expression de différentes enzymes lysosomales (cathepsines B,D,L) (RT-PCR en temps réel) et du marqueur d'autophagosomes LC3 (par Western Blot).

c) Conclusions et perspectives

Le modèle Cb m'a permis de réaliser une étude de la progression des mécanismes de mort cellulaire dans deux types de neurones : les neurones proprioceptifs des ganglions rachidiens et les cellules granulaires du cervelet. L'ensemble de ces données démontre dans le cervelet et dans les ganglions rachidiens (tunnel négatif) la présence d'une mort neuronale caspase-indépendante avec activation de l'autophagie. Des différences notables ont cependant été mises en évidence dans les différents types neuronaux étudiés, comme un gonflement mitochondrial limité aux cellules granulaires et la présence de dépôts minéralisés à un stade avancé de la dégénérescence des neurones proprioceptifs. La détermination de la composition de ces dépôts permettrait d'apporter des informations importantes en fonction par exemple du contenu en fer ou en protoporphyrines (Zn-protophyrine ou Fe-Protoporphyrine), d'autant plus qu'un rôle de la frataxine dans la biosynthèse de l'hème est suspecté (Lesuisse 2003, Yoon and Cowan 2004). Il est possible que l'absence de mitochondries gonflées soit due à une élimination plus efficace de ces organelles dans les neurones proprioceptifs suite à un défaut plus marqué, en accord avec la dégénérescence primaire de ces neurones chez les patients.

La précision des mécanismes de neurodégénérescence est en cours de réalisation. En effet, la chromatine périphérique observée dans les cellules granulaires associée à l'absence d'induction des caspases est typique de l'action de AIF. De plus, de façon intéressante, une translocation nucléaire de AIF a été observée dans des cellules en nécrose, en condition de diminution d'ATP (Daugas 2000). J'ai débuté un projet de mise en culture des cellules granulaires afin d'observer la réponse primaire de AIF suite à l'absence de frataxine provoquée par l'ajout de tamoxifène dans le milieu de culture. La mesure du niveau d'ATP pourra être réalisée.

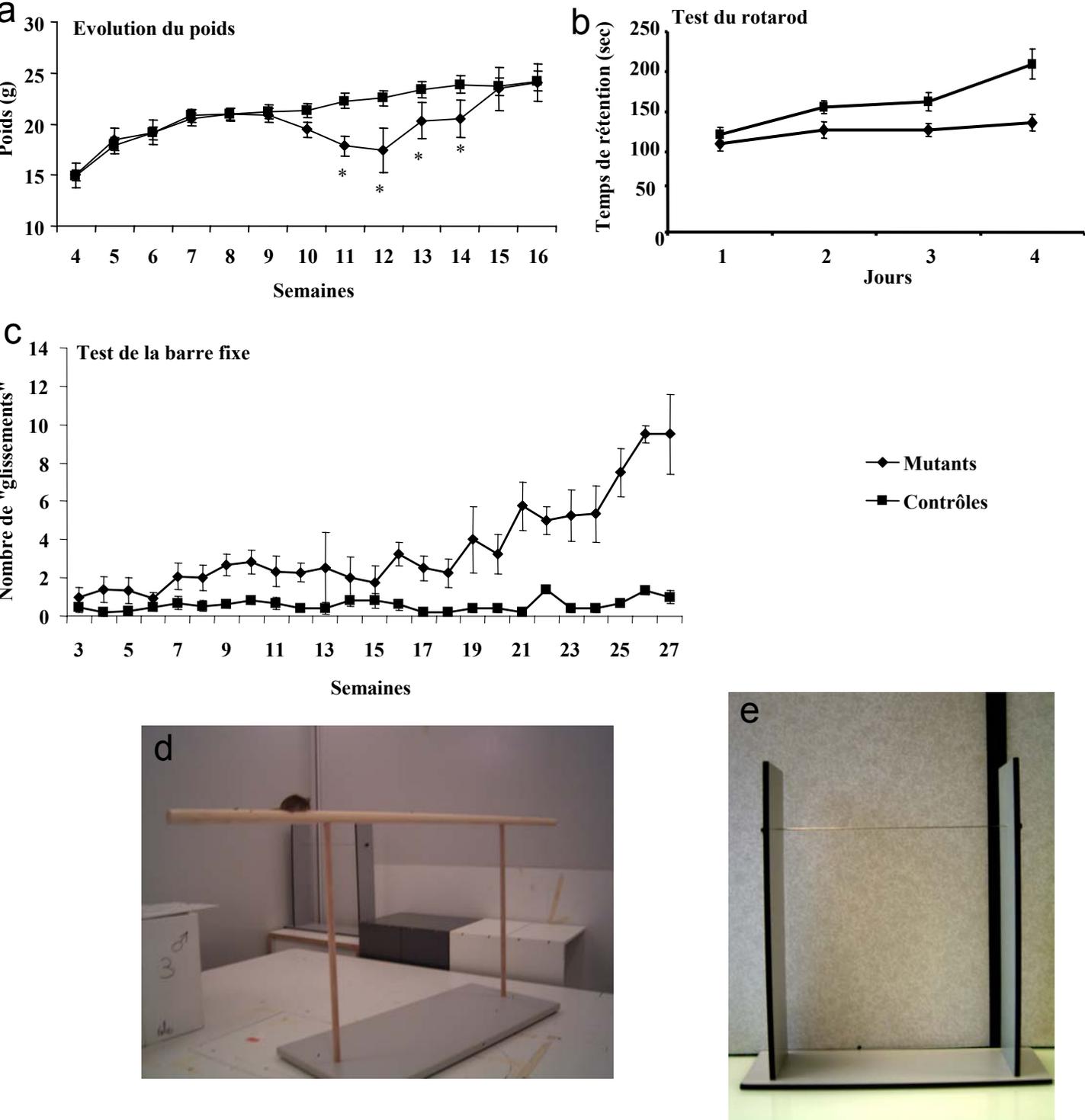


Figure 37 : Mutants Cb injectés à 2 semaines, poids et analyse comportementale

Les semaines indiquées sur les graphiques correspondent à l'âge réel des souris.

a. Une différence significative du poids est observée à partir de la semaine 11.

* $p < 0,05$ (Test de Student Newman Keuls) ($n > 20$ pour les contrôles, $3 < n < 10$ pour les mutants avec 3 souris au-delà de la semaine 12).

b. Test du rotarod par accélération réalisé pendant 4 jours, à 7 semaines (5 semaines après l'injection), démontrant une différence significative de la performance ($p < 0,001$) (temps de rétention sur le cylindre) et de la progression ($p < 0,05$) ($n = 8$).

c. Test de la barre fixe réalisé à partir de 3 semaines. Une différence significative est observée à partir de la semaine 7 ($n = 17$).

d. Test de la barre fixe, « fixed bar test ».

e. Test du « fil métallique », « string test ».

4.3) Essai thérapeutique sur le modèle Cb

a) Importance de ce modèle pour la réalisation d'essais thérapeutiques

L'importante variabilité des symptômes neurologiques et de leur progression chez l'homme empêche la constitution de groupes homogènes de patients pour des essais cliniques. De plus, l'évaluation d'un effet neurologique est délicate car si un effet placebo ne peut probablement pas agir sur la mesure des paramètres échocardiographiques, il peut participer à une apparente amélioration des symptômes neurologiques. L'idébénone entraîne également une diminution de la fatiguabilité qui peut aussi avoir un effet bénéfique sur certains signes comme la parole. La réalisation d'essais thérapeutiques sur des modèles murins est donc essentielle, ceux-ci présentant tous une mutation identique dans un fond génétique identique et sont élevés dans un même environnement. Il est maintenant admis que la fonction de la frataxine dans les cardiomyocytes et les neurones est identique, et il n'y a donc pas de raison de penser que l'idébénone fonctionnerait dans un seul de ces types cellulaires. La structure hydrophile de l'idébénone doit lui permettre de traverser la barrière hémato-encéphalique.

b) Mise au point des conditions de l'essai thérapeutique

Le modèle Cb est obtenu par injection du tamoxifène à 4 semaines conduisant à l'apparition des premiers symptômes détectables par le test du rotarod 10 semaines après l'injection de tamoxifène. J'ai ainsi réalisé des injections de tamoxifène plus précoces, à 1, 2 et 3 semaines, afin de déterminer si l'apparition des premiers symptômes pouvait être avancée par commodité quant à la durée de l'essai thérapeutique. L'injection à 1 semaine conduit à une importante létalité des animaux contrôles et mutants se produisant en général après les 5 jours d'injection de tamoxifène. Par contre, les souris supportent les injections réalisées à 2 et 3 semaines, ce qui nous a conduit à opter pour une injection 2 semaines. Les souris démontrent une perte de poids significative à partir de 10 semaines après injection (5g +/- 1g) (Fig.37a). On distingue en réalité deux groupes de mutants : le premier groupe présente une importante chute de poids et a une espérance de vie de 11,4 semaines +/- 2 semaines, le second groupe après une plus légère perte de poids au même âge, reprend le dessus et a une survie normale. De plus, la caractérisation histologique a démontré une apparition avancée de la perte notable de cellules granulaires d'environ 10 semaines par rapport aux souris injectées

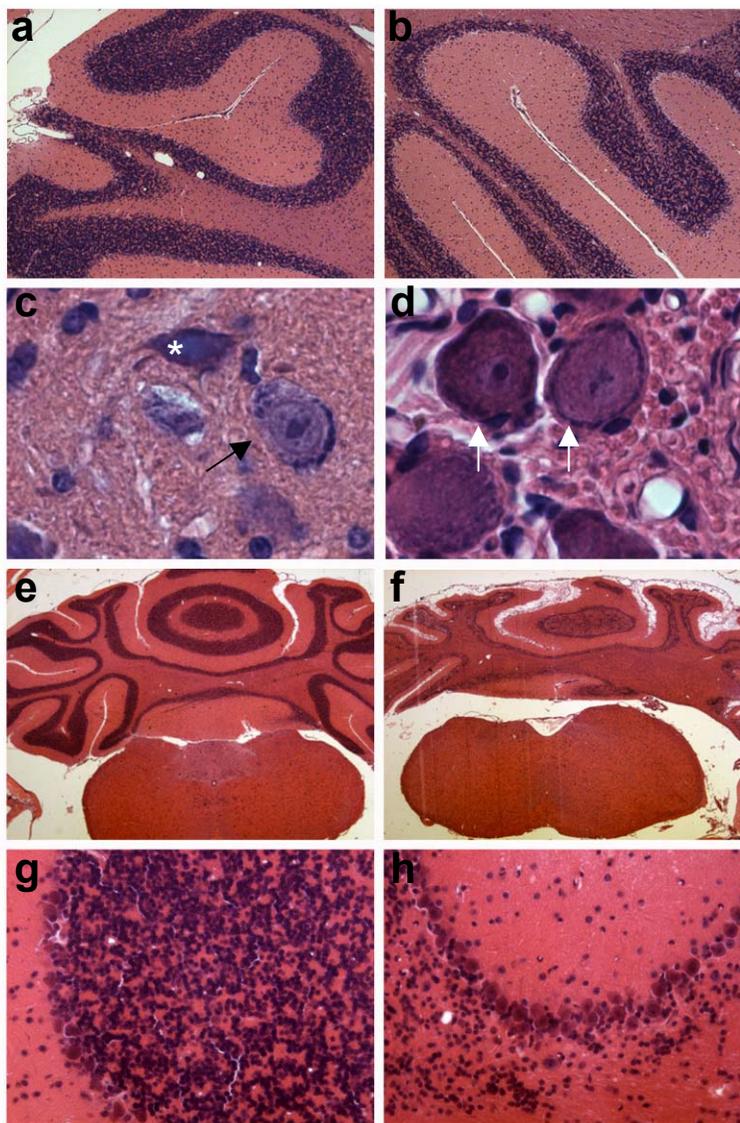


Figure 38 : Caractérisation des souris Cb injectées à 2 semaines (coloration éosine hématoxyline)

a-b. a. Cervelet d'un animal contrôle, 10 semaines après l'injection de tamoxifène. b. Cervelet du mutant Cb correspondant présentant une perte de cellules granulaires déjà visible. (x 10)
 c-d. Ganglions rachidiens à 10 semaines après injection (x 100). c. Présence de neurones en chromatolyse (*) et avec une désorganisation du corps de Nissl (flèche noire). d. Neurones avec corps de Nissl en périphérie cytoplasmique (flèches blanches).
 e-h. Cervelet de souris contrôles et mutantes à 30 semaines après injection. e. Contrôle (x 5). f. Mutant (x 5) avec une atrophie évidente du cortex cérébelleux. g. Agrandissement de la couche granulaire et des cellules de Purkinje (x 40). h. Perte importante de cellules granulaires sans diminution évidente du nombre de cellules de Purkinje (x 40).

à 4 semaines (Fig.38). En effet, la diminution du nombre de cellules granulaires est visible déjà à 10 semaines après l'injection.

J'ai ensuite déterminé de nouveaux tests comportementaux pouvant être réalisés chaque semaine sans que les souris s'y habituent, c'est-à-dire ne demandant pas un effort d'apprentissage important. Le test de la barre fixe s'est révélé être particulièrement adapté car il permet une bonne évaluation de la coordination avec un effort demandé moindre consistant uniquement en un déplacement. Il est constitué d'une barre fixe circulaire de 1 m de long, 2 cm de diamètre, située à 50 cm du sol (Fig.37d) sur laquelle les souris se déplacent. Le nombre de fois qu'une souris laisse glisser une de ses pattes en se déplaçant sur ce trajet de 1m est noté. Ce test a d'abord été réalisé sur des souris mutantes et contrôles injectées à 2 semaines (n=17). Une différence significative est observée à partir de 7 semaines, soit 5 semaines après l'injection de tamoxifène (Fig.37c). En accord avec les deux groupes déterminés d'après l'espérance de vie, les points apparaissant comme non significatifs à 13, 14 et 15 semaines sont dus à la mort des souris les plus sévèrement atteintes. Le deuxième groupe démontre une performance diminuée de façon significative au-delà de la semaine 15. En accord avec ces résultats, le test du rotarod réalisé à 7 semaines démontre une différence significative entre contrôles et mutants (Fig.37b).

Le string test utilisé en routine à l'ICS (Institut clinique de la souris, Strasbourg) a également été sélectionné. Celui-ci comporte un fil métallique rigide placé à 40 cm du sol sur lequel les souris s'attachent avec leurs deux pattes avant (Fig.37e). Le temps mis par les souris pour s'accrocher en remontant les pattes arrières est noté, permettant une évaluation de la coordination.

c) Essai thérapeutique et résultats préliminaires

La dose testée d'idébénone incorporée à la nourriture correspond à la dose ayant montré un effet positif sur le phénotype cardiaque des souris *Frda/MCK*, soit 90 mg/kg/jour. L'essai thérapeutique a été réalisé en double-aveugle en collaboration avec l'ICS. J'ai réalisé les injections de tamoxifène à 2 semaines, débuté le traitement à partir de la 3^{ème} semaine puis transféré régulièrement les souris au service de comportement. Le test du rotarod, le test de la barre fixe, le string test et les mesures électromyographiques des ondes motrices, sensitives et réflexes ont été réalisées chaque semaine, à partir de 4 semaines (soit une semaine après le début du traitement), pendant 10 semaines. Nous avons initialement prévu 15 souris mutantes

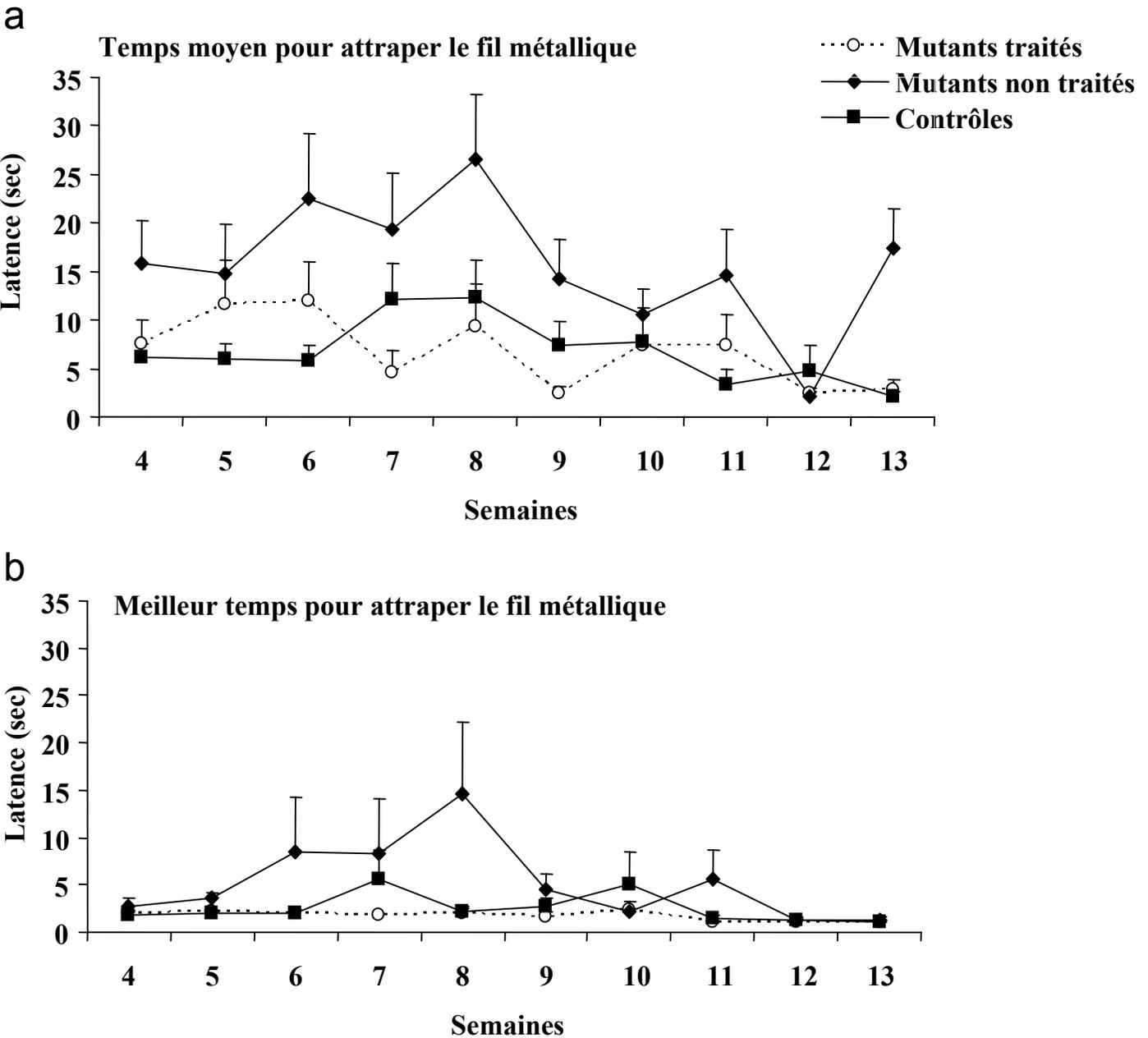


Figure 39 : Effet positif de l'idébénone sur la performance réalisée au test du fil métallique (string test)

Les semaines indiquées sur les graphiques correspondent à l'âge réel des souris.

Le test est réalisé chaque semaine.

a. Temps moyen (sur les 3 essais réalisés) pour attraper le fil métallique.

Différence significative entre mutants traités et non traités par ANOVA répétée sur les 6 et 8 premières semaines de test, $p < 0,05$ (Test de Student Newman Keuls).

b. Meilleur temps pris en compte (sur les 3 essais).

Différence significative entre mutants traités et non traités par ANOVA répétée sur les 8 premières semaines de test, $p < 0,05$ (Test de Student Newman Keuls).

traitées à l'idébénone, 15 souris mutantes non traitées et 30 souris contrôles avec, par portée un minimum d'une souris dans chaque cas de figure.

Parmi tous les paramètres testés, seul le string test démontre une différence significative entre mutants Cb traités et non traités par mesure ANOVA répétée durant les 8 premières semaines de test (Fig.39). La mort de nombreuses souris pendant la première semaine de test (1/3) a réduit considérablement le nombre d'animaux par groupe. Ainsi, l'expérimentateur n'a pas pu retrouver la différence significative que j'avais mise en évidence entre souris contrôles et mutantes par le test de la barre fixe. Les mesures électromyographiques démontrant une grande variabilité pour les souris mutantes et contrôles n'ont pas été prises en compte. Le rotarod réalisé chaque semaine entraîne, comme suspecté, une habitude des souris et n'a pas permis d'observer dans ces conditions de différences entre animaux mutantes et contrôles.

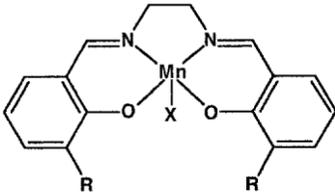
En conclusion, ces résultats sont tout de même très encourageants puisque malgré la perte importante d'animaux, les mutants traités réalisent une meilleure performance de « string test » statistiquement significative sur une période de 6-8 semaines. L'idébénone semblerait donc avoir un effet positif sur les symptômes neurologiques de l'AF. Il est donc possible que chez les patients, l'idébénone ralentisse la progression des symptômes, difficilement mesurable. Il est aussi fort probable que l'amélioration notable de la voix et des mouvements fins observée chez certains patients soit due à un effet positif de l'idébénone. Ces résultats soulignent également la similarités des mécanismes impliqués en l'absence de frataxine dans le système nerveux et le cœur. Par ailleurs, il semble que l'action de l'idébénone puisse être de relative longue durée. Le décalage d'une semaine observée dans le cœur serait donc essentiellement dû à la sévérité du phénotype cardiaque et non à une action ponctuelle de l'idébénone. Ces résultats étant très préliminaires et en raison de la perte de nombreux animaux, un nouvel essai est sur le point d'être relancé.

5) Apport des modèles dans la compréhension de la fonction de la frataxine – publication 4 et 5

5.1) Absence de stress oxydatif

Le fer s'accumule secondairement dans le cœur des mutants Frda/MCK et aucune augmentation significative du nombre de neurones présentant une accumulation de fer Fe^{2+} ou du Fe^{3+} n'a été observée dans le système nerveux des souris mutantes Cb et Br, et ce, même à

a



EUK-8: R = H
 EUK-134: R = OCH₃
 EUK-189: R = OCH₂CH₃

b

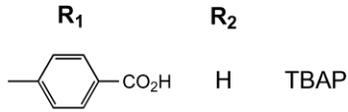
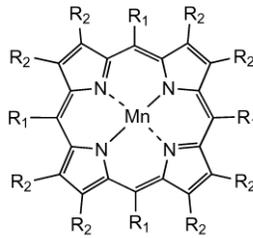


Figure 40 : Analogues de la SOD

a. Structures chimiques de différents sels de manganèse, appelés aussi composés EUK.

b. Structure chimique du MnTBAP, une manganèse-métalloprotoporphyrine (TBAP : tetrakis-acide 4 benzoïque-porphyrine).

l'âge de 2 ans. De plus, aucune variation significative des marqueurs d'oxydation des lipides et protéines n'a été détectée dans le cœur des mutants Frda/MCK. La sensibilité variable des tissus au stress oxydatif et son rôle central dans les maladies neurodégénératives nous ont cependant conduit à évaluer les traces d'oxydation dans le cervelet des mutants Cb. Par ailleurs, l'absence d'induction de la SOD2 démontrée dans un modèle cellulaire (fibroblastes de patients soumis à un stress oxydatif) suggérait alors une perturbation de l'expression des enzymes de détoxification et nous a conduit à évaluer ce point dans nos deux modèles (Chantrel-Groussard 2001).

