# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

*ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED414)*
**Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)**

# THÈSE

Présentée par **Karima HABBAS**
Soutenue le : jeudi 1er octobre 2020

En vue de l'obtention du grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Discipline/Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

# La diacylglycérol kinase kappa (Dgkκ) comme nouvelle cible thérapeutique dans le modèle murin *Fmr1*-KO du syndrome de l'X Fragile

**Membres du jury**

| | | |
|---|---|---|
| Dr. Barbara BARDONI | DR, INSERM, IPMC, Valbonne | Rapportrice |
| Dr. Gaëlle FRIOCOURT | CR, INSERM, IBRBS, Brest | Rapportrice |
| Dr. Nicolas VITALE | DR, INSERM, INCI, Strasbourg | Examinateur interne |
| Dr. Hervé MOINE | DR, CNRS, IGBMC, Illkirch | Directeur de thèse |

# Remerciements

Pour commencer je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie les Dr. Barbara Bardoni et Dr. Gaëlle Friocourt, en tant que rapportrices, de m'avoir accordé de votre temps à l'évaluation de ma thèse et d'y apporter votre expertise. Je remercie le Dr. Nicolas Vitale, examinateur interne, pour vos conseils tout au long de ma thèse et votre bienveillance. Enfin, un merci tout particulier au Dr. Françoise Piguet, membre invitée de mon jury, qui m'a transmis beaucoup de connaissance et de savoir-faire, qui a toujours été accessible et de bons conseils.

Hervé, je tenais à te remercier tout d'abord pour ton extrême gentillesse, ta compréhension dans n'importe quelle situation de la vie, ton écoute et ta disponibilité. Merci pour tout ce que tu m'as appris et pour tes nombreux conseils. Un directeur de thèse se proposant de faire des manips ce n'est pas si fréquent, mais toi tu n'as jamais hésité lorsque j'étais surchargée, quand j'ai eu besoin d'aide, tu étais toujours présent, nos projets n'ont pas toujours été facile, mais en binôme nous y sommes arrivés !

A l'équipe Chelly-Mandel,

Jean Louis Mandel, tu as toujours été de bons conseils, je te remercie pour ta bienveillance.

Jamel Chelly, merci pour nos nombreuses discussions enrichissantes, vos tournées en fin de journée au laboratoire resteront mythiques, toujours présent, bienveillant, et de bons conseils, non seulement scientifique mais également des conseils de vie.

Eric, merci pour ton aide, à toutes ses cultures de neurones, tous ces western blot, fait sans relâche et Dieu sait que cette année 2020 a été chargé en manip. Merci pour toutes nos discussions, pour ta générosité, pour tous ces chocolats, ces glaces et ces sucreries qui n'ont peut-être pas contribué à mon bien-être physique mais moral sans aucun doute !

Gabrielle…Gaby, que dire, si ce n'est MERCI. Quelle chance j'ai eu de t'avoir à mes côtés depuis le début de cette aventure. Ton expertise scientifique toujours au rendez-vous ! Tu as toujours été disponible pour moi peu importe l'heure, le jour, le mois, prête à tout pour m'aider.

Tu es devenue plus qu'une simple collègue, tu es une amie. Merci pour toutes nos discussions si enrichissantes. À toutes nos pauses café après de longue journée, à nos discussions sans fin sur le parking de l'IGBMC parce qu'évidemment il n'y en avait jamais assez !

Amélie, merci pour tous ces bons moments, pour ta joie de vivre, ces discussions interminables autour de bons repas. Malgré ta vie à 100 à l'heure, tu as toujours été là lorsque le laboratoire avait besoin de toi !

Jérémie, tu es arrivé une année après moi et tu as été LE binôme sans aucun doute, à toutes nos longues journées, nos longs week-ends, nos nombreux cafés, nos pauses déjeuner digne d'un hôtel 5 étoiles ou à contrario d'un Formule 1, à tous nos FAT repas, nos chocolats partagés (tu sais le Lindt saveur Paris Brest c'est le meilleur !). Merci pour tout, toujours disponible, à l'écoute, tu savais reconnaitre ma fatigue extrême et venir à la rescousse. On a beaucoup appris ensemble, la science est sacrée chez nous hein !

Merci à Andrea, notre ancienne post-doc avec qui j'ai partagé un beau projet, très prometteur, notre cohabitation a été courte mais merci pour tout !

Merci à Antonina pour ta gentillesse, ton professionnalisme et ton aide ! C'était un plaisir de travailler avec toi. Merci à la SATT Conectus ainsi qu'à Lysogène et toute leur équipe.

Merci à Ricardos, malgré la distance tu as toujours été de bon conseil, tu as toujours été présent pour moi à n'importe quel moment, je ne te remercierai jamais assez !

Johan alias Aziz, oui je sais que tu aimes quand je t'appelle comme ça (ironie quand tu me tiens) ! Depuis la licence, tu me hantes… Ton sourire le jour où tu as su que je venais faire ma thèse au labo (dans lequel tu étais déjà depuis ton master), je ne l'oublierai pas ! Merci pour toutes ses pauses café, déjeuners, ces discussions parfois sans fin, merci pour ton aide grâce à toi je gère les filtres sur imageJ et je sais faire des coupes de cerveaux adultes en agarose au vibratome !

Bogi, maintenant que tu comprends très bien le français, tu pourras lire mes remerciements et peut-être même ma thèse ! Tu es arrivée en post-doc, au cours de ma dernière année de thèse, pas la plus facile hein. Depuis ton arrivée nous nous sommes super bien entendues, tu m'as tellement apporté en si peu de temps, tu es une chercheuse hors norme, la soif de science, de réussite sont tes moteurs. Tu t'es TOUJOURS proposée pour m'aider quand bien même tu

n'avais pas une minute. Tu m'as encouragé et conseillé comme une grande sœur, tu as été si précieuse pour moi ! KÖSZÖNÖM SZÉPEN =)

Merci à nos stagiaires, que de bons souvenirs avec vous, tellement de rire, de repas partagés au labo et à travers notre si belle ville et ce n'est que le début. Quel bonheur ça a été de partager ces repas à 12h pile poil ! Merci Paul pour ton incroyable gentillesse, merci Sarah pour ta douceur (ta petite voix douce me manque dans le box), merci Pierre même si ce fut court c'était un réel plaisir de partager ces discussions autour de mises en page de présentations ppt et pour finir merci à OkayCakil, le meilleur des stagiaires, d'ailleurs celui avec qui j'ai passé le plus de temps et à qui je cède le flambeau de la thématique X Fragile, merci pour tout, pour ton aide parce que oui tu en as coulé des gels, tu en as fait des mises en pages…

Merci au reste de l'équipe, Ekaterina pour tous ces moments partagés autour de bons repas (je parle beaucoup de repas non ?!), pour ton aide dans la mise au point de protocole (je n'oublie pas les tranches de cerveaux, le vibratome, la culture cell…), tes conseils jusqu'à la dernière minute de ma thèse même si tu n'étais déjà plus au labo. Merci Vicky pour tes conseils et ton aide quand j'en avais besoin, merci Florent pour toutes ses conversations si enrichissantes, tous ces moments passés ensemble, merci Chantal pour tes conseils, ton rire que l'on entend partout au labo et qui fait du bien (n'oublie pas les western blot c'est au labo pas à la maison =)). Merci également à Nathalie et Valérie pour votre aide.

L'équipe Godin, merci à vous tous ! Merci particulièrement à Hakima, pour tous ces partages et cette motivation que tu transmets ! Merci à Peggy, l'ingénieure rêvée, tu as toujours été de bons conseils ! Évidemment, comment écrire des remerciements sans te citer…Juliette ! Tu sais à quel point je t'apprécie, merci pour tous nos moments de rires, de vie, nos discussions plus sérieuses, à cette bibliographie que tu m'envoyais par mail (sans aucune pression hein c'est juste pour être à jour dans ta rédaction de thèse !), ne change surtout pas et n'oublie pas, j'attends ton discours, ta petite larme et ma pancarte le 1er octobre ! =)

Au département de médecine translationnelle et de neurogénétique (notre cher TMN), je ne vous citerai pas tous mais merci pour tout !

A l'ICS, merci ! Particulièrement Fabrice, merci pour tout, ta précieuse aide, ton expertise, ton investissement, merci d'avoir cru en mon projet et de m'avoir accompagné jusqu'au bout. Merci pour ta patience à mes NOMBREUSES questions ! Je remercie aussi Christophe pour sa

gentillesse, merci à Chaouki, Hamid, Nadine et Chadia pour vous être bien occupés de mes fabuleuses *Fmr1*-KO !

Merci à Pascale Koebel, tu m'as tellement appris sur les virus, tu as toujours été disponible pour moi, merci pour tout et merci pour nos nombreuses discussions non scientifiques mais si enrichissantes ! Merci Anne Maglott-Roth pour ta gentillesse et ta disponibilité, la staurosporine, ça fonctionne !

Merci à Erwan, si je t'avais connu depuis le début de ma thèse j'aurais sûrement des images de coupes de cerveaux avec une précision et une profondeur inégalable ! Mais il n'est jamais trop tard, j'ai encore pleins de coupes à imager, je reviens ! Plus sérieusement, merci Erwan, tu as toujours répondu présent lorsque j'avais besoin d'aide, de la plus technique à la plus simple. Ta pédagogie, ta patience et ta bonne humeur font que tu es une personne géniale !

Les copinessssss ! Évidemment, un paragraphe pour vous serait peu ! Merci à vous toutes, Laure, Ekaterina, Helin, Angeliki, Diana et le meilleur pour la fin, Sirine. Je pourrai vous dire merci sans m'arrêter, grâce à vous, toutes les journées, même les plus difficiles étaient joyeuses. Dédicace à nos soirées raclette ! Laure, merci pour ton aide, tes encouragements et ton authenticité, depuis que tu es partie nos repas sont amères… mais tu es toujours présente pour nous malgré tout. Ekaterina, tes tomates-mozza-œufs durs nous manquent (pas vraiment) et tes pauses déjeuner à 16h après celle de 12h ont laissé un vide au labo sache le ! Merci pour tout. Helin, merci pour ta folie, je ne te comprends pas toujours mais tu me fais tellement rire, la thèse ce n'est pas facile hein ? Mais je te rassure c'est que du bonheur, avec du recul ! (Les phosphorylations ce n'est pas facile à voir en western blot surtout quand Karima n'est plus au labo =)). Angeliki, merci pour tous ces bons moments, ces bons conseils, ces pauses indispensables à notre bien-être et merci pour toutes ses astuces beautés partagées. Diana, notre dernière recrue, arrivée toute fraichement en thèse, merci pour tes gels précastés, tes cuves de western blot et ton aide tout simplement, petite pensée à tous nos covoiturages !

On dit souvent le meilleur pour la fin non ? Alors s'il devait y avoir une fin aux remerciements professionnels (même si amicaux pour la plupart), s'il devait y avoir une transition afin d'arriver aux remerciements de mes proches, personne ne serait mieux placé que Sirine ! Sirine c'est une sœur, une amie, une collègue, Sirine c'est nos années maternelles et primaires à la Brigitte jusqu'aux derniers mois de nos thèses, ce sont 28 années de souvenirs et de bonheur. Je te le dis toujours, tu es mon rayon de soleil, ta joie de vivre, tes mimiques, tes expressions typiques

et atypiques et tes ras-le-bol presque quotidien mdrrrr. Ta gentillesse n'a aucune limite, ta douceur et ta compassion, ta disponibilité, ton amour de l'autre sont parmi tes meilleures qualités. Merci pour tout, je ne saurai jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi depuis le début, merci à la famille Souali-Crespo, Sirine est simplement à votre image, d'une bonté sans précédent.

Je me demandais souvent pourquoi les remerciements étaient parfois si long, en même temps, une thèse c'est une expérience riche en émotions, riche en relations, et lorsqu'on a la chance d'avoir autant de proches, et une grande famille, ces remerciements sont très longs donc…

A vous mes amies, Charline, Feiza, Lyly et Nawel (pas de jalouses j'ai utilisé l'ordre alphabétique pour vous citer), MERCI. Charline, depuis la maternelle tu es à mes côtés, tu es un véritable bonheur, toujours en train de rire, tu es si bon public ! Feiza, ma co-équipière, merci pour tous ces moments où tu as réussi à atténuer mon stress, merci à toute cette bienveillance, PhD ! Lyly, ma jumelle de vie, merci pour tout ce que tu m'apportes, pour cette reconnaissance et ce respect que tu as envers moi. Nawel, si bonté et douceur devaient avoir des synonymes ce serait Nawel, tu es un bonheur dans ma vie, merci pour tout. Une amitié de plus de 15-20 ans ça se fait rare, c'est mon cadeau le plus précieux. Merci à tous ces moments passés, toutes ses nuits blanches à discuter de tout et de rien. Toutes ses nuits à réviser pour ma part pendant que vous vous amusiez dans la pièce d'à côté…C'est ce qu'on appelle le respect dans l'équipe ! Pour finir ce paragraphe, petite dédicace à Charline, les derniers jours de rédaction étaient très longs, très éprouvants, mais cette phrase que tu m'as dite m'a tellement fait rire et grâce à elle j'ai pu me motiver jusqu'au bout parce que tu sais : la prison c'est dure mais la sortie c'est sûr ! Et j'y suis arrivée, je suis à la sortie !

A vous ma famille, mon moteur et ma fierté ! A mes frères, Abbas, Ahmed, Farid et Mohamed, merci à vous, merci pour m'avoir toujours encouragé, merci d'avoir mis à ma disposition tout ce dont j'avais besoin, j'espère que vous êtes fières de votre petite sœur. Merci d'avoir toujours eu confiance en votre petite princesse comme dirait Ahmed, en votre boulette comme dirait Abbas. Vous êtes un pilier dans ma vie, une fratrie que tout le monde rêve d'avoir. A mes sœurs, Najet et Assia, même si vous êtes loin de moi, vous avez toujours été présentes pour moi, Assia merci pour ton soutien et ta motivation, merci pour toutes les fois où tu as voulu m'aider sans le pouvoir mais où tu as contribué à ma réussite et mon bonheur à ta manière ! Merci à Moussa, mon beau-frère exceptionnel, toujours là pour me faire rire et me soutenir, comme il le dit si bien : On t'aime Karima, on t'aime !!! Merci à mes belles sœurs, Camille, Fatima, Hanane,

Yamina, merci d'avoir toujours fait en sorte que je réussisse dans tout ce que j'ai entrepris dans ma vie, merci pour votre bienveillance, merci pour votre amour sans fin ! Merci à mes neveux et nièces, je ne vais pas vous citer, non pas parce que vous êtes 15 mais parce que vous êtes 15. Merci à vous tous, du plus grand 29 ans au plus petit 3 ans, tata est fière de vous et tata va enfin devenir docteur ! Un merci particulier à Yassin, petit neveu d'amour qui a grandi avec moi, tu es comme mon petit frère et sache que je suis fière de toi, merci pour tout. Je suis très chanceuse et reconnaissante d'avoir une aussi belle famille, un soutien sans précédent et tellement d'amour venant de vous.

Évidemment je remercie tout mon entourage proche, ma belle-famille et particulièrement ma belle-mère et ma belle-sœur Kawthar, ma belle-sœur Nadia, la famille Bentafat, la famille Sabour, Souad, ma cousine Hanane, mes cousines et cousins ainsi que toutes les personnes que j'aurai pu oublier.

J'arrive à la fin je vous rassure…

A toi mon mari, mon ami, mon confident, ma source de motivation, merci ! Merci d'avoir été un pilier pour moi, merci de m'avoir motivé et de continuer à le faire chaque jour que Dieu fait. Tu es sûrement la plus belle chose qui me soit arrivée, je ne cesserai de te remercier de toujours m'accompagner dans tous mes choix, de participer à mon bien être, merci pour ta bienveillance, pour ton amour, pour ta gentillesse et pour ta compréhension !

A vous mes parents, je n'ai pas de mot pour vous dire à quel point je vous aime et à quel point je vous remercie. Cette thèse c'est grâce à vous, cette thèse c'est la vôtre ! Grâce à vos sacrifices, on a pu faire des études et je ne vous en serai jamais assez reconnaissante pour ça. Papa, ta petite fille va devenir docteur, tu en es tellement fière, tu le répètes sans cesse, depuis ma tendre enfance tu m'as accompagné et soutenu sans faille. A toutes ces fois où tu me préparais le petit déjeuner parce que chaque minute était précieuse pour que je puisse réviser, à toutes ces fois où tu faisais régner le silence dans la maison parce que je cite « Karima révise, il faut la laisser se concentrer maintenant ! ». Merci papa je t'aime tellement. Maman, merci pour tout, ta douceur et ton amour n'ont d'égales ! Tu me répètes sans cesse que tu es fière de moi et que je suis ton bébé (soyez pas jaloux les frères et sœurs, tout le monde sait que je suis la préférée, la petite dernière =)), et que je suis ta plus grande fierté. Merci d'avoir consacré ta vie au bien-être de ta famille. Je ne suis qu'une petite réussite parmi vos réussites, papa, maman, c'est pour cela que je vous dédie cette thèse !

« La liberté commence où l'ignorance finie »

Victor Hugo

« La science n'a pas de patrie »

Louis Pasteur

# Table des matières

Remerciements .....

Table des figures ..... 1

Abréviations ..... 2

Introduction ..... 7

Chapitre I : Le syndrome de l'X fragile ..... 7

I. Les maladies neuro-développementales ..... 7

II. La déficience intellectuelle (DI) ..... 7

III. Les troubles du spectre autistique (TSA) ..... 8

IV. Le syndrome de l'X fragile ..... 9
1. Déficience intellectuelle associée au FXS ..... 9
2. Troubles du comportement associés au FXS ..... 10
3. Les caractéristiques morphologiques ..... 11
4. Les pathologies associées au FXS ..... 11
5. Les aspects neuroanatomiques ..... 11

V. Les causes génétiques du FXS ..... 12
1. Identification de la mutation FXS et du gène *FMR1* ..... 12
2. Mosaïcisme dans le FXS ..... 14

VI. Prémutations : FXPOI et FXTAS ..... 15
1. Mécanisme 1 : Séquestration et gain de fonction de l'ARN ..... 16
2. Mécanisme 2 : RAN translation ..... 17
3. Mécanisme 3 : Formation de R-loops ..... 17
4. Mécanisme 4 : Implication des mitochondries ..... 17
5. Mécanisme 5 : Long-Non coding ARN ..... 18

VII. Les différents modèles animaux du FXS ..... 18
1. La souris : Mus musculus ..... 18
2. La drosophile : Drosophila melanogaster ..... 22
3. Le poisson zèbre : Danio rerio ..... 24
4. Le rat : Rattus norvegicus ..... 25

Chapitre II : FMRP, fonctions et cibles ..... 27

I. Expression du gène *FMR1* ..... 27

II. Structure de la protéine FMRP ..... 28
1. La région N-terminale ..... 29
2. La région centrale ..... 29
3. La région C terminale ..... 30

III. La protéine FMRP et son épissage alternatif ..... 31

IV. Protéines associées à FMRP ..... 32

1. Les protéines FXR1P et FXR2P ... 32
2. Les protéines CYFIP 1 et CYFIP 2 ... 35
3. La protéine SMN ... 36
4. La protéine TDRD3 ... 36
5. La protéine MSP58 ... 37
6. La protéine NUFIP1 ... 38
7. La protéine 82-FIP ... 39

V. Les fonctions et mécanismes de régulation de FMRP ... 40
1. FMRP et les complexes ribonucléoprotéiques ... 40
2. FMRP et les polyribosomes (ou polysomes) ... 41
3. Les granules de stress (GS) ... 42
4. Les granules neuronaux (GN) ... 44
5. Les granules X fragile ... 47
6. Les P-bodies ... 48

VI. Les mécanismes de répression de la traduction par FMRP ... 49
1. Inhibition de l'initiation de la traduction par recrutement de CYFIP1 ... 50
2. Inhibition de la traduction par blocage du ribosome ... 50
3. Inhibition par la voie des miARN ... 52

VII. Les modifications post-traductionnelles modulant l'activité de FMRP ... 54
1. Phosphorylation ... 54
2. Méthylation ... 56

VIII. ARN cibles de FMRP ... 57
1. Les sites de fixation de FMRP ... 57
2. Techniques d'identification des ARNm cibles de FMRP ... 59
3. ARNm validés comme cible de FMRP ... 61

Chapitre III : La voie des mGluR et les différents axes thérapeutiques dans le FXS ... 63

I. Les mGluR dans la physiopathologie du FXS ... 63
1. Le syndrome de l'X fragile : une synaptopathie ... 63
2. La signalisation mGluR ... 64
3. La LTD-mGluR ... 66

II. Autres dérégulations dans le FXS ... 67
1. Les endocannabinoïdes ... 67
2. Dysfonctionnement des canaux ioniques ... 68
3. Le système GABA ... 68
4. AMPc : Adénosine monophosphate cyclique ... 69

III. Essais précliniques et cliniques pour le FXS ... 69

Chapitre IV : Identification d'une cible unique, DGKκ, et importance de la signalisation lipidique dans les neurones ... 72

I. Identification de la diacyl-glycérol kinase kappa comme cible unique de FMRP ... 72

II. DGKκ et lipides ... 73
1. Les domaines fonctionnels des DGK ... 74
2. La diacylglycérol kinase kappa : DGKκ ... 75

III. L'implication des DGK dans le cerveau ... 76

IV. Les rôles du DAG et du PA dans la régulation des épines ... 79

V. L'implication du PA dans la régulation de la traduction dendritique ..... 80
VI. Rôle de DGKκ dans le FXS ..... 81

Chapitre V : La thérapie génique ..... 84
I. Principe de la thérapie génique ..... 84
II. Historique de la thérapie génique ..... 85
III. Les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique ..... 86
1. Les virus adéno-associés (AAV) ..... 87
2. Cycle infectieux des AAV ..... 88
3. Les virus adéno-associés recombinants (AAVr) ..... 89
IV. Différentes voies d'administration des AAV dans le système nerveux central ..... 90
V. Sérotype et tropisme des AAV ..... 92
VI. Émergence de nouveaux vecteurs viraux ..... 93
VII. Réponse immunitaire aux AAV ..... 94
1. La réponse immunitaire innée ..... 95
2. Réponse immunitaire adaptative de l'hôte à la capside de l'AAV ..... 95
3. Réponse immunitaire adaptative de l'hôte au transgène ..... 95
VIII. Essais cliniques pour des maladies neurodégénératives basés sur l'utilisation d'AAV ..... 96
IX. Utilisation des AAV dans le syndrome de l'X fragile ..... 96
1. Utilisation de l'AAV5 en thérapie génique pour le FXS ..... 97
2. Utilisation de l'AAV9 en thérapie génique pour le FXS ..... 98
Objectifs de la thèse ..... 100
Stratégie pharmacologique : la pioglitazone (Article 1) ..... 102
Discussion article 1 ..... 147
Stratégie de thérapie génique : AAVrh10 et PHPe.B- DGKκ (Article 2) ..... 154
Résultats supplémentaires : injections néonatales d'AAVrh10-ΔN-DGKκ ..... 213
Discussion article 2 ..... 225
1. Absence de toxicité des AAV-ΔN- DGKκ in vitro ..... 225
2. Effet correcteur de l'AAVrh10-ΔN-DGKκ in vivo ..... 226
3. Conséquence sur les niveaux de lipides cérébraux (homéostasie DAG/PA) ..... 227
4. Vers une thérapie génique pour les patients FXS ? ..... 228
Conclusions générales ..... 231
Bibliographie ..... 232

# Table des figures

**Figure 1: Liste des troubles neuro-développementaux**
**Figure 2: Les facteurs génétiques et environnementaux des DI au cours du développement du système nerveux**
**Figure 3: Les différentes causes environnementales de la DI et des TSA**
**Figure 4: Caractéristiques cliniques du FXS au cours du développement**
**Figure 5: Caractéristiques faciales du FXS**
**Figure 6: Les conséquences moléculaires de l'expansion de trinucléotides CGG dans le gène *FMR1***
**Figure 7: Maladies à répétitions de trinucléotides et leurs localisations sur le gène Figure 8: Mutation de l'exon 5 dans le gène *FMR1***
**Figure 9: Hypothèse des mécanismes pouvant contribuer au FXTAS**
**Figure 10: Les différents modèles murins du FXS**
**Figure 11: Représentation schématique des différents modèles murins FXS**
**Figure 12: Phénotypes de plasticité synaptique chez la souris FXS**
**Figure 13: Comparaison des phénotypes FXS chez la souris et l'Homme**
**Figure 14: Phénotypes majeurs observés chez la drosophile mutante d*FMR1***
**Figure 15: Expression de la protéine FMRP chez la souris adulte dans différents organes Figure 16: Représentation schématique du gène *FMR1*, de l'ARN *FMR1* et de la protéine FMRP**
**Figure 17: Les différents domaines composant la protéine FMRP**
**Figure 18: Identification des partenaires moléculaires de FMRP**
**Figure 19: Modèle du rôle de FMRP dans les neurones**
**Figure 20: Composition et distribution cellulaire des granules de stress**
**Figure 21: Modèles d'inhibition de la traduction par FMRP**
**Figure 22: Schéma de la structure G-quadruplex**
**Figure 23: Structure secondaire du fragment d'ARN SoSLIP**
**Figure 24: Différentes techniques d'identification des ARNm cibles d'une protéine d'intérêt par approche CLIP**
**Figure 25: Liste des ARNm validés comme cible de FMRP**
**Figure 26: Dynamique des épines dendritiques lors de la maturation neuronale**
**Figure 27: Remodelage des épines dendritiques au cours du processus d'apprentissage Figure 28: Morphologie des épines dendritiques**
**Figure 29: Expression des gènes communs aux cibles de FMRP, au transcriptome axonale/ dendritique et aux gènes du spectre de l'autisme (ASD, autism spectrum disorders)**
**Figure 30: Les récepteurs mGluR, homologie de séquence d'acides aminés entre divers récepteurs métabotropiques du glutamate**

**Figure 31: Signalisation glutamatergique dans la synapse**
**Figure 32: Structure des mGluR et activation conformationnelle**
**Figure 33: La signalisation mGluR**
**Figure 34: Les mGluR-I stimulent la traduction à travers de multiples voies dans les neurones**
**Figure 35: Essais cliniques effectués à ce jour dans le cadre du FXS**
**Figure 36 : Protéines de la famille des diacylglycérol kinases de mammifères**
**Figure 37: Implication des DGK dans la fonction des synapses neuronales**
**Figure 38: Schéma général de la signalisation du DAG et du PA**
**Figure 39: Altérations des épines dendritiques et correction de ce phénotype en modulant l'expression de Dgkκ**
**Figure 40 : Altérations synaptiques induites par l'interférence avec l'expression de Dgkκ (absence d'expression de Dgkκ)**
**Figure 41: Interférence avec l'expression de Dgkκ (absence d'expression de Dgkκ) dans le striatum conduit à un comportement de type FXS**
**Figure 42: Nouveau modèle de la physiopathologie du FXS proposé**
**Figure 43: Stratégies de thérapie génique in vivo et ex vivo pour le traitement des maladies du système nerveux central (SNC)**
**Figure 44: Aperçu historique de la thérapie génique**
**Figure 45: Essais cliniques pour les maladies du système nerveux central utilisant des AAV**
**Figure 46: Exemples de vecteurs viraux utilisés dans le cadre de thérapies géniques**
**Figure 47: Organisation du génome AAV2**
**Figure 48: Cycle de vie de l'AAV**
**Figure 49: Représentation schématique des composants de base d'un vecteur de transfert de gène AAV recombinant**
**Figure 50: Différents modes d'administration des virus en thérapie génique**
**Figure 51: Avantages et inconvénients des différents mode d'administration des virus en thérapie génique**
**Figure 52: Récepteurs aux capsides, profil de transduction et propriétés du transport axonal des sérotypes d'AAV les mieux caractérisés utilisés pour le système nerveux central des mammifères**
**Figure 53: Des variants d'AAV9 contribuent à une meilleure transduction à travers le SNC et du SNP**
**Figure 54: Les deux risques associés à l'entrée d'AAV dans une cellule cible**
**Figure 55: Essais cliniques utilisant des vecteurs viraux dans les maladies neurologiques**

# Abréviations

**2-AG** 2- Arachidonylglycérol
**82-FIP** 82-kD FMRP Interacting Protein

**A**

**aa** amino acid
**AAV** Adeno-Associated-Virus
**AAVr** Adeno-Associated-Virus recombinant
**AAVS1** adeno-associated virus integration site 1
**Aβ1–42** beta amyloïde 1-42
**ABI1** Abl interactor 1
**ADA-SCID** Immunodéficience combinée sévère par déficit en adénosine désaminase
**ADN** Acide Désoxyribonucléique
**AGO2** Argonaute 2
**ALS** Amyotrophic Lateral Sclerosis
**AMPAR** 2-amino-3-(5-methyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïc acid receptor
**AMPc** Adénosine MonoPhosphate cyclique
**APC** Anaphase-Promoting Complex
**APP** Protéine précurseur de l'amyloïde
**APRA** Antibody-Positioned RNA Amplification
**Arc** Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
**ARN** acide ribonucléoprotéique
**ARNm** Acide RiboNucléique messager
**Arp2/3** Actin related protein 2/3
**ATD** domaine amino terminal
**AV** Adenovirus

**B**

**BBB** Blood Brain Barrier
**BC1** small untranslated BC1 RNA

**C**

**C2H2** cystéine2 histidine2
**CA1** Corne d'Ammon 1
**Camk2** Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain
**Cap** Capsid protein
**CAPRIN-1** Cell Cycle Associated Protein 1
**CaV2.2** (N-type) voltage-gated Ca2+ channels
**CB1** Canabinoid receptor type 1
**CB2** Canabinoid receptor type 2
**CDH1** Cadherin-1
**CDK5** Cyclin-dependent-like kinase 5
**CGG** Cytosine-Guanine-Guanine
**CK2** Caséine Kinase II
**CKO** Conditional Knock-Out
**CLIP** Cross-Link ImmunoPrecipitation
**CMV** CytoMegaloVirus
**COS C**V-1 simian **O**rigin carrying the **S**V40 replication origin
**CpG** Cytosine-phosphate-guanine
**CRD** domaine riche en cystéine
**CREATE** Cre Recombinase based AAV Targeted Evolution
**CRISPR-Cas9** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPR associated protein 9
**CYFIP1** Cytoplasmic *FMR1*-interacting protein 1
**CYFIP2** Cytoplasmic *FMR1*-interacting protein 2

**D**

**DAG** Diacylglycerol
**dFMRP** drosophila Fragile Mental Retardation Protein

**DGCR8/DROSHA** DiGeorge Syndrome Critical Region 8/ Ribonuclease III
**DGK** Diacylglécérol kinase
**DGKκ** Diacylglécérol kinase kappa
**DGLα** A Diacylglycerol lipase alpha
**DHPG** (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine
**DI** Déficience Intellectuelle
**DICER** Endoribonuclease Dicer

**E**

**E** embryonic day
**EEG** Electro-encéphalogramme
**eIF2α** Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
**eIF4A** Eukaryotic translation initiation factor 4 A
**eIF4E** Eukaryotic translation initiation factor 4E
**eIF4G** Eukaryotic translation initiation factor 4 G
**EMA** Agence Européenne des Médicaments
**EPAP** Acide glutamique-Proline-Alanine-Proline
**EPM** Elevated Plus Maze
**ERK1/2** Extracellular signal-regulated ½ kinases

**F**

**FASTK** Fas-activated serine/threonine kinase
**FCBS** FMRP consencus binding sequence
**FL** Full-length
**FMR4-6** Fragile Mental Retardation 4-6 long coding RNA
***FMR1*** Fragile Mental Retardation 1
***Fmr1*-KO** *Fmr1*-Knockout
**FMRP** Fragile Mental Retardation Protein
**FMRpolyG** Fragile Mental Retardation poly-Glycine
**FRAXA** Syndrome FRAXA, Fragile X Syndrome
**FSDH** Facioscapulohumeral muscular dystrophy
**FXG** Fragile X Granules
**FXPOI** Fragile X Premature Ovarian Failure
**FXR1P** Fragile X Related 1 Protein
**FXR2P** Fragile X Related 2 Protein
**FXRP** Fragile X Retardation Protein
**FXS** Fragile X Syndrome
**FXTAS** Fragile X Tremor Ataxia Syndrome

**G**

**G2** Gap 2 phase
**G3BP** Ras GTPase-activating protein-binding protein
**GABA** Acide γ-aminobutyrique
**GFP** Green Fluorescente Protein
**GN** Granules Neuronaux
**GRCh37** Genome Reference Consortium 37
**GRCh38** Genome Reference Consortium 38
**GS** Granules de Stress

**H**

**H3K79** Histone 3 Lysine 79
**hAsh1** human Achaete-scute homologue-1
**HCN1** Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel
**HEK293** Human embryonic kidney 293 cells
**HeLa** Henrietta Lacks cells
**HITS-CLIP** High-Throughput Sequencing of RNA isolated by Cross-Linking ImmunoPrecipitation
**hnRNPK** heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K
**hnRNPU** heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein U
**Homer1** Homer protein homolog 1
**HSP90** Heat shock protein 90
**HSPC300** Heat shock protein 300

**I**

**iGluR** Ionotropic Glutamate receptor
**IP** IntraPeritoneal Injection ou intraparenchymale

**IP3** Inositol triphosphate
**iPS** induced Pluripotent Stem cells
**IRM** Imagerie par résonnance magnétique
**ISO** Isoforme
**ITR** Inverted Terminal Repeat

**K**

**kB** kiloBase
**KD** Knock Down
**kDa** kiloDalton
**KH** K homology domain
**KI** Knock-In
**KIF3C** Kinesin-like protein KIF3C
**KIF5** Kinesin-related protein 5
**KO** Knock-Out
**Kv3.1** Potassium channel, voltage dependent, Kv3.1
**Kv4.2** Potassium channel, voltage dependent, Kv4.2

**L**

**LBC** LampBrush Chromosome
**LC3B** Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
**LCD** Low Complexity Domain
**LCR** Liquide Céphalo-Rachidien
**LLPS** Liquid-Liquid Phase Separation
**LMO2** LIM domain only 2
**lncARN** long non coding-ARN
**loxP** locus of crossing over P
**LTD** Long Term Depression
**LTP** Long Term Potentiation
**LV** Lenti-Virus

**M**

**M** mitose
**MARCKS** Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
**Mb** Megabase
**MB** Mushroom Bodies
**MeCP2** Methyl-CpG-binding protein 2
**mGluR** metabotropic Glutamate receptor
**miARN** microARN
**MN1** Lignée de Moto-Neurone murin
**MO** Morpholino
**MPT** Modifications Post-Traductionelle
**MSN** Neurones épineux moyens
**MSP58** 58-kDa microspherule protein
**mTOR** mammalian Target Of Rapamycin
**Munc13** Protein unc-13 homolog A
**MyoD** myoblast determination protein 1

**N**

**Nap22** Neuronal axonal membrane protein
**NAPI** Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter
**ncARN** non coding-ARN
**NDD** Neuro Developmental Disorders
**NES** Nuclear Export Signal
**NLGN1** Neuroligin-1
**NLS** Nuclear Localization Sequence
**NMDAR** N-methyl-D-aspartate Receptor
**NOR** Novel Object Recognition
**NR2A** NMDA sub-unit
**NRXN** Neurexin-1
**NUFIP1** Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 1

**O**

**OMS** Organisation Mondiale de la Santé

**ORF** Open Reading Frame
**OTC** Déficit en ornithine transcarbamylase

**P**

**P-bodies** Processing-Bodies
**PA** Phosphatidic Acid
**PABP-1** Polyadenylate-binding protein 1
**PAK1** Serine/threonine-protein kinase PAK 1
**PAR-CLIP** PhotoActivatable Ribonucleoside-enhanced CrossLinking and ImmunoPrecipitation
**PDE2A** cGMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase
**PDZ** Postsynaptic density protein-95/Disks/large/Zonula occludens-1
**PGZ** Pioglitazone
**PH** domaine d'homologie à la pleckstrine
**PIP2** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
**PKC** Protéine kinase C
**PLC-β** Phospholipase C beta
**PolyA** PolyAdenylation
**PPARɣ** Peroxyzome proliferator activated receptor ɣ
**PPI** Pre Pulse Inhibitory
**Pre-miARN** miARN précurseur
**Pri-miARN** miARN primaires
**PRMT1-3-4** Protein arginine N-methyltransferase 1-3-4
**PSD** post-synaptic density
**PSD-95** post-synaptic density-95 protein

**Q**

**QI** Quotient Intellectuel

**R**

**R-loops** Boucle-R
**Rac** Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
**RAN** translation Repeat Associated Non-AUG translation
**RBP** RNA Binding Protein
**RE** reticulum endoplasmique
**RGG** Arginine-Glycine-Glycine
**RhoGD1** Rho GDP-dissociation inhibitor
**RIP-CHIP** RNA-Binding Protein Immunoprecipitation
**RISC** RNA-Induced Silencing Complex
**ROR** Reporting Odds Ratio
**RMN** Résonance Magnétique Nucléaire
**RNase** Ribonucléase
**RNP** RiboNucleoProtein
**RT-qPCR** Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
**RV** Retro-virus

**S**

**S15** RPS15, 40S ribosomal protein S15
**S6K1** Ribosomal protein S6 kinase 1
**SAM** Sterile Alpha Motif
**SAM68** Src-associated in mitosis 68
**Sapap3/4** Disks large-associated protein 3/4
**Sc1**
**SCID-X1** Immunodéficience combinée sévère T-B+ par déficit en chaîne gamma
**SELEX** Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
**Semaf3f** Semaphorin-3F
**SFV** Semliki Forest virus
**SH-SY5Y** Lignées cellulaires humaines de neuroblastomes
**sh-RNA** short hairpin-RiboNucleic Acid
**Shank1-3** H3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1-3
**si-RNA** small interfering-RiboNucleic Acid
**SMN** Survival Motor Neuron
**SNC** Système Nerveux Central
**snoRNP** small nucleolar ribonucleoprotein
**SNP** Single Nucleotide Polymorphism

**snRNA** Small Nuclear RNA
**snRNPU** ribonucléoprotéines nucléaires du splicesome
**Sod1** Superoxide dismutase 1
**SoSLIP** Sod1 mRNA Stem Loops Interacting with FMRP

**T**

**Tap/NXF1** Nuclear RNA export factor 1
**TD** Tudor Domain
**TDAH** Trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité
**TDP-43** TAR DNA-binding protein 43
**TDRD3** Tudor domain-containing protein 3
**TIA-1** T-cell Intracellular Antigen 1
**TILLING** Targeting Induced Local Lesions in Genomes
**TLR9** Toll-Like receptor 9
**TMD** Transmembrane domain
**TOB3β** DNA topoisomerase 3-beta-1
**TPA** tetradecanoylphorbol 13-acetate
**TSA** Troubles du spectre autistique
**TSL** Troubles spécifiques du langage
**TTP** TristeTraProline
**TUG1** Tubulin gamma chain

**U**

**UTR** Untranslated region
**UV** Ultra-Violet

**V**

**VP** Structural protein
**VG** Viral Genome copy

**W**

**WAVE** Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1
**WRC** WAVE regulatory complex
**Wt** Wild-type

**X**

**XRN1** 5'-3' exoribonuclease 1

| Disease | Prevalence per 100 |
|---|---|
| Lesch-Nyhan syndrome | 0.0005 |
| Lowe syndrome | 0.0005 |
| Rubinstein-Taybi syndrome | 0.0008 |
| Cornelia de Lange syndrome | 0.0014 |
| Cri du chat syndrome | 0.0020 |
| Galactosaemia | 0.0020 |
| Angelman syndrome | 0.0040 |
| Williams syndrome | 0.0044 |
| Marfan syndrome | 0.0067 |
| Prader-Willi syndrome | 0.0067 |
| Rett syndrome | 0.0080 |
| Phenylketonuria | 0.0100 |
| Duchenne muscular dystrophy | 0.0143 |
| Tuberous sclerosis | 0.0167 |
| Trisomy 18 | 0.0250 |
| Velocardiofacial syndrome | 0.0250 |
| Neurofibromatosis type 1 | 0.0308 |
| Turner syndrome | 0.0400 |
| XYY | 0.0545 |
| XXX | 0.0550 |
| Noonan syndrome | 0.0571 |
| Fragile X syndrome | 0.0615 |
| Klinefelter syndrome | 0.0860 |
| Fetal alcohol syndrome | 0.1000 |
| Cerebral palsy | 0.1500 |
| Down syndrome | 0.1667 |
| Tourette syndrome | 0.5000 |
| Autistic spectrum disorder | 0.6500 |
| Developmental dyscalculia | 3.0000 |
| Attention deficit hyperactivity disorder | 5.0000 |
| Intellectual disability[4] | 5.5000 |
| Developmental dyslexia | 6.0000 |
| Developmental coordination disorder | 6.5000 |
| Specific language impairment | 7.4000 |
| Speech sound disorder | 10.0000 |

**Figure 1: Liste des troubles neurodéveloppementaux**

Les NDD sont classés par prévalence, la prévalence a été divisée par deux si elle est déclarée pour un seul sexe. Adapté de Bishop et al., 2010

# Introduction

# Chapitre I : Le syndrome de l'X fragile

## I. Les maladies neuro-développementales

Les maladies neurodéveloppementales (neuro-developmental disorders ou NDD) représentent un groupe hétérogène de maladies multifactorielles caractérisées par des troubles cognitifs (regroupant les troubles de la mémoire, de la perception ainsi que des difficultés dans le raisonnement, la compréhension et le jugement), des troubles de la communication et du comportement, ainsi que des défauts moteurs (Bishop et al., 2010 ; D'Souza et Karmiloff-Smith, 2017) (**Figure 1**). Les NDD apparaissent à différents stades du développement du cerveau : prolifération, différenciation, migration des neurones ou encore mise en place des connexions synaptiques. Elles incluent les déficiences intellectuelles (DI), les troubles envahissants du développement comme les troubles du spectre autistique (TSA) et le trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), l'épilepsie, les troubles spécifiques du langage (TSL) ainsi que des maladies neurosensorielles ou motrices (dont les tics). Je me focaliserai dans cette partie principalement sur la DI et les TSA qui sont les deux NDD centrales dans le cadre de mon projet de thèse. Les causes des DI et des TSA peuvent être génétiques (anomalies chromosomiques, formes monogéniques) mais également environnementales (expositions à des xénobiotiques, infections maternelles et/ou postnatal, traumatismes obstétriques ou du nourrisson) ainsi que la conséquence d'interactions complexes entre ces facteurs (Lemay et al., 2003 ; Mohamed et al., 2015 ; Hutton, 2016 ; Rogers et al., 2008 ; Sealey et al., 2016 ; Wozniak et al., 2019 ; Friocourt, 2007).

## II. La déficience intellectuelle (DI)

La déficience intellectuelle précédemment désignée sous le terme de « retard mental » (Salvador-Carulla et al., 2007) est définie comme une réduction significative des fonctions intellectuelles (apprentissage, raisonnement) et du comportement adaptatif (communication, motricité, habilités sociales, aptitudes scolaires) avant l'âge adulte. La DI touche 1 à 3% de la population générale (Purrugganan et al., 2018 ; Ropers et al., 2010) et 1 et 2% de la population en France, en Europe et aux USA (www.defiscience.fr). Elle peut être évaluée avec plusieurs

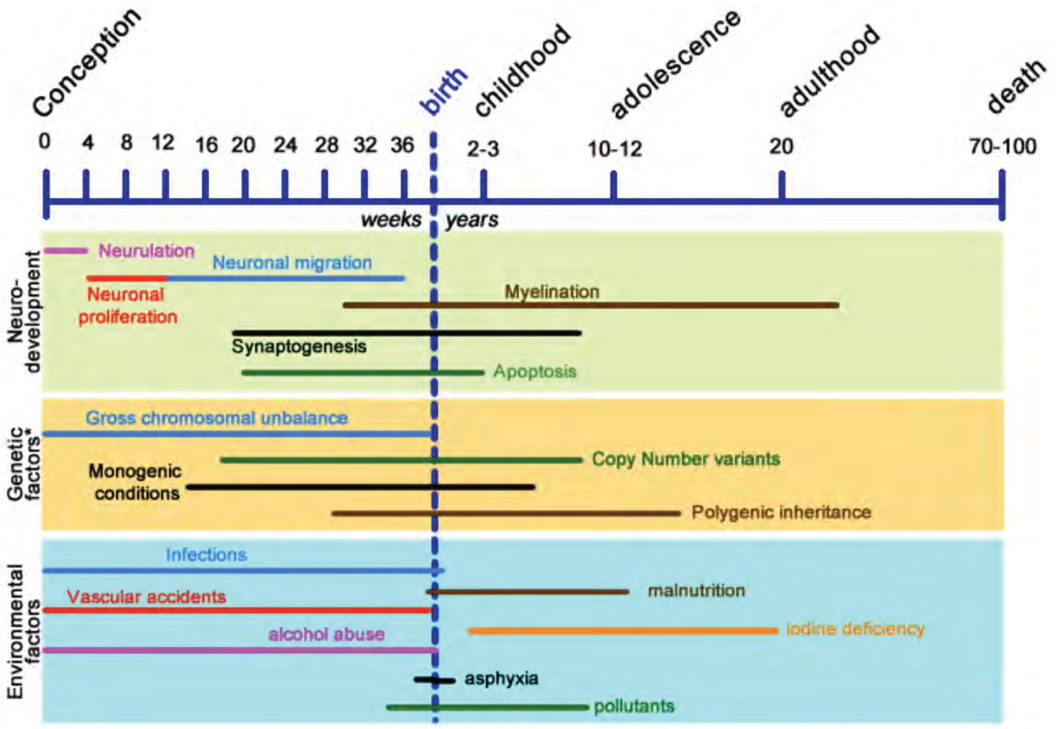



**Figure 2: Les facteurs génétiques et environnementaux des DI au cours du développement du système nerveux**

Issu de Chiurazzi et Pirozzi, 2016.

| Causes environnementales | Références |
|---|---|
| Exposition aux métaux lourds (plomb, mercure, aluminium) | Beattie et al., 1975 ; Bellinger et al., 1992, Koller et al., 2004 ; Mohamed et., 2015 ; Mendola et al., 2002 |
| Alcoolisation fœtale | Lemay et al., 2003 |
| Infection (rubéole, cytomégalovirus, toxoplasmose) | Hutton, 2016 ; Fombonne et al., 2012, Libbey et al., 2005 |
| Facteurs obstétriques (souffrance néonatale, naissance prématurée, césarienne, anoxie cérébrale, malnutrition) | Glasson et al., 2004 ; Hultman et al., 2002 ; Larsson et al., 2005 |
| Dysfonctionnement immunitaire | Croen et al., 2005 ; Casavant,2006 ; De Stefano, 2007 ; Chen et al., 2016 |
| Expositions à des xénobiotiques (perturbateurs endocriniens) | Sealey et al., 2016 |
| Prise de médicaments (thalidomide, misoprostol ou acide valproïque) | Strömland et al., 1994 ; Da Silva Dal Pizzol et al., 2006 ; Christensen et al., 2013 |
| Mode de vie maternel (malnutrition, carences en vitamines B9/D, consommation de drogues) | Neggers, 2014 ; Surén et al., 2013 ; Cannell, 2008 |

**Figure 3: Les différentes causes environnementales de la DI et des TSA**

types d'outils utilisant des échelles standardisées adaptées à l'âge et au niveau de développement du patient. On distingue deux composantes dans la DI, une composante cognitive et une composante adaptative. Différents tests peuvent aider à évaluer chaque composante, comme le test de Wechsler ou le quotient intellectuel (QI) pour la composante cognitive (Na et Burns, 2015). Le QI est défini comme l'indice exprimant les capacités cognitives d'un individu. Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le QI est subdivisé en 4 niveaux : retard léger (QI=50-70), retard moyen (QI=35-50), retard grave (QI=20-35) et retard profond (QI<20), la moyenne du QI d'un individu sain étant fixée à 100. Quant à la composante adaptative, l'évaluation se fait par l'observation des capacités psychomotrices et de socialisation via différents tests (Test Denver, échelle de Bayley et Brunet-Lézine) (Johnson et al., 2014 ; Bayley, 2006). Les causes connues de la déficience intellectuelle sont multiples, elles peuvent être génétiques (40-45%) ou environnementales (15-20%) mais dans une grande proportion des cas (35-40%) l'origine demeure inconnue (Kvarnung et Nordgren, 2017 ; Carlier, 2015 ; Pannetier, 2009) (**Figure 2**).

## III. Les troubles du spectre autistique (TSA)

Les troubles du spectre autistique sont définis comme des troubles neuro-développementaux touchant principalement la communication socio-émotionnelle (de réciprocité sociale) et la présence d'intérêts restreints et de comportements stéréotypés. Ces symptômes apparaissent très précocement (avant l'âge de 3 ans) ou durant la scolarité de l'enfant. Les TSA touchent environ 1% de la population (Fombonne et al., 2012) et sont hautement hétérogènes d'un point de vue clinique d'où l'appellation « spectre » de l'autisme. En effet chaque individu peut se situer à des degrés différents dans le spectre de l'autisme, selon la fréquence et l'intensité de ses particularités caractéristiques. Par exemple, certains individus présentant des TSA vont beaucoup parler alors que d'autres auront des difficultés à s'exprimer, certains auront besoin de temps pour réaliser des apprentissages alors que d'autres vont parfaitement les maîtriser. Les TSA sont généralement accompagnés par de nombreuses comorbidités, d'ordre cognitif telle que la DI, d'ordre neurologique comme l'épilepsie ou l'ataxie, d'ordre psychiatrique comme la schizophrénie ou des troubles du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité et encore d'ordre somatique comme les dysmorphies, la macrocéphalie et l'obésité (Hodges et al., 2020). Tout comme la DI, les TSA peuvent avoir des causes génétiques ou environnementales (**Figure 3**).

**Figure 4: Caractéristiques cliniques du FXS au cours du développement**

Issu de Hagerman et al., 2017.

La DI et les TSA représentent un problème majeur de santé publique. En effet, en 2017, d'après l'agence nationale de santé publique et l'assurance maladie, on dénombre 700 000 personnes atteintes de TSA et plus de 126 0000 personnes atteintes de DI en France (www.autisme-france.fr ; www.santepubliquefrance.fr ; www.ameli.fr). L'impact sur les conditions de vie du patient ainsi que de son entourage sont multiples, les difficultés d'intégration sociale, scolaire, d'adaptation du patient, sa prise en charge médicale (psychomotricien, ergothérapeute, orthophoniste) et sociale (transports scolaires, activités périscolaires adaptées), ainsi que la surcharge émotionnelle et mentale de l'entourage sont à prendre en compte. Le coût de prise en charge des soins par la famille d'un individu atteint de ses troubles est de 3000 euros par an en moyenne (transports, dépassement d'honoraire, équipement pédagogique) ce qui représente un budget conséquent qui a pour cause une inégalité d'accès aux soins pour ces patients. Tandis que le coût de prise en charge des soins par le système de santé d'un individu atteint de ses troubles est de 3000 euros par mois en moyenne Tous ces critères représentent un intérêt majeur pour la recherche entreprise dans ce contexte (www.santepubliquefrance.fr ; Mefford et al., 2012).

## IV. Le syndrome de l'X fragile

Le syndrome de l'X Fragile (Fragile X syndrome, FXS) est aussi connu sous le nom de syndrome de Martin et Bell, les deux médecins qui décrivirent la première présentation clinique de cette maladie en 1943. Le FXS est la cause héréditaire la plus fréquente de déficience intellectuelle et d'autisme, il fut le premier syndrome de déficience intellectuelle lié à une anomalie du chromosome X. L'incidence du FXS est estimée à 1/5000 garçons et 1/8000 filles, ses manifestations cliniques sont très variables et dépendent de l'âge, du sexe, de la génétique (*voir partie « Les causes génétiques du FXS »*), mais aussi de l'influence environnementale (prise en charge éducative, accompagnement psycho-éducatif et médico-social). Malgré ces variations, le FXS présente un tableau clinique assez typique (Hagerman et al., 2017) (**Figure 4**).

### 1. Déficience intellectuelle associée au FXS

La déficience intellectuelle associée au FXS est le symptôme principal le plus observé chez les patients. Cette DI est très variable, elle est modérée à sévère chez les garçons avec un

QI moyen autour de 35-50, tandis que chez 60% des filles elle est plutôt légère à modérée avec un QI de 55 à 70 (Hagerman et al., 2009 ; Kaufmann et al., 1999 ; Finelli et al., 1985 ; Merenstein et al., 1996 ; Maurin et al., 2014). Cette variabilité est expliquée par le niveau d'expression du gène *FMR1* (Fragile X Mental Retardation 1) en cause dans le FXS, selon le type de mutation et par le fait que le gène *FMR1* est localisé sur le chromosome X (*voir partie « Identification de la mutation et du gène FMR1 »*). Étant un syndrome lié au chromosome X, il est communément admis que la gravité moindre des symptômes intellectuels et cognitifs ainsi qu'une pénétrance incomplète sont observées chez les femmes atteintes du FXS (Reiss et Dant, 2003 ; Hagerman et al., 2009).