L'absence de stress oxydatif dans les tissus atteints des modèles générés a ainsi été démontrée par deux approches : une approche thérapeutique sur le modèle Frda/MCK utilisant un analogue des SODs et une approche moléculaire réalisée dans le cervelet des mutants Cb en parallèle avec H. Seznec qui s'est concentré sur le tissu cardiaque des souris Frda/MCK.

a) Approche thérapeutique, absence d'effet d'un analogue chimique des SODs sur la survie des mutants Frda/MCK – publication 5

Trois classes de molécules capables de mimer la fonction catalytique des SODs existent : les sels de manganèse, les macrocycles et les métalloporphyrines (Fig.40) (Gauvan 2002). Ces molécules contiennent un centre actif métallique pouvant catalyser la réaction de dismutation avec O_2^- , tout comme le centre métallique cuivre ou manganèse des SODs (Patel and Day 1999). La molécule testée correspond au MnTBAP, antioxydant catalytique qui fait partie de la famille des métalloporphyrines. Un effet bénéfique du MnTBAP a été observé sur le modèle murin de l'inactivation de la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD2 ou MnSOD) correspondant à une amélioration spectaculaire de la cardiomyopathie associée à une augmentation de la survie (Melov 1998). Le KO SOD2 présente en effet de nombreuses similarités avec les mutants Frda/MCK et développe notamment une cardiomyopathie dilatée, associée à une réduction de l'activité enzymatique du complexe II de la chaîne respiratoire et de l'aconitase, enzymes les plus diminuées dans le cœur de nos mutants (Lebovitz 1996, Melov 2001). Récemment, une étude plus détaillée du KO SOD2 traité à des doses semblables de MnTBAP a démontré un effet de la molécule sur un rétablissement partiel de l'activité des complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire (Hinerfeld 2004).

L'essai réalisé sur les mutants Frda/MCK, consistant en une injection journalière d'une dose de MnTBAP deux fois supérieures à celle ayant permis d'améliorer la

cardiomyopathie du KO SOD2, n'a pas entraîné d'amélioration significative de la survie des mutants Frda/MCK. En accord avec l'absence d'augmentation significative de protéines et lipides oxydés mesuré dans le tissu cardiaque, nous avons proposé que l'absence d'effet anti-oxydant du MnTBAP suggérait l'absence de production de radicaux libres.

b) Approche moléculaire, absence de protéines oxydées et diminution d'expression de la SOD2 – publication 5

La présence de protéines oxydées a été étudiée également dans le cervelet des mutants Cb sans démontrer d'augmentation significative, tout comme dans le tissu cardiaque. De façon intéressante, une diminution significative de ce marqueur a également été observée à des stades avancés de la dégénérescence cérébelleuse. La diminution tardive des marqueurs de stress oxydatif peut être due à un remaniement majeur du tissu suite à la colonisation par les fibroblastes, cellules gliales et collagène.

La mesure du taux d'expression de la SOD2 dans les tissus cardiaques et cérébelleux a permis d'observer une induction normale suivie d'une diminution significative. Une diminution d'expression de la SOD2 associée à une absence d'augmentation de marqueurs de stress oxydatif est généralement due à une diminution de la production de superoxydes (St Clair 2002).

De plus, les résultats d'une étude transcriptionnelle réalisée sur les tissus cardiaques de souris mutantes et contrôles Frda/MCK (collaboration avec V. Procaccio) vont aussi dans le sens d'une absence de radicaux libres. En effet, aucune variation de l'expression de gènes majeurs impliqués dans la détoxification ou la réponse au stress oxydatif n'a été observée. Enfin, le croisement de souris mutantes Frda/MCK avec des souris surexprimant la SOD1 (SOD cytosolique) n'a aucun effet sur la survie de ces animaux suggérant également l'absence de radicaux superoxydes cytosoliques.

c) Conclusions et perspectives

Nos résultats sont la première preuve *in vivo* de l'absence d'induction de stress en absence de frataxine. Nous attribuons ces observations à l'importante diminution de l'activité de la chaîne respiratoire susceptible de produire moins de radicaux libres. En effet, dans nos modèles, une diminution généralisée de l'activité des complexes I, II, III a été mesurée conduisant à 20 % d'activité résiduelle en absence de frataxine dans le tissu cardiaque. Nos

modèles sont donc très différents des modèles murins KO pour un seul composant de la chaîne respiratoire comme le KO du translocateur ATP/ADP Ant1 (Esposito 1999) entraînant l'accumulation de radicaux libres à un niveau particulier de la chaîne. Dans ces modèles, l'expression des enzymes de détoxification (SOD2, SOD1, catalase, GPX ...) et la quantité de marqueurs de protéines et lipides modifiés sont doublés ou triplés.

Les voies de régulation de la SOD2 ne sont pas totalement élucidées. La régulation de l'expression de la SOD2 nécessite un signal de la mitochondrie vers le noyau. Certains auteurs ont proposé l'intervention de messagers secondaires comme les radicaux libres et plus précisément les lipides peroxydés dans les cellules de mammifère (Rogers 2001) ou l'hème chez la levure (Pinkham 1997). La découverte récente d'une implication de la frataxine (primaire ou secondaire) dans la biosynthèse de l'hème pourrait expliquer en partie ce point. De plus, chez la levure, des sites de liaison à des facteurs de transcriptions communs dont l'activation ou la répression est hème-dépendante, ont été déterminés dans les régions promotrices de YFH1 et de SOD2 (Lombardia 2000, Ter Linde 2002). Une étude des séquences promotrices des gènes de la SOD2 et de la frataxine murines est actuellement en cours en collaboration avec le service bioinformatique de l'IGBMC.

5.2) Etudes en cours

a) La voie des acides aminés soufrés - publication 5 et études en cours

L'étude transcriptionnelle réalisée sur le cœur des animaux Frda/MCK dont la confirmation a été essentiellement réalisée par A. Hertzog et L. Reutenauer, a aussi permis de déterminer l'effet de l'absence de frataxine sur l'expression des gènes dans le tissu cardiaque.

L'implication de la voie de synthèse des acides aminés soufrés (5/21 gènes surexprimés) a été démontrée, voie initialement mise en évidence par une étude transcriptionnelle réalisée sur les lignées cellulaires de patients (Tan 2003). Parmi ces gènes, le gène de la méthylène tetrahydrofolate deshydrogénase NAD⁺ dépendante (Mthfd2) impliqué dans la biosynthèse de l'homocystéine à partir de la méthionine, est modifié avant l'apparition de tout phénotype cardiaque (fonctionnel et biochimique). Il est intéressant de remarquer que Mthfd2 et plusieurs autres gènes ressortis de l'étude transcriptionnelle sont régulés entre autres, par le facteur de transcription ATF4 (asparagine synthétase, asparaginyl ARNt synthétase et la glutathione S-transférase) (Siu 2002, Harding 2003). ATF4 est régulé par le biais de la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction (eIF2 α) en condition

Expression Mthfd2 et Atf4

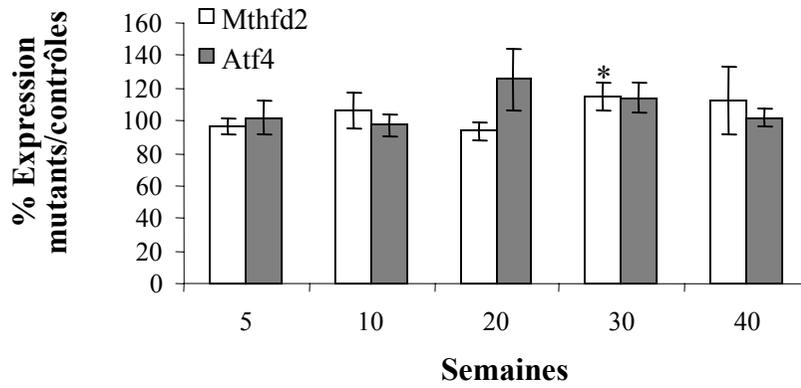


Figure 41 : Mthfd2 et Atf4

Expression des gènes ATF4 et Mthfd2 par RT PCR quantitative sur extraits d'ARN totaux de cervelets des animaux Cb (n=3 par génotype et par âge).

*p=0,01

de famine cellulaire en acides aminés ou en hème, de stress oxydatif et de désordre au niveau du réticulum endoplasmique (Harding 2000, Igarashi 2003). Nous avons donc mesuré l'expression de ATF4, régulé de façon post-transcriptionnelle (Vattem 2004). Or, seule l'expression au niveau transcriptionnel a été évaluée pour l'instant et est inchangée, nécessitant une étude complémentaire par Western Blot. Par ailleurs, on ne peut pas exclure une altération des voies de phosphorylation.

J'ai également évalué l'expression de Mthfd2 et ATF4 dans le cervelet des mutants Cb. Hormis une légère augmentation significative de Mthfd2 à 30 semaines, aucune variation significative n'a été mise en évidence (Fig.41).

L'absence d'augmentation primaire de Mthfd2 dans le cervelet démontre les différences au niveau des voies de dégénérescence impliquées dans les cardiomyocytes et les neurones. Par ailleurs, si l'on considère que la fonction de la frataxine est identique dans ces deux types cellulaires, ces résultats suggèrent que l'augmentation de Mthfd2 n'est pas directement due à la fonction de la frataxine mais correspond peut-être à un mécanisme de réponse ou de compensation tissu-spécifique. Une étude transcriptionnelle semblable sur des extraits de cervelet permettrait de déterminer les gènes dérégulés spécifiquement suite à l'absence de frataxine.

b) L'homéostasie du fer - publications 4 et 5

L'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer et l'activité de protéines correspondantes, a été étudiée dans les tissus cardiaques et cérébelleux des mutants Frda/MCK et Cb, respectivement. Dans le cœur, une augmentation progressive de l'activité de IRP1 a été observée, en accord avec une diminution de l'activité de l'aconitase cytosolique qui peut s'expliquer par la perte du noyau Fe-S de l'aconitase, en absence de frataxine. A 10 semaines (soit en phase finale de l'évolution du phénotype cardiaque), une augmentation de l'expression de la ferritine H et une diminution de l'expression du récepteur de la transferrine ont été observées. Ces résultats sont contraire à l'augmentation de l'activité IRP1 qui devrait résulter en un import de fer et un stockage réduit. Il est possible que la cellule perçoive que l'augmentation de IRP1 est « artificielle » (due au défaut de biosynthèse des noyaux Fe-S et non à un besoin réel en fer) et mette en action une boucle de régulation négative de l'activité IRP1 pour prévenir une accumulation de fer.

Dans le cervelet des mutants Cb, l'expression du récepteur de la transferrine et de la ferritine H est très différente puisqu'une diminution significative au niveau ARNm et protéine

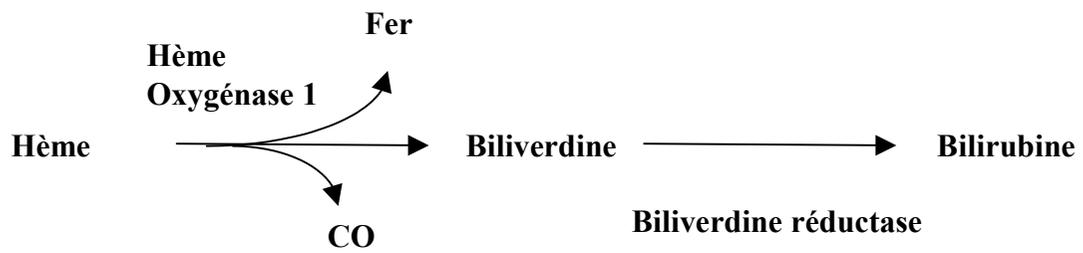


Figure 42 : Réaction catalytique réalisée par l'hème oxygénase 1 (HO-1)

se produit déjà à 10 semaines (avant toute perte de cellules granulaires, début du phénotype mitochondrial). Cette diminution ne va pas dans le sens d'une régulation médiée par IRP1 qui entraîne une expression opposée du récepteur de la transferrine et de la ferritine H. A 40 semaines, on retrouve une situation équivalente à celle se produisant dans le tissu cardiaque à 10 semaines, probablement par le même système. Il faut cependant garder en tête qu'à la fois le cœur à 10 semaines et le cervelet à 40 semaines, sont des tissus très remaniés (perte de nombreuses cellules, fibrose, gliose, collagène) et les interprétations sont délicates.

Nous nous sommes également intéressé à l'expression de l'hème oxygénase 1 (HO-1) dans le cervelet, dans un premier temps, pour son lien direct avec la régulation du stress oxydatif (Dennery 2000). C'est en effet une des enzymes les plus primairement induite en réponse à un stress oxydatif. La fonction principale de cette enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique est le catabolisme de l'hème qu'elle dégrade en libérant d'un côté la biliverdine réduite en bilirubine, deux molécules anti-oxydantes, et d'un autre côté du fer ferreux et du monoxyde de carbone (CO), pro-oxydants dans certaines conditions (Fig.42). Cependant, HO-1 est également une enzyme régulée par un grand nombre de stimuli allant de l'hème aux métaux lourds, en passant par l'hypoxie, l'hyperoxie, H₂O₂ ou NO (Poss 1997, Morse and Choi 2002, Sun 2004). Il a été notamment démontré dans des astrocytes de rat en culture, que l'augmentation de l'expression de HO-1 (par différentes méthodes : TNF α , dopamine, H₂O₂, des composés sulfhydryls, le peptide β amyloïde...) entraînait une mobilisation du fer libre vers la mitochondrie par l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (Wang 1995, Schipper 1999a et b, Ham and Schipper 2000, Schipper 2004). Les auteurs expliquent ainsi l'accumulation de fer et le défaut mitochondrial observés dans des pathologies comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Schipper 2000). Dans le cervelet des mutants Cb, en absence de stress oxydatif, nous pouvons supposer que l'augmentation primaire du taux d'expression de HO-1 permet de rediriger le fer libre vers la mitochondrie qui, en présence d'un besoin pour une biosynthèse des noyaux Fe-S déficiente, est utilisé, les noyaux Fe-S se formant aussi spontanément. Le mécanisme d'activation de HO-1 doit maintenant être élucidé mais pourrait impliquer le niveau de noyaux Fe-S, d'hème, de Zn-Protoporphyrine (Yang 2001) ou de fer. Cette hypothèse est en accord avec le gonflement modéré des mitochondries observé à partir de 10 semaines, traduisant une ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale.

Expression IscU et IscS

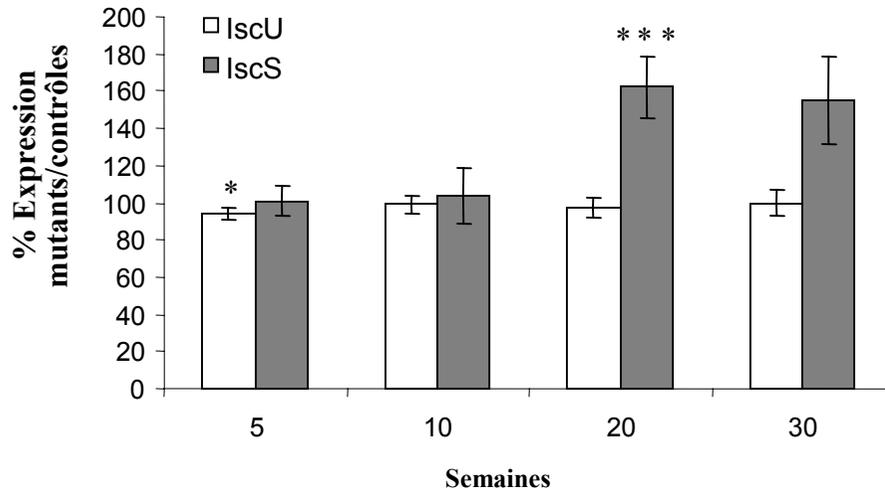


Figure 43 : IscU et IscS

Expression des gènes IscU et IscS par RT PCR quantitative sur des extraits d'ARN totaux de cervelets des animaux Cb (n=3 par génotype et par âge).

*p=0,03 ; ***p<0,001

c) La biosynthèse des noyaux Fe-S dans le cervelet des mutants Cb

L'expression de certains gènes impliqués dans la biosynthèse de l'hème et des protéines à noyau Fe-S a été investiguée dans le cervelet des mutants Cb. Une diminution significative très primaire de l'expression *IscU* (ARN) a été ainsi mesurée à 5 semaines, soit avant toute autre dérégulation observée (Fig.43). Une augmentation de l'expression de la cystéine désulfurase (*IscS*) a également été mesurée plus tardivement (à 20 semaines) (Fig.43).

Ces mécanismes sont en cours d'étude mais nous pouvons supposer que la diminution primaire de *IscU* est une réponse à l'absence de frataxine par diminution d'une protéine interagissant avec celle-ci. De plus, il semble que les voies de biosynthèse des noyaux Fe-S ne présentent pas de perturbation majeure avant 20 semaines. Il est donc possible qu'un mécanisme de compensation soit mis en place. Le défaut d'activité des protéines à noyaux Fe-S peut entraîner la mobilisation de fer libre dans la mitochondrie par l'induction de HO-1 dont les mécanismes d'activation doivent être déterminés mais pourraient impliquer les niveaux de fer, de noyaux Fe-S ou d'hème. Cette hypothèse serait également en accord avec l'absence de défaut de l'activité enzymatique des aconitases et de la succinate déshydrogénase dans le tissu cérébelleux à 10 semaines. Au contraire, une diminution significative de l'activité de ces deux enzymes se produit à 30 semaines.

En conclusion, il semble que les mécanismes de régulation du fer mis en action en absence de frataxine soient différents dans les deux tissus étudiés et nécessitent encore des précisions. Les observations réalisées dans le tissu cardiaque sont très intéressantes car elles confirment l'absence de radicaux libres. En effet, une augmentation de IRP1 suggère une perte du noyau 4Fe-4S. Au contraire, la présence de stress oxydatif entraîne la conversion d'un noyau 4Fe-4S en 3Fe-4S, sans changement de l'activité de IRP1. Par ailleurs, l'aconitase étant une protéine cytosolique, ces résultats démontrent aussi, en absence de stress oxydatif, le rôle nécessaire de la frataxine dans la biosynthèse des noyaux Fe-S cytosoliques.

Une analyse détaillée de l'activité de IRP1 et des protéines à noyau Fe-S (aconitases et succinate déshydrogénase) est actuellement en cours dans le cervelet des mutants Cb, à différents âges, par collaboration avec C. Bouton et P. Rustin respectivement. Les résultats préliminaires de l'activité des aconitases et du complexe II démontrent une atteinte claire à 30 semaines, et non encore mesurable à 10 semaines. Ces données constituent les premières mesures d'une déficience enzymatique des protéines à noyau Fe-S dans le système nerveux.

Les cellules granulaires représentent donc définitivement un bon modèle neurologique de l'absence de frataxine.

PUBLICATION 1

Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits.

Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P, Koenig M.

Nat Genet. 2001 Feb;27(2):181-6.

PUBLICATION 1



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Puccio H, **Simon D**, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P, Koenig M.

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.

Pages 181-6 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/ng/journal/v27/n2/full/ng0201_181.html&filetype=pdf

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

PUBLICATION 2

Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia.

Seznec H, Simon D, Monassier L, Criqui-Filipe P, Gansmuller A, Rustin P, Koenig M, Puccio H.

Hum Mol Genet. 2004 May 15;13(10):1017-24.

PUBLICATION 2



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Seznec H, **Simon D**, Monassier L, Criqui-Filipe P, Gansmuller A, Rustin P, Koenig M, Puccio H.

Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia.

Hum Mol Genet. 2004 May 15;13(10):1017-24.

Pages 1017-24 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://hmg.oupjournals.org/cgi/content/full/13/10/1017>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

PUBLICATION 3

Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia.

Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, Rustin P, Koenig M, Puccio H.

J Neurosci. 2004 Feb 25;24(8):1987-95.

PUBLICATION 3



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, Rustin P, Koenig M, Puccio H.

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.

Pages 1987-95 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.jneurosci.org/cgi/content/abstract/24/8/1987?>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

PUBLICATION 4
(manuscrit en préparation)

Frataxin-deficient cerebellum of a Friedreich ataxia neurological mouse model demonstrates caspase-independent neuronal death with autophagy and cathepsins induction

Simon D, Gansmuller A, Seznec H, Reutenauer L, Rustin P, Koenig M, Puccio H.

Frataxin-deficient cerebellum of a Friedreich ataxia neurological mouse model demonstrates caspase-independent neuronal death with autophagy and cathepsins induction

Delphine Simon¹, Anne Gansmuller¹, Hervé Seznec¹, Laurence Reutenauer¹, Pierre Rustin², Michel Koenig¹ and Hélène Puccio¹.

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS/INSERM/Université Louis Pasteur, 67404 Illkirch cedex, CU de Strasbourg, France.

² INSERM U-393, Hôpital Necker Enfants Malades, rue de S evres, 75015 Paris, France.

Correspondence should be addressed to HP, IGBMC, 1 rue Laurent Fries BP 10142, 67404 Illkirch, France. Phone: +33-3-8865 3264; Fax: +33-3-8865 3246; hpuccio@igbmc.u-strasbg.fr

Abstract

Friedreich ataxia (FRDA), is a progressive neurodegenerative genetic disease. It is caused by severely reduced levels of frataxin, a mitochondrial protein involved in iron-sulphur (Fe-S) cluster biosynthesis. Mechanisms of neuronal cell death execution are however unknown because of the absence of good neurological mouse models. We have recently generated and characterized a progressive and specific mouse model for FRDA. We now report the detailed characterization of the events leading to frataxin-deficient granule cells death. Ultrastructural studies show a progressive mitochondrial swelling finally leading to giant mitochondria, a common feature to autophagy, apoptosis and necrosis. However, combining these observations and the expression study of specific cell death molecular markers, we identify a mechanism that is caspase-independent with cathepsins and autophagy induction and final necrosis execution. Furthermore, we show for the first time in a frataxin-deficient neuronal tissue, a reduced activity of Fe-S cluster containing proteins and we demonstrate that, in absence of oxidative stress, HO-1 is early up-regulated allowing us to postulate a HO-1-dependent iron regulation. In conclusion, our data have clarified the neuronal cell death in absence of frataxin, previously thought to be apoptotic before, and we demonstrate the induction of a new pathway that could be related to heme deficiency as frataxin interaction with ferrochelatase has recently been shown.

Introduction

Friedreich ataxia (FRDA), the most common form of autosomal recessive ataxia, is a neurodegenerative disease characterized by degeneration of the large sensory neurons extending into the spinal cord, cardiomyopathy and increased incidence of diabetes (Harding 1981, Durr 1996). FRDA is caused by severely reduced levels of frataxin due to a large GAA triplet repeat expansion within the first intron of the frataxin gene (Campuzano 1997), causing inhibition of transcriptional elongation (Sakamoto 1999). Although substantial progress has been made since the discovery of the gene encoding frataxin, the exact function of frataxin and the mechanisms by which its insufficiency leads to defects in Fe/S cluster (ISC) protein assembly/activity (Rötig 1997, Foury 1999, Puccio 2001), mitochondrial iron deposits (Foury 1997, Babcock 1997, Wilson 1997, Waldvogel 1999), and alteration in defense against oxidative stress (Chantrel-Groussard 2001, Schulz 2000, Emond 2000) are still controversial. Most recent data coming from yeast models demonstrate a role of frataxin as an iron chaperone closely involved in ISC assembly/protection and heme biosynthesis (Huynen 2001, Muhlenhoff 2002a and b, Duby 2002, Lesuisse 2003, Yoon and Cowan 2003 and 2004).

Neuronal cell death involves several pathways which are not always clearly distinguishable. In a classical study of cell death, Schweichel and Merker (1973), divided cell death into three types, based on the differences in the ultrastructural morphological features (Yuan 2003). Type I death, termed apoptosis is characterized by cytoplasmic and chromatin condensation, DNA fragmentation, nuclear pyknosis, cell rounding, membrane blebbing, cytoskeletal collapse and the formation of membrane bound apoptotic bodies digested by macrophages or neighboring cells. Type II death corresponds to autophagy, and is characterized by the appearance of numerous cytoplasmic vacuoles of lysosomal origin. Finally, type III cell death is similar to what is now known as necrosis characterized by early swelling of intracellular organelles following by swelling and loss of plasma and nuclear membrane integrity.

FRDA is a classical progressive neurological disease for which the mechanisms of neuronal cell death are poorly understood. Studies performed on different cellular models for FRDA suggest an apoptotic mechanism. Indeed, FRDA fibroblasts treated with high iron levels or submitted to serum-withdrawal exhibit increase activated caspase 3 (Wong 1999) and caspase 9 (Pianese 2002), respectively. Furthermore, the increase in caspase 3 activity can be rescued by apoptosis inhibitors (Wong 1999), suggesting a primary involvement of apoptosis. Moreover, during retinoic acid-induced neurogenesis of frataxin deficient P19

embryonic carcinoma cell line, an increase in apoptosis susceptibility has been shown with a high DNA fragmentation by ^{14}C thymidine incorporation and TUNEL staining (Santos 2001). Finally, the transcriptional analysis of fibroblasts and lymphoblasts from FRDA patients as well as neural NT2 cell lines with reduced frataxin expression due to a specific frataxin RNAi, show that 9 genes out of the 48 modified genes are directly involved in the apoptotic pathway (Tan 2003). However, fibroblasts and lymphoblasts from FRDA patients in standard cell culture conditions do not show any phenotype, such as reduced viability or morphological signs of apoptosis, making them unsuitable models to determine the death mechanisms. The availability of mouse models depleted for frataxin are therefore important tools to unravel the mechanism of cell death.

Contrary to results from cellular models, our initial studies on different mouse models with frataxin deletion are more suggestive of necrotic cell death. Indeed, the death mechanisms implicated in the embryonic lethality of the constitutive knockout mouse model by ultrastructural studies show nuclear and cytoplasmic features typical of necrosis with only rare cells harboring chromatin condensation or showing TUNEL positive staining (Cossée 2000). In agreement with these results, no TUNEL-positive cells were observed in affected tissues of conditional cardiac and neuronal murine models (Puccio 2001). The sole mouse data showing signs of apoptosis are from mouse model with specific frataxin deletion in pancreatic islets' β -cells which show an increased number of activated-caspase 3 immunopositive islet cells, however neither histological nor ultrastructural data have been performed (Ristow 2000).

We have recently generated two conditional-inducible neuronal FRDA mouse models which develop progressive cerebellar and sensory ataxia, reproducing some of the features of FRDA (Simon 2004). The sensory ataxia was attributed to specific lesions within the spinocerebellar tracts of the spinal cord and the large sensory neurons of the dorsal root ganglia, the earliest and the most affected tissues in FRDA patients. Ultrastructural studies identified autophagic neuronal death in the large sensory neurons of the dorsal root ganglia, with the presence of all the different morphological steps of autophagy. We proposed that this autophagic mechanism was induced to eliminate the defective mitochondria and other organelles, providing a protective mechanism for survival of frataxin-deficient neurons for several weeks. In addition to the specific dorsal root ganglia neurodegeneration, this model shows a progressive loss of cerebellar granule cells participating to the locomotor deficits (Simon 2004). Although the cerebellum is not primarily affected in FRDA, the slow progression of the neuronal death (both cerebellar granules and Purkinje cells) in cerebellum

of our neurological FRDA mouse model is a valuable tool to study the progression of neuronal death. Furthermore, a detailed study of the cerebellar neuronal death allows a comparison with the mechanisms involved in the proprioceptive neuronal death.

A long standing hypothesis in FRDA is that death of the primary affected cells (sensory neurons, cardiomyocytes, and pancreatic cells) is due to an increased oxidative stress concomitant to a specific deficit in Fe-S enzymes and further accentuated by toxic cellular iron accumulation. We have recently reported several evidences showing a lack of increased oxidative stress in the frataxin-deficient tissues (cardiac and cerebellar) with in the cerebellum, a normal level of oxidized proteins, associated with a decreased expression in the mitochondrial detoxifying enzyme superoxide dismutase (Mn-SOD) (Seznec, manuscript submitted).

In this study, we report the detailed characterization of the cell death progression in frataxin-deficient cerebellum by a time-course ultrastructural analysis associated to the expression study of several enzymes implicated in apoptosis and autophagy. Furthermore, to begin to address the issue of a dysfunction in iron metabolism, Fe-S deficit and detoxifying enzymes in FRDA, we have evaluated the expression of proteins involved in iron homeostasis, ISC assembly and detoxification of toxic radicals.

Results

Ultrastructural abnormalities in cerebellum

Our initial histological studies of the cerebellar degeneration in the Prp28.6-DA16 line (Cb mutant), revealed a progressive loss of granule cells beginning at 20 weeks after frataxin gene deletion, with a loss of Purkinje cell arborisation (Simon 2004). This progressive neurodegeneration evolved until 40 weeks corresponding to the age at which all frataxin-deleted neurons have died, the remaining neurons expressing wild-type levels of frataxin (Seznec, manuscript submitted). The primary neuronal death in the Cb mutants was however not determined. Indeed, are the granule cells dying due to lack of normal Purkinje cell arborisation, or vice-versa. At 10 weeks, by electron microscope, morphological alterations are limited to granule cells without any alteration in the myelinated climbing or mossy fibers, nor the cellular bodies or arborizations of the Purkinje cells. The initial lesions are localized in the mitochondria and consist in a moderate mitochondrial swelling associated with cytoplasm swelling (Fig.1a). At 20 weeks, the swelling is more striking leading to giant mitochondria (Fig.1b). At 30 weeks, giant mitochondria exhibit woolly densities, strongly suggesting irreversible cell injury leading to cell death by necrosis (Fig.1c,f). Indeed, flocculent or woolly densities are believed to be precipitates of denatured mitochondrial matrix proteins and/or lipids liberated from disintegrating cristae when mitochondria are irreversibly damaged. In contrast, the dilatation of the rough endoplasmic reticulum and mitochondrial swelling are both reversible events. Similar alterations were observed at 40 weeks, however at 1 year of age, we could not detect any granule cells harbouring such giant mitochondria, suggesting the death of all frataxin-negative granule cells has occurred, in agreement with high collagen fiber colonization and normal frataxin level on whole cerebellar extracts (RNA and protein levels). Lipofuscin aggregates associated with both primary and secondary lysosomes, were obvious at 30 weeks in granule cells and in the neuropil (Fig.1e).

The neuropil demonstrates first defects at 30 weeks, with myelinated axons filled with enlarged and/or tubular mitochondria as well as degenerated endoplasmic reticulum as shown by crystalline-like array morphology (Fig.1g). Reports of this type of configuration were described in Purkinje cells axons of ataxic mouse mutants (Rhyu 1999). Moreover, autophagic structures were present, first apparent at 30 weeks, particularly striking at 1 year, with membranous whorls surrounding group of several altered mitochondria with dense and

tubular cristae (Fig.1h). Purkinje cells cellular bodies revealed very few abnormalities, even at 1 year, with only rare moderately swollen mitochondria.

The nuclear ultrastructure was variable. At 30 weeks, some cells showed heterochromatin peripheral redistribution (Fig.1e). Other cells demonstrate highly condensed chromatin and preserved plasma membrane, features of apoptosis. However, no classical apoptotic chromatin cup-shaped masses were seen nor cell splitting in a number of apoptotic bodies or engulfment by phagocytes, classical ultrastructural changes associated to the final stages of apoptosis.

In conclusion, electron microscopy experiments showed features of necrosis, apoptosis and autophagy. Furthermore, since the neuronal degeneration is progressive over a period of one year, the final steps of cell death is not clearly identifiable.

The autophagic-lysosomal pathway is activated and cell death mechanisms are caspase-independent

The selective involvement of mitochondria per se does not argue against apoptosis, necrosis or autophagy, because mitochondria are involved in all three modes of cell death. Mitochondrial swelling has been shown to induce apoptosis through release of cytochrome c as well as in necrosis and autophagy induction through decrease mitochondrial membrane potential (Rodriguez-Enriquez and Lemasters 2004).

We have clearly seen an autophagic mechanism in large sensory neurons of these mutants (Simon 2004). To study whether an autophagic mechanism was activated in cerebellum, we performed Western Blot analysis on whole cerebellar protein extracts between 5 and 40 weeks of age with an antibody directed against LC3, a marker of autophagosomes (Fig.2a). In vivo, LC3 is cleaved into two fragments, a cytosolic 18 KDa LC3-I and a 16 KDa LC3-II that localizes to autophagosomal membranes, the latter correlating with the number of autophagosomes (Kabeya 2000) and which can therefore be used to monitor autophagic activity. In Cb mutants, we showed a significant increase in the LC3-II form at 10 weeks with 153 +/- 15 % compared to control cerebellum.

To assess whether the induction of autophagy was associated with a general activation of the lysosomal pathway, the expression of three widely expressed lysosomal proteases, cathepsins B, D and L, was measured at the mRNA level by quantitative RT PCR on whole cerebellar mRNA extracts between 5 weeks and 40 weeks (Fig.2b). Cathepsins B and L are cysteine proteases and cathepsin D is a representative aspartic protease. At 30 weeks, an age

at which half of granule cells death have died, a significant increase was observed in mutants, for cathepsin D, B, L with 181 137, and 159 % of respective expression (% mutant/control). Interestingly, the increase in cathepsin D mRNA level is already significant at 20 weeks, at the very beginning of the cell death.

In contrast, by Western Blot and immunostaining (data not shown), we did not observed any activation of caspases 3, 7 and 9 between 5 weeks and 1 year of age, further confirming the absence of TUNNEL-positive cells and the EM data. Therefore, both morphological and molecular data suggest a caspase-independent, cathepsin-dependent neuronal cell death with activated autophagy.

Early and progressive increase in HO-1 expression in absence of oxidative stress

Implication of oxidative stress in FRDA has been an old debate. Our initial studies demonstrate an absence of oxidative stress in both frataxin-deficient cardiac tissue and in frataxin-deficient cerebellum, namely absence of increased oxidized proteins and decreased Mn-SOD expression (Seznec, submitted) (Seznec 2004, Seznec submitted). As oxidative stress has been linked to neuronal cell death associated with certain neurodegenerative conditions (Andersen 2004), we wanted to complete the previous results obtained in cerebellum, by investigating the expression of three other widely expressed enzymes, heme oxygenase 1 (HO-1), Cu-Zn-SOD and peroxiredoxin 6, all primarily regulated at transcriptional level, by real time RT-PCR on whole cerebellar extracts, between 5 and 30 weeks (Fig.3).

The only detoxification protein expression level clearly affected is HO-1. Indeed, a small significant increase has been measured for Cu-Zn-SOD mRNA at 20 weeks (10 %, $p=0,03$), with however no further change compared to control littermates at later stages in the disease. Interestingly, HO-1 is already significantly increased at 10 weeks (40 %, $p=0,01$), before any granule cell death occurred and before giant mitochondria are detected by electron microscopy. HO-1 is inducible by more diverse stimuli than any other enzymes described to date (Morse 2002), therefore its induction in the absence of oxidative stress is not surprising and can be linked to other disregulated pathways implicating heme or transition metals for example (Choi 1996, Fogg 1999, Schipper 2004, Suzuki 2004).

Early decreased expression of ferritine H and transferrin receptor, followed by an increase in cysteine desulfurase

D. Waldvogel has reported local inhomogeneities in the magnetic field by magnetic resonance scanning of FRDA patients' dentate nucleus which, in absence of blood vessels, is mainly due to iron (Waldvogel 1999). However, no evidence of iron accumulation was found by perl's staining in DRG (n=1), cerebellum (n=3), spinal cord (n=4) and peripheral nerve (n=2) from FRDA patients' autopsied tissues (Bradley 2000). Moreover, no iron homeostasis defect was observed in patients' cell lines and in blood (Wilson 1998, Scarano 2001). Regardless frataxin has been shown to be involved in the early steps of Fe-S cluster biosynthesis leading to reduced Fe-S cluster containing proteins activities in patients' heart, and in cardiac mouse model's heart. However, the only measures in patients' neuronal tissues have been realized on autopsied tissues with a significantly decreased complex I activity in cerebellum (n=2) and a significantly decreased aconitase activity in DRG (n=2) (Bradley 2000). Here, we investigate iron homeostasis and Fe-S cluster biosynthesis in the cerebellum of Cb by expression analysis of genes involved in Fe-S cluster biosynthesis as well as in iron homeostasis between 5 and 30 weeks in whole cerebellar protein extracts and/or mRNA (Fig.4). We have also measured aconitases (cytosolic and mitochondrial enzymes) and complex II activities, both containing Fe-S clusters (cytosolic aconitase only) at 10 and 30 weeks.

Previously, we had not observed any significant increase in iron deposits by Perl's and Turnbull staining in Cb mutants' cerebellum, even in 2 years old mutant mice. Surprisingly, by expression analysis (mRNA and protein), both ferritin H and transferrin receptor are decreased at 10 weeks (Fig.4) levels. As these two genes are normally post-transcriptionally regulated by IPR1 in opposite directions, this suggests that the down-regulation observed is IRP1-independent. The activity of IRP1 was not measured, however, between 5 and 20 weeks, no difference at mRNA level was seen between mutants and control littermates. As HO-1, has also been demonstrated to regulate and to be regulated by iron in different conditions of stress, we postulated that it could replace IRP1 activity in iron homeostasis regulation. At later stages (20 and 30 weeks), a significant increase of IRP1 is observed finally leading at 40 weeks to an increase in ferritin H and a decrease in transferrin receptor expression levels. Similar observations were already realized in frataxin-deficient heart of cardiac mouse model at final stages of cardiac pathology, suggesting an IRP1 unknown regulatory feedback loop to prevent iron accumulation as the loss of IRP1 Fe-S cluster should be associated with IRP1 activation.

Aconitases and complex II activities were not significantly affected at 10 weeks however both show significant reduction at 30 weeks ($p=0,03$) (Fig.4c). This is the first clear evidence of a reduced Fe-S cluster containing enzymes in neuronal tissues in absence of frataxin. We are currently realizing a kinetic study at different ages. We also measure at mRNA level, the expression of the cysteine desulfurase (IscS), the sulphur providing protein to the Fe-S cluster and IscU, shown as a frataxin-interactor in yeast and human fibroblasts (Tan 2003, Gerber 2003, Ramazzotti 2004). We observe a significant increase of IscS at 20 weeks (162 %, $p=4.10^{-5}$) and 30 weeks (155 %, $p=0,003$) (Fig.4c), with a normal level at 40 weeks (not shown). These results suggest that in cerebellum, the Fe-S cluster biosynthesis can occur without major perturbation until 10 weeks after frataxin deletion, underlying the necessary albeit non essential role of frataxin (Duby 2002). The small however significant very early decrease of IscU at 5 weeks (93 % +/- 3 %, $p=0,03$) could be one of the first consequences of frataxin deficiency. These hypothesis need however confirmations at protein levels.

Discussion

Apoptotic and autophagic cell death have been reported in several neurodegenerative disorders as Alzheimer's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis and various prion disease (Mattson 2000, Lossi and Merighi 2003), however only very little data exists for FRDA. In the first part of the present paper, we report a detailed ultrastructural and molecular characterisation of the neuronal cell death in the cerebellum of a FRDA neurological mouse model (Cb mutant mice) (Simon 2004). Frataxin-deficient granule cells show a progressive mitochondrial swelling by ultrastructural studies associated with a caspase-independent cell death mechanism with neither activation of initiating nor downstream caspases. In contrast, autophagy and lysosomes are early implicated with an increased expression of autophagosomal LC3 protein (10 weeks) and cathepsins mRNA (20 weeks). Final cell death execution occurs by necrosis. Moreover, we have confirmed the absence of oxidative stress in cerebellar degeneration and highlighted the involvement of a new pathway implicating HO-1.

Mitochondria lie at crucial checkpoint in the course of events leading to cell death and the opening of the mitochondrial permeability transition pores (MPTP) often associated with swelling can lead to apoptosis, necrosis or autophagy (Rodriguez-Enriquez 2004). Indeed, mitochondria have been shown to release, through the opening of MPTP, cytochrome c leading to apoptosis by caspases induction as well as other death-inducing proteins such as the apoptosis-inducing factor (AIF) known to act both in a caspase-dependent and independent manner (Daugas 2000, Cande 2004a). Moreover, mitochondrial dysfunction such as disruption of electron transport chain or impaired regulation of cellular redox potential (Green and Reed 1998) induce mitochondrial swelling leading to a selective elimination of defective mitochondria by autophagy (Lemasters 1998, Xue 1999, Elmore 2001). Finally, the rapid change of permeability associated with the MPTP causes large amplitude mitochondrial swelling, membrane depolarization and uncoupling of oxidative phosphorylation therefore leading to ATP levels profound drop which signifies onset of necrotic cell death (Leist 1999). Therefore, in Cb mutants cerebellum, if the final execution of granule cell death probably occurs by necrosis, as shown by the flocculent deposits in mitochondria and consistent with the role of frataxin in the biosynthesis of ISC containing proteins, key proteins in the mitochondrial respiratory chain (ATP drop), the progressive mitochondrial swelling observed is not sufficient to determine the mechanisms primarily involved.

Cathepsins increased expressions have been described in several genetic disorders. As examples, an early upregulation of cathepsin D mRNA has been associated with Alzheimer's disease brain (Cataldo 1995, Callahan 1999), leading to the proposal of a role in early neurodegenerative processes (Adamec 2000), and cathepsin B has been shown to be increased in motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis patients spinal cord (Kikuchi 2003). Moreover, mouse knock-out (KO) models have contributed to the demonstration of the direct role of cathepsins in autophagy. Indeed, cathepsin D knockout mice develop neuronal autophagy with central nervous tissues filled with autophagosomes and autolysosomes (Koike 2000). Moreover, a double KO for both cathepsins B and L, demonstrate neuronal loss with cerebellar atrophy very similar to the one we have observed in Cb mutants. Interestingly, the cathepsin L KO develops a dilated cardiomyopathy (Stypmann 2002) and this lysosomal enzyme was the only one increased in our conditional cardiac model by transcriptional analysis in mRNA extracts from frataxin-deficient heart (Seznec 2004, manuscript submitted).

Cathepsins can induce apoptosis through direct caspases activation or cytochrome c release (and secondary caspases activation) (Antunes 2001, Zhao 2003) allowing us to exclude here their participation in classical apoptosis with type II chromatin compaction (as two spherical masses) (Terwel and Van de Berg 2000, Uchiyama 2001) but also apoptosis-induced autophagy (Xue 1999) or autophagy-induced apoptosis (Lockshin and Zakeri 2004). We need however to further confirm whether type I chromatin condensation with chromatin nuclear margination (Jäättelä 2003) observed in some granule cells can be attributed to AIF (apoptosis inducing factor) nuclear translocation. AIF is indeed a mitochondrial flavoprotein with NADH oxidase activity normally contained in the mitochondrial intermembrane space and activated in specific apoptotic conditions, leading to its nuclear translocation (Susin 1999). In the nucleus, by cooperating with cyclophilin A, AIF induces large-scale DNA fragmentation with peripheral nuclear chromatin condensation (Lipton 2002, Cande 2004). Moreover, it has recently been shown that cathepsin D was involved in a caspase-independent neuronal death by inducing AIF release by an unknown mechanism (Jäättelä 2004). Therefore, AIF has now to be investigated in Cb mutants and its translocation could be compatible with i) the ultrastructural observations as some granule cells harbour these features of chromatin condensation, ii) cathepsin D expression as among the lysosomal enzymes measured it was the most increased and with iii) the defective respiratory chain expected as AIF activation has also been linked to mitochondrial energy depletion and does not need energy in contrast with classical apoptosis (Lang-Rollin 2003).

In conclusion, we proposed that the initial cell death mechanisms involved in the cerebellar granule cells correspond to autophagy, induced as a protective mechanism to specifically sequester defective mitochondria allowing a renewal of these organelles until a time point where this is not possible anymore, leading to mitochondrial energy depletion and necrosis. Autophagy induction is also compatible with absence of classical apoptosis as mitochondria sequestrations protects cells against apoptosis by preventing cytochrome c release (Jellinger and Stadelmann 2000). AIF participation will now have to be clearly demonstrated.

In the second part of this paper, we have investigated in neuronal tissues, different metabolisms closely linked with frataxin deficiency, namely iron homeostasis, Fe-S biosynthesis and oxidative stress regulation. By the expression analysis of three widely free radicals detoxification enzymes, we show that the only difference was a progressive increased expression of HO-1. HO-1 is a molecule that catabolize pro-oxidant heme to i) biliverdin, an antioxidant scavenging peroxy radicals and inhibiting lipid peroxidation, ii) carbon monoxide, and iii) free iron. Induction of HO-1 has been observed in brain tissues from patients in several neurodegenerative disorders as Parkinson's disease (dopaminergic neurons, inclusions and astrocytes) or Alzheimer's disease (neurons with and without neurofibrillary tangles and astrocytes) (Schipper 2000). However, if oxidative stress has been widely documented in these diseases' affected tissues and may be responsible for HO-1 induction, in contrast, in FRDA patients' neuronal tissues, authors failed to measure oxidative stress. This is in agreement with the absence of any other increased marker of oxidative stress in Cb mutants cerebellum (this paper and Seznec 2004, submitted) suggesting that HO-1 up-regulation must be due to another disregulated pathway. HO-1 is indeed activated in a wide variety of stimuli such as by heme or transition metals. It is also now accepted that HO-1 has an important role in the regulation of iron homeostasis (Ferris 1999) and HO-1 deficient patients (Yachie 1999) as well as the HO-1 murine KO both accumulate iron in tissues (Poss 1997). Therefore, as a decrease expression in ferritin H and transferrin receptor have been shown, we postulated that an iron regulating mechanism is by-passing the expected IRP1 regulation, and we propose a role of HO-1 in these mechanisms. Moreover, HO-1 has been shown to induce specifically mitochondrial iron sequestration in rat astroglial cells by HO-1 over-expression, by blocking heme synthesis, by a dopamine-induced or by low-micromolar concentrations of amyloid peptides (Wang 1995, Schipper 1999, Ham and Schipper 2000). This iron is non-transferrin-derived and enter the mitochondria through the opening of the mitochondrial transition pore. This is consistent with the early and moderate mitochondrial swelling that we observed

concurrently to the HO-1 increase. The increased HO-1 expression is also in agreement with the lack of apoptosis occurring in Cb mutants cerebellum as it has been shown to confer resistance to apoptosis (Liu 2004).