En général, la DI du FXS inclut des altérations de la mémoire à court terme et des altérations des coordinations visio-motrices (Dahlhaus et al., 2018). Les patients peuvent également présenter un retard de développement du langage et de la motricité globale (difficultés à tenir sa tête ou à s'assoir pour le nourrisson) et de la motricité fine (difficultés à tenir un crayon ou manipuler un objet) (Boyle et Kaufmann, 2010).

## 2. Troubles du comportement associés au FXS

Les troubles comportementaux, notamment les TSA, représentent les comorbidités les plus fréquentes chez les patients atteints de FXS. C'est ainsi que le FXS est couramment présenté comme la plus commune des causes mono-géniques d'autisme (Hagerman et al., 2017 ; Schaefer et Mendelsohn, 2008). Il est établi qu'environ 60% des garçons FXS et 16% des filles sont diagnostiqués avec des TSA (Schaefer et al., 2008 ; Klusek et al., 2014). Les TSA incluent les altérations des interactions et de la communication sociale, les comportements répétitifs (en particulier le « battements des mains » assez caractéristique du FXS) et l'évitement du contact visuel (Niu et al., 2017). Des comportements typiques du FXS incluent également de l'anxiété (en particulier face à la nouveauté), des troubles du déficit de l'attention associés à de l'hyperactivité, des stéréotypies (tendance à répéter les mêmes gestes, paroles ou comportements) ainsi que des altérations de la qualité du sommeil. Les garçons FXS manifestent également une agressivité, une timidité excessive et une hypersensibilité sensorielle (Tassone et al., 2012 ; Schneider et al., 2009). Chez les filles FXS, ces symptômes sont atténués, mais on retrouve la timidité excessive et également un repli sur soi, une tendance à la dépression et une instabilité émotionnelle (Dahlhaus et al., 2018 ; Boyle et Kaufmann, 2010).

**Figure 5: Caractéristiques faciales du FXS**

Comme illustré par les photographies des quatre enfants porteurs du FXS, les faciès associés à ce syndrome sont subtils. Ils peuvent inclure un visage long, mince ainsi que des oreilles décollées et un front proéminent, adapté de Garber et al., 2008.

## 3. Les caractéristiques morphologiques

Les anomalies morphologiques ne sont pas présentes chez tous les patients FXS. Elles sont plus marquées chez les garçons que chez les filles et également plus visibles à l'âge adulte. Elles incluent un visage long, des oreilles proéminentes, une peau douce, une laxité articulaire (probablement due à des anomalies des fibres d'élastine), un palais ogival, des pieds plats et une macro-orchidie (élargissement anormal de la taille des testicules) (Hagerman et al., 2017 ; Boyle et Kaufmann, 2010) (**Figure 5**).

## 4. Les pathologies associées au FXS

Outre la déficience intellectuelle, les troubles du spectre autistique et les anomalies morphologiques, les patients FXS présentent de nombreuses autres comorbidités plus ou moins fréquentes à différents âges. Dans l'ordre des pathologies les plus fréquentes, on observe des otites chez près de 85% des enfants FXS durant leur enfance (Hoffman et al., 2013). Ces otites pourraient exagérer des symptômes cognitifs ou comportementaux et également expliquer les modifications cranio-faciales présentes chez certains enfants (visage allongé, oreilles proéminentes) (Heulens et al., 2013). On observe des épilepsies chez environ 4-44 % des enfants de 1 à 14 ans qui diminuent après l'âge de 20 ans (Cowley et al., 2016 ; Sabaratnam et al., 2001). Un strabisme a été mis en évidence chez près de 5% des patients, ce qui correspond à pratiquement le double de la prévalence dans la population normale (Hatton et al., 1998 ; Alanay et al., 2007). On observe également des troubles gastro-intestinaux chez environ 11% des enfants (diarrhées, reflux) (Utari et al., 2010) et enfin des prolapsus de la valve mitral (dysfonctionnement des valvules cardiaques) sont retrouvés chez 0,8% des patients (Sreeram et al., 1989).

## 5. Les aspects neuroanatomiques

Récemment, l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) ainsi que les autopsies post-mortem ont pu mettre en évidence quelques altérations subtiles de plusieurs structures cérébrales chez les patients FXS (Reiss et al., 1994 ; Hazlett et al., 2012 ; Wang et al., 2017 ; Bruno et al., 2017). Ces structures sont impliquées dans différents processus neurologiques tels que la mémoire, l'apprentissage, l'anxiété, la peur, l'attention, le contrôle des mouvements

complexes ou encore la transmission et la coordination d'informations au sein même du système nerveux.

Le noyau caudé est un composant des ganglions de la base impliqué dans l'élaboration et l'initiation des mouvements complexes. Un élargissement de cette structure de manière bilatérale dans le cerveau a été montré très tôt durant le développement chez les enfants FXS, et semble être spécifique du syndrome (Hazlett et al., 2009 ; Sandoval et al., 2018).

Le système limbique, appelé encore cerveau émotionnel, a un rôle important dans le contrôle de l'agressivité, de la douleur, de la peur ainsi que dans la formation de la mémoire. L'hippocampe et l'amygdale sont deux structures du lobe temporal faisant partie du système limbique et ayant été montrées altérées chez les patients FXS. En effet, on observe un élargissement de l'hippocampe (Hoeft et al., 2008 ; Reiss et al., 1994 ; Kates et al., 1997) et une réduction de la taille de l'amygdale (Goethelf et al., 2008 ; Kates et al., 1997).

D'autres structures du lobe temporal comme le gyrus fusiforme ainsi que l'insula (ou cortex insulaire) ont été montrées respectivement élargies et réduites (Hoeft et al., 2008 ; Reiss et al., 1994 ; Kates et al., 1997). Concernant le vermis cérébelleux, qui est une partie du cervelet ayant un rôle dans le contrôle moteur mais également montré récemment comme étant impliqué dans des fonctions cognitives telles que l'attention, le langage et l'émotion, on observe qu'une hypoplasie du vermis est fréquente chez les patients FXS (Reiss et al., 1988 ; Goethelf et al., 2008).

Enfin, des défauts microstructuraux du corpus callosum ou corps calleux ont été rapportés. Le corps calleux est la plus importante commissure du cerveau reliant les 4 parties le composant et sa fonction est essentielle dans la transmission d'information et la coordination entre les hémisphères (Bagni et Zukin, 2019). Les altérations de ces structures cérébrales suggèrent la présence de défauts à l'échelle de la structure synaptique beaucoup plus subtiles.

## V. Les causes génétiques du FXS

### 1. Identification de la mutation FXS et du gène *FMR1*

Martin et Bell ont décrit pour la première fois le syndrome FXS en 1943 dans une famille avec onze fils atteints de déficience mentale sévère nés de mères non atteintes (Martin et Bell, 1943 ; Richards et al., 1981). Après la description initiale en 1969 par Lubs d'un site « fragile » sur le chromosome X de patients avec DI (Lubs, 1969 ; Stevenson et al., 1994), des travaux de cartographie ont mis en évidence que le site fragile correspond à une constriction de la

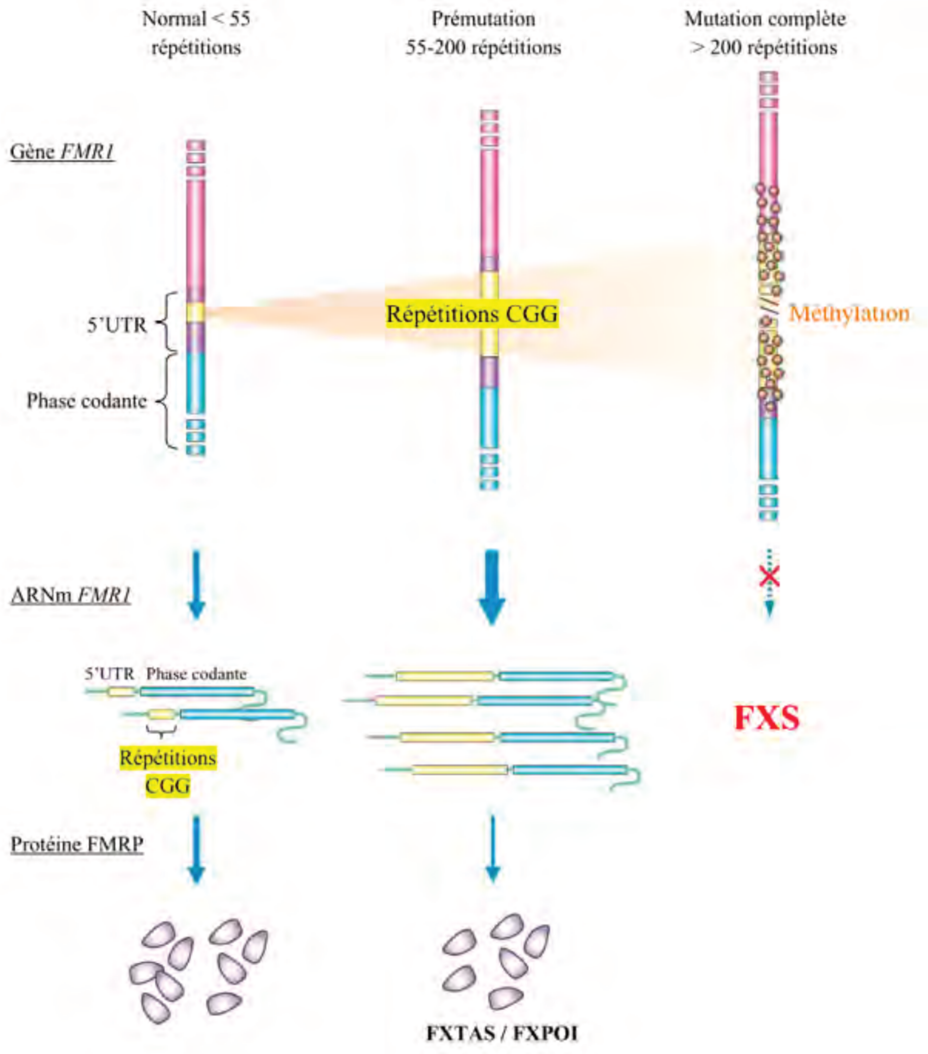



**Figure 6: Les conséquences moléculaires de l'expansion de trinucléotides CGG dans le gène *FMR1***

L'individu sain possède en moyenne ~30 répétitions CGG. L'ARNm correspondant est transcrit et la protéine FMRP est normalement traduite. Lorsque l'allèle est prémuté on observe entre ~55 et 200 CGG, avec une augmentation de la transcription de l'ARNm FMR1 et une légère baisse du niveau de la protéine. On parle de mutation complète lorsqu'on a plus de 200 CGG qui conduit à une hyper-méthylation de la région promotrice et des répétitions CGG provoquant l'absence de la protéine FMRP. UTR : région non traduite.

chromatine au niveau de la région q27.3 du chromosome X en métaphase visible lors de l'analyse cytogénétique (Krawczun et al., 1985). Le FXS doit son nom à cette caractéristique qui donne un aspect cassé au chromosome X lorsque les cellules sont cultivées en milieu déficient en folate (Lubs, 1969 ; Sutherland, 1977 ; Hecht et Sutherland, 1985). La mise en évidence de ce site appelé FRAXA a permis l'identification de la mutation responsable du syndrome et d'identifier sa caractéristique d'expansion (Oberle et al., 1991 ; Yu et al., 1991 ; Fu et al., 1991 ; Kremer et al., 1991). Cette séquence chromosomique instable correspond à l'expansion d'une répétition du trinucléotide CGG (Cytosine-Guanine-Guanine). En parallèle, le gène affecté par cette mutation a été identifié par clonage positionnel. La mutation est présente au niveau de la région 5' UTR (Untranslated Region) du gène *FMR1*, 150 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription (Verkerk et al., 1991). Le gène *FMR1* dont l'intégralité de la séquence génomique s'étend sur 40kb (kilobase), comporte 17 exons et le transcrit majeur mesure 3,9 kb : 0,2 kb correspondant à la partie 5'UTR, 1,9 kb à la séquence codante et 1,8 kb à la partie 3' UTR. D'autres transcrits sont produits par différents événements d'épissage alternatif, affectant les exons 12, 14, 15 et 17 (Ashley et al., 1993a ; Verkerk et al., 1993).

De manière générale, la mutation responsable du syndrome de l'X fragile est une expansion de répétitions du triplet CGG localisée dans la région 5'UTR du gène *FMR1* (Fu et al., 1991 ; Oberlé et al., 1991 ; Verkerk et al., 1991). Chez les individus sains, la longueur des répétitions CGG est polymorphe et varie entre 6 et 44 répétitions, avec une moyenne à 30. Lorsque le nombre de répétition se situe entre 50 et 200 CGG, on parle de prémutation. Les individus porteurs de prémutation ne développent pas le FXS mais peuvent développer avec l'âge un syndrome d'ataxie avec tremblements, FXTAS (Fragile X Tremor Ataxia Syndrome) ou une ménaupose précoce, la FXPOI (Fragile X Premature Ovarian Failure) chez les femmes (*voir partie « Prémutations : FXPOI et FXTAS »*). Lorsque la répétition est supérieure à 200 CGG, on parle de mutation complète et on observe l'apparition du phénotype FXS. Cette expansion élevée du nombre de répétitions de triplet CGG a pour conséquence une méthylation au niveau d'îlots CpG s'étendant jusqu'au promoteur du gène *FMR1*. Ces méthylations sont suivis de modifications épigénétiques avec des profils d'acétylation et de méthylation des histones modifiés (Coffee et al., 1999 ; 2002) et conduisant à l'inhibition de la transcription du gène *FMR1* et donc à l'absence de la protéine codée par ce gène, FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) (**Figure 6**).

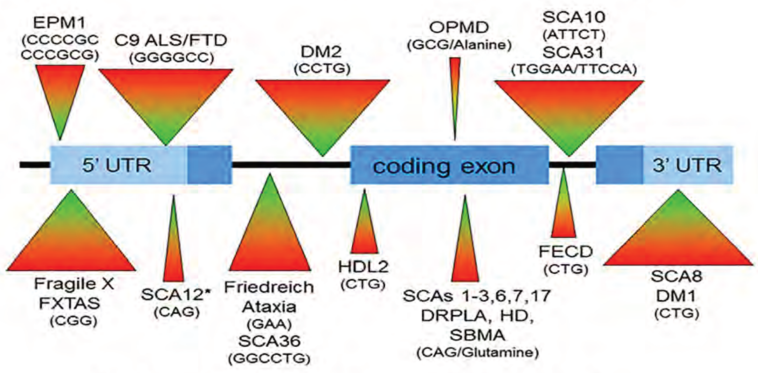



**Figure 7: Maladies à répétitions de trinucléotides et leurs localisations sur le gène**

Adapté de Paulson, 2018. EPM1 : maladie d'Unverricht-Lundborg , C9 ALS/FTD: mutation du gène C9orf72 liée à sclérose latérale amyotrophique, mutation du gène C9orf72 liée à la démence fronto-temporale, DM2: dystrophie myotonique de type 2, OPMD: dystrophie musculaire oculopharyngée, SCA10: ataxie spinocérébelleuse de type 10, SCA31: ataxie spinocérébelleuse de type 31, FXTAS: syndrome du tremblement associé au X fragile, SCA12 : ataxie spinocérébelleuse de type 12, HDL2: maladie de Huntington-like 2, SCA1- 3-6-7-17: ataxies spinocérébelleuses de type 1- 3-6-7-17, DRPLA: atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne, HD: maladie d'Huntington, SBMA: amyotrophie bulbospinale de l'adulte, FECD: dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs, SCA8: ataxie spinocérébelleuse de type 8, DM1: dystrophie myotonique de Steinert.

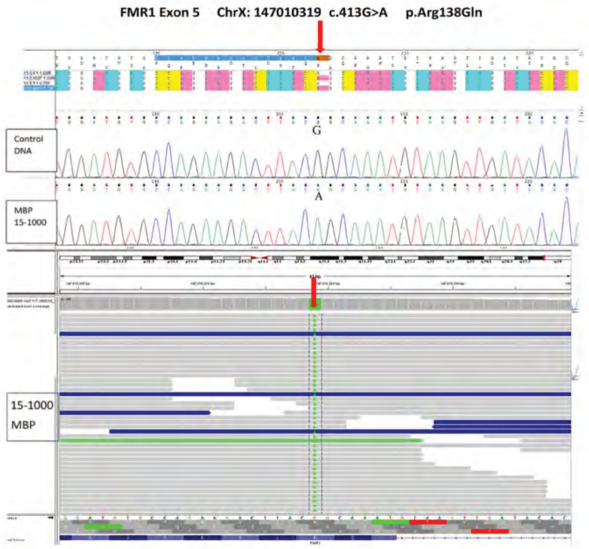



**Figure 8: Mutation de l'exon 5 dans le gène *FMR1***

Séquençage de l'ADN du gène *FMR1* montrant la mutation de l'exon 5 (ChrX: 147 010 319 c. 413G>A ; p.Arg138Gln), adapté de Sitzmann et al., 2018. La mutation est confirmée par la méthode de Sanger (en haut). Image de séquençage de nouvelle génération montrant le changement de G (guanine) en A (adénosine) à la position 413 du gène *FMR1* dans l'exon 5 (en bas).

Des mutations d'expansions de trinucléotides identifiées pour la première fois dans le gène *FMR1*, ont été par la suite retrouvées dans de nombreux autres gènes et montrées être responsables de plusieurs maladies neurodéveloppementales ou neurodégénératives telles que la maladie de Huntington, l'ataxie cérébelleuse de type I (SCA1), la dystrophie myotonique ou encore l'ataxie de Friedreich (Gonzalez-Algere, 2019) (**Figure 7**).

Il est intéressant d'introduire ici la notion de « paradoxe de Sherman » d'après Stéphanie Sherman qui, en 1985, en analysant la transmission du FXS dans plusieurs familles, constata que les manifestations du syndrome étaient plus sévères et plus fréquentes à chaque nouvelle génération (Sherman et al., 1985). En effet, le risque d'être atteint est fonction de la position du sujet dans le pedigree (généalogie). Afin d'expliquer ces observations, Sherman postula l'existence d'une prémutation sans effet phénotypique susceptible d'évoluer vers une mutation complète lorsque celle-ci est transmise par la mère. De manière intéressante, les prémutations chez les hommes sont généralement transmises à la génération suivante sans modification (ou éventuellement une contraction), tandis que chez les femmes les mutations deviennent généralement instables au moment de l'ovogenèse probablement lors de la méiose (Fu et al., 1991).

Bien que l'expansion de trinucléotides CGG soit retrouvée chez la plupart des patients FXS, plusieurs cas de mutation ponctuelle ou de délétions plus ou moins longues dans le gène *FMR1* ont été mises en évidence. Le premier cas de FXS sans mutation de répétition CGG identifié est une mutation faux-sens I304N dans la protéine FMRP (De Boulle et al., 1993). Récemment, plusieurs nouvelles mutations faux-sens (comme la conversion d'une arginine en glutamine en position 138, **Figure 8)**, non-sens ou encore d'autres anomalies génétiques du gène *FMR1* ont été identifiées, avec des phénotypes plus ou moins variables mais présentant pratiquement tous des retards de langage, de l'hyperactivité et de l'autisme (Sitzmann et al, 2018 ; Quartier et al., 2017).

## 2. Mosaïcisme dans le FXS

L'expansion des répétitions CGG dans le gène *FMR1* prédispose la répétition à une instabilité qui peut entraîner ce que l'on appelle un « mosaïcisme de taille ». En génétique, le mosaïcisme est défini comme un état dans lequel deux ou plusieurs populations de cellules avec des génotypes différents coexistent chez un même individu. Dans le cas du FXS, le mosaïcisme de taille correspond à la présence d'expansion de répétitions provenant de prémutation et de mutation complète de manière simultanée à travers différents types cellulaires (Pretto et al.,

2014 ; Nolin et al., 1994 ; Hammond et al., 1997 ; Fan et al., 2005 ; Mingroni-Netto et al., 1996). Un mosaïcisme en fonction de la longueur des répétitions CGG et/ou du degré de méthylation du promoteur *FMR1* a été observé chez la majorité des hommes affectés, indiquant une instabilité mitotique de la mutation complète (Fu et al., 1991 ; Tranfaglia, 2012). Concernant les femmes FXS, chez qui un seul chromosome X est exprimé en raison du phénomène d'inactivation du X durant l'embryogenèse, elles auront des cellules avec une expression « mosaïque » signifiant que certaines cellules posséderont un allèle normal et d'autres un allèle muté, cela a pour conséquence un phénotype moindre chez les femmes comparé aux hommes FXS (Wijetunge et al., 2013).

## VI. Prémutations : FXPOI et FXTAS

Les prémutations (répétitions de 55 à 200 CGG) comme dit précédemment ne causent pas le FXS mais peuvent conduire à deux autres maladies bien distinctes et totalement indépendantes du FXS : la FXPOI (Fragile X Premature Ovarian Failure) et le FXTAS (Fragile X Tremor Ataxia Syndrome). L'incidence de la prémutation est de 1/250 femmes et de 1/800 hommes (Pirozzi et al., 2011).

La FXPOI est une ménopause précoce définie comme la perte de la fonction hormonale ovarienne avant l'âge de 40 ans. Environ 20% des femmes porteuses de la prémutation développeront le FXPOI avant la quarantaine (Pirozzi et al., 2011). On observe une relation non-linéaire dans la corrélation entre le nombre des répétitions CGG et le risque de développer une FXPOI. Cela signifie que des femmes porteuses d'une prémutation comportant 80 à 100 CGG ont une probabilité plus élevée d'avoir la FXPOI que celles qui ont un nombre de répétitions proche de 200. Les mécanismes moléculaires de ce syndrome ne sont pas encore bien compris mais plusieurs problèmes hormonaux sont observés chez les femmes porteuses de la prémutation avec FXPOI (Pirozzi et al., 2011).

Le FXTAS affecte environ 40% des hommes porteurs de la prémutation et 16% des femmes, âgés de plus de 50 ans. Après l'âge de 80 ans, plus de 75% des hommes porteurs de la prémutation développeront le FXTAS (Jacquemont et al., 2003). Cette maladie neurodégénérative progressive est associée à un tremblement non intentionnel, une ataxie cérébelleuse et d'autres troubles comme un déclin cognitif, des troubles parkinsoniens, des troubles psychologiques telle que l'anxiété, la dépression et une neuropathie (Hagerman et al., 2001). De plus, les individus avec une répétition supérieure à 70 CGG ont plus de risques de développer un FXTAS (Hall et O'Keefe, 2012).

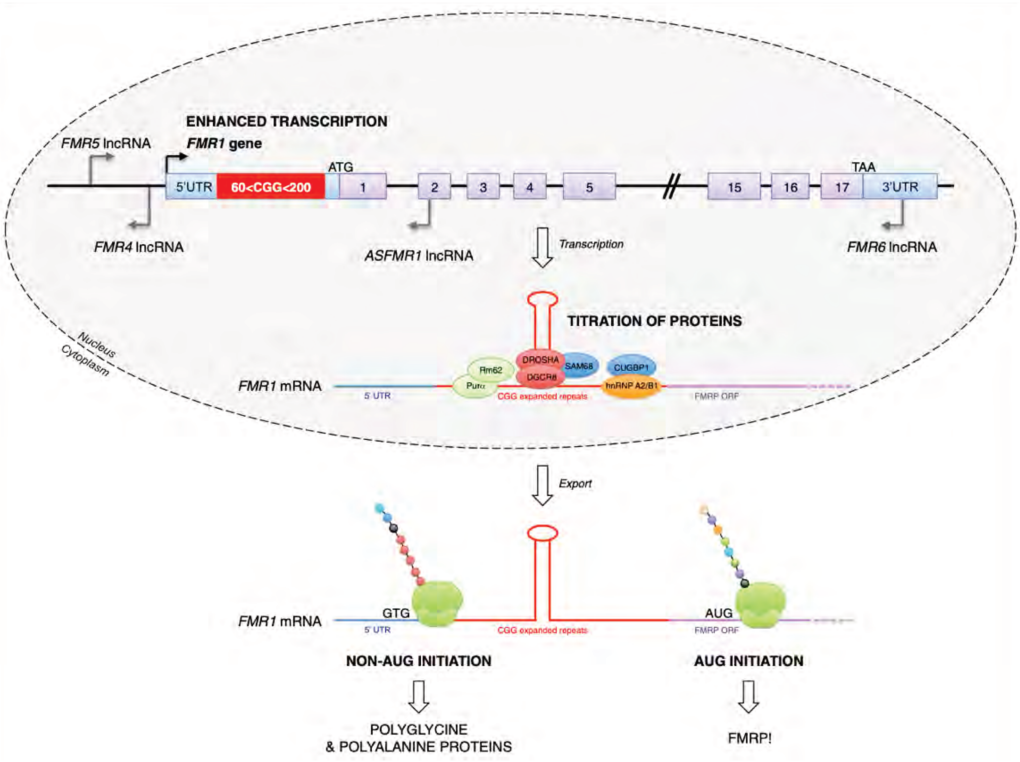



**Figure 9: Hypothèse des mécanismes pouvant contribuer au FXTAS**

L'expression de l'ARNm FMR1 et les transcrits antisens associés sont augmentés chez les porteurs de la prémutation. Certains transcrits s'accumulent dans le noyau et recrutent diverses protéines de liaison à l'ARN, tandis que l'exportation et la traduction sans AUG initiateur aboutissent à la production de protéines contenant de la polyglycine ou de la polyalanine. Issu de Sellier et al., 2014.

Il a été également rapporté d'autres symptômes tels que la dépression, l'anxiété, l'hypertension, des migraines, une fibromyalgie ou encore une hypothyroïdie chez les individus porteurs de la prémutation (Hagerman et al., 2017).

Grâce à l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) et aux méthodes de coloration immunohistochimique de tissus post-mortem de patients FXTAS, il a pu être mis en évidence chez 60% des patients des lésions de la substance blanche dans les pédoncules cérébelleux moyens et dans le splénium du corps calleux (Apartis et al., 2012). Des inclusions intranucléaires éosinophiles et ubiquitine-positive impliquant potentiellement un gain de fonction toxique de l'ARN messager *FMR1* sur le métabolisme cellulaire, ont été identifiées dans les neurones et les astrocytes de l'hippocampe, du thalamus et des ganglions de la base (Greco et al., 2002). On retrouve aussi ces inclusions dans la moelle épinière et dans plusieurs autres tissus non nerveux comme la thyroïde, le cœur, et les cellules de Leydig dans les testicules (Buijsen et al., 2014).