Therefore, we propose that the early HO-1 increase might act to redirect free iron to the mitochondria in a presence of a defective Fe-S clusters biosynthesis. The activation could occur through iron, iron-sulphur, or heme levels. The free iron could be used for Fe-S clusters biosynthesis. This probable compensatory mechanism finally lead at 30 weeks, to an increased cysteine desulfurase expression and a reduced aconitase activity showing alterations in the Fe-S cluster biosynthesis.

In conclusion, we show that frataxin-deficient granule cells die by a caspase-independent mechanism involving autophagy and necrosis. The present data underscore the notion that there is far more inter-relationship among the types of cell death that is generally acknowledged. It seems as already proposed that necrosis may be not completely chaotic and that there may be defined pathways (Lockshin and Zakeri 2004). The under-investigated autophagy probably comes from the absence of good markers of autophagy in mammals and the little ability to measure the origin of autophagy or metabolic control. The early induction of HO-1 in absence of oxidative stress in frataxin-deficient cerebellum is interesting and it is important to further investigated the role of this enzyme in FRDA as heme metabolism seems closely linked with frataxin. Indeed, an interaction between frataxin and ferrochelatase, the last enzyme of the heme biosynthesis pathway, has been shown in an *in vitro* system (Yoon and Cowan 2004).

Material and methods

Genotyping and DNA analysis

Breedings and genotyping were performed as previously described (Simon 2004). Frataxin gene deletion is induced in 4 weeks-old mice by tamoxifen injection and all the ages mentioned in this paper are considered after tamoxifen injection.

Quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR)

Total RNA extractions from cerebellum were performed using Trizol reagents (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. RT-PCR analysis were performed as described by the kit manufacturer (Promega). The RNAs (1 µg) were converted to cDNAs with random hexamer (0.1 µM) and oligo(dT) primer (0.1 µM) and MMLV-RT (Promega) in 50 µl reaction volume, and the reaction was diluted with Milli-Q water (80 µl). The transcripts were quantified on a real-time thermal cycler (real-time thermal cycler, LightCycler, Roche Diagnostics). Hprt transcripts were chosen as a reference gene, and serial dilution of RT were used for standards for each couple of primers. Primers for each gene namely, Hprt, Transferrin Receptor, Ferritin H and L, Cathepsins B, D, L, HO-1, SOD1, peroxiredoxin 6, were designed using primer 3 website. Q-RT-PCR was carried out in 20 µl reaction volume containing 2 µl of template cDNAs, 18 µL of home-made master mix () and 0.3 µM each primer. PCR conditions were 95°C for 5 min; 60°C, 20 sec; 72°C, 20 sec; 40-50 cycles. After PCR, absence of unwanted by-products was confirmed by automated melting curve analysis. The molar amounts of gene transcripts were calculated based on the crossing point analysis, with standard curves generated from the standard cDNAs. Each transcript level was normalized with Hprt transcripts levels in the same samples. Measurements were realized on cerebellum from 3 mice per age and per genotype and repeated at least 3 times.

Immunoblot analysis

Whole cerebellum protein extractions from liquid nitrogen frozen tissues, SDS-tricine polyacrylamide gel (only for anti-LC3 antibody) or 15 % classical polyacrylamide gel, transfer to nitrocellulose membranes and hybridization with antibodies were realized as previously described (Puccio 2001). Primary antibodies used were polyclonal anti-LC3 (), anti-ferritin (kindly given by C. Bouton, ref), anti-transferrin receptor (H68-4, 1/2000,

Zymed) and as control of quantity a monoclonal anti- β -tubulin (Boehringer Mannheim, 1/2000). After incubation with secondary antibody (goat anti-rabbit or goat anti-mouse respectively, coupled to peroxidase, the signal was quantified with Supersignal Substrate Western blotting (Pierce, IL) and by analysing the autoradiograms on a BioRad GS-700 imaging densitometer. Homozygous and heterozygous mice were used as controls. Measurements were realized on cerebellum from 3 mice per age and per genotype and repeated at least 3 times.

Electron microscopy

Animals were intracardially perfused with 2,5 % glutaraldehyde in PBS (0,1 M phosphate buffer pH 7,3). Cerebellum were dissected and incubated overnight in same fixative. Tissues were rinsed in PBS, postfixated in 1 % osmium tetroxide / PBS for 2 hours at 4°C, dehydrated and embedded in epon. Regions of interest were localized on 2 μ m sections stained with toluidine blue. Ultrathin sections from selected areas were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Philips 208 electron microscope, operating at 80 kV.

Respiratory Chain investigation

Cerebellum from control and mutant Cb mice were immediately frozen in liquid nitrogen. The activities of Fe-S cluster containing enzyme SDH (succinate dehydrogenase : complex II) and aconitases (mitochondrial and cytosolic) were determined compared to non-containing Fe-S cluster enzymes, COX (cytochrome oxidase : complex IV) and IDH (isocitrate dehydrogenase) respectively and as described (Rustin at al., 1994). Measurements were realized on whole cerebellar extracts from 3 mice per age and per genotype.

Bibliography

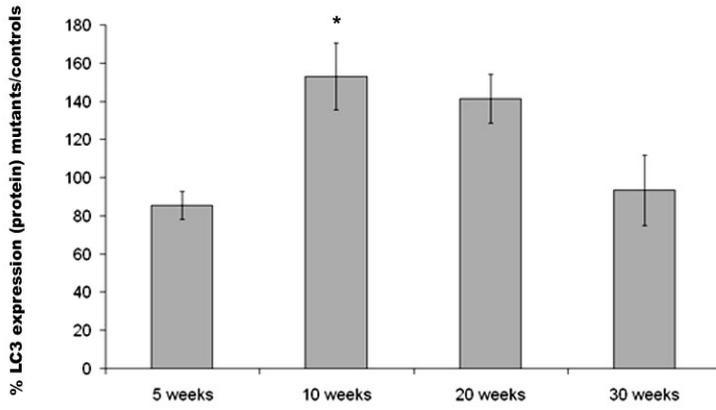
- Adamec E, Mohan PS, Cataldo AM, Vonsattel JP, Nixon RA (2000) Up-regulation of the lysosomal system in experimental models of neuronal injury: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 100:663-675.
- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl:S18-25.
- Antunes F, Cadenas E, Brunk UT (2001) Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J* 356:549-555.
- Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276:1709-1712.
- Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AH (2000) Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 9:275-282.
- Callahan LM, Vaules WA, Coleman PD (1999) Quantitative decrease in synaptophysin message expression and increase in cathepsin D message expression in Alzheimer disease neurons containing neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:275-287.
- Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Durr A, Mandel JL, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M (1997) Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 6:1771-1780.
- Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G (2004a) Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ* 11:591-595.
- Cande C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G (2004b) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 23:1514-1521.
- Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, Li J, Quarless S, Bursztajn S, Lippa C, Nixon RA (1995) Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* 14:671-680.
- Chantrel-Groussard K, Geromel V, Puccio H, Koenig M, Munnich A, Rotig A, Rustin P (2001) Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 10:2061-2067.
- Choi AM, Alam J (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:9-19.
- Cossee M, Puccio H, Gansmuller A, Koutnikova H, Dierich A, LeMeur M, Fischbeck K, Dolle P, Koenig M (2000) Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* 9:1219-1226.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 14:729-739.
- Duby G, Foury F, Ramazzotti A, Herrmann J, Lutz T (2002) A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet* 11:2635-2643.
- Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M (1996) Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 335:1169-1175.
- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *Faseb J* 15:2286-2287.
- Emond M, Lepage G, Vanasse M, Pandolfo M (2000) Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* 55:1752-1753.
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH (1999) Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1:152-157.
- Fogg S, Agarwal A, Nick HS, Visner GA (1999) Iron regulates hyperoxia-dependent human heme oxygenase 1 gene expression in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:797-804.
- Foury F (1999) Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett* 456:281-284.
- Foury F, Cazzalini O (1997) Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett* 411:373-377.
- Gerber J, Muhlenhoff U, Lill R (2003) An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* 4:906-911.
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
- Ham D, Schipper HM (2000) Heme oxygenase-1 induction and mitochondrial iron sequestration in astroglia exposed to amyloid peptides. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:587-596.
- Harding AE (1981) Early onset cerebellar ataxia with retained tendon reflexes: a clinical and genetic study of a disorder distinct from Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44:503-508.

- Huynen MA, Snel B, Bork P, Gibson TJ (2001) The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum Mol Genet* 10:2463-2468.
- Jaattela M, Tschopp J (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 4:416-423.
- Jaattela M, Cande C, Kroemer G (2004) Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death Differ* 11:135-136.
- Jellinger KA, Stadelmann C (2000) Mechanisms of cell death in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm Suppl* 59:95-114.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19:5720-5728.
- Kikuchi H, Yamada T, Furuya H, Doh-ura K, Ohyagi Y, Iwaki T, Kira J (2003) Involvement of cathepsin B in the motor neuron degeneration of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 105:462-468.
- Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, Shibata M, Yamamoto K, Kominami E, Peters C, von Figura K, Uchiyama Y (2000) Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J Neurosci* 20:6898-6906.
- Lang-Rollin IC, Rideout HJ, Noticewala M, Stefanis L (2003) Mechanisms of caspase-independent neuronal death: energy depletion and free radical generation. *J Neurosci* 23:11015-11025.
- Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S, Nicotera P (1999) Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res* 249:396-403.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366:177-196.
- Lesuisse E, Santos R, Matzanke BF, Knight SA, Camadro JM, Dancis A (2003) Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum Mol Genet* 12:879-889.
- Lipton SA, Bossy-Wetzel E (2002) Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell* 111:147-150.
- Liu ZM, Chen GG, Ng EK, Leung WK, Sung JJ, Chung SC (2004) Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* 23:503-513.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2405-2419.
- Lossi L, Merighi A (2003) In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 69:287-312.
- Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:120-129.
- Morse D, Choi AM (2002) Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:8-16.
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Gerber J, Lill R (2002a) Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J Biol Chem* 277:29810-29816.
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G, Lill R (2002b) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* 11:2025-2036.
- Pianese L, Busino L, De Biase I, De Cristofaro T, Lo Casale MS, Giuliano P, Monticelli A, Turano M, Criscuolo C, Filla A, Varrone S, Coccozza S (2002) Up-regulation of c-Jun N-terminal kinase pathway in Friedreich's ataxia cells. *Hum Mol Genet* 11:2989-2996.
- Poss KD, Tonegawa S (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10919-10924.
- Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P, Koenig M (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27:181-186.
- Ramazzotti A, Vanmansart V, Foury F (2004) Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 557:215-220.
- Rhyu IJ, Abbott LC, Walker DB, Sotelo C (1999) An ultrastructural study of granule cell/Purkinje cell synapses in tottering (tg/tg), leaner (tg(la)/tg(la)) and compound heterozygous tottering/leaner (tg/tg(la)) mice. *Neuroscience* 90:717-728.
- Ristow M, Pfister MF, Yee AJ, Schubert M, Michael L, Zhang CY, Ueki K, Michael MD, 2nd, Lowell BB, Kahn CR (2000) Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12239-12243.
- Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ (2004) Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2463-2472.
- Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A, Rustin P (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17:215-217.

- Sakamoto N, Chastain PD, Parniewski P, Ohshima K, Pandolfo M, Griffith JD, Wells RD (1999) Sticky DNA: self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia. *Mol Cell* 3:465-475.
- Santos MM, Ohshima K, Pandolfo M (2001) Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum Mol Genet* 10:1935-1944.
- Scarano V, de Cristofaro T, De Michele G, Salvatore E, De Biase I, Monticelli A, Filla A, Coccozza S (2001) Serum transferrin receptor levels in Friedreich's and other degenerative ataxias. *Neurology* 57:159-160.
- Schipper HM (2004) Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 1012:84-93.
- Schipper HM, Bernier L, Mehindate K, Frankel D (1999) Mitochondrial iron sequestration in dopamine-challenged astroglia: role of heme oxygenase-1 and the permeability transition pore. *J Neurochem* 72:1802-1811.
- Schipper HM, Chertkow H, Mehindate K, Frankel D, Melmed C, Bergman H (2000) Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD. *Neurology* 54:1297-1304.
- Schulz JB, Dehmer T, Schols L, Mende H, Hardt C, Vorgerd M, Burk K, Matson W, Dichgans J, Beal MF, Bogdanov MB (2000) Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* 55:1719-1721.
- Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253-266.
- Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, Rustin P, Koenig M, Puccio H (2004) Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci* 24:1987-1995.
- Stypmann J, Glaser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R, Monnig G, Haverkamp W, Breithardt G, Schmahl W, Peters C, Reinheckel T (2002) Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6234-6239.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
- Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, Ikeda-Saito M, Yoshida M, Igarashi K (2004) Heme regulates gene expression by triggering Crml-dependent nuclear export of Bach1. *Embo J* 23:2544-2553.
- Tan G, Napoli E, Taroni F, Cortopassi G (2003) Decreased expression of genes involved in sulfur amino acid metabolism in frataxin-deficient cells. *Hum Mol Genet* 12:1699-1711.
- Terwel D, van de Berg W (2000) c-Jun/AP-1 (N) directed antibodies cross-react with "apoptosis-specific protein" which marks an autophagic process during neuronal apoptosis. *Neuroscience* 96:445-446.
- Uchiyama Y (2001) Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch Histol Cytol* 64:233-246.
- Waldvogel D, van Gelderen P, Hallett M (1999) Increased iron in the dentate nucleus of patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 46:123-125.
- Wang X, Manganaro F, Schipper HM (1995) A cellular stress model for the sequestration of redox-active glial iron in the aging and degenerating nervous system. *J Neurochem* 64:1868-1877.
- Wilson RB, Roof DM (1997) Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet* 16:352-357.
- Wilson RB, Lynch DR, Fischbeck KH (1998) Normal serum iron and ferritin concentrations in patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 44:132-134.
- Wong A, Yang J, Cavadini P, Gellera C, Lonnerdal B, Taroni F, Cortopassi G (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet* 8:425-430.
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 14:180-198.
- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S (1999) Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103:129-135.
- Yoon T, Cowan JA (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc* 125:6078-6084.
- Yoon T, Cowan JA (2004) Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* 279:25943-25946.
- Yuan J, Lipinski M, Degterev A (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40:401-413.
- Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT (2003) Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem* 270:3778-3786.

Figure 2

a



b

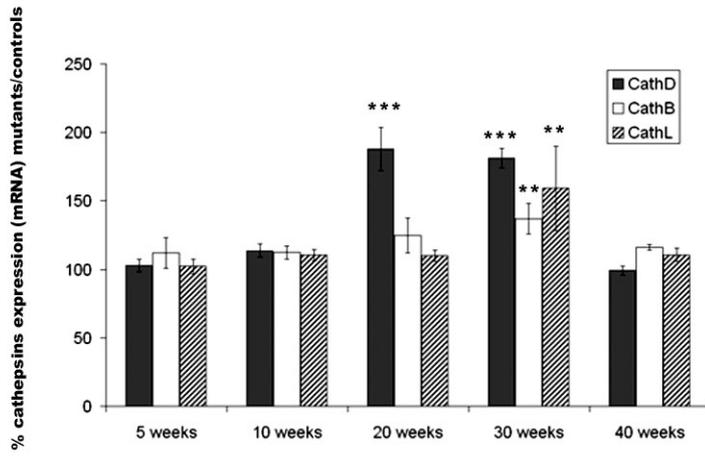


Figure 3

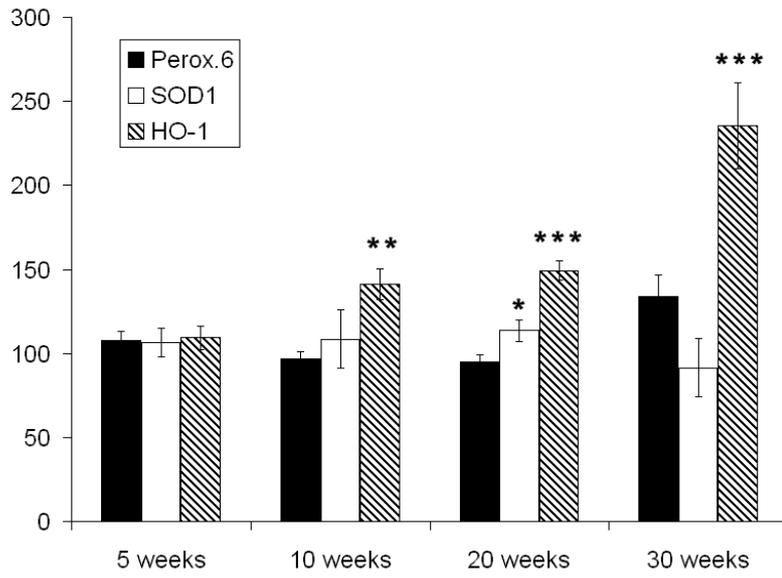
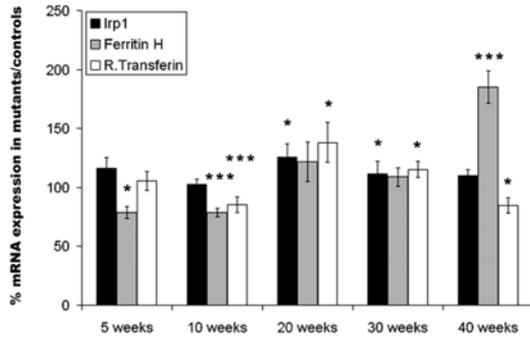
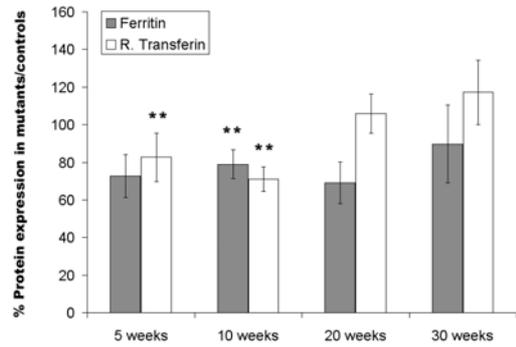


Figure 4

a



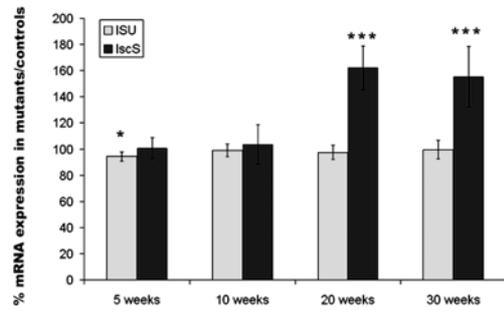
b



c

Activity	10	30
mut./cont.(%)	weeks	weeks
ACONITASE	101 +/- 5	-
SDH	107 +/- 17	75 +/- 7

d



LEGENDS

Figure 1 : Progressive mitochondrial swelling in granule cells followed by axonal defects and lipofuscin accumulation

a-d. Progressive mitochondrial swelling as shown by red circles, with damaged cristae in mutant granule cells, associated with an enlarged cytoplasm. Moderate swelling is present at 10 weeks (a), and is evolving into giant mitochondria at 20 weeks (b) and 30 weeks (c) compare with control at 30 weeks (d). Note also at 30 weeks in a mutant, presence of woolly densities in the two upper encircled mitochondria and highly condensed nucleus (white asterisk).

e. Lipofuscin (L) accumulation at 30 weeks with presence of granule cells showing heterochromatin condensation at the periphery of the nucleus (red arrowhead).

f. Higher-power view of woolly densities at 30 weeks in a voluminous mitochondria (black arrowhead).

g. Crystalline-like array of smooth reticulum in a myelinated axon of the neuropil (white arrowhead) and presence of swollen mitochondria (m) at 30 weeks.

h. Abnormally dense mitochondria isolated in an autophagosome in neuropil here at 1 year.

m: mitochondria, PC : Purkinje cell, L: lipofuscin.

1cm : 2,8 μm (a-d), 4 μm (e), 1,1 μm (f), 2 μm (g), 1 μm (h).

Figure 2 : Autophagy and cathepsins induction

a. Western blot analysis with LC3 polyclonal antibody performed on whole cerebellar protein extracts between 5 and 30 weeks. Relative expression is expressed as a percentage of LC3 protein expression in mutant extracts compared to controls, normalized using β -tubulin. Significant increase was measured at 10 weeks.

b. Quantitative RT-PCR analysis of cathepsins B, D, L expression levels, performed on whole cerebellar RNA extracts ranging from 5 to 40 weeks. Results are expressed as a percentage of cathepsins expression levels in mutants extracts compared to controls, normalized using hprt transcript. Cathepsin D expression is significantly increased at 20 weeks, whereas all three cathepsins show significant induction at 30 weeks.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Figure 3 : HO-1 induction in absence of oxidative stress

Quantitative RT-PCR analysis of SOD1, Peroxiredoxin 6 and HO-1 expression levels, performed on whole cerebellar RNA extracts ranging from 5 to 30 weeks. Results are expressed as a percentage of gene expression levels in mutants extracts compared to controls, normalized using hprt transcript. HO-1 expression is significantly and progressively increased between 10 and 30 weeks.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Figure 4 : Disturbed iron homeostasis regulation and reduced Fe-S cluster containing enzymes deficiency

a. Quantitative RT-PCR analysis of IRP1, Ferritin H and Transferrin Receptor expression levels, performed on whole cerebellar RNA extracts ranging from 5 to 40 weeks. Results are expressed as a percentage of gene expression levels in mutants extracts compared to controls, normalized using hprt transcript.

b. Western blot analysis of Ferritine and Transferrin Receptor protein levels performed on cerebellum whole protein extracts between 5 and 30 weeks. Relative expression was expressed as a percentage of protein expression in mutant extracts compared to controls, normalized using β -tubulin. Significant decrease was measured at 5 and 10 weeks.

c. Activity of aconitase and succinate dehydrogenase (SDH) in whole cerebellar extracts of 10 and 30 weeks-old mice, expressed in percentage (ratio of mutant to control) (n=3). Aconitase was not measured at 30 weeks.

d. Quantitative RT-PCR analysis of IscS and IscU expression levels, performed on whole cerebellar RNA extracts ranging from 5 to 30 weeks. Results are expressed as a percentage of gene expression levels in mutants extracts compared to controls, normalized using hprt transcript.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

PUBLICATION 5
(manuscrit soumis)

Friedreich ataxia, the oxidative stress paradox.

Seznec H, Simon D, Bouton C, Reutenauer L, Hertzog A, Drapier J.C,
Procaccio V, Patel M, Koenig M, Puccio H.

PUBLICATION 5



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Seznec H, **Simon D**, Bouton C, Reutenauer L, Hertzog A, Drapier J.C, Procaccio V, Patel M, Koenig M, Puccio H.

Friedreich ataxia, the oxidative stress paradox.

Hum Mol Genet. 2005 ;14(4):463-474.

Pages 463-474 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://hmg.oupjournals.org/cgi/content/full/14/4/463?>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

DISCUSSION

PARTIE III

DISCUSSION

Les premiers modèles murins de l'ataxie de Friedreich

Les modèles murins générés au laboratoire, par inactivation conditionnelle et/ou inductible du gène de la frataxine, ont été les premiers et sont encore à ce jour, les seuls modèles reproduisant la pathophysiologie de l'AF. Ils nous ont permis : i) de reproduire les atteintes cardiaques et neurologiques spécifiques de l'AF aux niveaux phénotypique, fonctionnel, structural, ultrastructural et biochimique, ii) de mettre en évidence le déficit primaire de l'activité des protéines à noyau Fe-S et l'accumulation secondaire de fer conséquente, iii) d'exclure une participation majeure du stress oxydatif dans la pathologie développée par nos souris, iv) de définir les mécanismes neurodégénératifs impliqués dans différents types neuronaux v) de concevoir des essais thérapeutiques sur les symptômes cardiaques et neurologiques, en commençant par l'idébénone.

Lors de la découverte du défaut en activité des protéines à noyau Fe-S dans deux biopsies cardiaques de patients (Rötig 1997), le modèle de déficit secondaire à une accumulation du fer intramitochondrial est rapidement apparu comme une hypothèse évidente, les noyaux Fe-S étant particulièrement sensibles aux radicaux libres. Le schéma du cercle vicieux impliquant l'accumulation mitochondriale de fer, le stress oxydatif et la déstabilisation des noyaux Fe-S est accepté par la communauté scientifique. Au cours des cinq dernières années, les modèles murins ont grandement participé au remplacement de ce cercle vicieux (initialement proposé en absence de frataxine) par une séquence d'évènements. Ainsi, l'évènement primaire en absence de frataxine correspond à un défaut de l'assemblage des noyaux Fe-S conduisant à l'accumulation secondaire et tardive de fer (défaut d'incorporation et déstabilisation des noyaux).

La génération de modèles murins était essentielle dans la compréhension de la physiopathologie de l'AF et la réalisation d'essais thérapeutiques, car en l'absence de phénotype spontané des lignées cellulaires de patients à partir de lymphoblastes et fibroblastes, les levures représentaient alors le seul modèle *in vivo* de l'absence de frataxine. Or, si la levure a été un acteur essentiel dans la découverte de la fonction de la frataxine en démontrant un lien étroit entre la frataxine et le fer mitochondrial puis en remplaçant la

frataxine dans la voie de biosynthèse des noyaux Fe-S, les différences des métabolismes du fer et de l'hème par rapport aux mammifères rendaient nécessaire l'obtention d'un modèle plus proche de l'homme. De plus, des modèles murins étaient nécessaires pour disséquer les cascades moléculaires impliquées aux niveaux neurologique et cardiaque.

La stratégie par inactivation conditionnelle adoptée par le laboratoire, bien que ne reproduisant pas exactement le défaut moléculaire des patients atteints par l'AF, a été la plus fructueuse. Nos modèles présentent en effet une absence totale de frataxine dans les cellules avec une recombinase active, au contraire des patients dont toute cellule présente un taux résiduel de protéine. M. Ristow a également réalisé les croisements de nos souris présentant l'exon 4 entre deux sites loxP à l'état homozygote avec une souris exprimant une recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules β du pancréas, lui permettant d'obtenir un modèle murin du diabète développé en l'absence de frataxine (Ristow 2003). Hormis ces approches conditionnelles, d'autres équipes ont tenté d'introduire l'expansion trinuécléotidique de GAA mais sans réussir à entraîner, pour l'instant, de phénotype chez la souris et ce même tardivement. L'introduction d'une séquence répétée GAA est envisageable par deux techniques : le gène FRDA humain porté par un YAC ou un BAC et possédant une expansion pathologique peut être introduit dans un fond murin KO (souris transgénique) ou l'expansion peut être directement insérée dans le gène murin par recombinaison homologue (modèle KI). La réalisation d'un KI reproduisant l'expansion trinuécléotidique GAA s'est heurtée à différents problèmes : difficultés pour cloner une séquence répétée pure de grande taille, mais aussi nécessité de séquences en amont et en aval pour induire l'instabilité de ces séquences. Le groupe de M. Pandolfo n'a ainsi pas pu introduire d'expansion supérieure à 230 GAA conduisant de 25 à 35 % de protéine résiduelle (souris hétérozygotes pour la délétion du gène sur un allèle et pour l'expansion 230 GAA) avec une stabilité somatique et intergénérationnelle de l'expansion (Miranda 2002). L'autre stratégie basée sur la réintroduction d'une séquence répétée humaine sur un fond KO est possible car le YAC contenant le gène humain de la frataxine et ses séquences flanquantes peut compléter l'inactivation du gène murin (Pook 2001). Des expériences semblables utilisant un YAC contenant le gène (et les séquences flanquantes) de la frataxine humaine présentant une expansion GAA de grande taille dans le premier intron, sont en cours. Dans ces conditions, une instabilité intergénérationnelle, allant aussi bien dans le sens des expansions que des contractions a été observée (communication de M. Pook, 2003 *International Friedreich's Ataxia Research Conference, U.S.A*, revue Seznec 2004a). Les résultats préliminaires de M. Pook sont encourageants et démontrent que les souris homozygotes pour des expansions de

DANS LES TISSUS ATTEINTS	Présence de stress oxydatif (Barnham 2004, Ischiropoulos and Beckman 2003)	Apoptose/Nécrose (Mattson 2000)	Mitochondrie (Orth 2001, Schon 2003)	Métabolisme du fer ou autres métaux (Ke 2003)	Protéasome et autophagie (Ogier-Denis 2003)
Maladie d'Alzheimer Hippocampe et cortex cérébral frontal (Zhu 2004)	-Augmentation des marqueurs de l'oxydation des protéines, lipides, ADN, sucres -Augmentation de HO-1, NADPH, glutathion, SOD1, catalase, GSHPx, GSSG-R, peroxiredoxines, Hsps	Mort apoptotique et non apoptotique décrites Nombreux marqueurs apoptotiques comme la caspase 3 (Dickson 2004)	Défaut d'activité de la COX, du complexe I et du cycle de Krebs (pyruvate dehydrogenase, α -ketoglutarate deshydrogenase) (Perry 2002)	-Niveau élevé de fer sans augmentation de la ferritine, de la transferrine, du récepteur de la transferrine -Augmentation de IRP1, 2 (Ozcanakaya and Delibas 2002)	-Perturbation des enzymes lysosomales (Cathepsine D par ex.) -Ubiquitine associées aux agrégats -Lipofuscine -Vacuoles autophagiques (Nixon 2000)
Maladie de Parkinson Substance noire (Neurones dopaminergiques) (Dauer 2003)	-Augmentation des marqueurs de l'oxydation des protéines, lipides, ADN -Diminution du glutathion, de la catalase, de la glutathione peroxydase - Augementation des SODs, HO-1, catalase, GSHPx	Mort apoptotique et non apoptotique décrites Marqueurs apoptotiques modifiés : Bax, Bcl-xL, caspases 3, 8, 9	Défaut de l'activité du complexe I, et de l' α -ketoglutarate deshydrogenase	-Niveau élevé de fer sans augmentation de l'expression de la ferritine (Takanashi 2001)	-Perte spécifique de l'activité d'une sous-unité du protéasome -Ubiquitine associées aux agrégats -Lipofuscine -Vacuoles autophagiques
Sclérose amyotrophique latérale (SLA) Cortex moteur et moelle épinière (m.e) (Carri 2003)	-Augmentation des marqueurs de l'oxydation des protéines, lipides, ADN -Augmentation de : GSHPx et son cofacteur (selenium), SOD2, catalase -Induction d'enzymes de la réparation de l'ADN	Apoptose : SOD1 mutée est pro-apoptotique (nombreux marqueurs modifiés) (Pasinelli 2004)	Défaut de l'activité des complexes I, II, III, IV et de la citrate synthase (dans m.e et certaines régions du cerveau) (Wiedemann 2002)	-Pas de différence du niveau total de cuivre -Niveau élevé de fer dans certaines régions du cerveau, et des ferritines H et L -Augmentation des métallothionéines dans m.e.	-Réduction de l'activité du protéasome -Ubiquitine associée aux agrégats -Vacuoles autophagiques
Maladie de Huntington Striatum et cortex cérébral	-Augmentation de SOD2 -Pas d'augmentation des marqueurs de l'oxydation des lipides, ADN, protéines (Alam 2000) -Augmentation de ces marqueurs décrite dans d'autres études (Browne 1999)	Apoptose -Marqueurs apoptotiques modifiés dont rôle important de la caspase 2 (Hermel 2004) -Clivage de la Huntingtine par caspases	Défaut d'activité des complexes II, III et de l'aconitase	-Niveau élevé dans les ganglions de la base	-Activation du protéasome -Participation des cathepsines (certaines cathepsines localisées dans les inclusions) -Vacuoles autophagiques
Ataxie de Friedreich Cœur et ganglions rachidiens	Non démontré dans les tissus atteints	Pas décrit	Défaut d'activité des complexes I, II, III de la chaîne respiratoire et des aconitases (Rötig 1997)	-Niveau élevé dans le cœur (Lamarche 1980)	-Lipofuscine observées dans les ganglions rachidiens et dans le cœur (Lamarche 1980, 1982)

Tableau 5 : Observations biochimiques et moléculaires réalisées dans les tissus lésés de patients autopsiés atteints par différentes maladies neurodégénératives

200 GAA (mais avec une variabilité de la taille de l'expansion selon les tissus) réalisent des performances réduites lors du test du rotarod, à 3, 6 et 9 mois. À terme, les deux types de modèles (conditionnels et avec expansions) seront très certainement complémentaires car ils permettent d'obtenir des niveaux de sévérité différents importants notamment dans la réalisation d'essais thérapeutiques.

Importance des modèles murins dans la compréhension des maladies dégénératives

De façon plus générale, les modèles murins sont essentiels pour la compréhension des mécanismes des maladies évoluant lentement et avec des variations symptomatiques importantes entre les individus, comme les maladies neurodégénératives, associées ou non à des symptômes non neurologiques. Les tissus atteints disponibles proviennent en effet uniquement d'autopsies, soit à des stades avancés de la pathologie, et il est impossible éthiquement, de réaliser un acte aussi traumatisant qu'une biopsie (surtout du système nerveux) sans effet bénéfique immédiat (Murphy 2003). Il est de plus parfois difficile de réaliser des comparaisons entre les tissus autopsiés de patients à des stades pathologiques différents et des contextes génétiques différents. Par ailleurs, l'absence de phénotype des lignées de fibroblastes et lymphoblastes de patients complique la compréhension des mécanismes moléculaires et la réalisation de cribles de molécules potentiellement thérapeutiques.

Les études réalisées sur les tissus provenant d'autopsies de patients sont bien sûr essentielles et ont conduit notamment à l'identification de lésions spécifiques, comme les plaques séniles et les lésions neurofibrillaires dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il y a plus de 100 ans. Elles permettent encore aujourd'hui de confirmer avec certitude le diagnostic. Cependant, toutes les lésions ne peuvent pas être déterminées de façon exhaustive car l'examen complet de la moelle épinière ou du cerveau est très lourd et les neurones atteints encore présents au moment de l'autopsie perdent généralement les marqueurs phénotypiques les caractérisant limitant les comptages (Przedborski 2003). Par ailleurs, la mesure de paramètres biochimiques en vue de la compréhension des mécanismes de neurodégénérescence conduit à des observations semblables dans les tissus spécifiquement atteints de la plupart des maladies neurodégénératives avec i) une accumulation de fer, ii) une augmentation des marqueurs de stress oxydatif et iii) des défauts mitochondriaux. Le tableau 5 illustre ce point en répertoriant certaines de ces mesures (liste non exhaustive) dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la SLA (sclérose latérale amyotrophique), la

maladie de Huntington et l'AF. Les tissus autopsiés correspondent en effet à des stades pathologiques avancés et il est difficile de déterminer par analyse post-mortem si ces différents éléments sont primaires, secondaires, ou dus à un processus final de dégénérescence qui serait commun à toute mort neuronale. De plus, des phénomènes similaires se produisant lors des processus « normaux » de vieillissement et l'absence de tissus « contrôles » correspondant rendent difficile l'attribution stricte à la neurodégénérescence. Le fer est en effet le métal de transition le plus abondant du cerveau et est important dans le transport de l'oxygène, les activités métaboliques, la synthèse de la myéline et de certains neurotransmetteurs (Thompson 2001). Le cerveau est aussi en fonction de son poids, l'organe consommant le plus d'oxygène (25 % de l'oxygène consommé) et les neurones sont très sensibles au stress oxydatif, avec une capacité de détoxification limitée (Lindenau 2000, Li 1995), sans régénérescence possible du tissu nerveux. On peut donc supposer que la co-occurrence d'une accumulation de fer, de stress oxydatif et de défauts mitochondriaux correspond très probablement à une seule et même lésion neuropathologique et que leur présence concomitante est expliquée par leur lien étroit (Schipper 2004). Ces observations ont très certainement contribué à l'affirmation de la présence de stress oxydatif dans l'AF bien qu'aucune augmentation des marqueurs de stress n'ait été mesurée dans les tissus cardiaques ou nerveux.

Les modèles murins représentent ainsi une source de tissus sains et atteints à différents stades de la pathologie, permettant de disséquer les étapes de l'apparition des lésions neuronales primaires menant à la neurodégénérescence. Ils permettent également la création de lignées cellulaires variées.

Le stress oxydatif : cause ou conséquence ?

L'implication du stress oxydatif dans l'AF fait l'objet d'un débat animé. Il est certain que l'association fer, mitochondrie et plus précisément chaîne respiratoire suggère obligatoirement la présence de radicaux libres. Cependant, chez les patients, aucune mesure directe de stress oxydatif n'a été réalisée dans les tissus atteints (MacEvilly 1997). Les études cinétiques réalisées sur les tissus issus des modèles murins *Frda/MCK* et *Cb*, ont ainsi permis de montrer l'absence d'implication du stress oxydatif dans la déstabilisation des noyaux Fe-S et ce, même en fin de pathologie, en présence d'une accumulation de fer. Ces données ne sont pas en contradiction pour autant avec la présence l'augmentation de certains marqueurs dans

l'urine ou le sang des patients reflétant plutôt la dégénérescence secondaire ou un état général altéré (Schulz 2000, Emond 2000).

Une difficulté pouvant en effet être rencontrée dans la création de modèles murins de maladies neurodégénératives, est l'absence de phénotype développé sur l'échelle de temps correspondant à l'espérance de vie de l'animal (2 ans). Ainsi, il n'existe pour l'instant, dans la maladie de Parkinson, aucun modèle murin génétique reproduisant la sélectivité de la mort spontanée des neurones dopaminergiques, qui semble se produire, chez l'homme, sur une échelle de temps plus longue. C'est probablement pour cette raison que les expansions de 230 GAA introduites chez la souris dans le KI de la frataxine n'entraîne pas de phénotype à 2 ans. Cependant, ces modèles murins restent utiles pour la détermination des événements primaires de neurodégénérescence et la définition, en absence de phénotype, de marqueurs présymptomatiques ou « biomarqueurs » (DeKosky 2003).

De façon générale, les modèles murins ont fortement contribué à la mise en doute de l'implication primaire des radicaux libres dans les maladies neurodégénératives. Les KI murins de la SOD1 (mutée dans 15 % des cas familiaux de SLA), ont ainsi permis de favoriser l'hypothèse d'un effet toxique des mutations conduisant à une oligomérisation de la protéine par opposition à une action pro-oxydante de celle-ci par un défaut de la régulation du stress oxydatif, n'excluant pas la production secondaire de stress par l'agrégat (Williamson 2000, Ischiropoulos and Beckman 2003, Valentine 2003). De même, les modèles KI de la maladie d'Alzheimer avec mutations dans le gène APP (« Amyloid protein precursor », protéine membranaire précurseur du peptide β -amyloïde ($A\beta$) à l'origine des plaques séniles) ont montré que le défaut primaire était dû à un défaut synaptique avant toute accumulation observable de $A\beta$ (Bossy-Wetzel 2004). En conclusion, il est plus juste de considérer que le stress oxydatif participe à la propagation des lésions menant à la neuropathologie de façon plus ou moins centrale selon les affections (Andersen 2004, Ischiropoulos and Beckman 2003).

La mitochondrie au centre des mécanismes de mort cellulaire

Les tissus nerveux des animaux Cb étudiés à différents âges ont permis de mettre en évidence la séquence des événements entraînant la mort des cellules granulaires du cervelet et des cellules sensibles des ganglions rachidiens. En accord avec les observations réalisées par plusieurs auteurs, même à l'aide de tissus murins à différents âges, il est difficile de distinguer strictement nécrose, apoptose et autophagie, et le nouveau terme « necrapoptosis » proposé

récemment est particulièrement adapté (Lemasters 1999, Kim 2003). En ce sens, il a été notamment démontré que l'induction de l'autophagie était souvent observée avant une mort par apoptose afin de réduire la masse cytoplasmique (Locksin 2001), que le système lysosomal était activé de façon primaire dans les neurones atteints dans la maladie d'Alzheimer qui meurent pourtant par apoptose (Nixon 2000) ou encore que les étapes finales de l'autophagie, une fois la plus grande partie du cytoplasme dégradée, sont de type apoptotique (Locksin 2004). Les différents traits partagés par les mécanismes de mort cellulaire ont également été discutés de façon plus approfondie dans la partie résultats (4.2.a).

La co-occurrence de ces trois types de mort cellulaire dans les neurones des modèles murins de l'AF peut être expliquée par le rôle central de la mitochondrie, joué dans tous ces processus. Ainsi, un facteur clé dans le déroulement des cascades nécrotiques, autophagiques et apoptotiques est le gonflement mitochondrial par l'ouverture d'un pore membranaire mitochondrial appelé canal ou pore de transition de la perméabilité mitochondriale (PTPM) (Lemasters 1998, Lemasters 2002, Rodriguez-Enriquez 2004). Pour certains, il fait intervenir uniquement la membrane interne de la mitochondrie et implique les protéines de la famille Bcl-2 (Bax et Bak, pro-apoptotiques) associées ou non au canal anionique voltage-dépendant (VDAC, « voltage-dependent anion channel ») (Jäätelä 2004). Un autre modèle décrit un pore plus imposant composé de la cyclophiline D (matrice), le translocateur de l'adénine (ANT, « adenine nucleotide translocator ») (membrane interne), VDAC (membrane externe), le récepteur aux benzodiazépines, la molécule pro-apoptotique Bax (Crompton 1999). Ce dernier modèle ne peut cependant pas expliquer toutes les conditions expérimentales, comme le KO murin de ANT qui présente un PTPM fonctionnel dans les mitochondries (Rodriguez-Enriquez 2004, He and Lemasters 2004). Ainsi, un modèle original propose également un pore formé par l'agrégation de protéines non correctement repliées ou défectueuses résultant de dommages variés ou d'un stress oxydatif, constituant un signal très primaire d'un défaut mitochondrial (He and Lemasters 2002). L'ouverture du PTPM permet donc d'induire l'apoptose par le relargage de molécules pro-apoptotiques, la nécrose en présence d'une forte diminution d'ATP ou l'autophagie, en conséquence de la séquestration des mitochondries avec un potentiel de membrane altéré ou des protéines défectueuses (Ogier-Denis and Codogno 2003). Bien sûr, ces mécanismes peuvent être également induits indépendamment de l'ouverture de ce canal.

Le schéma récapitulatif suivant est particulièrement bien adapté aux observations réalisées dans le cervelet des mutants Cb. Le gonflement mitochondrial initial est ainsi probablement dû à une augmentation de la perméabilité mitochondriale suite à un défaut de la

chaîne respiratoire démontré par la réduction de l'activité de l'aconitase et du complexe II de la chaîne respiratoire dans le cervelet des mutants Cb. Il serait intéressant de vérifier si certaines protéines n'ayant pas incorporé de noyaux Fe-S participent à la formation du PTPM. Nous avons également proposé que dans les étapes initiales, l'autophagie avait un rôle de protection permettant en présence de peu de mitochondries gonflées, de dégrader ces organelles défectueux. Quand plus de mitochondries sont impliquées, l'autophagie ne peut alors plus assurer une séquestration suffisante et éviter soit l'apoptose en empêchant le relargage du cytochrome c (Elmore 2001, Takano-Ohmuro 2000), soit la chute énergétique, entraînant donc, selon les niveaux d'ATP, une mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Rodriguez-Enriquez 2004). Ainsi dans les cellules granulaires, les mécanismes enclenchés suggèrent dans un second temps, une induction caspase-indépendante de AIF (qui est en cours d'investigation) avec une mort finale par nécrose. AIF est une flavoprotéine mitochondriale bi-fonctionnelle, impliquée d'une part dans la régulation de l'apoptose en devenant une DNase active par sa coopération avec la cyclophiline A dans les cellules de mammifères (Cande 2004b) et d'autre part, dans l'assemblage et/ou la maintenance du complexe I de la chaîne respiratoire (Vahsen 2004). Ce dernier point bien que non démontré pour l'instant sous-entend une connexion directe entre l'activité de la chaîne respiratoire et les mécanismes de mort cellulaire. L'élucidation de ces mécanismes est en cours et les cultures de cellules granulaires seront un outil précieux. Les mécanismes de mort cellulaire caspase-indépendants sont encore loin d'être compris et notre modèle permettra d'apporter de nouveaux éléments. Il faudra notamment vérifier l'implication des cathepsines, car si leur rôle dans l'induction de l'apoptose classique est démontré depuis plusieurs années (Leist 2001), il a été proposé plus récemment que la cathepsine D pouvait également induire la translocation nucléaire de AIF (Jäättelä 2004).

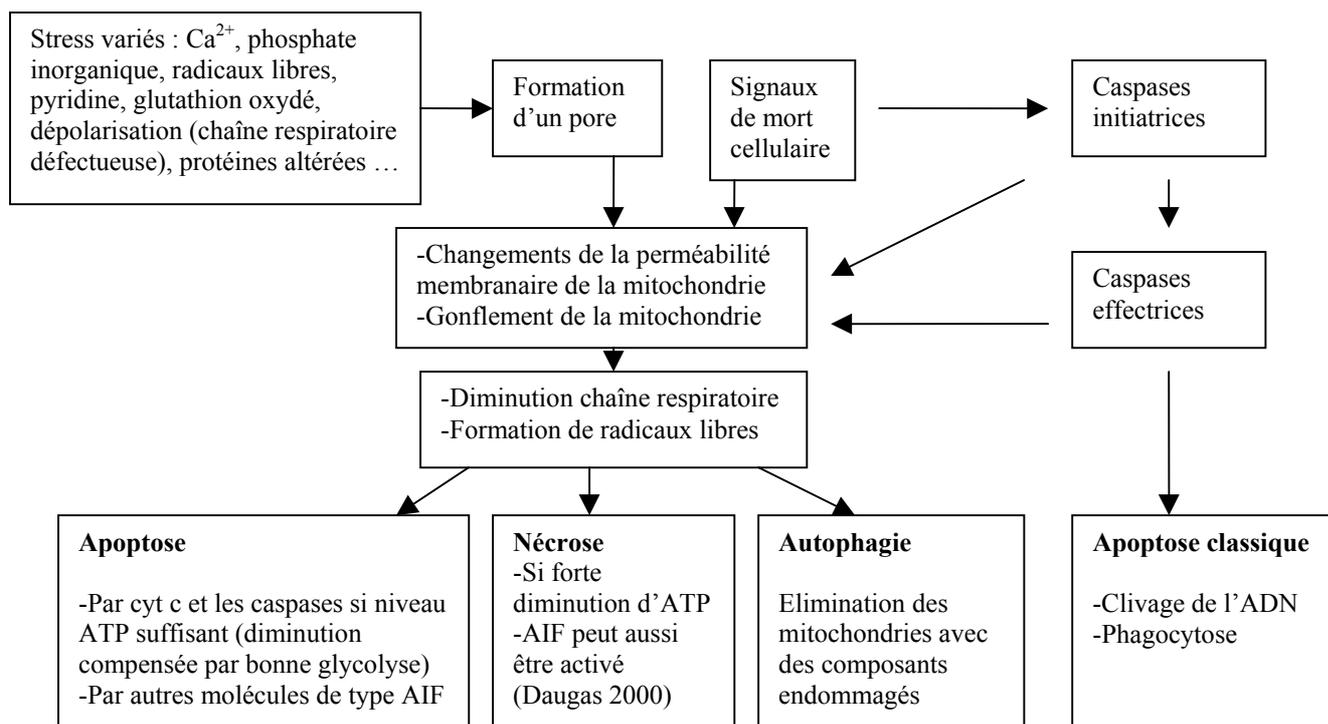


Figure 44 : Induction des différents types de mort cellulaire par l'ouverture du PTPM

De façon générale, la mitochondrie semble tenir une place importante dans les principales maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et Parkinson, SLA, maladie de Huntington) (Schon and Manfredi 2003). Ainsi, un blocage de la chaîne respiratoire par différentes toxines dans des cellules en culture ou dans des modèles murins, peut entraîner une accumulation du peptide A β observée dans la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down (Busciglio 2002), une accumulation des corps de Lewy spécifiques de la maladie de Parkinson (Lee 2002), ou une pathologie très similaire à la maladie de Huntington (Napolitano 2004). Par ailleurs, l'exposition de l'homme ou des animaux au MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), un inhibiteur du complexe I, conduit au développement de symptômes typiques de la maladie de Parkinson. Dans la SLA, la découverte d'une localisation mitochondriale de la SOD1 dans l'espace inter-membranaire longtemps considérée comme cytosolique, explique les lésions mitochondriales observées dans la moelle épinière des patients.