Au niveau moléculaire, contrairement à ce qui est observé chez les patients FXS, chez les patients FXTAS le niveau de l'ARNm *FMR1* est augmenté jusqu'à 8 fois en corrélation positive avec la longueur des répétitions CGG, tandis que le niveau d'expression de la protéine FMRP est diminué (Primerano et al., 2002 ; Feng et al., 1995). Les mécanismes moléculaires impliqués sont liés à la présence des répétitions CGG dans les transcrits mais ne sont pas encore totalement élucidés et plusieurs équipes ont proposés différents modèles (**Figure 9**).

## 1. Mécanisme 1 : Séquestration et gain de fonction de l'ARN

Ce modèle postule que le nombre élevé (>50) de répétitions CGG dans l'ARNm *FMR1* prémuté se lie à des protéines de liaison aux CGG dont la séquestration affecte la fonction cellulaire normale. Parmi ces protéines, on trouve SAM68 (Src-associated in mitosis 68), une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif qui colocalise avec les agrégats CGG et les protéines DGCR8/DROSHA (DiGeorge syndrome chromosomal region 8/drosha ribonuclease type III) formant un complexe ribonucléoprotéique impliqué dans la biogenèse des miARN (microARN) (Sellier et al., 2010 ; Sellier et al., 2014). La séquestration de ces protéines les empêcherait de réaliser leurs fonctions normales, conduisant à une toxicité gain de fonction de l'ARN qui dérégulerait les neurones et les astrocytes provoquant leur mort.

## 2. Mécanisme 2 : RAN translation

Une autre voie moléculaire pathogénique associée aux répétitions CGG dans le gène *FMR1* est la « RAN translation » (Repeat-Associated Non-AUG translation). Cette traduction non canonique à partir des répétitions CGG aboutit après traduction à trois homo-polypeptides distincts, dont le principal est la poly-Glycine (FMRpolyG) s'accumule dans des inclusions intracellulaires chez les patients et modèles murins FXTAS et deviendrait toxique pour les cellules (Todd et al., 2014 ; Boivin et al., 2018).

## 3. Mécanisme 3 : Formation de R-loops

La transcription de région riche en GC comme la région 5'UTR du gène *FMR1* favorise la formation de R-loops (boucle R) : des hybrides ADN/ARN stables formés entre l'ARN transcrit et sa matrice ADN simple brin (ADN : acide désoxyribonucléoprotéique, ARN : acide ribonucléoprotéique). La formation d'une boucle R peut conduire à des dommages de l'ADN responsables d'instabilités génomiques (McIvor et al., 2010 ; Helmrich et al., 2011). La formation de R-loops est une caractéristique connue, normale et importante du promoteur du gène *FMR1*, mais l'expansion des répétitions CGG, et l'augmentation associée de la transcription entraîne une formation accrue de boucles R plus longues qui sont plus sujettes à se replier en structures secondaires complexes (hairpin probablement) et qui pourraient, dans un contexte inapproprié, entraîner des cassures de l'ADN. Ces cassures, en s'accumulant dans les inclusions intracellulaires, pourraient déclencher une mort cellulaire associée (Loomis et al., 2014).

## 4. Mécanisme 4 : Implication des mitochondries

Les mitochondries, qui ont un rôle connu dans les pathologies neurologiques (ataxie de Friedreich, maladie de Huntington) (Guo et al., 2016 ; Farshbaf et Ghaedi, 2017 ; Cotticelli et al., 2019 ; Chaturvedi et Beal, 2013 ; Delerue et al., 2019), ont été récemment proposées être impliquées dans le FXTAS. L'étude de la dynamique de la chaine respiratoire oxydative mitochondriale, des niveaux de stress ainsi que la complexité du réseau mitochondrial a mis en évidence que la capacité respiratoire mitochondriale est compromise dans les fibroblastes des patients FXTAS. De plus, les fibroblastes de patients présentent une architecture mitochondriale altérée avec des mitochondries moins interconnectées et circulaires.

L'altération bioénergétique des cellules pourrait contribuer au mécanisme de toxicité cellulaire chez les patients FXTAS (Alvarez-Mora et al., 2017).

### 5. Mécanisme 5 : Long-Non coding ARN

Les non-coding ARN (NcARN) jouent un rôle important dans les maladies humaines (maladie neurologiques, cancers) et ont de multiples fonctions (Esteller, 2011 ; Mattick et Makunin, 2006 ; Anastasiadou et al., 2019). Il a été proposé que plusieurs « long non-coding ARN » (lncARN) : FMR4, FMR5 et FMR6 (Fragile Mental Retardation 4,5,6) contribueraient au développement des phénotypes associés à la prémutation du gène *FMR1*. L'expression des lncARN FMR4, FMR5, FMR6 et *FMR1* est altérée dans les tissus cérébraux des patients atteints de FXS et de FXTAS / FXPOI (Pastori et al., 2013 ; Khalil et al., 2008), ce qui pourrait entraîner des différences dans les nombres de répétitions CGG, le degré de méthylation de l'ADN ou le degré de modification des histones. Chez les porteurs de prémutation, il semblerait que FMR4 soit fortement exprimé tandis qu'il ne l'est pas chez les patients porteurs de la mutation complète. FMR4 est un produit de l'ARN polymérase II et peut également réguler l'expression de gènes importants lors de la différenciation des cellules précurseurs neuronales humaines (Kumari et Usdin, 2010). Concernant FMR5, son expression apparait dans certaines régions du cerveau des patients à la fois porteurs de la prémutation et de la mutation complète. Tandis que le transcrit de FMR6 n'est ni observé chez les patients FXTAS/FXPOI ni chez les patients FXS (Pastori et al., 2013 ; Khalil et al., 2008).

L'implication des lncRNA dans les mécanismes moléculaires aboutissant aux pathologies associées au gène *FMR1* est très intéressante mais il est nécessaire de mener des études supplémentaires afin d'évaluer l'impact de ces transcrits sur les phénotypes cliniques observés. D'autres mécanismes moléculaires restent à être investigués (lncRNA TUG1 : Taurine-Upregulated Gene1 ou encore l'ARN BC1 : petit ARN non codant BC1) afin d'éclaircir l'impact des lncRNA dans la mutation du gène *FMR1* (Huang et al., 2019).

## VII. Les différents modèles animaux du FXS

### 1. La souris : *Mus musculus*

Malgré leurs différences, la souris et l'homme possèdent en commun près de 99% de leurs gènes ainsi que la plupart des mécanismes physiologiques (Waterson et al., 2002 ; Tecott,

| Mouse model type | Description | Stem cell | Transgene | Background | Official name | Jackson code | Available at fragile X mutant mouse facility[1] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Knockout | *Fmr1* knockout | 129/OlaHsd | | C57BL/6 | B6.129P2-*Fmr1*$^{tm1Cgr}$ | 3025 | Yes |
| | *Fmr1* knockout | 129/OlaHsd | | FVB | FVB;129P2-*Fmr1*$^{tm1Cgr}$ | 2700 | No |
| | *Fmr1* knockout | 129/OlaHsd | | FVB | FVB.129P2-*Fmr1*$^{tm1Cgr}$ | 3024 | No |
| | *Fmr1* knockout | 129/OlaHsd | | Sighted FVB | FVB.129P2- Pde6b$^{+}$Tyr$^{c-ch}$ *Fmr1*$^{tm1Cgr}$ | 4624 | No |
| | Sighted FVB | 129/OlaHsd | | Sighted FVB | FVB.129P2- Pde6b$^{+}$Tyr$^{c-ch}$ | 4828[1] | No |
| Conditional knockout | *Fmr1* conditional restoration | 129/OlaHsd | | | *Fmr1* cON | | Yes |
| | *Fmr1* conditional knockout | 129/OlaHsd | | | *Fmr1* CKO | | Yes |
| | *Fmr1* constitutionally inactivated | 129/OlaHsd | | | *Fmr1* KO2 | | Yes |
| Point mutation | | 129/SvJ | | C57BL/6 | B6.129-*Fmr1*$^{tm1(I304N)Rbd}$ | 10504 | |
| | | | | FVB | FVB.129-*Fmr1*$^{tm1(I304N)Rbd}$ | 8909 | |
| YAC rescue | Transgenic YAC rescue | | YapRV.2 (modified from YAC 209G4) | C57BL/6 | TG298 | | Yes |
| | CGG90YAC | | YapRV-EX (modified from YAC 209G4) | FVB | TG296 | | Yes |
| Repeat expansion | $CGG_{dup}$KI | 129/OlaHsd | | C57BL/6 | B6.129P2-*Fmr1*$^{tm2Cgr}$ | 24102 | Yes |
| | $CGG_{nih}$KI | 129S6/SvEv | | C57BL/6 | | | |

**Figure 10: Les différents modèles murins du FXS**

*Issu de Kooy, 2017*

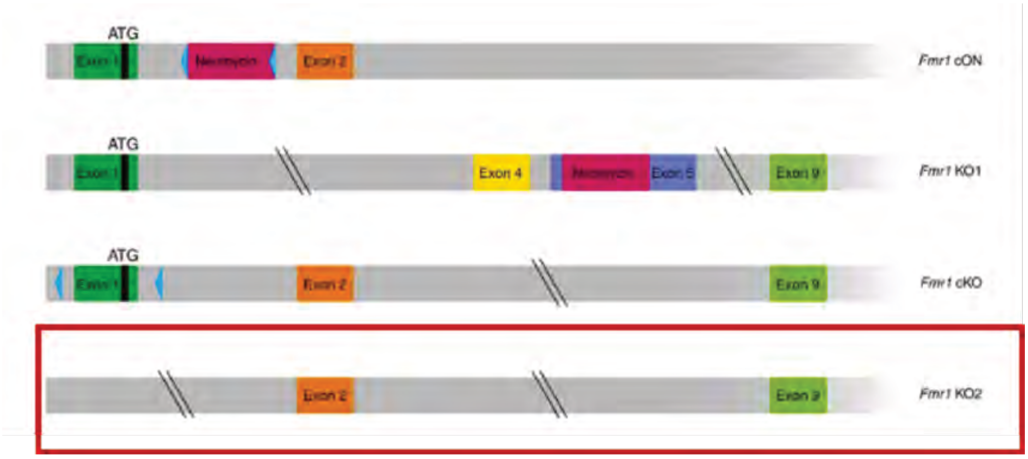



**Figure 11: Représentation schématique des différents modèles murins FXS**

Dans mon projet j'ai utilisé le modèle Fmr1-KO2 (encadré en rouge). Adapté de Kooy, 2017.

2003). Il y a plus de 20 ans, le premier modèle murin du syndrome de l'X fragile a été créé (The Dutch-Belgian Fragile X Consortium, 1994). Dans cette partie, je décrirai les différents modèles murins utilisés à ce jour ayant permis des avancées majeures dans la compréhension de la fonction de FMRP **(Figure 10)**.

La souris présente plusieurs avantages pour l'étude fonctionnelle des gènes humains. En effet la protéine humaine FMRP partage 97% d'identité en séquence d'acides-aminés avec son orthologue murin (The Dutch-Belgian Fragile Consortium, 1994 ; Brackett et al., 2013). La stratégie d'inactivation génique knock-out (KO) utilisant la recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires a été utilisée la première fois en 1994 pour la création du premier KO (KO1). Le KO1 a été réalisé par insertion d'un marqueur de sélection codant pour la néomycine dans l'exon 5 du gène *FMR1* conduisant à l'interruption de la phase codante du gène (The Dutch-Belgian Fragile Consortium, 1994).

Un deuxième modèle murin (KO2) a été créé en 2006 par la même équipe du Prof. Oostra. L'insertion de sites loxP (locus of crossing-over) de part et d'autre d'une région englobant le promoteur et l'exon 1 a permis, après croisement avec des souris exprimant la Cre recombinase dans l'ovocyte mature, une recombinaison des sites loxP avec pour conséquence la suppression de la transcription du gène *FMR1* dans tous les tissus (Mientjes et al., 2006). Dans ce modèle, l'ARNm *Fmr1* est indétectable alors qu'il n'est réduit qu'à 27% par rapport au Wt (wild-type, sauvage) dans le modèle KO1 (Mientjes et al., 2006).

Il existe également un KO conditionnel appelé CKO (conditional KO) qui est un variant du KO2 où la recombinaison peut être induite en fonction du tissu ou de la période choisie. Gardons à l'esprit que ces modèles ne récapitulent pas l'expansion de triplets nucléotidiques CGG existant chez les patients FXS mais aboutissent au même résultat moléculaire d'absence de la protéine FMRP. La différence fondamentale entre les souris modèles FXS couramment utilisées et les patients est que chez les souris, FMRP n'a jamais été exprimée alors que chez les patients, le gène *FMR1* et son produit FMRP s'expriment au moins jusqu'à la 10$^{ème}$ semaine de gestation (Devys et al., 1993 ; Willemsen et al., 2002) (**Figure 11**).

Afin d'essayer de reproduire au maximum les mécanismes pathologiques se produisant chez l'homme, plusieurs modèles souris knock-in (KI) avec des répétitions de CGG ont été créées. L'équipe Brouwer en 2007 a créé des souris transgéniques avec environ 230 répétitions de CGG au niveau de la région 5'UTR du gène *FMR1* mais contrairement aux patients FXS, chez la souris ce nombre de répétitions n'induit pas la méthylation du promoteur et l'inhibition de la transcription du gène *Fmr1* (Brouwer et al., 2007). En termes de caractéristiques pathologiques, la souris KI présente plusieurs caractéristiques biochimiques, histologiques et

comportementales des patients FXTAS et l'augmentation des répétitions jusqu'à 350 CGG montre toujours une situation de prémutation chez la souris (Entezam et al., 2007 ; Ludwig et al., 2014). L'ensemble de ces études indiquent que les mécanismes conduisant à l'inactivation du gène *FMR1* sont différents entre la souris et l'homme (potentiellement lié au nombre d'ilôts CpG moindre chez la souris), et peut-être que ce mécanisme serait inexistant chez la souris (Matsuo et al., 1993).

Aucune différence majeure n'a été observé entre les souris *Fmr1*-KO et les souris Wt concernant l'espérance de vie, le taux de fécondité et la morphologie globale, ni au niveau du poids et ni au niveau de la morphologie des organes vitaux (Kooy et al., 1996). Cependant, les souris *Fmr1*-KO récapitulent les caractéristiques majeures des patients FXS. On observe ainsi des troubles subtils du comportement et de l'apprentissage ainsi qu'une macro-orchidie chez près de 90% des souris mâles. Les tests comportementaux et moteurs ont permis de montrer que les souris sont hyperactives et faiblement anxieuses et qu'elles sont susceptibles aux crises épileptiques induites par des stimuli sonores dans les premières semaines (Peier et al., 2000 ; Yan et al., 2005). Fait intéressant, les souris *Fmr1*-KO deviennent résistantes aux crises à l'âge adulte ce qui est similaire à ce qui est observé chez les patients FXS, qui ne présentent généralement plus de crises d'épilepsie avant l'âge adulte (Wisniewski et al., 1991). Les souris *Fmr1*-KO présenteraient des troubles subtils de mémorisation et d'apprentissage, plus précisément de la mémoire spatiale hippocampe dépendante (Zhang et al., 2009). Dans le test de la piscine de Morris, un dispositif aquatique circulaire comporte une plateforme sur laquelle la souris peut s'agripper pour ne pas être dans l'eau, les souris *Fmr1*-KO ont été décrites avoir des difficultés à mémoriser le nouvel emplacement de la plateforme lorsque celui-ci a été modifié contrairement aux souris Wt, suggérant une altération des circuits de la mémoire et de l'apprentissage dépendant de l'hippocampe (Van Dam et al., 2000). Cependant, ce phénotype n'est pas retrouvé dans toutes les études et semblerait dépendre en partie du fond génétique des souris (Paradee et al., 1999; Peier et al., 2000) ou des conditions de réalisation du test.

D'un point de vue neuro-anatomique, des augmentations de taille du cortex cingulaire (+18.8%, p = 7.6E04) et de l'hippocampe (+20%, p = 0.03) ont pu être observées dans le cerveau des souris *Fmr1*-KO (Collins et al., 2017) en accord possible avec des anomalies discrètes observées chez les patients FXS (*cf partie « Aspects neuro-anatomiques »*). Par ailleurs, des anomalies des épines dendritiques semblables à celles des patients dans différentes régions du cerveau comme le cortex occipital, le bulbe olfactif et le cortex du tube somatosensoriel ont également été observées (Galvez et al., 2005 ; McKinney et al., 2005). Ces anomalies sont caractérisées par des épines dendritiques plus longues, plus fines, tortueuses et

**Table 1 Fragile X mouse synaptic plasticity phenotypes**

| Category | Region | Fragile X Mouse Phenotype | Age | References |
|---|---|---|---|---|
| mGluR LTD | hippocampus | enhanced | P25-30 | Huber et al., 2002; Hou et al., 2006; Bhattacharya et al., 2012; Michalon et al., 2012 |
| mGluR LTD | hippocampus | does not require new protein synthesis | 4-12 wk | Nosyreva and Huber, 2006; Hou, et al., 2006; Zang et al., 2009** |
| mGluR LTD | hippocampus | *enhanced and not PS-dependent | P35-42 | Iliff et al., 2012 |
| mGluR LTD | cerebellum | enhanced | 3-7 wk | Koekkoek et al., 2005 |
| mGluR LTD | hippocampus | enhanced and does not require new protein synthesis | 3-7 wk | Volk et al., J Neurosci, 2007 |
| LTP | hippocampus | NONE | 20-26 wk; 8-10 wk; 3-12 month | Godfraind et al., 1996; Li et al., 2002; Larson et al., 2005 |
| L-LTP | hippocampus | NONE | 5-7 wk; 2-4 month | Paradee et al., 1999; Zhang et al., J 2009 |
| LTP | hippocampus | deficient | 2 wk; 6-8 wk | Hu et al., 2008; Shang et al., 2009 |
| LTP | hippocampus | deficient with weak stimulus; normal with strong stimulus | 2-3 month | Lauterborn et al., 2007 |
| LTP | hippocampus | enhanced B-adrenergic-facilitated heterosynaptic LTP (PS-dependent) | 3-4 month | Connor et al., 2011 |
| LTP priming | hippocampus | does not require new protein synthesis (mGluR-dependent) | 6-10 wk | Auerbach and Bear, 2010 |
| LTP | anterior cingulate ctx | deficient | 6-8 wk | Zhao et al., 2005; Xu et al., 2012 |
| LTP | anterior cingulate ctx | impaired facilitation of LTP by 5-HT2AR agonist | 6-8 wk | Xu et al., 2012 |
| LTP | somatosensory, temporal ctx | deficient | 8-10 wk; 3 month | Li et al., 2002; Hayashi et al., 2007 |
| LTP | somatosensory ctx | delayed window for plasticity | P3-10 | Harlow et al., 2010 |
| LTP | visual ctx | deficient (mGluR-dependent) | P13-25 | Wilson and Cox, 2007 |
| LTP | anterior piriform ctx | deficient in aged mice; normal in 3-6 mo mice | 6-18 month | Larson et al., 2005 |
| LTP | amygdala | impaired (mGluR-dependent) | 6-8 wk; 3.5-6 mo | Zhao et al., 2005; Suvrathan et al., 2010 |
| STD-LTP | somatosensory ctx | deficient with weak stimulus | P10-18 | Desai et al., 2006 |
| STD-LTP | prefrontal ctx | deficient with weak stimulus; normal with strong stimulus | P14-23 | Meredith et al., 2007 |
| homeostasis | hippocampus | deficient translation-dependent scaling | P6-7 slice culture | Soden and Chen, 2010 |
| homeostasis | hippocampus | normal transcription-dependent scaling | P6-7 slice culture | Soden and Chen, 2010 |
| experience-dependent | visual ctx (in vivo) | altered ocular dominance plasticity | LTD | Dolen et al., 2007 |
| experience-dependent | somatosensory ctx | deficient experience-dependent plasticity (induced by whisker trimming) | LTD | Bureau et al., 2008 |

## Figure 12: Phénotypes de plasticité synaptique chez la souris FXS

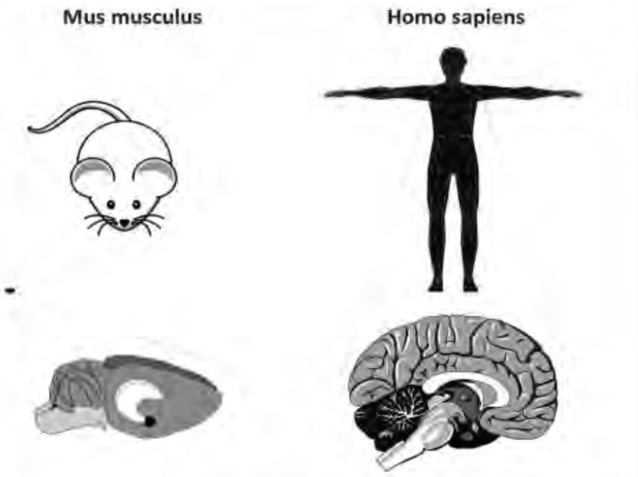
Les modèles de souris X fragile présentent de multiples formes de plasticité synaptique altérées dans plusieurs régions du cerveau. La majorité des phénotypes ont été évalués chez la souris Fmr1-KO en absence de FMRP. *Évalué à l'aide d'une souris knock-in CGG qui modélise la prémutation FXTAS. ** Évalué à l'aide d'une souris avec une mutation ponctuelle pour laquelle la liaison FMRP-ARNm est perturbée. Issu de Sidorov et al., 2013.

une augmentation (possible, car non vue dans toutes les études) de leur densité (Nimchinsky et al., 2001; Irwin et al., 2002). Les épines dendritiques sont des éléments très dynamiques. Leur remodelage est dû à l'apparition et la disparition d'épines transitoires, l'utilisation de stimuli sensoriels agissant sur la modulation de la formation ou l'élimination des épines montre que les souris *Fmr1*-KO y sont insensibles, ce qui suggère que les circuits synaptiques en développement peuvent ne pas être correctement régulés par des stimuli sensoriels dans le FXS (Pan et al., 2010).

Un apport majeur du modèle souris a été la mise en évidence des anomalies de la plasticité synaptique. Les plasticités synaptiques principalement étudiées sont la LTP (long term potentiation) et la LTD (long term depression) (*voir les parties « Signalisation mGluR » « LTD-mGluR »*). La plupart des études ont révélé que la LTP était déficiente dans le cortex des souris *Fmr1*-KO et dans une certaine mesure dans l'hippocampe en fonction de l'âge et selon le modèle utilisé (Sidorov et al., 2013) **(Figure 12)**. La LTP comprend deux phases distinctes, une phase précoce ne nécessitant pas de synthèse protéique et une phase tardive dépendant de la synthèse protéique et le l'expression génique. Dans le modèle murin, il s'agit de la LTP dépendant de la synthèse protéique et de l'activation des récepteurs mGluR-I (récepteurs métabotropiques au glutamate de type I) qui est impactée. Plusieurs études ont montré des effets bénéfiques d'antagonistes mGluR1/5 (récepteurs du groupe des mGluR-I) sur cette LTP dans le modèle murin (*voir partie « Essais cliniques pour le FXS »*) (Xu et al., 2012).

Une des formes de plasticité les mieux étudiées dans le modèle *Fmr1*-KO est la mGluR-LTD, une LTD dépendante de l'activation mGluR1/5 et impliquant la synthèse protéique et l'internalisation des récepteurs AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate). Plusieurs études ont montré une augmentation de la mGluR-LTD dans l'hippocampe des souris *Fmr1*-KO (Huber et al., 2002 ; Thomson et al., 2017). Les altérations de la LTD et la LTP ainsi que les anomalies phénotypiques des épines dendritiques seraient à l'origine de la déficience intellectuelle et de certaines altérations comportementales chez les patients FXS.

Récemment, le noyau accumbens, considéré comme une structure centrale dans le contrôle des comportements sociaux, montre également des altérations de plasticité synaptique chez la souris *Fmr1*-KO jusque-là non investigué. Une étude a montré que la NMDAR-LTP (N-méthyl-D-Aspartate-Receptor-LTP) des afférences excitatrices des neurones épineux moyens (MSN) est complétement absente chez la souris *Fmr1*-KO (Neuhofer et al., 2015). Ce phénomène physiologique est accompagné d'épines dendritiques en forme de filopode (longues et sans tête à l'extrémité). Ces résultats ainsi que la mise en évidence d'une autre forme de plasticité altérée, la CB1-LTD (endocanabinoid receptor 1-LTD) pourrait expliquer les déficits




| | Mouse: Fmr1$^{-/y}$ | Man: FXS |
|---|---|---|
| Genetics | gene disrupted | transcriptional silencing |
| | premature stop | expansion of repeats |
| Silencing | no hypermethylation up to 300 repeats | hypermethylation causes heterochromatin formation starting at app. 200 repeats |
| Background | inbred | not inbred |
| Transcript | aberrant | present prior to silencing |
| FMRP | no protein present | lost, reduced and/or mosaic rare; mutations in the protein |
| FMRP Identity | 97% | 100% |
| Network Activity | enhanced excitability, mainly in the cortex | not well studied yet, evidence for increased and decreased activity |
| Behaviour | a broad spectrum with high variability | a broad spectrum with high variability |
| Cognition | variable results | selective impairments |
| Sociality | mixed results | decreased active social contact |
| Communication | impaired | cluttered speech |
| Aggression | no aggression despite similar mechanisms | increased |
| Epilepsy | seizures are consistently observed in the audiogenic seizure paradigm | seizure activity is highest during adolescence and decreases after the age of 20 |

**Figure 13: Comparaison des phénotypes FXS chez la souris et l'Homme**

La figure résume certaines différences majeures entre les souris modèles et les patients FXS. Les phénotypes comportementaux observés chez l'homme et la souris ne correspondent pas totalement, bien que le modèle murin récapitule de nombreux aspects biochimiques de la maladie. De plus, le développement cérébral plus complexe chez l'homme dont dépend les nombreuses fonctions cérébrales altérées ainsi que la génétique complexe de la maladie ne peut pas être modélisée chez la souris, possiblement en raison d'un contrôle d'expression génique moins fort chez la souris. Adapté de Dalhaus, 2018.

d'interaction sociale ainsi que les troubles émotionnels observés chez les patients FXS (Neuhofer et al., 2015).

La première mutation faux sens identifiée provoquant le FXS est la mutation I304N, cette mutation correspond au remplacement d'un résidu isoleucine en asparagine en position 304 dans la protéine FMRP. Le modèle murin comportant cette mutation récapitule les caractéristiques majeures des souris *Fmr1*-KO et des patients FXS et présente des troubles cognitifs, comportementaux, une hyperactivité et une susceptibilité aux crises audiogènes ainsi qu'une macro-orchidie (Zang et al., 2009). Chez ces souris, le niveau d'ARNm *Fmr1*-I304N est le même que celui des souris Wt tandis que le niveau de la protéine est réduit à environ 30% par rapport à FMRP Wt. L'utilisation de ce modèle FXS a permis de montrer que FMRP-I304N perd ses caractéristiques majeures de liaison aux ARN et d'association aux polyribosomes (*voir partie « Les fonctions et mécanismes de régulation de FMRP »*) (Zang et al., 2009).