Dans le tissu cardiaque des mutants Frda/MCK, la présence de vacuoles de dégénérescence en très grand nombre suite à une délétion quasi-totale de la frataxine c'est-à-dire dans tous les cardiomyocytes, rend difficile l'attribution de la mort cellulaire à une nécrose avancée ou à des processus autophagiques. La réalisation de marquage

immunohistochimiques serait intéressante, notamment la détection des cathepsines B et L, significativement augmentées lors de l'étude transcriptionnelle (Seznec 2004c soumis). La dégénérescence autophagique a été démontrée dans les cardiomyopathies dilatées (Shimomura 2001).

La détermination des mécanismes de mort cellulaire est importante non seulement pour la compréhension de la progression de la pathologie et des mécanismes de neurodégénérescence mais aussi dans une optique thérapeutique. En effet, si l'autophagie permet d'éliminer régulièrement les mitochondries déficientes, empêchant par exemple la production de radicaux libres ou l'accumulation de fer et permettant d'avoir un niveau de production énergétique basal, la mort cellulaire se produit peut-être par essoufflement de ce mécanisme. Par ailleurs, une diminution des activités lysosomales est décrite au cours du vieillissement (Keller 2004). De plus, la frataxine est importante mais non essentielle à la biosynthèse des noyaux Fe-S, et un taux résiduel de protéine est présent chez les patients. Une stimulation continue de l'autophagie permettrait donc l'élimination des mitochondries défectueuses (renouvelées en temps normal tous les 15-20 jours dans les cellules post-mitotiques) pouvant fonctionner normalement un temps donné grâce à un niveau résiduel de frataxine.

Basée sur ce principe, une nouvelle voie thérapeutique basée sur la l'inhibition de la perméabilité membranaire mitochondriale afin de limiter la mort de cellules post-mitotiques, est actuellement en cours de développement. Ces molécules comprennent les inhibiteurs de l'ouverture du PTPM ou des protéines de la famille Bcl-2 modifiées en vue de traverser la membrane plasmique. Des essais pré-cliniques ont montré un effet de la cyclosporine A, un inhibiteur de la formation du PTPM, sur des modèles expérimentaux de la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington (Mattson and Kroemer 2003).

Importance des modèles murins dans la réalisation d'essais thérapeutiques

Les modèles murins sont également importants pour la réalisation d'essais thérapeutiques, et plus spécifiquement pour des maladies à évolution lente et variable telles les maladies neurodégénératives. Il est en effet très difficile de concevoir des essais thérapeutiques car ces maladies se déclenchent en général chez des personnes adultes, à des âges différents et selon des profils d'évolution symptomatiques variables, rendant impossible la réalisation de groupes homogènes de patients, pouvant ainsi masquer l'effet d'une molécule. De plus, la plupart de ces maladies ne sont pas diagnostiquées chez l'homme avant

l'apparition des symptômes. Ces difficultés expliquent l'absence de traitement préventif ou retardant la mort neuronale dans le cas des maladies neurodégénératives.

Il faut cependant garder en tête que certaines molécules avec des effets positifs sur la souris peuvent être sans effet sur l'homme. Ainsi, le remacémide (inhibiteur du récepteur NMDA) et le coenzyme Q10 ont augmenté significativement la survie et la performance sur rotarod des souris R6/2 modélisant la maladie de Huntington (surexpression d'un fragment N-terminal de la huntingtine) (Ferrante 2002) mais ont été sans effet chez l'homme lors d'un essai clinique réalisé sur 340 patients (Huntington study group 2001). Ces données peuvent être dues à un défaut dans l'essai clinique, à une différence physiologique entre souris et homme ou une combinaison des deux. Il est cependant important de reproduire le plus exactement possible la pathologie humaine chez la souris. Le développement des techniques permettant la transgénèse à l'aide de BAC, la réalisation de KI et la spécificité grandissante des recombinaisons devraient permettre d'améliorer la spécificité des modèles murins (Watase and Zoghbi 2003).

Nos modèles murins, bien que ne reproduisant pas exactement génétiquement l'AF ont permis de confirmer l'effet positif de l'idébénone, anti-oxydant, sur les aspects cardiaques. De plus, l'amélioration observée dans nos modèles démontrant une sévérité accrue (absence de protéine) renforce l'effet positif de la molécule. Les essais de l'idébénone ont été débutés simultanément chez les patients et dans les modèles murins suite aux résultats préliminaires positifs observés chez trois patients (Rustin 1999). La démonstration d'un effet de l'idébénone sur le modèle Frda/MCK a permis i) d'étayer l'effet thérapeutique de l'idébénone dans cette maladie afin d'accélérer sa mise sur le marché, ii) de valider définitivement notre modèle et iii) d'évaluer les effets biochimiques de l'idébénone (mesures des activités des protéines à noyaux Fe-S par exemple) difficilement réalisable chez l'homme. Cependant, si un effet a été mis en évidence au niveau cardiaque chez l'homme, la démonstration d'un effet bénéfique au niveau neurologique est beaucoup plus délicate. Les modèles neurologiques sont donc absolument essentiels. Les résultats préliminaires de l'essai ont démontré un effet de l'idébénone sur le modèle murin Cb pour un des paramètres testé, ce qui valide notre modèle neurologique tout en expliquant probablement les améliorations décrites par certains patients (parole, mouvements fins), bien que difficilement mesurables par les tests et échelles disponibles aujourd'hui. En absence de stress oxydatif mesuré dans nos modèles et dans les tissus atteints des patients, le mode d'action de l'idébénone n'est pas encore clairement défini. Il est possible que l'idébénone agisse sur l'activité de la chaîne respiratoire mais il serait

également intéressant d'étudier l'effet de l'idébénone sur la régulation directe ou indirecte de l'expression de certains gènes.

Il est donc important aujourd'hui de se concentrer sur la définition de nouvelles molécules issues d'autres familles chimiques et de ne pas se limiter aux anti-oxydants. Nous mettons beaucoup d'espoir dans la réalisation de cribles à haute densité à partir de modèles cellulaires provenant des modèles murins qui permettront peut-être de mettre en évidence de nouvelles pistes thérapeutiques.

Intérêt des modèles murins pour la génération de modèles cellulaires

Parmi les axes de recherche développés au laboratoire, l'un d'eux réalisé par H. Seznec consiste en la création d'un modèle cellulaire de l'AF à partir des fibroblastes murins. L'approche choisie a permis de diminuer l'expression du gène FRDA au niveau de son ARNm en utilisant un ribozyme, dans des fibroblastes murins issus du modèle Frda/MCK, présentant un taux initial de 50 % de frataxine, afin de se rapprocher de la situation observée chez les patients. Deux lignées distinctes avec 9 et 23 % de frataxine résiduelle ont été générées. Ces lignées présentent un défaut de croissance ainsi qu'un phénotype biochimique spécifique de l'AF avec une diminution de l'activité de l'aconitase et du complexe II de la chaîne respiratoire associée à une diminution de l'expression de la SOD2 (Seznec 2004c soumis). Ces déficits offrent autant de paramètres potentiellement corrigeables par la réalisation de criblage de molécules à grande échelle.

Vers de nouvelles pistes ...

Un point intéressant observé dans le modèle cellulaire et dans le cervelet des mutants Cb, correspond à une induction de l'expression de HO-1. Un défaut de la biosynthèse de l'hème a été démontré chez la levure bien que le rôle de la frataxine dans ces voies ne soit pas encore clairement défini (Lesuisse 2003, Yoon 2004, Lange 2004). Or HO-1 est la seule enzyme régulant les niveaux cellulaires d'hème. L'hème a des fonctions diverses dont la régulation de la transcription de certains gènes nucléaires, c'est en effet un messager de choix entre le noyau et la mitochondrie et plus précisément entre le noyau et le niveau d'activité de la chaîne respiratoire. Ces voies sont appelées « voies rétrogrades » car elles permettent un signal de la mitochondrie vers le noyau, et ont été essentiellement étudiées chez la levure (Chelstowska 1999). Chez les mammifères, peu de données ont été publiées et la plupart

concernent des régulations via le niveau de calcium impliquant ainsi les grandes voies des kinases activant les facteurs de transcription NF κ B, NFAT ou ATF (Butow and Avadhani 2004). L'implication de l'hème a été démontrée par sa fixation à deux facteurs de transcriptions : BACH1 et NPAS2 (Ye and Zhang 2004, Tahara 2004a et b, Dioum 2002). Certains gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, HO-1 et les gènes de la β et α -globine (dans les cellules érythroïdes) sont ainsi régulés par BACH1 (Suzuki 2004). Or, le taux d'expression de la frataxine semble avoir un lien direct avec le niveau de l'activité respiratoire et de la SOD2 (Ristow 2000, Seznec 2004c soumis). De plus, chez la levure, des études plus complètes ont été réalisées et les gènes cibles des deux principaux facteurs de transcription régulés par l'hème sont mieux connues (Hap1p et Rox1p) (Lombardia 2000). Ainsi la régulation de HO-1 et de la SOD2 (Pinkham 1997) par ces facteurs a été démontrée et des sites de fixation à Rox1p ont été mis en évidence sur YFH1. Des connexions importantes semblent exister et une étude approfondie de ces voies va être entreprise dans le laboratoire.

Et maintenant ?

Il est nécessaire aujourd'hui, de se concentrer sur la découverte de nouvelles voies thérapeutiques et les patients attendent avec impatience d'entendre parler d'une autre molécule que l'idébénone.

Il y a cependant une question qui se pose : existe-t-il une volonté à l'heure actuelle, en France ou en Europe, de développer des médicaments orphelins, et cette nécessité éthique peut-elle s'accorder aux contraintes économiques et réglementaires actuelles ?

Des avancées importantes ont été réalisées en ce sens à l'échelle européenne et un règlement sur les médicaments orphelins a été adopté par le Parlement européen et le Conseil des ministres, le 16 décembre 1999 visant à inciter l'industrie pharmaceutique et biotechnologique à développer et à commercialiser des médicaments orphelins en permettant à l'industrie, en cas de succès, de rentabiliser aussi correctement que possible son investissement. Les Etats-Unis disposent d'une loi sur la définition, l'utilisation et la fabrication des médicaments orphelins depuis 1983, l'« Orphan Drug Act ».

La définition « européenne » comprend les points suivants : (i) un médicament orphelin est destiné au diagnostic, à la prévention ou au traitement d'une affection entraînant une menace pour la vie ou une invalidité chronique ne touchant pas plus de 5 personnes sur 10000 en Europe, (ii) en raison du faible nombre de personnes malades concernées, il ne peut générer, par sa commercialisation, de retour sur investissement suffisant pour le laboratoire

qui le met au point, en l'absence de mesures d'incitation, (iii) il n'existe aucune méthode satisfaisante de diagnostic, de prévention ou de traitement autorisé en Europe pour la maladie considérée et s'il en existe, le médicament orphelin procurera un bénéfice notable aux personnes malades par rapport aux méthodes déjà existantes.

En France, la « Mission ministérielle des médicaments orphelins » existant depuis 1995 a contribué à la promotion de la banque de données «Orphanet», de la plate forme maladies rares, au soutien des projets de recherche sur les maladies rares et plus récemment à la réglementation du prix des médicaments (1999) ainsi qu'à une exonération des taxes et contributions dues habituellement par l'industrie pharmaceutique à l'Assurance maladie et de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afssaps). Depuis 2002, un financement spécifique dédié aux médicaments orphelins commercialisés est prévu dans le budget des hôpitaux au titre des médicaments innovants.

Pour qu'un médicament soit mis à disposition des malades, il doit posséder une autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrée par l'Afssaps d'après les données collectées lors des essais cliniques de médicaments. En l'absence d'AMM, certains médicaments peuvent être mis à la disposition des malades avant leur éventuelle autorisation de mise sur le marché. C'est le cas : (i) des médicaments en expérimentation dans le cadre d'essais cliniques, (ii) des médicaments bénéficiant d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) délivrée par l'Afssaps, lorsqu'il s'agit de maladies rares ou graves, (iii) des préparations hospitalières ou magistrales. Les médicaments relevant d'une ATU sont soit autorisés à l'étranger, soit en cours de développement et présumés efficaces, utiles et bien tolérés à la lumière des données disponibles, lesquelles sont cependant préliminaires.

En pratique, il semble que les choses soient beaucoup plus compliquées et si les patients bénéficient aujourd'hui d'ATU pour l'idébénone, c'est en grande partie par l'intervention des médias provoquée par P. Rustin. Les médias sont en effet des acteurs importants pour faire connaître une pathologie rare et donner la parole aux oubliés. L'efficacité de l'idébénone a maintenant été démontrée depuis 5 ans mais l'autorisation de mise sur le marché n'est toujours pas obtenue. Les essais thérapeutiques réalisés sur le modèle neurologique Cb permettront peut-être d'accélérer les démarches.

Il est certain qu'il y a de nombreux freins au développement des médicaments orphelins. Outre la découverte de la molécule, la mise en œuvre des essais cliniques coûte cher. Pour résoudre le problème de la rentabilité ultérieure du médicament, la recherche de molécules potentiellement thérapeutiques parmi une gamme de médicaments déjà disponible sur le marché (pour d'autres pathologies) ou dont la non-toxicité a déjà été démontrée est

souhaitable, ainsi que l'internationalisation des essais avec protocoles ouverts, s'il n'est pas possible de mettre au point d'autres protocoles. Les critères d'évaluation peuvent être revus car dans le cas de pathologies graves où le pronostic vital est en jeu, l'existence d'un "mieux", d'un retardement de l'évolution sont des notions à prendre en compte. En France, les essais cliniques sont menés selon les règles de bonne pratique clinique et dans le respect de la réglementation en vigueur sur la protection des personnes qui s'y prêtent datant de 1988 (loi « Huriet – Sérésclat »), soit avant l'entrée des médicaments orphelins dans les textes de loi, mais une révision serait nécessaire pour accorder une souplesse dans le cadre des essais pour des pathologies rares.

Des initiatives encourageantes germent au sein de structure publiques françaises dans le but de favoriser la recherche de molécules thérapeutiques en centralisant les molécules chimiques issues des différentes bibliothèques (chimiothèques) universitaires. Les plateformes combinent la génomique et la protéomique permettant d'accélérer considérablement l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles, la chimie combinatoire qui constitue une source abondante de molécules sous la forme de chimiothèques et le criblage robotisé à haut débit, qui permet d'évaluer en plusieurs étapes, rapidement *in vitro*, l'activité de ces collections de produits sur un nombre de plus en plus élevé de cibles validées.

Dernières conclusions

J'aimerais conclure cette thèse comme chaque réunion annuelle de l'AFAF à la fin de laquelle Juliette Dieusaert, présidente de l'association, demande aux chercheurs présents un message d'espoir pour les patients. Tâche bien difficile pour une étudiante face aux patients pleins d'attentes, les yeux rivés sur vous.

En huit années, depuis la découverte du gène, la fonction de la frataxine a été élucidée par les efforts conjoints de chercheurs dans des domaines variés qui ont su collaborer et un début de thérapie est aujourd'hui proposé aux patients. Des modèles murins de l'AF ont été créés, validés et sont opérationnels pour tester de nouvelles molécules. Quelles seront-elles ? Peut-être issues de cribles à grande échelle, mais il est certain que les thérapeutiques à venir, pourront, à partir de maintenant, être conçues dans le but d'agir sur la cause primaire de la maladie.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- (2001) A randomized, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology* 57:397-404.
- Ackroyd RS, Finnegan JA, Green SH (1984) Friedreich's ataxia. A clinical review with neurophysiological and echocardiographic findings. *Arch Dis Child* 59:217-221.
- Adamec J, Rusnak F, Owen WG, Naylor S, Benson LM, Gacy AM, Isaya G (2000) Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 67:549-562.
- Adinolfi S, Trifuoggi M, Politou AS, Martin S, Pastore A (2002) A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet* 11:1865-1877.
- Agarwal N, Offermanns S, Kuner R (2004) Conditional gene deletion in primary nociceptive neurons of trigeminal ganglia and dorsal root ganglia. *Genesis* 38:122-129.
- Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103:373-383.
- Alam ZI, Halliwell B, Jenner P (2000) No evidence for increased oxidative damage to lipids, proteins, or DNA in Huntington's disease. *J Neurochem* 75:840-846.
- Albanese C, Hulit J, Sakamaki T, Pestell RG (2002) Recent advances in inducible expression in transgenic mice. *Semin Cell Dev Biol* 13:129-141.
- Alboliras ET, Shub C, Gomez MR, Edwards WD, Hagler DJ, Reeder GS, Seward JB, Tajik AJ (1986) Spectrum of cardiac involvement in Friedreich's ataxia: clinical, electrocardiographic and echocardiographic observations. *Am J Cardiol* 58:518-524.
- Alikasifoglu M, Topaloglu H, Tuncbilek E, Ceviz N, Anar B, Demir E, Ozme S (1999) Clinical and genetic correlate in childhood onset Friedreich ataxia. *Neuropediatrics* 30:72-76.
- Allredge CD, Schlieve CR, Miller NR, Levin LA (2003) Pathophysiology of the optic neuropathy associated with Friedreich ataxia. *Arch Ophthalmol* 121:1582-1585.
- Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (*ABC7*) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (*XLSA/A*). *Hum Mol Genet* 8:743-749.
- Aloria K, Schilke B, Andrew A, Craig EA (2004) Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep*.
- Andersen JK (1998) Use of genetically engineered mice as models for exploring the role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Front Biosci* 3:c8-16.
- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl:S18-25.

- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, Kaplan J (1994) The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76:403-410.
- Atamna H, Walter PB, Ames BN (2002) The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age. *Arch Biochem Biophys* 397:345-353.
- Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276:1709-1712.
- Balk J, Lill R (2004) The cell's cookbook for iron--sulfur clusters: recipes for fool's gold? *Chembiochem* 5:1044-1049.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3:205-214.
- Bartolo C, Mendell JR, Prior TW (1998) Identification of a missense mutation in a Friedreich's ataxia patient: implications for diagnosis and carrier studies. *Am J Med Genet* 79:396-399.
- Beato M (1991) Transcriptional regulation of mouse mammary tumor virus by steroid hormones. *Crit Rev Oncog* 2:195-210.
- Becker EM, Greer JM, Ponka P, Richardson DR (2002) Erythroid differentiation and protoporphyrin IX down-regulate frataxin expression in Friend cells: characterization of frataxin expression compared to molecules involved in iron metabolism and hemoglobinization. *Blood* 99:3813-3822.
- Berciano J, Pascual J, Polo M (2000) History of Ataxia Research. In: *Handbook of Ataxia Disorders* (Klockgether T, ed), pp 77-100. Bonn: Dekker M.
- Bidichandani SI, Ashizawa T, Patel PI (1998) The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet* 62:111-121.
- Bidichandani SI, Purandare SM, Taylor EE, Gumin G, Machkhas H, Harati Y, Gibbs RA, Ashizawa T, Patel PI (1999) Somatic sequence variation at the Friedreich ataxia locus includes complete contraction of the expanded GAA triplet repeat, significant length variation in serially passaged lymphoblasts and enhanced mutagenesis in the flanking sequence. *Hum Mol Genet* 8:2425-2436.
- Bit-Avragim N, Perrot A, Schols L, Hardt C, Kreuz FR, Zuhlke C, Bubel S, Laccone F, Vogel HP, Dietz R, Osterziel KJ (2001) The GAA repeat expansion in intron 1 of the frataxin gene is related to the severity of cardiac manifestation in patients with Friedreich's ataxia. *J Mol Med* 78:626-632.
- Bonetti B, Raine CS (1997) Multiple sclerosis: oligodendrocytes display cell death-related molecules in situ but do not undergo apoptosis. *Ann Neurol* 42:74-84.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl:S2-9.
- Bradley JL, Homayoun S, Hart PE, Schapira AH, Cooper JM (2004) Role of oxidative damage in Friedreich's ataxia. *Neurochem Res* 29:561-567.

- Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AH (2000) Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 9:275-282.
- Branda SS, Yang ZY, Chew A, Isaya G (1999) Mitochondrial intermediate peptidase and the yeast frataxin homolog together maintain mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* 8:1099-1110.
- Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF (1999) Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol* 9:147-163.
- Brunk UT, Terman A (2002) Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33:611-619.
- Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G, Szwedda LI (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* 305:242-245.
- Busciglio J, Pelsman A, Wong C, Pigino G, Yuan M, Mori H, Yankner BA (2002) Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* 33:677-688.
- Butow RA, Avadhani NG (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14:1-15.
- Campanella A, Isaya G, O'Neill HA, Santambrogio P, Cozzi A, Arosio P, Levi S (2004) The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin-deficient yeast. *Hum Mol Genet* 13:2279-2288.
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, et al. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271:1423-1427.
- Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, Trottier Y, Kish SJ, Faucheux B, Trouillas P, Authier FJ, Durr A, Mandel JL, Vescovi A, Pandolfo M, Koenig M (1997) Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 6:1771-1780.
- Cande C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G (2004a) Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ* 11:591-595.
- Cande C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G (2004b) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 23:1514-1521.
- Capecchi MR (1989a) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5:70-76.
- Capecchi MR (1989b) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.
- Cardoso CM, Custodio JB, Almeida LM, Moreno AJ (2001) Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 176:145-152.

- Carri MT, Ferri A, Cozzolino M, Calabrese L, Rotilio G (2003) Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Res Bull* 61:365-374.
- Caruso G, Santoro L, Perretti A, Serlenga L, Crisci C, Ragno M, Barbieri F, Filla A (1983) Friedreich's ataxia: electrophysiological and histological findings. *Acta Neurol Scand* 67:26-40.
- Caruso G, Santoro L, Perretti A, Massini R, Pelosi L, Crisci C, Ragno M, Campanella G, Filla A (1987) Friedreich's ataxia: electrophysiologic and histologic findings in patients and relatives. *Muscle Nerve* 10:503-515.
- Casazza F, Morpurgo M (1996) The varying evolution of Friedreich's ataxia cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 77:895-898.
- Casazza F, Ferrari F, Piccone U, Maggiolini S, Capozzi A, Morpurgo M (1990) [Progression of cardiopathology in Friedreich ataxia: clinico-instrumental study]. *Cardiologia* 35:423-431.
- Castelnovo G, Biolsi B, Barbaud A, Labauge P, Schmitt M (2000) Isolated spastic paraparesis leading to diagnosis of Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69:693.
- Cavadini P, Gellera C, Patel PI, Isaya G (2000) Human frataxin maintains mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* 9:2523-2530.
- Cecchi C, Latorraca S, Sorbi S, Iantomasi T, Favilli F, Vincenzini MT, Liguri G (1999) Glutathione level is altered in lymphoblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 275:152-154.
- Chamberlain S, Worrall C, Williamson R (1988) Attempts to identify the chromosomal localization of the Friedreich's ataxia locus. *Adv Neurol* 48:257-260.
- Chamberlain S, Shaw J, Wallis J, Rowland A, Chow L, Farrall M, Keats B, Richter A, Roy M, Melancon S, et al. (1989) Genetic homogeneity at the Friedreich ataxia locus on chromosome 9. *Am J Hum Genet* 44:518-521.
- Chantrel-Groussard K, Geromel V, Puccio H, Koenig M, Munnich A, Rotig A, Rustin P (2001) Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 10:2061-2067.
- Chelstowska A, Liu Z, Jia Y, Amberg D, Butow RA (1999) Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast* 15:1377-1391.
- Chen OS, Kaplan J (2001) YFH1-mediated iron homeostasis is independent of mitochondrial respiration. *FEBS Lett* 509:131-134.
- Chen OS, Hemenway S, Kaplan J (2002) Genetic analysis of iron citrate toxicity in yeast: implications for mammalian iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16922-16927.
- Child JS, Perloff JK, Bach PM, Wolfe AD, Perlman S, Kark RA (1986) Cardiac involvement in Friedreich's ataxia: a clinical study of 75 patients. *J Am Coll Cardiol* 7:1370-1378.
- Cho SJ, Lee MG, Yang JK, Lee JY, Song HK, Suh SW (2000) Crystal structure of *Escherichia coli* CyaY protein reveals a previously unidentified fold for the evolutionarily conserved frataxin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8932-8937.

- Colombo R, Carobene A (2000) Age of the intronic GAA triplet repeat expansion mutation in Friedreich ataxia. *Hum Genet* 106:455-458.
- Cossee M, Schmitt M, Campuzano V, Reutenauer L, Moutou C, Mandel JL, Koenig M (1997a) Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7452-7457.
- Cossee M, Puccio H, Gansmuller A, Koutnikova H, Dierich A, LeMeur M, Fischbeck K, Dolle P, Koenig M (2000) Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* 9:1219-1226.
- Cossee M, Campuzano V, Koutnikova H, Fischbeck K, Mandel JL, Koenig M, Bidichandani SI, Patel PI, Molte MD, Canizares J, De Frutos R, Pianese L, Cavalcanti F, Monticelli A, Coccozza S, Montermini L, Pandolfo M (1997b) Frataxin fracas. *Nat Genet* 15:337-338.
- Cossee M, Durr A, Schmitt M, Dahl N, Trouillas P, Allinson P, Kostrzewa M, Nivelon-Chevallier A, Gustavson KH, Kohlschutter A, Muller U, Mandel JL, Brice A, Koenig M, Cavalcanti F, Tammaro A, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Labuda M, Montermini L, Poirier J, Pandolfo M (1999) Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol* 45:200-206.
- Cox RD, Brown SD (2003) Rodent models of genetic disease. *Curr Opin Genet Dev* 13:278-283.
- Craig EA, Marszalek J (2002) A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. *Cell Mol Life Sci* 59:1658-1665.
- Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 158:507-517.
- Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM (1999) The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* 66:167-179.
- Cummings CJ, Zoghbi HY (2000) Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:281-328.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329:23-38.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 14:729-739.
- de Grey AD (1997) A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *Bioessays* 19:161-166.
- de Haan JB, Cristiano F, Iannello RC, Kola I (1995) Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int* 35:1281-1297.
- DeKosky ST, Marek K (2003) Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 302:830-834.

- De Michele G, Cavalcanti F, Criscuolo C, Pianese L, Monticelli A, Filla A, Coccozza S (1998) Parental gender, age at birth and expansion length influence GAA repeat intergenerational instability in the X25 gene: pedigree studies and analysis of sperm from patients with Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 7:1901-1906.
- De Michele G, Di Maio L, Filla A, Majello M, Coccozza S, Cavalcanti F, Mirante E, Campanella G (1996) Childhood onset of Friedreich ataxia: a clinical and genetic study of 36 cases. *Neuropediatrics* 27:3-7.
- De Michele G, Filla A, Cavalcanti F, Di Maio L, Pianese L, Castaldo I, Calabrese O, Monticelli A, Varrone S, Campanella G, et al. (1994) Late onset Friedreich's disease: clinical features and mapping of mutation to the FRDA locus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57:977-979.
- Delatycki MB, Camakaris J, Brooks H, Evans-Whipp T, Thorburn DR, Williamson R, Forrest SM (1999a) Direct evidence that mitochondrial iron accumulation occurs in Friedreich ataxia. *Ann Neurol* 45:673-675.
- Delatycki MB, Paris DB, Gardner RJ, Nicholson GA, Nassif N, Storey E, MacMillan JC, Collins V, Williamson R, Forrest SM (1999b) Clinical and genetic study of Friedreich ataxia in an Australian population. *Am J Med Genet* 87:168-174.
- Dennery PA (2000) Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul* 36:181-199.
- Desmyter L, Dewaele S, Reekmans R, Nystrom T, Contreras R, Chen C (2004) Expression of the human ferritin light chain in a frataxin mutant yeast affects ageing and cell death. *Exp Gerontol* 39:707-715.
- Dhe-Paganon S, Shigeta R, Chi YI, Ristow M, Shoelson SE (2000) Crystal structure of human frataxin. *J Biol Chem* 275:30753-30756.
- Dickson DW (2004) Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest* 114:23-27.
- Dioum EM, Rutter J, Tuckerman JR, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez MA, McKnight SL (2002) NPAS2: a gas-responsive transcription factor. *Science* 298:2385-2387.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-578.
- Dragatsis I, Zeitlin S (2000) CaMKIIalpha-Cre transgene expression and recombination patterns in the mouse brain. *Genesis* 26:133-135.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Duby G, Foury F, Ramazzotti A, Herrmann J, Lutz T (2002) A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet* 11:2635-2643.
- Duclos F, Rodius F, Wrogemann K, Mandel JL, Koenig M (1994) The Friedreich ataxia region: characterization of two novel genes and reduction of the critical region to 300 kb. *Hum Mol Genet* 3:909-914.

- Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M (1996) Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 335:1169-1175.
- Dutka DP, Donnelly JE, Nihoyannopoulos P, Oakley CM, Nunez DJ (1999) Marked variation in the cardiomyopathy associated with Friedreich's ataxia. *Heart* 81:141-147.
- Dutka DP, Donnelly JE, Palka P, Lange A, Nunez DJ, Nihoyannopoulos P (2000) Echocardiographic characterization of cardiomyopathy in Friedreich's ataxia with tissue Doppler echocardiographically derived myocardial velocity gradients. *Circulation* 102:1276-1282.
- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *Faseb J* 15:2286-2287.
- Emond M, Lepage G, Vanasse M, Pandolfo M (2000) Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* 55:1752-1753.
- Epplen C, Epplen JT, Frank G, Miterski B, Santos EJ, Schols L (1997) Differential stability of the (GAA)_n tract in the Friedreich ataxia (STM7) gene. *Hum Genet* 99:834-836.
- Erb W. *Handbuch der Krankheiten des Nervensystems*. I. Leipzig: Vogel; 1878.
- Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC (1999) Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4820-4825.
- Faivre G, Souris D, Gregoire P, Neimann JL, Worms AM, Schmitt J, Briquel F, Floquet A (1978) [The myocardiopathies of hereditary neuro-muscular diseases]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 71:397-405.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237:752-757.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, Beal MF (2002) Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* 22:1592-1599.
- Ferreira GC (1999) Ferrochelatase. *Int J Biochem Cell Biol* 31:995-1000.
- Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Coccozza S (1996) The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 59:554-560.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Finocchiaro G, Baio G, Micossi P, Pozza G, di Donato S (1988) Glucose metabolism alterations in Friedreich's ataxia. *Neurology* 38:1292-1296.
- Fischbeck KH, Souders D, La Spada A (1991) A candidate gene for X-linked spinal muscular atrophy. *Adv Neurol* 56:209-213.
- Fonfria E, Dare E, Benelli M, Sunol C, Ceccatelli S (2002) Translocation of apoptosis-inducing factor in cerebellar granule cells exposed to neurotoxic agents inducing oxidative stress. *Eur J Neurosci* 16:2013-2016.

- Forss-Petter S, Danielson P, Sutcliffe JG (1986) Neuron-specific enolase: complete structure of rat mRNA, multiple transcriptional start sites, and evidence suggesting post-transcriptional control. *J Neurosci Res* 16:141-156.
- Foury F (1999) Low iron concentration and aconitase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett* 456:281-284.
- Foury F, Cazzalini O (1997) Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett* 411:373-377.
- Foury F, Talibi D (2001) Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* 276:7762-7768.
- Foury F, Roganti T (2002) Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* 277:24475-24483.
- Frazzon J, Dean DR (2003) Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 7:166-173.
- Friedreich, N. (1863a) Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Arch Pathol Anat*, 27, 1-26.
- Friedreich, N. (1863b) Über degenerative Atrophie der spinalen Hinterstränge. *Virchows Arch Pathol Anat*, 26, 433-459.
- Friedreich, N. (1876) Über ataxie mit besonderer berücksichtigung der hereditären formen. *Virchows Arch Pathol Anat*, 68, 145-245.
- Friedreich, N. (1877) Über ataxie mit besonderer berücksichtigung der hereditären formen. *Virchows Arch Pathol Anat*, 70.
- Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:849-858.
- Fujita R, Agid Y, Trouillas P, Seck A, Tommasi-Davenas C, Driesel AJ, Olek K, Grzeschik KH, Nakamura Y, Mandel JL, et al. (1989) Confirmation of linkage of Friedreich ataxia to chromosome 9 and identification of a new closely linked marker. *Genomics* 4:110-111.
- Gakh O, Adamec J, Gacy AM, Twesten RD, Owen WG, Isaya G (2002) Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* 41:6798-6804.
- Gates PC, Paris D, Forrest SM, Williamson R, Gardner RJ (1998) Friedreich's ataxia presenting as adult-onset spastic paraparesis. *Neurogenetics* 1:297-299.
- Geoffroy G, Barbeau A, Breton G, Lemieux B, Aube M, Leger C, Bouchard JP (1976) Clinical description and roentgenologic evaluation of patients with Friedreich's ataxia. *Can J Neurol Sci* 3:279-286.
- Gerber J, Muhlenhoff U, Lill R (2003) An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep* 4:906-911.
- Gibson TJ, Koonin EV, Musco G, Pastore A, Bork P (1996) Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 19:465-468.

- Gillis JC, Benefield P, McTavish D (1994) Idebenone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in age-related cognitive disorders. *Drugs Aging* 5:133-152.
- Giunta A, Maione S, Biagini R, Filla A, De Michele G, Campanella G (1988) Noninvasive assessment of systolic and diastolic function in 50 patients with Friedreich's ataxia. *Cardiology* 75:321-327.
- Gottdiener JS, Hawley RJ, Maron BJ, Bertorini TF, Engle WK (1982) Characteristics of the cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Am Heart J* 103:525-531.
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
- Haeberlein SL (2004) Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death. *Neurochem Res* 29:521-530.
- Ham D, Schipper HM (2000) Heme oxygenase-1 induction and mitochondrial iron sequestration in astroglia exposed to amyloid peptides. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:587-596.
- Hanauer A, Chery M, Fujita R, Driesel AJ, Gilgenkrantz S, Mandel JL (1990) The Friedreich ataxia gene is assigned to chromosome 9q13-q21 by mapping of tightly linked markers and shows linkage disequilibrium with D9S15. *Am J Hum Genet* 46:133-137.
- Harding AE (1981a) Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104:589-620.
- Harding AE (1981b) Early onset cerebellar ataxia with retained tendon reflexes: a clinical and genetic study of a disorder distinct from Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44:503-508.
- Harding AE, Hewer RL (1983) The heart disease of Friedreich's ataxia: a clinical and electrocardiographic study of 115 patients, with an analysis of serial electrocardiographic changes in 30 cases. *Q J Med* 52:489-502.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6:1099-1108.
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11:619-633.
- Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:5586-5591.
- Hebert JM, McConnell SK (2000) Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol* 222:296-306.
- Heidenfelder BL, Makhov AM, Topal MD (2003) Hairpin formation in Friedreich's ataxia triplet repeat expansion. *J Biol Chem* 278:2425-2431.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117:285-297.

- Hermel E, Gafni J, Propp SS, Leavitt BR, Wellington CL, Young JE, Hackam AS, Logvinova AV, Peel AL, Chen SF, Hook V, Singaraja R, Krajewski S, Goldsmith PC, Ellerby HM, Hayden MR, Bredesen DE, Ellerby LM (2004) Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 11:424-438.
- Hernandez-Gonzalez E, Abreu A, Mustelier R, Telleria A, Calzada D, Gomez-Fernandez L (1997) [Cardiovascular changes in a group of patients with heredoataxia. Clinical, electrocardiographic and echocardiographic findings]. *Rev Neurol* 25:847-849.
- Hinerfeld D, Traini MD, Weinberger RP, Cochran B, Doctrow SR, Harry J, Melov S (2004) Endogenous mitochondrial oxidative stress: neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice. *J Neurochem* 88:657-667.
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL (2004) Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25:259-264.
- Hughes JT, Brownell B, Hewer RL (1968) The peripheral sensory pathway in friedreich's ataxia. An examination by light and electron microscopy of the posterior nerve roots, posterior root ganglia, and peripheral sensory nerves in cases of friedreich's ataxia. *Brain* 91:803-818.
- Huynen MA, Snel B, Bork P, Gibson TJ (2001) The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum Mol Genet* 10:2463-2468.
- Igarashi J, Sato A, Kitagawa T, Sagami I, Shimizu T (2003) CO binding study of mouse heme-regulated eIF-2alpha kinase: kinetics and resonance Raman spectra. *Biochim Biophys Acta* 1650:99-104.
- Ischiropoulos H, Beckman JS (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111:163-169.
- Isnard R, Kalotka H, Durr A, Cossee M, Schmitt M, Pousset F, Thomas D, Brice A, Koenig M, Komajda M (1997) Correlation between left ventricular hypertrophy and GAA trinucleotide repeat length in Friedreich's ataxia. *Circulation* 95:2247-2249.
- Jaattela M, Tschopp J (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 4:416-423.
- Jaattela M, Cande C, Kroemer G (2004) Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death Differ* 11:135-136.
- Jauslin ML, Wirth T, Meier T, Schoumacher F (2002) A cellular model for Friedreich Ataxia reveals small-molecule glutathione peroxidase mimetics as novel treatment strategy. *Hum Mol Genet* 11:3055-3063.
- Jauslin ML, Meier T, Smith RA, Murphy MP (2003) Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *Faseb J* 17:1972-1974.
- Jiralerspong S, Ge B, Hudson TJ, Pandolfo M (2001) Manganese superoxide dismutase induction by iron is impaired in Friedreich ataxia cells. *FEBS Lett* 509:101-105.
- Jiralerspong S, Liu Y, Montermini L, Stifani S, Pandolfo M (1997) Frataxin shows developmentally regulated tissue-specific expression in the mouse embryo. *Neurobiol Dis* 4:103-113.

- Jitpimolmard S, Small J, King RH, Geddes J, Misra P, McLaughlin J, Muddle JR, Cole M, Harding AE, Thomas PK (1993) The sensory neuropathy of Friedreich's ataxia: an autopsy study of a case with prolonged survival. *Acta Neuropathol (Berl)* 86:29-35.
- Johnson JE, Wold BJ, Hauschka SD (1989) Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 9:3393-3399.
- Juvonen V, Kulmala SM, Ignatius J, Penttinen M, Savontaus ML (2002) Dissecting the epidemiology of a trinucleotide repeat disease - example of FRDA in Finland. *Hum Genet* 110:36-40.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19:5720-5728.
- Karthikeyan G, Lewis LK, Resnick MA (2002) The mitochondrial protein frataxin prevents nuclear damage. *Hum Mol Genet* 11:1351-1362.
- Karthikeyan G, Santos JH, Graziewicz MA, Copeland WC, Isaya G, Van Houten B, Resnick MA (2003) Reduction in frataxin causes progressive accumulation of mitochondrial damage. *Hum Mol Genet* 12:3331-3342.
- Kawai C, Kato S, Takashima M, Fujiwara H, Haebara H (2000) Heart disease in Friedreich's ataxia: observation of a case for half a century. *Jpn Circ J* 64:229-236.
- Ke Y, Ming Qian Z (2003) Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 2:246-253.
- Keats BJ, Ward LJ, Shaw J, Wickremasinghe A, Chamberlain S (1989) "Acadian" and "classical" forms of Friedreich ataxia are most probably caused by mutations at the same locus. *Am J Med Genet* 33:266-268.
- Kellendonk C, Tronche F, Casanova E, Anlag K, Opherk C, Schutz G (1999) Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol* 285:175-182.
- Keller JN, Dimayuga E, Chen Q, Thorpe J, Gee J, Ding Q (2004) Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2376-2391.
- Keyser K, Imlay JA (1996) Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13635-13640.
- Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ (2003) Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 3:527-535.
- Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J* 18:3981-3989.
- Klockgether T, Chamberlain S, Wullner U, Fetter M, Dittmann H, Petersen D, Dichgans J (1993) Late-onset Friedreich's ataxia. Molecular genetics, clinical neurophysiology, and magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 50:803-806.
- Knight SA, Sepuri NB, Pain D, Dancis A (1998) Mt-Hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J Biol Chem* 273:18389-18393.
- Koenig M, Dürr A (2000) Friedreich's Ataxia. In: *Handbook of Ataxia Disorders* (Klockgether T, ed), pp 151-161. Bonn: Dekker M.

- Koenig M, Pandolfo M (1998) Friedreich's Ataxia. In: Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases (Wells RD, Warren ST, eds), pp 373-398. Houston and Atlanta: Academic Press.
- Koutnikova H, Campuzano V, Koenig M (1998) Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase. *Hum Mol Genet* 7:1485-1489.
- Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, Dolle P, Cazzalini O, Koenig M (1997) Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 16:345-351.
- Kroemer G (1998) The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ* 5:547.
- Kroemer G (2004) Early work on the role of mitochondria in apoptosis, an interview with Guido Kroemer. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1:S33-36.
- Kucej M, Foury F (2003) Iron toxicity protection by truncated Ras2 GTPase in yeast strain lacking frataxin. *Biochem Biophys Res Commun* 310:986-991.
- Ladame, P. (1890) Friedreich's disease. *Brain*, 13, 467-537.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352:77-79.
- Labuda M, Labuda D, Miranda C, Poirier J, Soong BW, Barucha NE, Pandolfo M (2000) Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion. *Neurology* 54:2322-2324.
- Lamarche J, Luneau C, Lemieux B (1982) Ultrastructural observations on spinal ganglion biopsy in Friedreich's ataxia: a preliminary report. *Can J Neurol Sci* 9:137-139.
- Lamarche JB, Cote M, Lemieux B (1980) The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can J Neurol Sci* 7:389-396.
- Lamarche J, Shapcott D, Côté M, Lemieux B (1993) Cardiac Iron Deposits in Friedreich's Ataxia. In: *Handbook of Cerebellar Diseases* (Lechtenberg R, ed), pp 453-457. Newark: Dekker, M.
- Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1050-1055.
- Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9782-9787.
- Lee D, Threadgill DW (2004) Investigating gene function using mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 14:246-252.
- Lee HJ, Shin SY, Choi C, Lee YH, Lee SJ (2002) Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J Biol Chem* 277:5411-5417.
- Leist M, Jaattela M (2001) Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* 8:324-326.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185:1481-1486.

- Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S, Nicotera P (1999) Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res* 249:396-403.
- Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA (2002) Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 4:769-781.
- Lemasters JJ, Qian T, Elmore SP, Trost LC, Nishimura Y, Herman B, Bradham CA, Brenner DA, Nieminen AL (1998a) Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. *Biofactors* 8:283-285.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B (1998b) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366:177-196.
- Leone M, Brignolio F, Rosso MG, Curtioni ES, Moroni A, Tribolo A, Schiffer D (1990) Friedreich's ataxia: a descriptive epidemiological study in an Italian population. *Clin Genet* 38:161-169.
- Lerman-Sagie T, Rustin P, Lev D, Yanoov M, Leshinsky-Silver E, Sagie A, Ben-Gal T, Munnich A (2001) Dramatic improvement in mitochondrial cardiomyopathy following treatment with idebenone. *J Inher Metab Dis* 24:28-34.
- Lesuisse E, Santos R, Matzanke BF, Knight SA, Camadro JM, Dancis A (2003) Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Hum Mol Genet* 12:879-889.
- Levi S, Corsi B, Bosisio M, Invernizzi R, Volz A, Sanford D, Arosio P, Drysdale J (2001) A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* 276:24437-24440.
- Li DS, Ohshima K, Jiralerspong S, Bojanowski MW, Pandolfo M (1999a) Knock-out of the *cyaY* gene in *Escherichia coli* does not affect cellular iron content and sensitivity to oxidants. *FEBS Lett* 456:13-16.
- Li J, Saxena S, Pain D, Dancis A (2001) Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J Biol Chem* 276:1503-1509.
- Li J, Kogan M, Knight SA, Pain D, Dancis A (1999b) Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem* 274:33025-33034.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11:376-381.
- Lindenau J, Noack H, Possel H, Asayama K, Wolf G (2000) Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia* 29:25-34.
- Linder CC (2001) The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. *Lab Anim (NY)* 30:34-39.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2405-2419.