Pour compléter cette partie sur les modèles murins, un modèle de souris transgénique exprimant un chromosome artificiel de levure (Yeast Artificial Chromosome ; YAC) composé du gène *FMR1* humain (avec 20 répétitions CGG et des régions supplémentaires en amont et en aval du gène) a été croisé avec des souris *Fmr1*-KO afin de vérifier si l'expression de FMRP peut corriger les phénotypes des souris *Fmr1*-KO (Peier et al., 2000). Ces souris transgéniques surexpriment la protéine FMRP humaine (10 à 15 fois plus d'expression par rapport aux souris Wt). Le croisement avec les souris *Fmr1*-KO provoque des troubles du comportement opposés à celui des souris Wt et on observe une correction de la macro-orchidie. Les souris sont moins actives et plus anxieuses que les souris Wt. Ces données confirment que la protéine FMRP joue un rôle au niveau des activités locomotrices et de l'anxiété (Peier et al., 2000).

Les modèles murins ont permis de grandes avancées dans le contexte de la physiopathologie des maladies et particulièrement dans le FXS mais il faut garder à l'esprit que de nombreuses différences subsistes entre les deux espèces (Dalhaus, 2018) (**Figure 13**).

## *2.* La drosophile : *Drosophila melanogaster*

Le gène orthologue de *FMR1* chez la drosophile a été découvert pour la première fois en 2000 et a été nommé d*FMR1* (Wan et al., 2000). Il présente une forte homologie de séquence avec les trois gènes humains de la famille FXRP (Fragile X Related Protein) : *FMR1* et ses deux paralogues *FXR1* et *FXR2* (codant respectivement pour les protéines FMRP, FXR1P et FXR2P, *voir le chapitre « FMRP, fonctions et cibles »*) (Zhang et al., 2001 ; Coffee et al., 2010). Le taux de similarité entre dFMRP (aussi dénommé dFXR) et FMRP est de 56% avec une

conservation de la plupart des domaines fonctionnels (2KH domaines et une RGG box, *voir partie « Structure de la protéine FMRP »*) (Wan et al., 2000 ; Zhang et al., 2001). Chez l'adulte dFMRP est exprimé dans le système nerveux central et certains neurones spécifiques : des yeux, des projections du lobe antennaire et dans le corps cellulaire des Mushroom Bodies (MB) qui sont le centre de l'apprentissage et de la mémoire chez la drosophile (Zhang et al., 2001 ; Morales et al., 2002 ; Sudhakaran et al., 2014). dFMRP est localisée majoritairement au niveau du cytoplasme des cellules, et elle est fortement exprimée dans les neurones avec une localisation au niveau du perikaryon et des dendrites (Wan et al., 2000 ; Zhang et al., 2001 ; Lee et al., 2003). Le gène d*FMR1* ne présente pas de répétitions CGG au niveau de la région 5'UTR. Différents mutants drosophiles viables du gène d*FMR1* ont été obtenus et caractérisés : des mutants hypomorphes avec une faible expression de dFMRP ou hypermorphes avec une surexpression, des mutants nuls avec une absence totale de dFMRP et des mutants dFMRP-I307N (correspondant à la mutation I304N observée chez le patient FXS) (Zhang et al., 2001 ; Dockendorff et al., 2002 ; Inoue et al., 2002 ; Lee et al., 2003). Ces mutations entraînent un retard de développement moteur caractérisé par des troubles de coordination du vol et de la motilité. On retrouve également des altérations de l'apprentissage et de la mémoire olfactive et du comportement de séduction ainsi que du rythme circadien (Morales et al., 2002). Ces troubles sont associés à des altérations de l'architecture des synapses et de la transmission synaptique similaire à ceux des souris *Fmr1*-KO (Zhang et al., 2001 ; Dockendorff et al., 2002). Des défauts ont également été observés au niveau de la croissance, du guidage et du branchement des axones impliqués dans le contrôle de l'éclosion et de l'activité locomotrice (Dockendorff et al., 2002 ; Morales et al., 2002). Les synapses des jonctions neuromusculaires sont anormalement larges chez les mutants d*FMR1* et ressemblent à celles observées au niveau des épines dendritiques chez les mammifères (Schenck et al., 2003 ; Zhang et al., 2001). On observe ces altérations au niveau des photorécepteurs histaminergiques (des synapses centraux) et des jonctions neuromusculaires glutamatergiques (des synapses périphériques) (Zhang et al., 2001). D'une manière intrigante, la surexpression ou la délétion de dFMRP aboutit aux mêmes altérations de la neurotransmission en réduisant significativement la transmission des synapses centrales et en exagérant celle des synapses périphériques. Ces observations permettent de proposer que les fonctions de dFMRP pourraient être différentes en fonction des synapses concernées (Zhang et al., 2001).

Le mutant d*FMR1*-I307N n'est pas un dominant négatif mais il est plutôt associé à une perte de fonction de la protéine. Par ailleurs, les drosophiles mâles d*FMR1* présentent une forte réduction de la fertilité (Coffee et al., 2010). Et de manière générale, un large spectre

**TABLE 1** | Main phenotypes of loss of function *dFMR1* mutants.

| Phenotype | References |
|---|---|
| **BEHAVIOR** | |
| Adult locomotion/Climbing | Zhang et al., 2001; Dockendorff et al., 2002; Inoue et al., 2002; Morales et al., 2002; Martinez et al., 2007; Banerjee et al., 2010; Adewoye et al., 2015; Novak et al., 2015; Monyak et al., 2016 |
| Circadian rhythm | Dockendorff et al., 2002; Inoue et al., 2002; Morales et al., 2002; Banerjee et al., 2007, 2010; Gatto and Broadie, 2009; Siller and Broadie, 2011; Xu et al., 2012; Adewoye et al., 2015; Monyak et al., 2016 |
| Courtship | Dockendorff et al., 2002; McBride et al., 2005; Banerjee et al., 2007, 2010; Chang et al., 2008; Choi et al., 2010; Tauber et al., 2011; Gross et al., 2015 |
| Grooming | Tauber et al., 2011 |
| Larval crawling | Xu et al., 2004; Coyne et al., 2015; Günther et al., 2016; Kashima et al., 2017 |
| Olfactory learning and memory | Morales et al., 2002; Bolduc et al., 2008; Kanellopoulos et al., 2012; Andlauer et al., 2014; Sudhakaran et al., 2014; Choi et al., 2015; Monyak et al., 2016 |
| Social behavior | Bolduc et al., 2010 |
| Sleep | Bushey et al., 2009; van Alphen et al., 2013 |
| Touch perception | Cvetkovska et al., 2013 |
| **NEURAL PHYSIOLOGY/STRUCTURE** | |
| Bouton area | Pan et al., 2004; Gatto and Broadie, 2008; Reeve et al., 2008; Coffee et al., 2010; Friedman et al., 2013; Cavolo et al., 2016; Doll et al., 2017 |
| Bouton/synapse number | Zhang et al., 2001; Zarnescu et al., 2005; Banerjee et al., 2007, 2010; Gatto and Broadie, 2008; Xu et al., 2008; Pepper et al., 2009; Coffee et al., 2010; Beerman and Jongens, 2011; Bhogal et al., 2011; Siller and Broadie, 2011; Friedman et al., 2013; Kashima et al., 2016, 2017; Mansilla et al., 2017 |
| Calcium signaling | Tessier and Broadie, 2011; Gatto et al., 2014; Sudhakaran et al., 2014; Doll and Broadie, 2016 |
| M B β-lobe crossing | Michel et al., 2004; McBride et al., 2005; Banerjee et al., 2007; Bolduc et al., 2008; Chang et al., 2008; Beerman and Jongens, 2011; Gross et al., 2015 |
| Neural branching | Morales et al., 2002; Lee et al., 2003; Pan et al., 2004; Reeve et al., 2005, 2008; Gatto and Broadie, 2008; Tessier and Broadie, 2008; Xu et al., 2008; Cziko et al., 2009; Pepper et al., 2009; Coffee et al., 2010; Bhogal et al., 2011; Siller and Broadie, 2011; Friedman et al., 2013; Kim et al., 2013; Doll and Broadie, 2015; Myrick et al., 2015; Kashima et al., 2016 |
| Neurite extension | Morales et al., 2002; Michel et al., 2004; Pan et al., 2004; Reeve et al., 2005; Gatto et al., 2014 |
| Neural fasciculation | Schenck et al., 2003; Reeve et al., 2005 |
| Neurotransmission | Zhang et al., 2001; Martinez et al., 2007; Gatto and Broadie, 2008; Friedman et al., 2013; Doll et al., 2017; Franco et al., 2017 |
| Synaptic growth | Zhang et al., 2001; Morales et al., 2002; Schenck et al., 2003; Abekhoukh et al., 2017; Doll et al., 2017 |
| Branch/Neurite/NMJ/Synaptic length | Lee et al., 2003; Schenck et al., 2003; Reeve et al., 2008; Tessier and Broadie, 2008; Bhogal et al., 2011; Siller and Broadie, 2011; Cvetkovska et al., 2013; Kim et al., 2013; Gatto et al., 2014; Bozzetti et al., 2015; Myrick et al., 2015; Sterne et al., 2015; Abekhoukh et al., 2017; Doll et al., 2017; Kennedy and Broadie, 2017 |
| Synapse structure | Zhang et al., 2001; Morales et al., 2002; Lee et al., 2003; Schenck et al., 2003; Michel et al., 2004; Pan et al., 2004; McBride et al., 2005; Reeve et al., 2005, 2008; Zarnescu et al., 2005; Banerjee et al., 2007, 2010; Bolduc et al., 2008; Chang et al., 2008; Gatto and Broadie, 2008, 2009; Tessier and Broadie, 2008; Xu et al., 2008; Cziko et al., 2009; Pepper et al., 2009; Coffee et al., 2010; Beerman and Jongens, 2011; Bhogal et al., 2011; Siller and Broadie, 2011; Cvetkovska et al., 2013; Friedman et al., 2013; Kim et al., 2013; Gatto et al., 2014; Bozzetti et al., 2015; Doll and Broadie, 2015; Gross et al., 2015; Myrick et al., 2015; Sterne et al., 2015; Cavolo et al., 2016; Kashima et al., 2016, 2017; Abekhoukh et al., 2017; Doll et al., 2017; Kennedy and Broadie, 2017; Mansilla et al., 2017 |
| Synapse volume | Mansilla et al., 2017 |
| **OTHERS** | |
| Adult eclosion | Dockendorff et al., 2002; Inoue et al., 2002; Morales et al., 2002 |
| Aging | Martinez et al., 2007; Bushey et al., 2009 |
| Apoptosis | Gatto and Broadie, 2011 |
| Blastoderm cellularization | Deshpande et al., 2006; Monzo et al., 2006; Papoulas et al., 2010 |
| Cell cycle | Deshpande et al., 2006; Monzo et al., 2006; Epstein et al., 2009; Callan et al., 2010, 2012; Papoulas et al., 2010 |
| Germline development | Zhang et al., 2004, 2014; Costa et al., 2005; Deshpande et al., 2006; Megosh et al., 2006; Epstein et al., 2009; Yang et al., 2009; Bozzetti et al., 2015; Jiang et al., 2016 |
| Heart rate | Novak et al., 2015 |
| Oviposition | Kacsoh et al., 2015a,b; Jiang et al., 2016 |
| Phagocytosis | O'Connor et al., 2017 |

## Figure 14: Phénotypes majeurs observés chez la drosophile mutante dFMR1

Issu de Drozd, Bardoni et Capovilla, 2018.

phénotypique est observé après la perte de fonction de dFMRP chez la drosophile, il comprend des anomalies comportementales (mouvements non coordonnés lors des tests de vol ou d'escalade, altération de l'apprentissage olfactif, altération des boutons synaptiques de la signalisation du calcium ou encore de la croissance synaptique (**Figure 14**) mais également d'autres phénotypes tels que des altérations de l'éclosion, de l'apoptose, du cycle cellulaire, de la cellularisation du blastoderme, du développement germinal, du cœur et de la rate (Drozd, Bardoni et Capovilla, 2018). Ce large impact pourrait être expliqué par le fait que dFMRP recouvre l'activité des 3 FXRP chez les mammifères.

## 3. Le poisson zèbre : *Danio rerio*

La protéine FMRP du poisson zèbre partage 72% d'identité avec son orthologue humain. Chez le poisson, comme chez l'Homme, FMRP est fortement exprimée au niveau du cerveau incluant le télencéphale, le diencéphale, le métencéphale, la moelle épinière et le cervelet (Ng et al., 2013). En 2006, l'équipe de Tucker a utilisé des morpholinos (MO) dans des embryons de 1 à 2 jours afin de réduire l'expression de FMRP (Knock Down). Ces oligonucléotides anti-sens possèdent des phosphorodiamidates à la place des désoxyriboses. Ils ont été utilisés pour cibler l'ARNm *FMR1* et empêcher sa traduction pour un maximum de 4 jours. L'inhibition de la traduction est donc transitoire. Les injections de MO contre l'ARNm *FMR1* ont permis de montrer des défauts de branchements axonaux, des changements dans le nombre de ganglion de Gasser (ganglion nerveux du nerf trijumeau) et des anomalies cranio faciales chez les embryons (Tucker et al., 2006).

En 2009, une équipe a généré deux mutants *Fmr1*-KO en utilisant la stratégie dite de TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) qui permet d'induire des lésions locales ciblées au niveau du génome et sélectionner par la suite des mutants nuls n'exprimant pas FMRP (Den Broeder et al., 2009). Ces mutants sont viables et ne présentent pas d'anomalies de développement, contredisant les résultats obtenus avec les morpholinos (Tucker et al., 2006). Les auteurs expliquent que les effets observés avec les MO sont des artefacts expérimentaux, de plus, le faible nombre de poissons utilisés conforte l'idée que ces variabilités non spécifiques ne sont pas liées au knock-down. Par la suite, Ng et al., ont observé que chez les adultes, les poissons présentent des troubles du comportement et d'apprentissage ainsi qu'une réduction de la LTP et une augmentation de la LTD sans pour autant avoir une altération de la transmission synaptique glutamatergique basale (Ng et al., 2013). Finalement, Kim et al., ont montré que le poisson zèbre *Fmr1*-KO a, tout comme le modèle murin, une réduction de l'anxiété et une

hyperactivité, plus spécifiquement dans la phase dite « néophobique » correspondant aux 10 premières minutes dans un environnement non familier dans le test de l'open-field (test en champ ouvert utilisé pour tester les niveaux d'activité locomotrice générale, d'anxiété et l'intention d'exploration). Par contre, les stéréotypies présentent chez les patients et le modèle murin ne sont pas observées chez le poisson zèbre (Kim et al., 2014).

## 4. Le rat : *Rattus norvegicus*

La protéine FMRP chez le rat partage environ 90% d'identité avec son orthologue humain. Chez le rat, FMRP est fortement exprimée au niveau du thymus, de l'utérus, des testicules, du foie, du rein, du poumon ainsi que le muscle, le cerveau et les glandes surrénales. Le modèle rat a été créé dans le but de mettre en évidence des phénotypes FXS plus prononcés que chez la souris étant donné que la distance évolutive entre le rat et l'homme est moindre que celle entre la souris et l'homme, et afin de voir si le modèle rat récapitule des phénotypes de la souris étant donné leur appartenance commune à l'ordre des rongeurs. Deux modèles de rats ont été développés, les rats *Fmr1*-KO29 (Engineer et al., 2014 ; Till et al., 2015 ; Berzhanskaya et al., 2016 ; Kenkel et al., 2016) et les rats *Fmr1*$^{exon4KO}$ crées par la technique CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindoromic Repeats-CRISPR-associated protein9) (Tian et al., 2017).

Les études ont révélé que les modèles rats récapitulent de nombreuses caractéristiques moléculaires et physiologiques du modèle murin, notamment un excès du taux de synthèse protéiques neuronales, une exagération de la mGluR-LTD dans l'hippocampe, des densités élevées des épines dendritiques et une hyper-excitabilité corticale (Till et al., 2015 ; Berzhanskaya et al., 2016 ; Tian et al., 2017). Cependant, et de manière surprenante, les rats ne reproduisent pas très bien le phénotype comportemental des souris (Till et al., 2015), ni les symptômes des patients FXS mieux que le modèle murin. Bien que des déficits hippocampe-dépendants aient été observés (Till et al., 2015 ; Tian et al., 2017), les rats ne montrent pas de défauts dans la mémoire spatiale et l'apprentissage (Till et al., 2015) comme observé chez la souris (Paradee et al., 1999 ; Van Dam et al., 2000 ; Baker et al., 2010). Cela montre que même si l'on observe les mêmes différences moléculaires, cela n'exclut pas que le comportement animal puisse être différent. Compte tenu du nombre élevé de protéines affectées par la perte de FMRP comme nous allons le voir plus tard (*cf partie « Les protéines associées à FMRP »*), de nombreuses possibilités d'altérations existent, à travers lesquelles le fond génétique peut avoir un impact sur les symptômes de la maladie. En effet, on sait depuis longtemps que le

phénotype spécifique des souris modèles FXS varie considérablement d'une souche à l'autre (Bernardet et Crusio, 2006 ; Kazdoba et al., 2014). Des études supplémentaires seraient nécessaires pour caractériser plus en détail la performance des rats FXS en termes de cognition et de sociabilité et pour expliquer certaines divergences entre les deux modèles de rats (Till et al., 2015 ; Tian et al., 2017). Pour autant, plusieurs études ont pu mettre en évidence certains comportements altérés dans le modèle rat.

En 2016, Berzhanskaya et al., ont étudié la perturbation de l'activité corticale liée à l'attention et l'excitation et ont montré que les rats *Fmr1*-KO âgés de 3 à 4 semaines étaient hyperactifs (Berzhanskaya et al., 2016). En 2018, une équipe s'est intéressée au retrait social que l'on observe chez les patients FXS, en utilisant le test du « tube » chez le rat *Fmr1*-KO, ce test permet de mettre en évidence une domination social chez les rongeurs. Les rats mâles *Fmr1*-KO vivant ensemble forment une hiérarchie de domination sociale, mais sont significativement subordonnés aux animaux sauvages dans des cages de groupes mixtes (Saxena et al., 2018). En 2019, une autre équipe s'est intéressée à la mémoire associative reposant sur la préférence d'un animal à explorer la nouveauté (en termes d'objet et de lieu). Les rats *Fmr1*-KO montrent un retard de reconnaissance d'objet/lieu et ce jusqu'à pratiquement 6 mois d'âge. De manière intéressante, l'équipe a essayé de corriger ce phénotype à l'aide d'un traitement à la Lovastatin qui un hypolipidémiant (*voir partie « Essais cliniques pour le FXS*), à 29 jours les animaux ont été supplémenté en Lovastation dans leur alimentation à raison de 100mg/kg et ce durant 35 jours et à l'âge de 5-9 semaines ils observent une correction du phénotype chez les animaux KO visible plusieurs mois après le traitement (Asiminas et al., 2019).

# Chapitre II : FMRP, fonctions et cibles

## I. Expression du gène *FMR1*

Chez l'Homme et la souris, *FMR1* est exprimé dans la grande majorité des tissus fœtaux et adultes, mais à l'âge adulte, son niveau d'expression est surtout élevé dans le cerveau, les ovaires et les testicules et très faible dans les muscles (Devys et al., 1993 ; Hinds et al., 1993 ; Tamanini et al., 1997). L'étude du profil d'expression du gène *FMR1* au cours du développement embryonnaire par *hybridation in situ* et immunohistochimie sur une variété de tissus humains et murins a permis de montrer que *FMR1* est exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire chez l'homme et augmente progressivement jusqu'à atteindre un pic d'expression au dixième jour de gestation. Puis, l'expression est réduite progressivement jusqu'à atteindre un niveau similaire dans tous les tissus testés, excepté dans le cerveau et les testicules où une forte expression est maintenue jusqu'à l'âge adulte (Hinds et al., 1993). Plus précisément, chez l'Homme, des analyses immunohistochimiques sur coupes de fœtus âgés de 8 à 9 semaines et 25 semaines ont permis de bien localiser l'expression de *FMR1*. On observe à 8-9 semaines, une forte expression dans le système nerveux central : dans les neurones cholinergiques du noyau basalis magnocellulaire (impliqué dans l'innervation cholinergique du cerveau), les neurones pyramidaux de l'hippocampe, les noyaux subthalamiques, le cortex cérébral, le striatum et le cervelet (Abitbol et al., 1993). La zone périventriculaire du télencéphale, la rétine neurale, le mésenchyme céphalique (zone périencéphalique, mandibule et langue), toutes les structures cartilagineuses ainsi que les cellules du foie et de la moelle épinière montrent une forte expression de *FMR1*. Par contre, on ne détecte pas d'expression dans les viscères, les poumons, le cœur, l'intestin, la rate, le pancréas, les glandes surrénales, les reins et les gonades (Abitbol et al., 1993). A 25 semaines, sur des coupes de cerveaux de jumeaux monozygotes, une forte expression de *FMR1* est observée dans la zone ventriculaire et sous ventriculaire, le noyau basalis magnocellulaire, l'hippocampe, le putamen, le thalamus ainsi que les noyaux réticulaires thalamiques et subthalamiques. Il est intéressant de noter que l'hippocampe et le noyau basalis magnocellulaire sont deux structures cérébrales impliquées

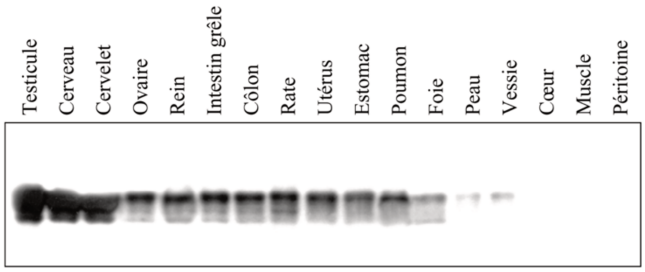



**Figure 15: Expression de la protéine FMRP chez la souris adulte dans différents organes**

Western-blot montrant le niveau d'expression de la protéine FMRP dans des extraits de tissus et organes à l'aide de l'anticorps monoclonal 1C3, adapté de Khandjian et al., 1995.

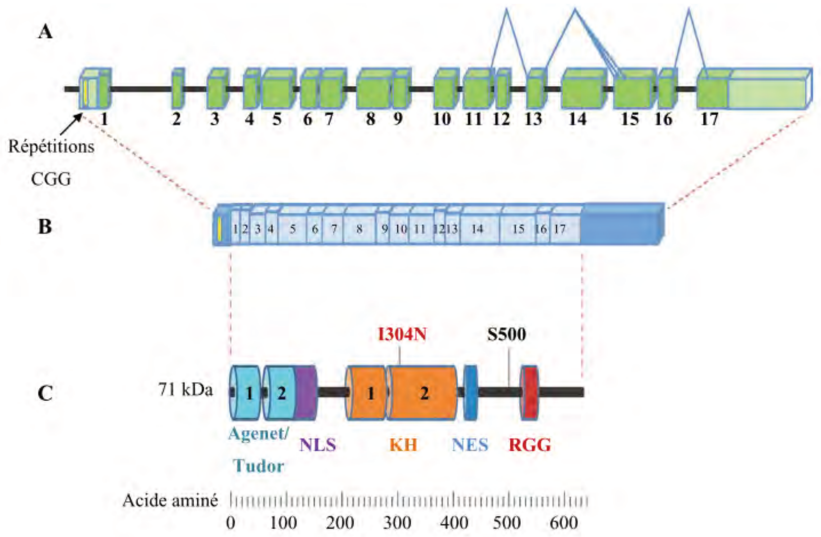



**Figure 16: Représentation schématique du gène *FMR1*, de l'ARN FMR1 et de la protéine FMRP**

(A) Le gène FMR1. Les régions codantes (vert foncé), non-codantes (vert clair) et les introns (lignes continues noires) sont schématisées. Les lignes bleues indiquent l'épissage alternatif. (B) L'ARNm FMR1. Les exons (bleus clairs) sont schématisés au-dessus de leur séquence correspondante en acide aminé. (C) La protéine FMRP. NLS, signal de localisation nucléaire ; KH, domaine d'homologie avec hnRNP K ; NES, signal d'export nucléaire ; RGG, domaine riche en arginine-glycine-glycine ; S500, serine principalement phosphorylée ; I304N, mutation ponctuelle identifiée chez un patient FXS, adapté de Santoro et al., 2011.

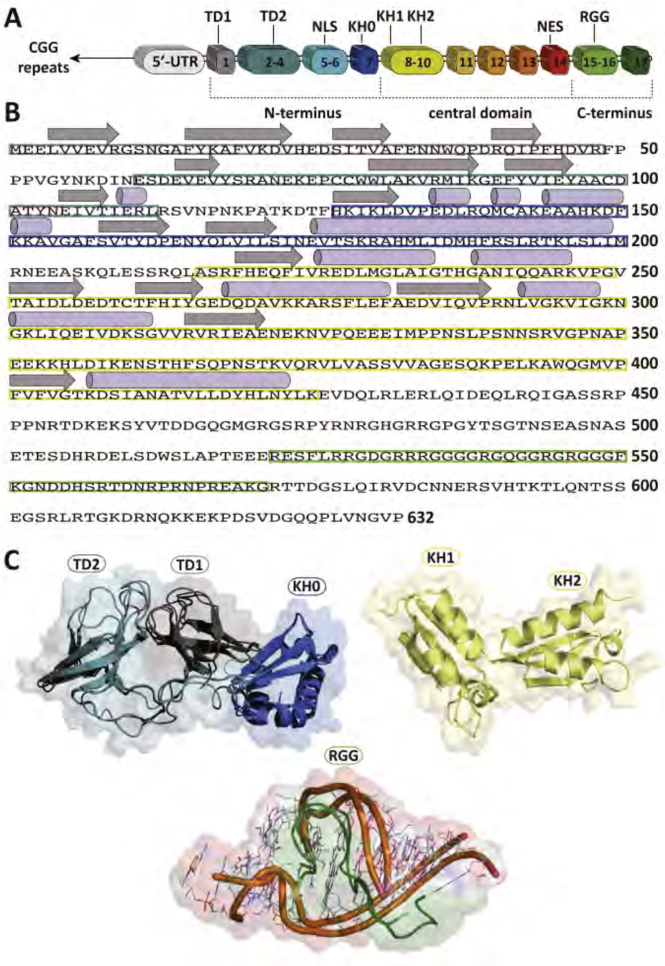
dans le processus de mémorisation, que l'on retrouve altérées lorsqu'il y a absence d'expression du gène *FMR1* chez les patients FXS (Abitbol et al., 1993).

Chez la souris, *FMR1* n'est pas exprimé durant les premiers jours de développement embryonnaire jusqu'au deuxième jour de l'embryogenèse (Bakker et al., 2000). Du deuxième au quatorzième jour, le niveau d'expression augmente progressivement dans tous les tissus même si les tissus d'origines ectodermiques (cerveau, ganglion de la base, épithélium olfactif…) montrent une expression particulièrement élevée. Au-delà du quatorzième jour, l'expression de *FMR1* est spécifiquement très élevée dans les gonades et le cerveau contrairement aux autres tissus comme les muscles squelettiques et cardiaques où son expression diminue (Khandjian et al., 1998 ; Agulhon et al., 1999 ; Bardoni et al., 2001) (**Figure 15**). A l'âge adulte, chez la souris, le niveau d'expression de *FMR1* est très faible dans le cœur, le derme, les muscles squelettiques ainsi que les vaisseaux sanguins comme chez l'homme (Devys et al., 1993 ; Bakker et al., 2000), plutôt modéré dans l'intestin, l'utérus, la thyroïde, le foie, les poumons et les reins et forte dans le thymus, l'œsophage, la rétine et plus particulièrement dans le cerveau (neurones pyramidaux de l'hippocampe et cellules de Purkinje du cervelet), les testicules (spécifiquement les spermatogonies) et les ovaires (Devys et al., 1993 ; Bakker et al., 2000).

*FMR1* est donc exprimé de manière relativement ubiquitaire au cours du développement, son expression ne se limite pas au système nerveux central laissant supposer que sa fonction s'exerce dans d'autres tissus. Une corrélation avec d'autre symptôme non neurologique du FXS serait à faire. Il est intéressant de noter que le niveau de FMRP est le plus élevé dans le cerveau et les testicules, organes dont la morphologie et le fonctionnement sont touchés dans le syndrome de l'X fragile (Khandjian et al., 1995 ; Hagerman et al., 2017).

## II. Structure de la protéine FMRP

Grâce à ses différents domaines, la protéine FMRP peut interagir avec des partenaires protéiques et des ARN. La structure de la protéine est organisée en trois régions distinctes : la région N-terminale, la région centrale et la région C-terminale, toutes trois capables d'interagir avec les ARN (**Figures 16 et 17**).




## Figure 17: Les différents domaines composant la protéine FMRP

(A) Représentation schématique de l'organisation des domaines de FMRP. La région 5'UTR et les 17 exons qui composent la protéine sont représentés, ainsi que les deux domaines Tudor (TD), les trois domaines d'homologie K (KH0, KH1, KH2), la boîte RGG et l'emplacement des séquences de localisation et d'exportation nucléaires (NLS et NES). (B) La séquence d'acides aminés (code Uniprot Q06787) avec représentation de structure secondaire dérivée de structures tridimensionnelles disponibles. Les feuillets β et les hélices α sont définies respectivement par des flèches et des rectangles. (C) Superposition de toutes les structures tridimensionnelles disponibles pour le domaine N-terminal (en haut à gauche) avec les domaines TD1, TD2 et KH0 en gris, cyan et bleu, pour les domaines KH1-KH2 (en haut à droite) en jaune et pour la boîte RGG représentée en vert (au milieu) co-cristallisée en complexe avec deux brins d'ARN différents représentés en brun, adapté de d'Annessa, 2019.

## 1. La région N-terminale

Cette région comprise entre les acides aminés (aa) 1 à 200 est impliquée dans les interactions protéine-protéine, elle est composée de deux domaines Tudor (TD) en tandem, aussi appelés Agenet, d'une séquence de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localisation Signal) et d'un domaine KH0 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein K Homology 0). Sa structure tridimensionnelle a été initialement décrite en 2006 par l'équipe de Ramos (Ramos et al., 2006). Les domaines Tudor (TD1 aa 1 à 48 et TD2 aa 61 à 112) sont connus pour avoir de nombreuses fonctions, dont les interactions protéine-protéine et la fixation des lysines méthylées pouvant faciliter l'adressage de FMRP au noyau (Winograd et Ceman, 2011). Malgré la ressemblance structurale des deux motifs répétés, TD2 est moins compacte que TD1 ce qui facilite son interaction avec les acides nucléiques via les arginines et les lysines méthylées, particularité des domaines Tudor (Pek et al., 2012). Concernant TD1, il a été proposé par approche in silico qu'il aurait la capacité à interagir avec la protéine ribosomale S15 (RPS15, 40S ribosomal protein S15) qui a un rôle central dans la biogenèse des ribosomes (Sim et al., 2016). Le domaine KH0 (aa 127 à 200) a été récemment identifié par approche cristallographique (Myrick et al., 2015a), faisant suite à la découverte des deux autres domaines KH1 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein K Homology 1) et KH2 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein K Homology 2) présents dans la partie centrale de la protéine FMRP et découverts bien plus tôt (Gibson et al., 1993) et cristallisés par la suite par l'équipe de Valverde (Valverde et al, en 2007). Ce domaine diffère des deux autres dans sa composition en acides aminés (Hu et al., 2015). Les domaines TD1, TD2 ainsi que KH0 constituerait une plateforme d'interaction protéine-protéine bien conservée chez les paralogues et orthologues de FMRP. La séquence NLS est située entre les résidus 115 et 150 et son activité de localisation nucléaire est renforcée par la région 151 à 196 (Bardoni et al., 1997).

## 2. La région centrale

Cette région est constituée des deux domaines KH, KH1 codés par les exons 8-10 (aa 212 à 266) et KH2 codé par l'exon 13 (aa 285 à 328), ils ont été identifiés initialement dans la protéine hnRNP K (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K). Ces domaines sont retrouvés dans une grande variété de protéines de liaison aux ARN, et souvent répétés en tandem de 2 à 16 fois (Valverde et al., 2007 ; Valverde et al., 2008). Les domaines KH sont classés en deux

types, type I avec la présence d'un repliement β1α1α2β1β'α' retrouvés chez les eucaryotes ou de type II avec un repliement α'β'β1α1α2β2 retrouvés exclusivement chez les procaryotes. En 2005, l'équipe de Darnell a montré par approche de sélection *in vitro* que le domaine KH2 interagissait avec des ARN formant une « kissing loop » (*voir partie « Sites de fixation de FMRP »*) (Darnell et al., 2005), cependant aucun ARN « naturel » comportant ce motif n'a à ce jour été identifié comme se liant à FMRP. L'importance fonctionnelle de ces domaines a été par ailleurs soulignée par l'identification d'un patient FXS avec la mutation I304N localisé au niveau du domaine KH2 (De Boulle et al., 1993). En effet cette mutation a pour conséquence un dépliement partiel du cœur hydrophobe du domaine affectant la capacité à se lier aux ARN (Siomi et al., 1996 ; Darnell et al., 2005) et son association aux polyribosomes (Zang et al., 2009), deux fonctions majeures de FMRP (*voir partie « Les fonctions et mécanismes de régulation de FMRP »*).

Dans la région centrale, on trouve également une séquence d'export nucléaire (NES, nuclear export signal). La présence simultanée d'un NLS et d'un NES dans FMRP suggère qu'elle peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences d'inhibition de l'export nucléaire avec la leptomycine B, qui, en inhibant l'interaction avec l'exportine-1, induit une accumulation partielle de FMRP dans le noyau (Tamanini et al., 1999).

## 3. La région C terminale

Cette région, comprise entre les acides aminés 405 à 632, a une structure intrinsèque désordonnée ayant pour conséquence une mauvaise connaissance de ses arrangements structuraux. Cette région, qualifiée de Low Complexity Domain (LCD) est enrichie en glycines, tyrosines et sérines. Elle favorise les interactions dynamiques avec les protéines et les ARN et est impliquée dans la formation des particules ribonucléiques (Kato et al., 2012). Cette région comporte notamment un motif RGG ou boite RGG, riche en glycine (44%) et arginine (28%). Ce motif a été identifié dans la protéine hnRNP U (heterogenous nuclear RiboNucleoProtein U). La boite RGG permet à FMRP d'interagir avec les motifs G-quadruplex (Brown et al., 2001 ; Vasilyev et al., 2015), les ARN riches en guanine (Burge et al., 2006) et les micro-ARN (Wang et al., 2015). L'affinité pour les motifs d'ARN diminue avec le niveau de méthylation des arginines de la boite RGG (Stetler et al., 2006). L'interaction RGG-ARN a été caractérisée par résonnance magnétique nucléaire (RMN) ainsi que par cristallographie aux rayons X. La

boite RGG reconnait également un autre motif de trois tiges boucles appelé SoSlip (*voir partie « Sites de fixation de FMRP »*) (Bechara et al., 2009).

Les domaines de liaisons aux ARN sont une caractéristique majeure de FMRP lui donnant sa capacité à lier et « potentiellement » à réguler des ARNm spécifiques ayant des fonctions importantes pour la plasticité synaptique. Notons que les domaines TD2, NES et RGG montrent un très fort degré de conservation entre espèces (comparaison faite entre 58 espèces) suggérant une conservation de fonction, contrairement au domaine KH2 présentant un faible degré de conservation reflétant une fonction espèce-spécifique (Schwarz et al., 2016).

## III. La protéine FMRP et son épissage alternatif

La séquence génomique du gène *FMR1* s'étend sur 40 kb au niveau du locus Xq27.3 (Verkerk et al., 1991). Elle comporte 17 exons et le transcrit complet mesure 3,9 kb : 0,2 kb correspondant à la partie 5'UTR, 1,9 kb à la séquence codante et 1,8 kb à la partie 3' UTR. Ce transcrit primaire est sujet à différents épisodes d'épissage alternatif produisant différentes isoformes de la protéine. En ce qui concerne les gènes humains avec de multiples exons, 90 à 94% d'entre eux sont soumis à l'épissage alternatif (Johnson et al., 2003 ; Wang et al., 2008), notamment dans le système nerveux central (Mazin et al., 2013 ; Castle et al., 2008). Ces évènements d'épissage alternatif affectent les exons 12, 14, 15 et 17 et conduisent à la production potentielle de 20 isoformes dont le poids moléculaire varie entre 47 et 71 kDa (kiloDaltons) et 11 isoformes ont été décrites (Ashley et al., 1993 ; Verkerk et al., 1993) s'exprimant dans différentes régions et à différents moments du développement et avec des propriétés biochimiques éventuellement distinctes.

Chez l'Homme, FMRP est une protéine moyenne de 632 acides aminés pour sa forme la plus longue dite « Full-Length, FL » appelée ISO1 (UniProt , Q06787). Cette isoforme contient tous les domaines de FMRP décrits précédemment.

L'isoforme ISO7 est exprimée de façon prédominante dans les cellules COS (cellules dérivées de tissus de reins de singe, **C**V-1 simian **O**rigin carrying the **S**V40 replication origin), les lymphoblastes ainsi que le cerveau, elle est délétée de l'exon 12 (Sittler et al., 1996 ; Fu et al., 2015 ; Zimmer et al., 2017). Avec l'isoforme ISO17, également délétée de l'exon 12, elles représentent 80% de toutes les isoformes dans le cerveau, suggérant un rôle non-important de l'exon 12 dans la fonction physiologique cérébrale (Sittler et al., 1996 ; Fu et al., 2015).

L'isoforme ISO8 ne possède pas d'exon 12 et contient le deuxième site accepteur d'épissage au niveau de l'exon 15. Son expression est prédominante dans le cortex adulte humain (Ding et

al., 1997). Les sites accepteurs d'épissage permettent l'inclusion ou l'exclusion des sites de modifications post-traductionnels.

L'isoforme ISO13 contenant le premier site accepteur d'épissage dans l'exon 17 est l'isoforme majeure chez l'homme dans le cœur, la rate, le foie, les reins et le cortex fœtal, à elle seule cette isoforme représente 40% de toutes les isoformes dans le cortex fœtal (Huang et al., 1996 ; Ding et al., 1997). Par contre, elle n'est pas abondante dans le sang, le cerveau adulte et les testicules où elle représente seulement 7,38% des isoformes (Fu et al., 2015).

Enfin, les isoformes 4 à 6 et 10 à 12 ne possèdent pas d'exon 14. L'exclusion de l'exon 14 induit un décalage du cadre de lecture qui a pour conséquence de modifier la composition de la région C-terminale de la protéine (Brackett et al., 2013).

Pour résumé, les isoformes excluant l'exon 12 (isoformes ISO7 à ISO12) sont les plus abondantes et celles qui semblent jouer un rôle physiologique important dans le cerveau. Les formes excluant l'exon 14 (isoformes ISO4-6 et 10-12) qui impactent la localisation subcellulaire de la protéine, aboutissant à une forme nucléaire, sont minoritaires et de fonction incertaine (Fu et al., 2015). Grâce à leur domaine Agenet permettant de lier les histones H3 méthylées en lysine 79 (H3K79) de la chromatine, des fonctions importantes de FMRP ont été proposées dans les voies de réparation des dommages à l'ADN (Alpatov et al., 2014). Ce rôle vis-à-vis de la pathologie FXS semble toutefois peu clair. Une nouvelle isoforme a été découverte dans les testicules, l'isoforme 24 correspondant un saut d'exon 11 qui code pour une partie du domaine KH2 de liaison aux ARNm, sa fonction exacte reste à déterminer (Fu et al., 2015).

## IV. Protéines associées à FMRP

Beaucoup de protéines partenaires ont été identifiées dans des complexes RiboNucléoProtéiques (RNP) comportant FMRP (Pascuito et Bagni, 2014). Je parlerai ici de certaines interactions protéiques qui sont les mieux caractérisées à ce jour.

### 1. Les protéines FXR1P et FXR2P

Au niveau moléculaire, FMRP et ses deux autres protéines homologues FXR1P (Fragile X Related 1 Protein) et FXR2P (Fragile X Related 2 Protein) appartiennent à la famille des FXR protéines et forment des homo ou hétéro-dimères (Zhang et al., 1995 ; Siomi et al., 1996). Les gènes *FXR1* et *FXR2* sont localisés au niveau des locus 3q28 et 17p13.1 respectivement,

possèdent 17 exons, comme FMRP, et partagent environ 60% d'identité entre elles (Kaufmann et al., 2002). Les trois protéines FXRP partagent les plus fortes homologies de séquences au niveau de leurs domaines fonctionnels, incluant les domaines Tudor, NLS, NES, KH1 et KH2, suggérant des fonctions communes telles que l'association aux ARN et la capacité de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme. De plus, elles sont associées aux polyribosomes suggérant des fonctions de régulation de la traduction ou de la stabilité de l'ARN (Feng et al., 1997), et interagissent également avec la voie des miARN (Jin et al., 2004 ; Majumber et al., 2020).

Au niveau de leur profil d'expression, les trois protéines sont globalement exprimées de manière similaire dans le cerveau des mammifères. Elles sont fortement exprimées dans le cytoplasme de plusieurs types de neurones chez le fœtus et chez l'adulte. En cultures primaires d'hippocampes, leur expression est également cytoplasmique avec une localisation au niveau des dendrites proximales (Siomi et al., 1996). Ces similarités suggèrent que les protéines paralogues pourraient compenser partiellement l'absence de FMRP chez les patients FXS (Feng et al., 1997) mais au cours du développement différents profils d'expression de ces trois protéines sont observés, ce qui suggère également des fonctions indépendantes et différentes entre chacune d'elles. En effet, bien qu'ayant une localisation similaire à celle de FMRP dans le cerveau, FXR1P et FXR2P ont une localisation différente dans les cellules musculaires et testiculaires (Tamanini et al., 1997). De plus, dans le noyau, FMRP et FXR1P sont localisées au niveau du nucléoplasme, tandis que FXR2P est retrouvée au niveau du nucléole (Tamanini et al., 2000).

En ce qui concerne FXR1P, son expression est ubiquitaire avec une plus forte expression dans les muscles et le tissu cardiaque. Il a été montré que FXR1P est critique pour la survie post-natale, en effet chez les souris où FXR1 a été inactivé, on observe en histochimie à l'âge embryonnaire E19 (E : jour embryonnaire) des défauts d'architecture et de structure des cellules cardiaques et squelettiques associés à des troubles de la myogenèse et un décès rapide après la naissance par insuffisance cardiaque et respiratoire (Mientjies et al., 2004). Chez le xénope, la réduction de l'expression de FXR1P montre une altération de la formation des somites ainsi que de l'expression de la protéine MyoD (myoblast determination protein 1) régulant la différentiation musculaire (Davidovic et al., 2005). Chez le poisson zèbre, le knock-down du gène FXR1 a pour conséquence des anomalies des muscles striés et une cardiomyopathie sévère conduisant à une insuffisance cardiaque mortelle pour les embryons (Van't Padje et al., 2009). FXR1P est fortement exprimé dans le muscle et est sujet à de multiples épissages alternatifs générant différents variants. Sept isoformes sont connues à ce jour, et parmi elles, l'expression

des isoformes 1 et 3 est prédominante dans le muscle squelettique (McClure et al., 2019). Chez l'homme, une réduction de l'expression des isoformes musculaires due à une diminution de la stabilité des ARNm correspondants est observée dans les myotubes et les myoblastes de patients atteints de la dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale (FSH ou FSDH), une dystrophie musculaire progressive autosomique dominante (Davidovic et al., 2008).

Pour étudier l'impact de l'absence d'expression de FXR2P, un modèle murin Fxr2-KO a été créé en 2002 (Bontekoe et al., 2002), au niveau phénotypique on observe une augmentation de l'hyperactivité dans le test de l'open-field et une altération de l'activité locomotrice dans le test rotarod (test d'évaluation de l'activité motrice chez les rongeurs), comme chez la souris *Fmr1*-KO. Il a été également mis en évidence que les souris Fxr2-KO avaient une altération de la mémoire à l'aide du test de la piscine de Morris. Pour confirmer et approfondir le rôle de FXRP2 dans les mécanismes cognitifs et locomoteurs, un modèle murin double KO *FMR1*/FXR2 a été généré (Spencer et al., 2006). Comparativement aux souris simple KO, le double KO présente une exagération des phénotypes d'hyperactivité dans le test de l'open-field, une exagération des réponses aux stimuli auditifs durant le test de prepulse-inhibition (PPI, test permettant de montrer une altération de la réponse de réflexe de sursaut suite à un stimulus auditif inattendu) ainsi qu'une exagération dans la réponse au test de conditionnement de peur contextuelle (contextual fear conditioning, test permettant d'évaluer la mémoire du rongeur à associer un nouvel environnement à un stimulus aversif) ( Spencer et al., 2006). Un trouble du rythme circadien a également été mis en évidence (Spencer et al., 2006). Deng et Dunaevsky ont rapporté que, contrairement aux souris *Fmr1*-KO, les épines des neurones du cortex et d'hippocampes des souris Fxr2-KO sont moins denses par rapport aux souris Wt (souris âgées de deux semaines). Cependant, les épines dendritiques sont plus longues que les souris Wt, comme chez les souris *Fmr1*-KO (Deng et Dunaevsky, 2009). Ces résultats suggèrent que FXR2P aurait des fonctions dans le remodelage des épines dendritiques.

Concernant la liaison aux ARN, des analyses de microarray et RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction) ont montré que l'expression de plusieurs ARNm essentiels aux processus de mémorisation et de cognition est altérée chez la souris Fxr2-KO, ces ARNm cibles n'étant pas les mêmes que ceux retrouvés co-immunoprécipités avec FMRP (Brown et al., 2001). Ces résultats indiquent, avec les résultats phénotypiques, que la protéine FXR2P a une fonction cérébrale importante mais distincte de FMRP (Cavallaro et al., 2008). Si FMRP et FXR2P contribuent de manière coopérative aux mécanismes contrôlant la locomotion, la sensitivité ainsi que les processus de cognition (Spencer et al., 2006), et que l'expression d'une protéine serait partiellement suffisante pour

compenser l'absence de l'autre, leur effet sur certains phénotypes (ex. interactions sociales) suggèrent que ces protéines jouent des rôles partiellement chevauchant (Saré et al., 2019).

## 2. Les protéines CYFIP 1 et CYFIP 2

Les protéines CYFIP1 et CYFIP2 (CYtoplasmic FMRP Interacting Protein 1/2) sont des homologues avec 88% d'identité, et elles sont fortement conservées au cours de l'évolution (Schenck et al., 2001). Elles font parties du complexe de régulation WRC (WAVE regulatory complex) avec plusieurs autres protéines (WAVE : Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1, NAPI : Na (+) -dependent inorganic phosphate cotransporter, ABI1 : Abl interactor 1 et HSPC300 : Small heat shock protein 300) (Cory et Ridley, 2002 ; Derivery et al., 2009). Ce complexe établit un lien entre la signalisation Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate) via CYFIP1 pour cibler la protéine Arp2/3 (Actin related protein 2/3) qui est importante dans la régulation spatio-temporelle de la dynamique de l'actine impliqué dans de nombreux processus tels que la migration, la polarité et l'adhésion cellulaire ainsi que le trafic vésiculaire (Cory et Ridley, 2002 ; Derivery et al., 2009). CYFIP1 et CYFIP2 ne sont pas des protéines de liaison aux ARN mais interagissent avec FMRP via l'exon 7, le domaine impliqué dans la dimérisation de FMRP (Schenck et al., 2001).

CYFIP1 a été montrée interagir avec FMRP dans le contexte de la régulation de l'initiation de la traduction avec un troisième partenaire : la protéine eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) (Napoli et al., 2008 ; Beggs et al., 2015). Tandis que CYFIP2 est capable d'interagir avec FXR1P et FXR2P en plus de FMRP (Schenck et al., 2001). La fonction précise de l'interaction CYFIP / FMRP n'est pas encore comprise, cependant il apparaît clairement que la surexpression de CYFIP1 entraîne une arborisation dendritique complexe des neurones hippocampiques (Oguro-Ando et al., 2015), alors que chez les souris hétérozygotes CYFIP1-KO on observe une légère réduction de l'arborisation de ces mêmes neurones (Pathania et al., 2014). Néanmoins, récemment un rôle antagoniste de CYFIP1 et FMRP a été montré chez la drosophile dans les jonctions neuromusculaires et dans les cellules granulaires du bulbe olfactif chez la souris (Abekhoukh et al., 2017). En effet, il a été montré par des expériences d'inactivation par shRNA (short-hairpin RNA) utilisant des vecteurs lentiviraux, que CYFIP1 et FMRP modulent toutes deux la signalisation mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), mais CYFIP1 agit sur la croissance des épines dendritiques tandis que FMRP agit sur leur déstabilisation, vraisemblablement par des voies indépendantes (Abekhoukh et al., 2017).

Concernant leur expression au niveau du cerveau, il a été récemment montré par single cell RNA-sequencing dans le cerveau de souris, que CYFIP1 s'exprime dans les neurones et les astrocytes alors que CYFIP2 est majoritairement exprimée que dans les neurones (Zhang et al., 2019).

## 3. La protéine SMN

La protéine SMN (Survival Motor Neuron) est codée par le gène *SMN1* qu'on retrouve très conservé au cours de l'évolution (Rochette et al., 2001). Elle est essentielle à l'assemblage de petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires du splicesome (snRNP U), grâce à son auto-oligomérisation suivie d'une interaction avec de petits ARN nucléaires (snRNA), des protéines Gemins 2-8 et des protéines Sm dans le cytoplasme formant un grand complexe macromoléculaire appelé complexe SMN (Li et al., 2014 ; So et al., 2016). Ce complexe est importé dans le noyau et l'assemblage final des snRNP a lieu dans les corps de Cajal (Cajal Bodies, CBs). La protéine SMN est localisée dans les dendrites et les axones (Carrel et al., 2006 ; Todd et al., 2010 ; Zhang et al., 2006), contribuant ainsi au trafic neuronal et à la traduction locale de transcrits (Rossol et al., 2002 ; Kye et al., 2014 ; Sanchez et al., 2013). Il a été montré que SMN et FMRP interagissent *in vitro* et dans des lignées cellulaires humaines de neuroblastomes SH-SY5Y ainsi que dans des lignées de motoneurones murins MN1. SMN et FMRP co-immunoprécipitent et colocalisent au niveau des granules cellulaires et SMN pourrait ainsi contribuer à la fonction neuronale de FMRP (Piazzon et al., 2008).

## 4. La protéine TDRD3

La protéine TDRD3 (TuDoR Domain-containing protein 3) est exprimée dans une variété de tissus avec une prédominance cytoplasmique indiquant une fonction dans les processus cellulaires de base. Elle interagit potentiellement avec FMRP via deux régions différentes (aa 216 à 332 au niveau des domaines KH et aa 430 à 486) (Linder et al., 2008). TDRD3 co-sédimente dans le cytoplasme avec FMRP lors de la traduction active des polyribosomes (Ahmad et al., 2017). TDRD3 lie également FXR1P et FXR2P (Linder et al., 2008).

Le rôle de FMRP dans la formation des granules de stress semble important (*voir partie « FMRP et les granules de stress »*). En effet dans des conditions de stress, FMRP se concentre dans ces granules et il a été montré que la surexpression de TDRD3 dans les cellules HeLa

(Henrietta Lacks) induisait la formation des granules de stress où elle co-localise avec FMRP (Goulet et al., 2008).

De manière intéressante, dans le cas de la mutation faux sens I304N, FMRP n'est plus capable de s'associer à TDRD3 suggérant l'importance du domaine KH2 dans cette association. De plus, cette perte d'association impacte la liaison aux ARNm, l'homodimérisation et la régulation de la traduction (Linder et al., 2008).

TDRD3 joue un rôle dans le recyclage des protéines par le système d'ubiquitine-protéasome. Stoll et al., ont proposé que TDRD3 permet d'intégrer à la fois FMRP et la topoisomérase TOP3β dans des mRNP cytoplasmiques (la délétion du gène *TOP3β* a été associé à la schizophrénie et à la déficience intellectuelle) (Stoll et al., 2014). L'association polyribosomique de TOP3β humain dépend de son partenaire, TDRD3, car la suppression de TDRD3 ou des mutations de ses domaines d'interaction protéique perturbent cette association (Stoll et al., 2014). Les données actuelles suggèrent que TDRD3 peut interagir avec plusieurs protéines de liaison à l'ARN par le biais de ses différents domaines de liaison aux protéines, tels que son domaine Tudor, le motif de liaison à FMRP et le motif EBM (exon-junction-complex-binding) (Ahmad et al., 2017). En absence de TDRD3, FMRP n'est plus présente dans les mRNP comportant TOP3β. TOP3β est une enzyme qui normalement contrôle la topologie de l'ADN durant la transcription, mais il a été montrée dans cette étude qu'elle agit également sur l'ARN, suggérant son implication dans le métabolisme des ARNm cibles de FMRP (Stoll et al., 2014). De plus, TOP3β agirait avec FMRP dans le processus de formation des synapses. En effet, Xu et al., ont montré que la formation des synapses était défectueuse chez la drosophile et la souris mutante pour TOP3β, comme ce qui a été observé chez les animaux mutants pour FMRP. Cela suggère que TOP3β agit comme une ARN topoisomérase s'associant avec FMRP pour favoriser l'expression des ARNm critiques pour le développement cérébral (Xu et al., 2013).