- Lodi R, Cooper JM, Bradley JL, Manners D, Styles P, Taylor DJ, Schapira AH (1999) Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11492-11495.
- Lodi R, Rajagopalan B, Blamire AM, Cooper JM, Davies CH, Bradley JL, Styles P, Schapira AH (2001) Cardiac energetics are abnormal in Friedreich ataxia patients in the absence of cardiac dysfunction and hypertrophy: an in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *Cardiovasc Res* 52:111-119.
- Lombardia LJ, Cadahia-Rodriguez JL, Freire-Picos MA, Gonzalez-Siso MI, Rodriguez-Torres AM, Cerdan ME (2000) Transcript analysis of 203 novel genes from *Saccharomyces cerevisiae* in hap1 and rox1 mutant backgrounds. *Genome* 43:881-886.
- Lopez-Arlandis JM, Vilchez JJ, Palau F, Sevilla T (1995) Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis. *Neuroepidemiology* 14:14-19.
- Lutz T, Westermann B, Neupert W, Herrmann JM (2001) The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J Mol Biol* 307:815-825.
- Lynch DR, Lech G, Farmer JM, Balcer LJ, Bank W, Chance B, Wilson RB (2002) Near infrared muscle spectroscopy in patients with Friedreich's ataxia. *Muscle Nerve* 25:664-673.
- Machkhas H, Bidichandani SI, Patel PI, Harati Y (1998) A mild case of Friedreich ataxia: lymphocyte and sural nerve analysis for GAA repeat length reveals somatic mosaicism. *Muscle Nerve* 21:390-393.
- Manyam BV (1993) Friedreich's Disease. In: *Handbook of cerebellar disease* (R. L, ed), pp 431-452. Newark: Dekker M.
- Marie P. Sur l'héredo-ataxie cérébelleuse. *Clinique des maladies nerveuses. La semaine médicale, Paris, 1893, 13: 444-447.*
- Marino G, Lopez-Otin C (2004) Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 61:1439-1454.
- Massey A, Kiffin R, Cuervo AM (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2420-2434.
- Mattson MP, Kroemer G (2003) Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* 9:196-205.
- McLeod JG (1971) An electrophysiological and pathological study of peripheral nerves in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 12:333-349.
- Meijer AJ, Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2445-2462.
- Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, Crapo JD, Wallace DC (1998) A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 18:159-163.
- Melov S, Doctrow SR, Schneider JA, Haberson J, Patel M, Coskun PE, Huffman K, Wallace DC, Malfroy B (2001) Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide

- dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J Neurosci* 21:8348-8353.
- Metzger D, Chambon P (2001) Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24:71-80.
- Monros E, Molto MD, Martinez F, Canizares J, Blanca J, Vilchez JJ, Prieto F, de Frutos R, Palau F (1997) Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am J Hum Genet* 61:101-110.
- Miranda CJ, Santos MM, Ohshima K, Smith J, Li L, Bunting M, Cossee M, Koenig M, Sequeiros J, Kaplan J, Pandolfo M (2002) Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett* 512:291-297.
- Montermini L, Kish SJ, Jiralerspong S, Lamarche JB, Pandolfo M (1997) Somatic mosaicism for Friedreich's ataxia GAA triplet repeat expansions in the central nervous system. *Neurology* 49:606-610.
- Montermini L, Rodius F, Pianese L, Molto MD, Cossee M, Campuzano V, Cavalcanti F, Monticelli A, Palau F, Gyapay G, et al. (1995) The Friedreich ataxia critical region spans a 150-kb interval on chromosome 9q13. *Am J Hum Genet* 57:1061-1067.
- Mordente A, Martorana GE, Minotti G, Giardina B (1998) Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone). *Chem Res Toxicol* 11:54-63.
- Morgan RO, Naglie G, Horrobin DF, Barbeau A (1979) Erythrocyte protoporphyrin levels in patients with Friedreich's and other ataxias. *Can J Neurol Sci* 6:227-232.
- Morse D, Choi AM (2002) Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:8-16.
- Muhlenhoff U, Lill R (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1459:370-382.
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Gerber J, Lill R (2002a) Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *J Biol Chem* 277:29810-29816.
- Muhlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R (2003) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J* 22:4815-4825.
- Muhlenhoff U, Richhardt N, Ristow M, Kispal G, Lill R (2002b) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet* 11:2025-2036.
- Murakami K, Mawatari S (2003) Oxidation of hemoglobin to methemoglobin in intact erythrocyte by a hydroperoxide induces formation of glutathionyl hemoglobin and binding of alpha-hemoglobin to membrane. *Arch Biochem Biophys* 417:244-250.
- Murphy DD, Ravina B (2003) Brain banking for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 16:459-463.
- Murphy MP (2001) Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction. *Expert Opin Biol Ther* 1:753-764.
- Musco G, Stier G, Kolmerer B, Adinolfi S, Martin S, Frenkiel T, Gibson T, Pastore A (2000) Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin. *Structure Fold Des* 8:695-707.

- Nachin L, Loiseau L, Expert D, Barras F (2003) SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *Embo J* 22:427-437.
- Napolitano M, Centonze D, Gubellini P, Rossi S, Spiezia S, Bernardi G, Gulino A, Calabresi P (2004) Inhibition of mitochondrial complex II alters striatal expression of genes involved in glutamatergic and dopaminergic signaling: possible implications for Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 15:407-414.
- Nichol H, Gakh O, O'Neill HA, Pickering IJ, Isaya G, George GN (2003) Structure of frataxin iron cores: an X-ray absorption spectroscopic study. *Biochemistry* 42:5971-5976.
- Nicotera P, Leist M, Fava E, Berliocchi L, Volbracht C (2000) Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol* 10:276-282.
- Niwa T, Naito C, Mawjood AH, Imai K (2000) Increased glutathionyl hemoglobin in diabetes mellitus and hyperlipidemia demonstrated by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Clin Chem* 46:82-88.
- Nixon RA, Cataldo AM (1995) The endosomal-lysosomal system of neurons: new roles. *Trends Neurosci* 18:489-496.
- Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM (2000) The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res* 25:1161-1172.
- Nolano M, Provitera V, Crisci C, Saltalamacchia AM, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Filla A, Santoro L, Caruso G (2001) Small fibers involvement in Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 50:17-25.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252:1097-1102.
- Ogier-Denis E, Codogno P (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603:113-128.
- Ohshima K, Montermini L, Wells RD, Pandolfo M (1998) Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J Biol Chem* 273:14588-14595.
- Ohsumi Y (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:211-216.
- Oppenheimer DR (1979) Brain lesions in Friedreich's ataxia. *Can J Neurol Sci* 6:173-176.
- Orban PC, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6861-6865.
- Orth M, Schapira AH (2001) Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* 106:27-36.
- Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Ben Hamida M, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel JL, Koenig M (1995) Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 9:141-145.
- Ouvrier RA, McLeod JG, Conchin TE (1982) Friedreich's ataxia. Early detection and progression of peripheral nerve abnormalities. *J Neurol Sci* 55:137-145.

- Ozcanakaya R, Delibas N (2002) Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croat Med J* 43:28-32.
- Palau F, De Michele G, Vilchez JJ, Pandolfo M, Monros E, Cocozza S, Smeyers P, Lopez-Arlandis J, Campanella G, Di Donato S, et al. (1995) Early-onset ataxia with cardiomyopathy and retained tendon reflexes maps to the Friedreich's ataxia locus on chromosome 9q. *Ann Neurol* 37:359-362.
- Park S, Gakh O, Mooney SM, Isaya G (2002) The ferroxidase activity of yeast frataxin. *J Biol Chem* 277:38589-38595.
- Park S, Gakh O, O'Neill HA, Mangravita A, Nichol H, Ferreira GC, Isaya G (2003) Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation. *J Biol Chem* 278:31340-31351.
- Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, Brown RH, Jr. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron* 43:19-30.
- Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M (2004) Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 10:396-401.
- Pasternac A, Krol R, Petិតlerc R, Harvey C, Andermann E, Barbeau A (1980) Hypertrophic cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: symmetric or asymmetric? *Can J Neurol Sci* 7:379-382.
- Pastore A, Tozzi G, Gaeta LM, Bertini E, Serafini V, Di Cesare S, Bonetto V, Casoni F, Carozzo R, Federici G, Piemonte F (2003) Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich's ataxia: a potential role in the pathogenesis of the disease. *J Biol Chem* 278:42588-42595.
- Patel M, Day BJ (1999) Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol Sci* 20:359-364.
- Penninger JM, Kroemer G (2003) Mitochondria, AIF and caspases--rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* 5:97-99.
- Pentland B, Fox KA (1983) The heart in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 46:1138-1142.
- Perry G, Taddeo MA, Nunomura A, Zhu X, Zenteno-Savin T, Drew KL, Shimohama S, Avila J, Castellani RJ, Smith MA (2002) Comparative biology and pathology of oxidative stress in Alzheimer and other neurodegenerative diseases: beyond damage and response. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133:507-513.
- Petersen A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P, Sulzer D (2001) Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* 10:1243-1254.
- Pianese L, Cavalcanti F, De Michele G, Filla A, Campanella G, Calabrese O, Castaldo I, Monticelli A, Cocozza S (1997) The effect of parental gender on the GAA dynamic mutation in the FRDA gene. *Am J Hum Genet* 60:460-463.

- Piemonte F, Pastore A, Tozzi G, Tagliacozzi D, Santorelli FM, Carozzo R, Casali C, Damiano M, Federici G, Bertini E (2001) Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Eur J Clin Invest* 31:1007-1011.
- Pinkham JL, Wang Z, Alsina J (1997) Heme regulates SOD2 transcription by activation and repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 31:281-291.
- Pook MA, Al-Mahdawi S, Carroll CJ, Cossee M, Puccio H, Lawrence L, Clark P, Lowrie MB, Bradley JL, Cooper JM, Koenig M, Chamberlain S (2001) Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics* 3:185-193.
- Priller J, Scherzer CR, Faber PW, MacDonald ME, Young AB (1997) Frataxin gene of Friedreich's ataxia is targeted to mitochondria. *Ann Neurol* 42:265-269.
- Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V (2003) Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest* 111:3-10.
- Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J, Hindelang C, Matyas R, Rustin P, Koenig M (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27:181-186.
- Radisky DC, Babcock MC, Kaplan J (1999) The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J Biol Chem* 274:4497-4499.
- Ramazzotti A, Vanmansart V, Foury F (2004) Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 557:215-220.
- Reggiori F, Klionsky DJ (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1:11-21.
- Richardson DR (2003) Friedreich's ataxia: iron chelators that target the mitochondrion as a therapeutic strategy? *Expert Opin Investig Drugs* 12:235-245.
- Richardson DR, Muralian C, Ponka P, Becker E (2001) Development of potential iron chelators for the treatment of Friedreich's ataxia: ligands that mobilize mitochondrial iron. *Biochim Biophys Acta* 1536:133-140.
- Richter A, Poirier J, Mercier J, Julien D, Morgan K, Roy M, Gosselin F, Bouchard JP, Melancon SB (1996) Friedreich ataxia in Acadian families from eastern Canada: clinical diversity with conserved haplotypes. *Am J Med Genet* 64:594-601.
- Ristow M, Pfister MF, Yee AJ, Schubert M, Michael L, Zhang CY, Ueki K, Michael MD, 2nd, Lowell BB, Kahn CR (2000) Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12239-12243.
- Ristow M, Mulder H, Pomplun D, Schulz TJ, Muller-Schmehl K, Krause A, Fex M, Puccio H, Muller J, Isken F, Spranger J, Muller-Wieland D, Magnuson MA, Mohlig M, Koenig M, Pfeiffer AF (2003) Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J Clin Invest* 112:527-534.
- Rodriguez-Enriquez S, He L, Lemasters JJ (2004) Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2463-2472.

- Rogers RJ, Monnier JM, Nick HS (2001) Tumor necrosis factor-alpha selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin-1beta utilizes an alternative pathway. *J Biol Chem* 276:20419-20427.
- Romeo G, Menozzi P, Ferlini A, Fadda S, Di Donato S, Uziel G, Lucci B, Capodaglio L, Filla A, Campanella G (1983) Incidence of Friedreich ataxia in Italy estimated from consanguineous marriages. *Am J Hum Genet* 35:523-529.
- Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A, Rustin P (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17:215-217.
- Rouault TA, Klausner RD (1996) Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends Biochem Sci* 21:174-177.
- Roy A, Solodovnikova N, Nicholson T, Antholine W, Walden WE (2003) A novel eukaryotic factor for cytosolic Fe-S cluster assembly. *Embo J* 22:4826-4835.
- Rustin P, Munnich A, Rotig A (1999a) Quinone analogs prevent enzymes targeted in Friedreich ataxia from iron-induced injury in vitro. *Biofactors* 9:247-251.
- Rustin P, von Kleist-Retzow JC, Chantrel-Groussard K, Sidi D, Munnich A, Rotig A (1999b) Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* 354:477-479.
- Said G, Marion MH, Selva J, Jamet C (1986) Hypotrophic and dying-back nerve fibers in Friedreich's ataxia. *Neurology* 36:1292-1299.
- Sakamoto N, Chastain PD, Parniewski P, Ohshima K, Pandolfo M, Griffith JD, Wells RD (1999) Sticky DNA: self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia. *Mol Cell* 3:465-475.
- Sanchez-Casis G, Cote M, Barbeau A (1976) Pathology of the heart in Friedreich's ataxia: review of the literature and report of one case. *Can J Neurol Sci* 3:349-354.
- Santoro L, De Michele G, Perretti A, Crisci C, Cocozza S, Cavalcanti F, Ragno M, Monticelli A, Filla A, Caruso G (1999) Relation between trinucleotide GAA repeat length and sensory neuropathy in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:93-96.
- Santos MM, Ohshima K, Pandolfo M (2001) Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum Mol Genet* 10:1935-1944.
- Santos R, Dancis A, Eide D, Camadro JM, Lesuisse E (2003) Zinc suppresses the iron-accumulation phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* lacking the yeast frataxin homologue (Yfh1). *Biochem J* 375:247-254.
- Santos R, Buisson N, Knight SA, Dancis A, Camadro JM, Lesuisse E (2004) *Candida albicans* lacking the frataxin homologue: a relevant yeast model for studying the role of frataxin. *Mol Microbiol* 54:507-519.
- Sarsero JP, Li L, Wardan H, Sitte K, Williamson R, Ioannou PA (2003) Upregulation of expression from the FRDA genomic locus for the therapy of Friedreich ataxia. *J Gene Med* 5:72-81.
- Sauer B (1987) Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7:2087-2096.

- Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5166-5170.
- Saveliev A, Everett C, Sharpe T, Webster Z, Festenstein R (2003) DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* 422:909-913.
- Scarano V, de Cristofaro T, De Michele G, Salvatore E, De Biase I, Monticelli A, Filla A, Coccozza S (2001) Serum transferrin receptor levels in Friedreich's and other degenerative ataxias. *Neurology* 57:159-160.
- Schipper HM (1999) Glial HO-1 expression, iron deposition and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res* 1:57-70.
- Schipper HM (2000) Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp Gerontol* 35:821-830.
- Schipper HM (2004) Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 1012:84-93.
- Schipper HM, Bernier L, Mehindate K, Frankel D (1999) Mitochondrial iron sequestration in dopamine-challenged astroglia: role of heme oxygenase-1 and the permeability transition pore. *J Neurochem* 72:1802-1811.
- Schneider A, Behrens M, Scherer P, Pratje E, Michaelis G, Schatz G (1991) Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *Embo J* 10:247-254.
- Schoenle EJ, Boltshauser EJ, Baekkeskov S, Landin Olsson M, Torresani T, von Felten A (1989) Preclinical and manifest diabetes mellitus in young patients with Friedreich's ataxia: no evidence of immune process behind the islet cell destruction. *Diabetologia* 32:378-381.
- Schols L, Amoiridis G, Przuntek H, Frank G, Epplen JT, Epplen C (1997) Friedreich's ataxia. Revision of the phenotype according to molecular genetics. *Brain* 120 (Pt 12):2131-2140.
- Schon EA, Manfredi G (2003) Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest* 111:303-312.
- Schulz JB, Dehmer T, Schols L, Mende H, Hardt C, Vorgerd M, Burk K, Matson W, Dichgans J, Beal MF, Bogdanov MB (2000) Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia. *Neurology* 55:1719-1721.
- Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253-266.
- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2:55-67.
- Sellitro F, Petretta M, Guidace G, Squarcia U, Agnetti A, Guidan G (1986) [Cardiomyopathy in Friedreich's ataxia]. *Pediatr Med Chir* 8:163-167.
- Seznec H, Wilson RB, Puccio H (2004a) 2003 International Friedreich's Ataxia Research Conference, 14-16 February 2003, Bethesda, MD, USA. *Neuromuscul Disord* 14:70-82.

- Seznec H, Simon D, Monassier L, Criqui-Filipe P, Gansmuller A, Rustin P, Koenig M, Puccio H (2004b) Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 13:1017-1024.
- Seznec H, Simon D, Bouton C, Reutenauer L, Hertzog A, Drapier J.C, Procaccio V, Patel M, Koenig M, Puccio H. (2004c, soumis) Friedreich ataxia, the oxidative stress paradox.
- Sharma R, Bhatti S, Gomez M, Clark RM, Murray C, Ashizawa T, Bidichandani SI (2002) The GAA triplet-repeat sequence in Friedreich ataxia shows a high level of somatic instability in vivo, with a significant predilection for large contractions. *Hum Mol Genet* 11:2175-2187.
- Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, Kitaura Y, Isomura T, Suma H (2001) Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 65:965-968.
- Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* 277:24120-24127.
- Skre H (1975) Friedreich's ataxia in Western Norway. *Clin Genet* 7:287-298.
- Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 142:128-130.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14376-14381.
- Steinsapir K, Lewis W (1985) Dilated cardiomyopathy associated with Friedreich's ataxia. *Arch Pathol Lab Med* 109:454-456.
- Sternberg N, Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150:467-486.
- Strain J, Lorenz CR, Bode J, Garland S, Smolen GA, Ta DT, Vickery LE, Culotta VC (1998) Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem* 273:31138-31144.
- Sun J, Brand M, Zenke Y, Tashiro S, Groudine M, Igarashi K (2004) Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1461-1466.
- Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, Ikeda-Saito M, Yoshida M, Igarashi K (2004) Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *Embo J* 23:2544-2553.
- Syntichaki P, Tavernarakis N (2003) The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat Rev Neurosci* 4:672-684.
- Tahara T, Sun J, Nakanishi K, Yamamoto M, Mori H, Saito T, Fujita H, Igarashi K, Taketani S (2004) Heme positively regulates the expression of beta-globin at the locus control region via the transcriptional factor Bach1 in erythroid cells. *J Biol Chem* 279:5480-5487.

- Takanashi M, Mochizuki H, Yokomizo K, Hattori N, Mori H, Yamamura Y, Mizuno Y (2001) Iron accumulation in the substantia nigra of autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP). *J Neurochem* 77:311-314.
- Takano-Ohmuro H, Mukaida M, Kominami E, Morioka K (2000) Autophagy in embryonic erythroid cells: its role in maturation. *Eur J Cell Biol* 79:759-764.
- Taketani S, Adachi Y, Nakahashi Y (2000) Regulation of the expression of human ferrochelatase by intracellular iron levels. *Eur J Biochem* 267:4685-4692.
- Tan G, Napoli E, Taroni F, Cortopassi G (2003) Decreased expression of genes involved in sulfur amino acid metabolism in frataxin-deficient cells. *Hum Mol Genet* 12:1699-1711.
- Tan G, Chen LS, Lonnerdal B, Gellera C, Taroni FA, Cortopassi GA (2001) Frataxin expression rescues mitochondrial dysfunctions in FRDA cells. *Hum Mol Genet* 10:2099-2107.
- Taroni F, DiDonato S (2004) Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci* 5:641-655.
- Ter Linde JJ, Steensma HY (2002) A microarray-assisted screen for potential Hap1 and Rox1 target genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19:825-840.
- Terman A, Brunk UT (2004) Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1400-1404.
- Thompson KJ, Shoham S, Connor JR (2001) Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* 55:155-164.
- Thyagarajan B, Guimaraes MJ, Groth AC, Calos MP (2000) Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244:47-54.
- Tozzi G, Nuccetelli M, Lo Bello M, Bernardini S, Bellincampi L, Ballerini S, Gaeta LM, Casali C, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F (2002) Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Arch Dis Child* 86:376-379.
- Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S (1996) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87:1317-1326.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335-344.
- Ulku A, Arac N, Ozeren A (1988) Friedreich's ataxia: a clinical review of 20 childhood cases. *Acta Neurol Scand* 77:493-497.
- Valentine JS, Hart PJ (2003) Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3617-3622.
- Vahsen N, Candé C, Brière JJ., Bénit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schägger H, Rustin P, Kroemer G (2004) AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation - accepté dans EMBO
- Vavilova TI, Gurskaia NZ, Usman VB (1978) [Cardiac changes in familial Friedreich's ataxia (clinico-morphologic study)]. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova* 78:1621-1625.

- Voisine C, Schilke B, Ohlson M, Beinert H, Marszalek J, Craig EA (2000) Role of the mitochondrial Hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1. *Mol Cell Biol* 20:3677-3684.
- Vorgerd M, Schols L, Hardt C, Ristow M, Epplen JT, Zange J (2000) Mitochondrial impairment of human muscle in Friedreich ataxia in vivo. *Neuromuscul Disord* 10:430-435.
- Waldvogel D, van Gelderen P, Hallett M (1999) Increased iron in the dentate nucleus of patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 46:123-125.
- Wang X, Manganaro F, Schipper HM (1995) A cellular stress model for the sequestration of redox-active glial iron in the aging and degenerating nervous system. *J Neurochem* 64:1868-1877.
- Watase K, Venken KJ, Sun Y, Orr HT, Zoghbi HY (2003) Regional differences of somatic CAG repeat instability do not account for selective neuronal vulnerability in a knock-in mouse model of SCA1. *Hum Mol Genet* 12:2789-2795.
- Weber P, Metzger D, Chambon P (2001) Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in the mouse brain. *Eur J Neurosci* 14:1777-1783.
- Wetts R, Herrup K (1983) Direct correlation between Purkinje and granule cell number in the cerebella of lurcher chimeras and wild-type mice. *Brain Res* 312:41-47.
- Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA (2002) Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* 80:616-625.
- Williamson TL, Corson LB, Huang L, Burlingame A, Liu J, Bruijn LI, Cleveland DW (2000) Toxicity of ALS-linked SOD1 mutants. *Science* 288:399.
- Wilson RB, Roof DM (1997) Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet* 16:352-357.
- Wilson RB, Lynch DR, Fischbeck KH (1998) Normal serum iron and ferritin concentrations in patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 44:132-134.
- Winter RM, Harding AE, Baraitser M, Bravery MB (1981) Intrafamilial correlation in Friedreich's ataxia. *Clin Genet* 20:419-427.
- Wong A, Yang J, Danielson S, Gellera C, Taroni F, Cortopassi G (2000) Sensitivity of FRDA lymphoblasts to salts of transition metal ions. *Antioxid Redox Signal* 2:461-465.
- Wong A, Yang J, Cavadini P, Gellera C, Lonnerdal B, Taroni F, Cortopassi G (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet* 8:425-430.
- Wyllie A (1998) Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature* 391:20-21.
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 14:180-198.
- Yamanaka K, Ishikawa H, Megumi Y, Tokunaga F, Kanie M, Rouault TA, Morishima I, Minato N, Ishimori K, Iwai K (2003) Identification of the ubiquitin-protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nat Cell Biol* 5:336-340.

- Yang G, Nguyen X, Ou J, Rekulapelli P, Stevenson DK, Dennery PA (2001) Unique effects of zinc protoporphyrin on HO-1 induction and apoptosis. *Blood* 97:1306-1313.
- Yoon T, Cowan JA (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc* 125:6078-6084.
- Yoon T, Cowan JA (2004) Frataxin-mediated iron delivery to ferroxidase in the final step of heme biosynthesis. *J Biol Chem* 279:25943-25946.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297:259-263.
- Yuan J, Lipinski M, Degtrev A (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40:401-413.
- Zeviani M, Carelli V (2003) Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 16:585-594.
- Zhang X, Chen J, Graham SH, Du L, Kochanek PM, Draviam R, Guo F, Nathaniel PD, Szabo C, Watkins SC, Clark RS (2002) Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem* 82:181-191.
- Zhang Y, Riesterer C, Ayrall AM, Sablitzky F, Littlewood TD, Reth M (1996) Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 24:543-548.
- Zheng B, Sage M, Sheppard EA, Jurecic V, Bradley A (2000) Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. *Mol Cell Biol* 20:648-655.
- Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Cande C, Kroemer G, Hagberg H, Blomgren K (2003) Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 86:306-317.
- Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA, Perry G (2004) Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1000:32-39.
- Zinyk DL, Mercer EH, Harris E, Anderson DJ, Joyner AL (1998) Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Curr Biol* 8:665-668.
- Zouari M, Feki M, Ben Hamida C, Larnaout A, Turki I, Belal S, Mebazaa A, Ben Hamida M, Hentati F (1998) Electrophysiology and nerve biopsy: comparative study in Friedreich's ataxia and Friedreich's ataxia phenotype with vitamin E deficiency. *Neuromuscul Disord* 8:416-425.