## 5. La protéine MSP58

La protéine MSP58 (MicroSpherule Protein 58 ; 58kDa) a été identifiée comme partenaire cellulaire de FMRP (Davidovic et al., 2006). Dans les cultures cellulaires non-neuronales, MSP58 est principalement présent dans le noyau où elle interagit avec l'isoforme nucléaire, ISO6 de FMRP (site de reconnaissance dans le domaine C-terminal de FMRP, entre les aa 490 et 526, contenant un domaine de phosphorylation pouvant moduler l'interaction MSP58-FMRP). Cependant, dans les neurones mais pas dans les cellules gliales, MSP58 est

également présent dans le compartiment cytoplasmique, ainsi que dans les neurites, où elle colocalise avec FMRP. MSP58 est proposée jouer un rôle dans la régulation de la transcription, cependant, elle est fortement présente au niveau du perikaryon des neurones et au niveau des synapses où elle co-localise avec FMRP. MSP58 est une protéine de liaisons aux ARN avec une forte affinité pour la structure G-quadruplex (*voir partie « Les sites de fixation de FMRP »*), et comme FMRP, elle est retrouvée présente au niveau des polyribosomes préparés à partir de synaptoneurosomes (Davidovic et al., 2006). La présence de MSP58 dans les polyribosomes au niveau de la synapse ainsi que sa capacité à se lier aux ARNm contenant un motif G-quadruplex, suggère qu'elle jouerait un rôle, avec FMRP et/ou d'autres interacteurs, dans le contrôle de la synthèse locale des protéines dans le développement et la maturation synaptiques (Davidovic et al., 2006).

## 6. La protéine NUFIP1

La protéine NUFIP (NUclear FMRP Interacting Protein) est une protéine nucléaire ayant un profil d'expression neuronale similaire à celui de FMRP avec une expression élevée dans les régions impliquées dans les fonctions cognitives (au niveau du cortex et de l'hippocampe). Cela suggère que l'interaction entre FMRP et NUFIP est pertinente pour la fonction neuronale *in vivo* (Bardoni et al., 1999 ; Bardoni et al., 2003a).

NUFIP a la capacité de lier les ARN in vitro, elle se localise à proximité des sites de transcription dans le noyau et elle pourrait ainsi être impliqué dans le métabolisme de l'ARN dans le noyau (Bardoni et al., 1999). Cette protéine interagit avec la région de FMRP comportant les exons 4 et 5 (résidus 66 à 134), mais elle ne se fixe pas aux protéines FXR1P et FXR2P (Bardoni et al., 2003a). De plus, NUFIP colocalise avec les isoformes nucléaires de FMRP. Elle possède un domaine à doigt de zinc (C2H2, cystéine2 histidine2), une séquence NLS et une séquence NES, et fait la navette entre le noyau et le cytoplasme. Dans les neurones, elle est présente au niveau du réticulum endoplasmique et des synaptoneurosomes en association avec les ribosomes. Étant donné que les sites nucléaires NUFIP1 sont distincts des sites d'ARN naissant cela suggère que NUFIP1 pourrait être impliqué dans les premières étapes qui suivent la synthèse de l'ARNm, telles que les étapes de stockage ou de maturation initiale (Bardoni et al., 2003a). L'interaction entre NUFIP1 et FMRP, ainsi que la présence d'une partie du pool de protéines NUFIP1 dans le cytoplasme (notamment dans les cellules de Purkinje), suggèrent également que la fonction NUFIP1 est liée au processus d'exportation d'ARNm du noyau (Bardoni et al., 2003a). La localisation de NUFIP1 ne semble pas altérée en absence de

FMRP, confirmant ainsi que l'activité de navette de NUFIP1 est indépendante de FMRP, de plus NUFIP1 possède sa propre séquence signale NES ce qui suggère que son activité de navette peut être indépendante de FMRP (Bardoni et al., 2003a).

Concernant les fonctions de NUFIP1, Boulon et al., ont montré en 2008 que NUFIP1 fait partie d'un complexe d'assemblage des particules ribonucléprotéiques, composés lui-même de différentes protéines, impliquant une chaperone HSP90 (heat shock protein 90) et des protéines de la famille L7Ae (retrouvées dans les snoRNP lors de la biogenèse des ribosomes) et les snRNP lors de l'épissage) (Boulon et al., 2008). NUFIP1 est également indispensable pour l'activité de l'ARN polymérase II responsable de la transcription des ARNm (Cloutier et Coulombe, 2010). Plus récemment, NUFIP1 a été montré possédant plusieurs propriétés dans le mécanisme de ribophagie, un processus de dégradation des ribosomes induit par une carence en nutriments (Wyant et al., 2018). Dans des conditions de carence, la traduction dans la cellule est arrêtée, laissant de nombreux ribosomes inactifs. Les deux sous-unités du ribosome sont beaucoup plus sensibles aux ribonucléases (RNases) qu'un ribosome intact et seront la cible des mécanismes de ribophagie. NUFIP1 a plusieurs propriétés suggérant qu'elle fonctionne comme un récepteur d'autophagie pour les ribosomes pendant la ribophagie induite par la carence en nutriments (starvation-induced autophagy), elle lie la protéine LC3B (Light chain 3B, protéine associée aux microtubules ayant un rôle central dans l'autophagie) ainsi que les ribosomes. Un mutant de la protéine NUFIP1 exprimé dans les cellules HEK293 (Human embryonic kidney 293, lignée cellulaire de rein embryonnaire humain) ne se lie pas à la protéine LC3B et ne peut pas donc pas agir dans le mécanisme de dégradation ribosomale lors de l'induction de l'autophagie (Wyant et al., 2018).

## 7. La protéine 82-FIP

Par criblage double hybrides suivi de pull-down et d'immunoprécipitation, l'équipe de Barbara Bardoni a identifié une autre protéine interagissant avec les exons 4 et 5 de la protéine FMRP (résidus 66 à 134) comme la protéine NUFIP1, nommée 82-FIP (82 kDa FMRP Interacting Protein) (Bardoni et al., 2003b). 82-FIP, tout comme NUFIP1, malgré la forte homologie de séquences existant entre les protéines FXR, ne se fixe pas aux protéines FXR1P et FXR2P (Bardoni et al., 2003b). 82-FIP et FMRP interagissent *in vitro* et *in vivo* et sont toutes deux localisées dans des complexes mRNP (messenger ribonucleoprotein) contenant FMRP associé à des polyribosomes (Bardoni et al., 2003b). Au niveau du cerveau, la distribution de 82-FIP est similaire à celle de FMRP, et elle peut également faire la navette entre le noyau et le

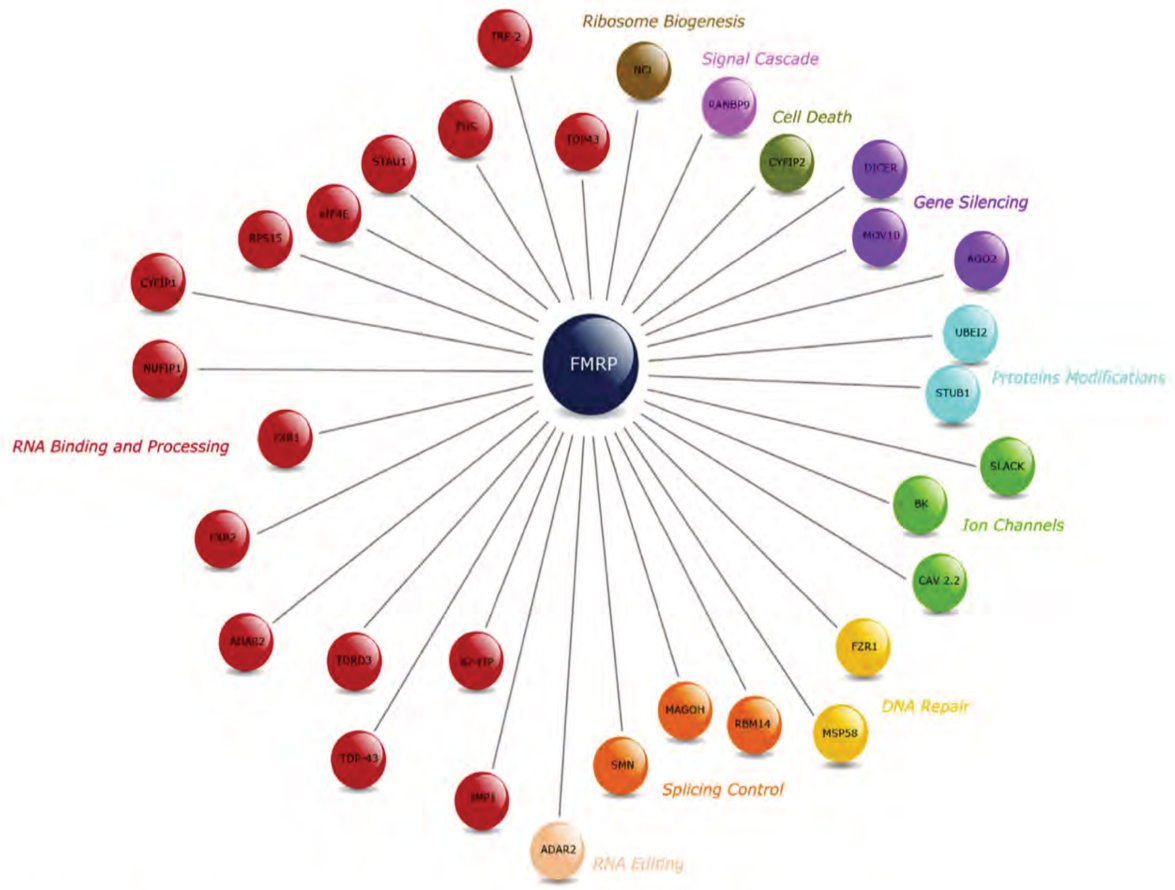



**Figure 18: Identification des partenaires moléculaires de FMRP**

Les interactions représentées proviennent du serveur Web GeneMANIA et sont filtrées afin de ne conserver que celles pour lesquelles une liaison physique a été prouvée expérimentalement, issu de d'Annessa, 2019.

cytoplasme. Mais au niveau cellulaire, d'après les résultats obtenus par l'équipe de Barbara Bardoni, 82-FIP possède une distribution dépendante du cycle cellulaire, on la retrouve cytoplasmique durant les phases G2/M (Gap2/Mitose) et s'accumule au niveau du noyau durant la phase G1(Gap1). La fonction exacte de 82-FIP n'est pas déterminée mais sa localisation nucléaire pourrait être liée au métabolisme de l'ARN spécifique à ce compartiment cellulaire (maturation, stockage, assemblage de mRNP). Elle peut lier les séquences ARN polyG *in vitro*, tout comme FMRP, ainsi que les polysomes suggérant qu'elle pourrait avoir une certaine affinité pour les ARNm locaux et par conséquent un rôle dans le développement du système nerveux et dans les fonctions cognitives (Bardoni et al., 2003b).

La liste établie ici des protéines rapportées interagissant avec FMRP n'est pas exhaustive (**Figure 18**). De nombreuses interactions ont été décrites ces dernières années, suggérant que FMRP est un acteur clé dans de nombreux processus cellulaires. Sa présence au sein de vaste complexes mRNP et ses divers domaines d'interaction semble lui donner accès à un vaste champ d'interacteurs. La question des interactions qui sont les plus importantes pour sa fonction neuronale dans la pathologie du FXS reste donc très ouverte.

## V. Les fonctions et mécanismes de régulation de FMRP

FMRP est canoniquement définie comme un régulateur de la traduction se liant à un grand nombre de cibles ARNm et agissant sur eux généralement comme répresseur (Davis et Broadie, 2018). Dans cette partie, je vais décrire les rôles les mieux caractérisés de FMRP, même si de nombreuses autres fonctions ont été proposées par la suite (Davis et Brodie, 2018).

### 1. FMRP et les complexes ribonucléoprotéiques

FMRP est une protéine de liaison aux ARNm interagissant avec de nombreux partenaires protéiques dans des complexes RNP présents à différents endroits de la cellule. Il est important de rappeler que FMRP est une protéine essentiellement cytoplasmique mais qu'elle a des capacités à faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Eberhart et al., 1996 ; Bardoni et al., 1997). Un modèle bien établi suggère que FMRP entre dans le noyau pour se fixer sur ses ARNm cibles pour ensuite les accompagner dans le cytoplasme (Eberhart et al., 1996). Le transport de FMRP dépendrait de sa fixation aux ARNm selon l'observation d'une

accumulation de protéine GFP-FMRP (GFP, green fluorescent protein) au niveau du noyau après l'utilisation d'ARN interférent contre le facteur d'export Tap/NXF1 (Nuclear eXport Factor 1) des ARNm (Kim et al., 2009b). Ce phénomène est d'autant plus marqué lorsque le signal d'export nucléaire de FMRP est délété. De plus, Tap/NXF1 co-immunoprécipite avec FMRP d'une manière ARN dépendante.

Par ailleurs, FMRP est montrée associée aux ARN naissants au niveau des sites actifs de transcription des « lampbrush chromosomes (LBC)» dans les ovocytes d'amphibiens. Les lampbrush chromosomes sont des structures transitoires qui existent pendant le stade diplotène de la première division méiotique dans les gamétocytes femelles de la plupart des animaux, à l'exception des mammifères (Kim et al., 2009).

En 2013, Durry et al., ont montré que les isoformes ISO6 et 12 de FMRP sont présentes au niveau des Cajal Bodies, qui sont les lieux d'assemblage et de maturation des complexes RNP. Ces observations suggèrent des fonctions spécifiques pour les isoformes nucléaires mineurs dans le contrôle post-transcriptionnel des ARN (Dury et al., 2013).

## 2. FMRP et les polyribosomes (ou polysomes)

En 1996, Tamanini et al., ont observé que FMRP était présente dans un complexe de poids moléculaire supérieur à 600 kDa dans des cellules lymphoblastoïdes humaines, dont elle se dissocie à forte concentration ionique ou par un traitement aux RNases (Tamanini et al., 1996). Ce complexe correspond aux polyribosomes avec lesquels FMRP co-sédimente après ultracentrifugation sur gradient de sucrose (Khandjian et al., 1996). FMRP a été proposé interagir via les exons 13 et 14 avec la grande sous-unité du ribosome 60S où elle est essentiellement présente (Khandjian et al., 1996 ; Siomi et al., 1996). Une parfaite co-localisation entre FMRP et les polyribosomes cytoplasmiques est visible en immunofluorescence (Khandjian et al., 1996), et il a été également montré par microscopie immuno-électronique que FMRP est associée aux polysomes libres et à ceux attachés à la membrane du réticulum endoplasmique (Willemsen et al., 1996). Au niveau des neurones, FMRP a été également montrée s'associer aux polysomes dans le perikaryon et dans les préparations de synaptoneurosomes (Feng et al., 1997b ; Khandjian et al., 2004 ; Stefani et al., 2004 ; Davidovic et al., 2005). Cette association aux polysomes est sensible au traitement à la puromycine (antibiotique nucléosidique qui a pour effet d'inhiber la biosynthèse des protéines en mimant l'extrémité 3' d'un aminoacyl-ARNt) ce qui provoque l'arrêt anticipé de la traduction de l'ARN messager par le ribosome qui induit un arrêt prématuré de la traduction indiquant que

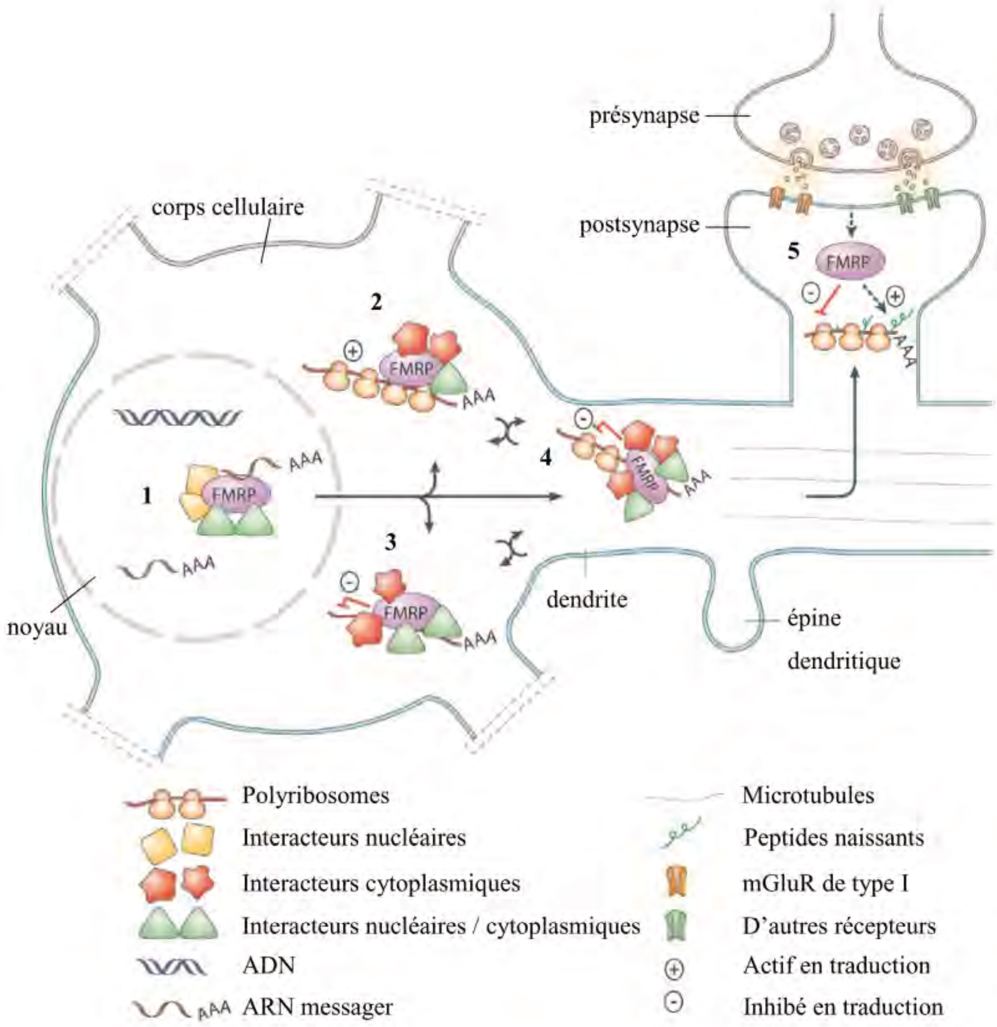



**Figure 19: Modèle du rôle de FMRP dans les neurones**

(1) FMRP s'associe aux ARNm dans un complexe mRNP au niveau du noyau. (2) une fois transportée vers le cytoplasme, FMRP s'associe aux polyribosomes actifs en traduction. (3) durant un stress cellulaire, FMRP est basculée vers les granules de stress inhibés en traduction. (4) FMRP est également présente dans des granules neuronaux où elle est proposée reconnaître un ensemble d'ARNm spécifiques, d'inhiber leur traduction et d'agir sur le transport de ces particules vers les compartiments post-synaptiques. (5) au niveau des synapses, FMRP régulerait la traduction locale de ses ARNm en réponse à l'activité des mGluR-I.

FMRP est associée aux polysomes fonctionnels dans les neurones (Stefani et al., 2004). Dans les cellules dérivées d'un patient avec la mutation FMRP-I304N, l'interaction avec les polysomes actifs en traduction est abolie ce qui indique que la fonctionne normale de FMRP est dépendante de cette association (Feng et al., 1997a).

En plus de réguler la traduction par de multiples mécanismes, FMRP est proposée réguler la formation et le transport de granules de mRNP des granules d'ARN, y compris les granules de transport d'ARNm (appelés également granules neuronaux ; GN), les granules X fragile, les Processing-bodies (P-bodies) et les granules de stress (GS). La régulation de la formation de granules de mRNP est nécessaire pour le transport et la localisation d'espèces spécifiques d'ARNm dans les sites post-synaptiques. Nous allons voir plus en détails le rôle de FMRP dans ces différents granules (**Figure 19**).

## 3. Les granules de stress (GS)

FMRP a été identifiée favoriser la formation des granules de stress (GS). Les GS sont des assemblages ribonucléoprotéiques sans membrane qui se forment pendant un stress cellulaire (Protter et Parker, 2016). Par exemple, à la suite d'un choc thermique, une diminution de 90 % du taux de la synthèse protéique est immédiatement observée (Duncan et Hershey, 1989). Cette baisse est la conséquence d'une diminution du nombre de polyribosomes faisant suite à un arrêt de la traduction et une réorganisation des mRNP. La majorité des ARNm cellulaires, à l'exception des ARNm codants pour les protéines de choc thermique, quitte les polysomes pour intégrer les GS dans lesquels ils sont réprimés en phase pré-initiation (43S) (Anderson et Kedersha, 2002), indiquant le rôle des GS dans la régulation de la synthèse protéique. Les GS sont des structures dynamiques avec des entrées et sorties rapides de différents facteurs les constituants (FASTK : Fas-activated serine/threonine kinase, XRN1 : 5'-3' exoribonuclease 1, TTP : Tristetraprolin, G3BP : Ras GTPase-activating protein-binding protein, PABP-1 : Polyadenylate-binding protein) (Kedersha et al., 2005). L'émétine ou la cycloheximide altèrent la stabilisation des polyribosomes et inhibent l'assemblage des GS tandis que la puromycine les déstabilise en stimulant leur assemblage (Kedersha et al., 2000). La moitié du cœur protéique des GS est composé de RBP (RNA Binding Protein). En 2002, Mazroui et al., ont montré, après un choc thermique ou après la surexpression de FMRP dans des cultures de fibroblastes, que FMRP est présente dans les GS (Mazroui et al., 2002). En 2006, Kim et al., ont montré que FMRP est présente dans les GS des hippocampes de souris traitées à l'arsenite par immunopurification de la protéine TIA1 (T-cell Intracellular Antigen 1 ; composant

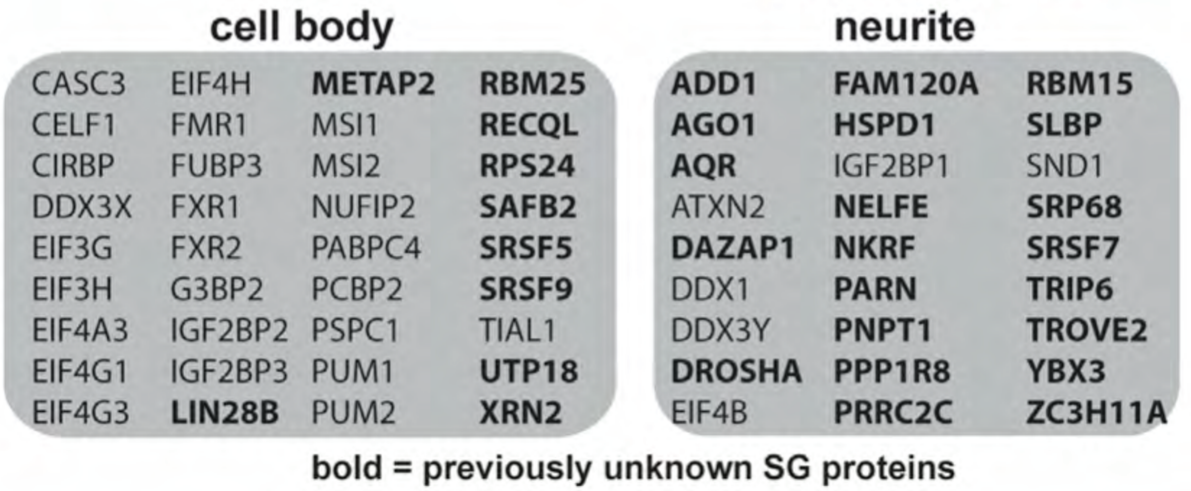



**Figure 20: Composition et distribution cellulaire des granules de stress**

La composition des granules de stress et la distribution subcellulaire sont modifiées dans les iPS-MN (moto-neuron) dérivés de la SLA (sclérose latéral amyotrophique). Vue d'ensemble des RBP dont la localisation dans les iPS-MN non stressés est soit limitée au corps cellulaire, soit se prolonge dans les projections neuronales. Issu de Markmiller et al., 2018.

essentiel des GS et marqueur de stress cellulaire) (Kim et al., 2006). Ils ont montré également *in vivo* chez des souris, que FMRP quitte les polyribosomes pour intégrer les GS après induction mécanique de lésions neuronales avec des électrodes placée dans le gyrus denté et l'hippocampe (Kim et al., 2006).

La composition protéique/ARN des GS varie selon le type de stress et la localisation cellulaire. Par exemple dans les GS neuronaux, la composition varie entre les dendrites, le soma ou encore les axones (Markemiller et al., 2018) (**Figure 20**). Il a été montré que l'induction d'un stress oxydatif dans des cellules PC12 (modèle de neurones parasympatiques) provoque la formation de GS comportant FMRP à la fois dans le soma et les neurites (Dolzhanskaya et al., 2006a).

La contribution essentielle de FMRP dans la formation des GS a été évalué en 2009, par Didiot et al., en testant la capacité des fibroblastes immortalisés à partir de souris *Fmr1*-KO à former des GS après un traitement à l'arsenite. Contrairement aux fibroblastes transfectés avec l'ISO7-FMRP, les fibroblastes ne comportant pas FMRP montrent une réduction significative de la formation des GS. Une réduction est également observée pour les cellules lymphocytaires de patient porteur de la mutation FMRP-I304N (Didiot et al., 2009).

Les processus de formation des GS, leur composition et le rôle de FMRP dans ces derniers a commencé à être étudié. Lorsqu'un ensemble de molécules forment un réseau dense d'interactions faibles dans une cellule, cela va permettre à ces molécules de se regrouper dans une même phase homogène dépendant de l'environnement (pH, température) permettant une cohésion moléculaire au niveau des molécules présentes dans cet amas (Alberti et al., 2019). Les GS, tout comme les granules de mRNP sont assemblés sous forme d'organites sans membrane dans les neurones par séparation de phase liquide-liquide (LLPS) (Gomes et Sharter, 2018). La dynamique d'assemblage et désassemblage des GS est vraisemblablement sujette à de nombreuses activités de modifications post traductionnelles (MPT) comme des phosphorylations, des glycosylations, des méthylations de ces composants. Récemment, il a été montré que la phosphorylation de FMRP et CAPRIN-1 (cell cycle associated protein 1) jouait un rôle dans le contrôle de la séparation de phases avec l'ARN et modulait l'architecture des GS (Kim et al., 2019). Dans une autre étude, Valdez-Sinon et al., se sont intéressés à CDH1 codant pour la Cadhérine E, connue comme l'unité régulatrice du complexe de l'ubiquitine ligase E3 (Cdh1-APC (Cadherin-1-anaphase-promoting complex)) impliquée dans la régulation de l'apprentissage et la mémoire. L'analyse protéomique a révélé que Cdh1-APC interagissait avec des régulateurs connus de la traduction, y compris les protéines des granules de stress. L'inhibition de l'activité par Cdh1-APC provoque une augmentation de la formation de granules

de stress dépendant de FMRP. Ils proposent donc un modèle dans lequel Cdh1-APC cible FMRP, et inhibe la formation de granules de stress, conduisant à l'activation de la synthèse protéique. Le mécanisme par lequel Cdh1-APC ubiquitinyle FMRP et affecte sa capacité à former des GS reste encore incompris (Valdez-Sinon et al., 2020).

L'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle de FMRP dans l'assemblage de ces granules. De manière intéressante, FXR1P et FXR2P sont quant à eux également décris comme étant présents dans les GS (Gareau et al., 2013 ; Herman et al., 2019).

## 4. Les granules neuronaux (GN)

Les ARNm peuvent être dirigés vers différents compartiments pour y être stockés ou traduits. C'est en particulier le cas pour les neurones qui sont de grandes cellules. Certaines protéines ne vont être produites qu'au niveau de la synapse, de l'axone ou des dendrites, c'est donc pour cela que leur ARNm sera transporté de manière active jusqu'à celles-ci pour y être traduit (Job et Eberwine, 2001). Cet adressage des ARNm est donc un phénomène fondamental. En effet, il est essentiel pour la plasticité synaptique et le développement neuronal (Buffington et al., 2014 ; Triller et Sheng, 2012). Plusieurs études ont montré que les ARNm sont transportés dans les dendrites et les axones neuronaux sous forme de granules mRNP contenant les ARNm, des protéines de liaison à l'ARN, des facteurs de traduction et des ribosomes (Glock et al., 2017 ; Pilaz et Silver, 2017). Une étude de séquençage d'ARN à haut-débit du neuropile de l'hippocampe (constitué de l'ensemble des connexions neuritiques de cette région) a permis d'identifier plus de 2500 ARNm (Cajigas et al., 2012). La traduction locale de ces ARN dans les dendrites peut intervenir dans la plasticité synaptique et participer aux changements à long terme de la force synaptique. Le transport des ARN débute par la formation de particules RNP dans les GN où la traduction est inhibée (Krichevsky et Kosik, 2001). Ces cargos sont pris en charge par des protéines motrices du cytosquelette, telles que les kinésines et les dynéines cytoplasmiques pour le transport à longue distance le long des microtubules axonaux et dendritiques et, dans certains cas grâce aux moteurs à myosine pour le transport le long des filaments d'actine (Hirokawa et Tanaka, 2015 ; Xiao et al., 2016). Les kinésines facilitent principalement le transport des ARNm dans le sens antérograde (Gagnon et Mowry, 2011 ; Lim et al., 2017). En revanche, les dynéines facilitent principalement le transport rétrograde, mais elles peuvent également moduler le transport antérograde de mRNP spécifiques dans certains systèmes cellulaires (Ayloo et al., 2017 ; Herbert et al., 2017). Aux niveaux des synapses, les ARN sont relâchés et traduits en réponse à une stimulation synaptique (Krichevsky et Kosik,

2001). La dépolarisation induit une réorganisation des GN avec un passage des ARN vers les polysomes actifs en traduction (Krichevsky et Kosik, 2001). Le transport directionnel des granules de mRNP est réalisé par des interactions complexes entre les ARNm, les RBP, les adaptateurs et les protéines motrices (Buxbaum et al., 2015 ; Rezaul et al., 2016). Les RBP se lient aux éléments agissant en *CIS* des ARNm et peuvent agir comme des adaptateurs directs ou indirects pour recruter des protéines motrices afin de cibler les mRNP.

L'étude de la composition de ces GN a mis en évidence de nombreuses protéines. Des protéines impliquées dans le transport des ARNm (Staufen, Pur α et β), des protéines de la traduction (eIF2α : Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha et la protéine ribosomique L3) et des ARNm dendritiques (Camk2a : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain, et Arc : Activity-regulated cytoskeleton-associated protein) (Kanai et al., 2004). Parmi ces protéines, la famille des FXR protéines a été identifiée. De même, la purification de GN par fractionnement subcellulaire à partir de cerveaux de souris (E18) a confirmé la présence de FMRP dans ces granules avec d'autres protéines de liaison aux ARN et des protéines ribosomiques (Elvira et al., 2006).

Par ailleurs, notons qu'il existerait d'autres particules d'ARN de transport distinctes des GN. Ces particules de transport ne contiendraient pas un ribosome complet mais seulement la petite sous-unité du ribosome (d'où l'appellation particules de transport et non pas granule), suggérant que la traduction est bloquée à l'étape d'initiation (Sossin et DesGroseillers, 2006). FMRP semblerait être présente dans les deux types de granules. Cependant, les différences entre ces différents granules d'ARN de transport, dans les neurones, restent incompris. Le rôle exact de FMRP dans les GN est proposé sélectionner des ARN dendritiques au niveau du corps cellulaire des neurones pour former ces granules, réprimer la traduction de ces ARN et réguler leur transport vers les synapses. Ce modèle d'action de FMRP sur le transport et la régulation de la traduction des ARNm neuronaux est basé sur différentes observations. La majorité de la proportion de FMRP est associée aux polysomes au niveau du corps cellulaire, alors que seulement 10% de la protéine totale est retrouvée associée aux microtubules, dans des particules mRNP ne comportant pas de ribosomes fonctionnels (Wang et al., 2008). Les kinésines KIF3C (Kinesin-like protein KIF3C) et KIF5 (Kinesin-related protein 5) ont été identifiées comme partenaires de FMRP, faisant de FMRP un intermédiaire potentiel entre un cargo d'ARN et les protéines motrices associées aux microtubules (Davidovic et al., 2007 ; Dictenberg et al., 2008). FMRP recrute KIF5 pour faciliter le transport des ARNm dendritiques vers des emplacements appropriés (Dictenberg et al., 2008).

Depuis plusieurs années, de nombreux partenaires de FMRP au niveau des GN ont été mis en évidence. En 2019, Chu et al., se sont intéressés à TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) et FMRP, toutes deux connues pour réguler le transport spatio-temporel et la traduction des ARNm dendritiques. Une altération fonctionnelle de l'une ou l'autre a été liée à des troubles neurodégénératifs et neurodéveloppementaux (SLA, sclérose latérale amyotrophique pour la TDP-43 et le FXS pour FMRP) (Ferro et al., 2018 ; Richter et al., 2015 ; Chu et al., 2019). Dans cette étude, à l'aide des techniques de « live cell imaging » (microscopie en temps réel), d'immunofluoresence et de « TRICK reporter RNA » (système d'ARN rapporteur permettant de suivre simultanément les trajectoires des granules de mRNP mobiles et analyser la distribution des granules dans les dendrites (Halstead et al., 2015)) dans des neurones pyramidaux et hippocampiques, TDP-43 a été montré coopérer avec FMRP et Staufen 1 pour réguler le transport spatio-temporel d'un sous-ensemble d'ARNm dendritiques. Plus précisément, TDP-43 facilite le transport antérograde des granules Rac1 et probablement d'autres granules mRNP dans les processus neuronaux en coopérant avec FMRP pour recruter la kinésine1 dans ces granules (Chu et al., 2019). Une mauvaise régulation du transport et de la traduction de l'ARNm dans les processus neuronaux est étroitement associée aux maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives, dont beaucoup sont soutenues par des mutations et / ou une mauvaise expression de TDP-43 ou FMRP (Jovicic et Gitler, 2014 ; Maziuk et al., 2017).

FMRP est présente au niveau des épines dendritiques des neurones hippocampiques et cette présence est augmentée après activation des récepteurs mGluR-I, par l'agoniste spécifique DHPG ((S)-3,5-DiHydroxyPhenylGlycine) (Antar et al., 2004 ; Antar et al., 2005). Le transport des particules associées à FMRP dans les dendrites a été montré être bidirectionnel et dynamique avec une cinétique mesurée par microscopie en temps réel de l'ordre de 1.8 µm/s, (Dictenberg et al., 2008 ; Wang et al., 2008). Plusieurs études n'ont montré aucune altération de la localisation de différents transcrits cibles en absence de FMRP dans un état non-stimulé des neurones (Steward et al., 1998 ; Muddashetty et al., 2007 ; Dictenberg et al., 2008 ; Subramanian et al., 2011). Cependant, après activation des mGluR-I la stimulation du transport d'ARNm proposés cibles de FMRP (Map1b : Microtubule-associated protein 1B, Camk2a, Rgs-5 : Regulator of G-protein signaling 5 et d'autres) est en partie perdue dans les neurones *Fmr1*-KO (Dictenberg et al., 2008) suggérant que FMRP contribue à l'efficacité de transport des ARNm. Au laboratoire, l'équipe a montré que deux ARNm, proposés comme cibles de FMRP (Psd95 et Camk2a), sont transportés via une structure G-quadruplex (*voir partie « Les sites de fixation de FMRP »*) correspondant au site de fixation de FMRP (Subramanian et al.,

2011). Notre équipe a montré que la structure G-quadruplex a été identifiée comme un élément agissant en *CIS* sur le transport de l'ARN vers les neurites. Toutefois, le rôle de FMRP dans ce transport est montré, encore une fois, être subtil. Bien que des ARNm comportant une structure G-quadruplex sont transportés de la même manière en présence et en absence de FMRP dans des neurones non-stimulés, la stimulation de leur transport par l'activation mGluR-I est diminuée en absence de FMRP, mais le transport n'est pas aboli.

Ces différentes données suggèrent que le transport des ARNm, lorsque les neurones ne sont pas stimulés, ne dépend pas de FMRP mais nécessiterait l'intervention d'autres protéines de liaison aux ARN. Au niveau synaptique, FMRP est présente à la fois dans les compartiments pré- et post- synaptiques (Feng et al., 1997b ; Antar et al., 2004 ; Christie et al., 2009 ; Akins et al., 2012). Son ARNm est également localisé au niveau des synapses, et FMRP est traduite localement après activation des récepteurs mGluR-I (Weiler et al., 1997 ; Antar et al., 2004). FMRP est proposée réguler la traduction locale des ARNm importants pour la plasticité synaptique. En absence de FMRP, dans les préparations de synaptoneurosomes de cerveau de souris *Fmr1*-KO, la traduction locale activée par les récepteurs mGluR-I n'est pas induite (Weiler et al., 2004).

## 5. Les granules X fragile

L'observation de « granules X fragile » (FXG) contenant FMRP, FXR1P et FXR2P dans le compartiment présynaptique axonal suggère un rôle physiologique pour les protéines X fragile dans la régulation du protéome axonal (Antar et al., 2006 ; Akins et al., 2012). En dépit de l'appellation de FXG faite par ces auteurs pour décrire ces granules présynaptiques, il n'est pas clair si ces granules constituent une classe distincte des autres GN. La répression de la traduction par FMRP se produit majoritairement au niveau post-synaptique mais la présence de ces FXG dans le compartiment pré-synaptique axonal suggère un rôle répresseur des FXRP également à cet endroit (Chyung et al., 2019). La caractérisation protéique de ces FXG a permis de mettre en évidence une expression des FXRP différente selon les régions du cerveau observées (Darnell et al., 2011 ; Antar et al., 2006 ; Christie et al., 2009 ; Chyung et al., 2019). Par exemple, la majorité des FXG hippocampiques sont composés de FXR2P et FMRP tandis que les FXG du cortex frontal contiennent les trois protéines X fragile (Christie et al., 2009). Les FXG ont longtemps été associé à la période de développement chez la souris, une période nécessitant une intense plasticité synaptique (Christie et al., 2009). Mais récemment, les FXG ont été identifiés dans l'hippocampe chez l'Homme et chez la souris adulte suggérant ainsi leur

implication tout au long de la vie (Akins et al., 2017). Des sous-unités ribosomiques sont retrouvées associé aux FXG dans plusieurs régions du cerveau et notamment dans l'hippocampe, le cortex moteur et le bulbe olfactif (Akins et al., 2017). En plus des sous-unités ribosomiques, plusieurs ARNm cibles de FMRP connus comme Omp, Map1b ou encore la β-caténine ont été observés colocalisant avec les FXG (Akins et al., 2017). La diversité des ARNm associés aux FXG est également région du cerveau dépendante (Chyung et al., 2019 ; Akins et al., 2017) ce qui suggère un contrôle spatio-temporel de la synthèse protéique dans le compartiment pré-synaptique axonal par les FXG (Akins et al., 2017).

## 6. Les P-bodies

Les P-bodies (processing-bodies) sont des granules d'ARN où la traduction des ARNm est réprimée et leur dégradation favorisée par la voie des miARN (Zhang et al., 2001). Les P-bodies sont des structures hautement conservées et observées dans des cellules somatiques de vertébrés, d'invertébrés, de plantes et de levures. Les P-bodies jouent des rôles fondamentaux dans la dégradation générale des ARNm (Kulkarni et al., 2010) mais tous les ARNm qui entrent dans les P-bodies ne sont pas dégradés, il a été démontré que certains ARNm peuvent sortir des P-bodies et être traduit (Brengues et al., 2005 ; Bhattacharya et al., 2006). La purification et le séquençage des ARNm contenus dans les P-bodies a montré que ces ARNm sont en grande partie réprimés en amont de l'initiation de la traduction et sont protégés de la dégradation au niveau de la région 5 ' (Hubstenberger et al., 2017). Les P-bodies ont plusieurs rôles dont la dégradation des ARNm indésirables (Sheth et al., 2003), le stockage de l'ARNm jusqu'à ce qu'il soit nécessaire pour la traduction et l'aide à la répression traductionnelle par les miARN (Hubstenberger et al., 2017). Dans les neurones, les P-bodies se déplacent grâce aux protéines motrices en réponse à la stimulation neuronale (Cougot et al., 2008). L'association de FMRP au complexe de « silencing » induit par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex), un composant intégral du « silencing » guidé par les miARN, a permis de proposer que FMRP aurait un rôle dans la formation de ces granules et dans la répression de la traduction via son interaction avec d'autres RBP (Jin et al., 2004 ; Muddashetty et al., 2011). Cependant, dans les cellules non-neuronales FMRP ne colocalise pas dans les P-bodies (Didiot et al., 2009) et dans les neurones une telle localisation n'a pas été montrée. Les P-bodies sont des sites où les ARNm soumis à l'action d'un si (small interfering) ou miARN (microARN) s'accumulent mais l'absence de FMRP n'a pas d'influence sur la présence de ces structures ni sur l'efficacité

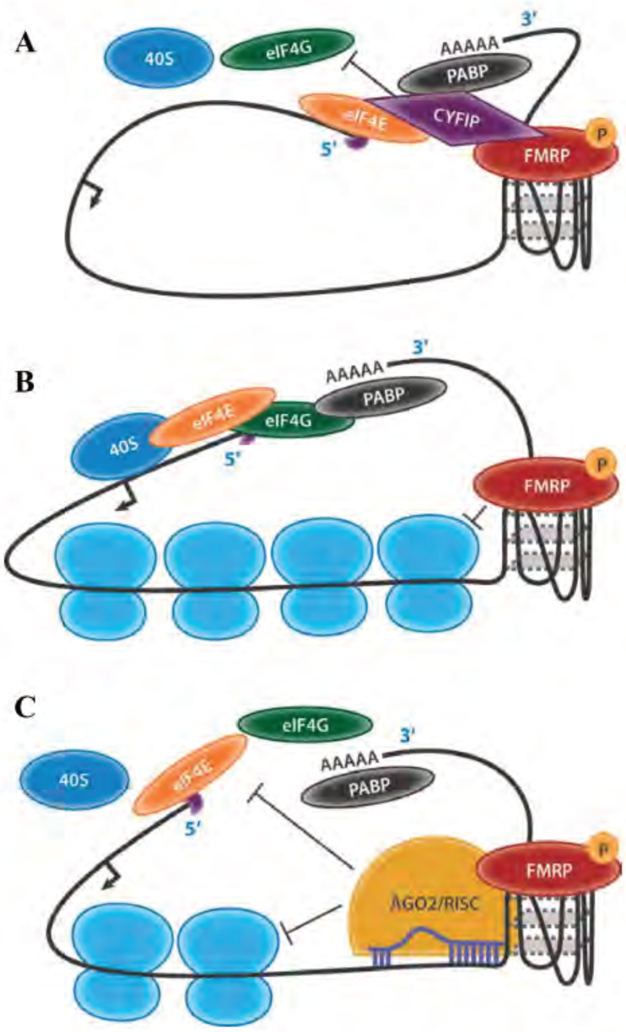



**Figure 21: Modèles d'inhibition de la traduction par FMRP**

(A) FMRP recrute CYFIP1 au niveau de la région 5'UTR pour bloquer la formation du complexe eIF4A-eIF4G-eIF4E (eIF4F) et inhiber l'initiation de la traduction. (B) FMRP provoque l'arrêt du ribosome durant l'étape de l'élongation de la traduction. (C) FMRP recrute le complexe d'ARN interférence RISC pour inhiber l'initiation ou l'élongation de la traduction, adapté de Santoro et al., 2011.

d'action d'un si ou miARN (Didiot et al., 2009). La relation entre FMRP et ces structures demeure incomprise.

## VI. Les mécanismes de répression de la traduction par FMRP

Différentes fonctions ont été attribuées à FMRP à ce jour : la régulation de différentes étapes de la traduction (Darnell et al., 2011), la régulation du transport et de la localisation ou encore de la stabilité des ARNm, le contrôle de canaux ioniques, la stabilité du génome, l'editing, mais la fonction la plus étudiée est la répression de la traduction d'ARNm spécifiques au niveau des synapses (Bassell et al., 2008). La traduction est un processus complexe de synthèse des protéines par les ribosomes à partir de l'information génétique contenue dans les ARNm. L'ARNm est utilisé comme une plateforme d'assemblage pour le ribosome durant l'étape d'initiation. Puis, il sert de matrice pour la biosynthèse des protéines durant la phase d'élongation. Enfin il spécifie l'arrêt de la synthèse au niveau du signal d'arrêt de la traduction durant la phase de terminaison. L'étape d'initiation est certainement la plus complexe et la plus régulée. Chez les eucaryotes, l'initiation implique une cascade d'événements moléculaires avec de nombreux partenaires protéiques et nucléiques. Le mécanisme est initié à l'extrémité 5' de l'ARNm avec la reconnaissance de la coiffe (5'm7Gppp-) par le complexe d'initiation eIF4F (composé de 3 facteurs d'initiation : eIF4E, eIF4G et eIF4A : Eukaryotic translation initiation factor 4E,4G,4A). Ces étapes permettent de recruter la petite sous-unité ribosomique activée 43S au niveau de l'extrémité 5'. Une fois recrutée, la particule 43S se déplace sur l'ARNm jusqu'au premier codon AUG où la sous-unité 60S est ensuite recrutée pour former un ribosome 80S fonctionnel (Hernandez et al., 2009 ; Sonenberg et Hinnebusch, 2009). En absence de FMRP, il y a un excès de traduction basale et une perte d'activation de traduction induite par une activation neuronale dans les épines dendritiques (Ifrim et al., 2015). FMRP est proposée agir seule (Darnell et al., 2011) ou en association à des miARN et au complexe RISC (Jin et al., 2004 ; Muddashetty et al., 2011) ou encore aux protéines CYFIP1 et eIF4E (4E-BP) (Napoli et al., 2008). Je vais décrire dans cette partie, les différents mécanismes de répression de la traduction proposés pour FMRP (**Figure 21**).

## 1. Inhibition de l'initiation de la traduction par recrutement de CYFIP1

FMRP a été proposée inhiber la traduction coiffe-dépendante en formant un complexe de répression de la traduction des mRNP avec la protéine CYFIP1 et le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (4E-BP). Le complexe FMRP-CYFIP1 a été proposé inhiber l'initiation en se liant à eIF4E (Napoli et al., 2008). De précédentes études ont montré que la réduction génétique des niveaux de CYFIP1 dans les neurones de souris augmentait le niveau de protéines codées par des ARNm cibles de FMRP, y compris Map1b, Camk2a et App (Napoli et al., 2008). Cette interaction de CYFIP1 avec eIF4E est modulée en fonction de la signalisation des mGluR-I (Napoli et al., 2008). Après activation des mGluR-I à l'aide d'un traitement au DHPG dans des préparations de synaptoneurosomes, le complexe se dissocie pour permettre la traduction. Ces données ont permis de proposer un modèle dans lequel FMRP recruterait CYFIP1 sur des ARNm spécifiques, lui permettant d'interagir avec eIF4E afin d'inhiber l'initiation de la traduction. Chez les souris *Fmr1*-KO, la liaison eIF4E-eIF4G et la phosphorylation d'eIF4E sont toutes deux augmentées (Ronesi et al., 2012 ; Gkogkas et al., 2014). Ensemble, ces observations suggèrent que FMRP régule à la fois l'initiation par des mécanismes directs et indirects. De plus, l'activation pharmacologique de la traduction locale en utilisant le DHPG montre une réduction du niveau d'eIF4E associé au complexe CYFIP1/FMRP. L'association eIF4E/CYFIP1 serait donc inversement corrélé à la traduction (Napoli et al., 2008).

## 2. Inhibition de la traduction par blocage du ribosome

Un des autres modèles d'inhibition de la traduction est « le blocage du ribosome ». FMRP est proposée bloquer le ribosome au cours de la phase d'élongation de la synthèse peptidique. FMRP s'associe majoritairement aux polyribosomes et il a été proposé que FMRP bloquerait les polyribosomes en phase d'élongation (Darnell et al., 2011). Ce modèle repose sur le fait que FMRP cosédimente avec les polyribosomes bloqués sur l'ARNm après traitement à la puromycine. La puromycine provoque le relargage des ribosomes en cours de traduction (visible sous forme d'un déplacement des pics d'absorbance à 260nm des fractions lourdes vers les fractions légères sur un gradient de sucrose), mais n'agit pas sur les ribosomes bloqués en élongation sur l'ARNm, les « stalled ribosomes » (Stefani et al., 2004). L'utilisation d'azide de sodium, un inhibiteur de l'initiation de la traduction, a révélé également la présence de FMRP dans les fractions comportant des polyribosomes bloqués en cours d'élongation (Ceman et al., 2003). Par la suite, le séquençage *in vivo* à haut débit d'ARN isolés par CLIP (cross-link

immunoprecipitation) a montré que FMRP se lie le plus souvent aux régions codantes des ARNm, avec moins de sites de liaison dans les UTR 5 'et 3' (Ascano et al., 2012 ; Darnell et al., 2011). La fréquence élevée de liaison aux régions codantes suggère que FMRP agirait en bloquant le déplacement des ribosomes sur les ARNm. A ce jour, le mécanisme de blocage des ribosomes sur les ARNm n'est pas caractérisé. Un tel mécanisme pourrait résulter d'une altération d'un composant de la traduction, de la dynamique de repliement des protéines naissantes et/ou l'influence de structures secondaires sur l'ARNm (Buchan et Stansfield, 2007). Des expériences analysant spécifiquement le déplacement des ribosomes avec ou sans FMRP ont montré que l'allongement des polypeptides était 40 à 50% plus rapide dans les lysats cérébraux *Fmr1*-KO comparé aux Wt, ce qui suggère un rôle de FMRP dans la régulation du taux de synthèse protéique (Darnell et al., 2011). Le mécanisme par lequel FMRP sélectionnerait les séquences codantes avec lesquelles il est retrouvé en interaction n'est pas connu.

Plusieurs équipes ont tenté d'identifier des séquences communes au niveau des ARNm auxquelles FMRP se lie (Ascano et al., 2012 ; Darnell et al., 2011 ; Darnell et al., 2001). Il semble y avoir de multiples motifs de liaison par FMRP, y compris les motifs G-quadruplex identifiés la première fois dans le propre ARNm de FMRP (Schaeffer et al., 2001) et que l'on retrouve souvent dans des régions non traduites (Darnell et al., 2011) (*voir partie « Les sites de fixation de FMRP »*). Darnell et al., n'ont pas pu identifier de sites spécifiques reconnus par FMRP sur les ARNm cibles testés pour expliquer leurs résultats mais ils ont proposé que FMRP reconnaîtrait aléatoirement la phase codante pour bloquer les ribosomes. Ces suggestions sont en complète contradiction avec la reconnaissance d'ARNm spécifiques par FMRP et ne permettent pas d'expliquer le processus de blocage du ribosome. Plus récemment, des analyses bio-informatiques des séquences de liaison consensus de FMRP (FMRP consencus binding sequence, FCBS) et des données de séquençage par CLIP ont permis d'identifier les motifs de séquence courte TGGA et GAC dans les régions codantes et les régions non traduites (Anderson et al., 2016). D'autres travaux récents ont identifié un rôle de FMRP dans la localisation des ARNm concernant les interactions avec les boîtes RGG et les motifs G-quadruplex, tandis que les interactions au niveau domaine KH régulent quant à eux la traduction des ARNm cibles (Goering et al., 2019). Des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour mieux comprendre le rôle des domaines de liaison de FMRP et les motifs reconnus dans le mécanisme de régulation par FMRP (*voir partie « Les sites de fixation de FMRP »*).

## 3. Inhibition par la voie des miARN

Les miARN sont une catégorie de petits acides ribonucléiques, simple brin et non codants propre aux cellules eucaryotes. Ils agissent comme des régulateurs négatifs de l'expression génique et fonctionnent au sein du complexe RNP RISC (RNA-induced silencing complex). Ce complexe est constitué de plusieurs protéines dont la protéine Argonaute 2 (AGO2) (Sontheimer, 2005) qui est une endonucléase séquence-spécifique pouvant induire une coupure dans le squelette phosphodiester de l'ARNm cible pour provoquer sa dégradation (Rand et al., 2005). Dans le modèle drosophile, dFMRP module l'expression des miARN pour contrôler le développement neuronal (Jin et al., 2004 ; Xu et al., 2008). En effet, chez la drosophile et chez les mammifères FMRP a été montré s'associer aux protéines AGO2 et DICER (Endoribonuclease Dicer), deux composants importants du complexe RISC (Caudy et al., 2002 ; Ishizuka et al., 2002 ; Plante et al., 2006). Chez la souris, FMRP s'associe au complexe RISC et / ou aux miARN qui coopèrent pour réguler la traduction de l'ARNm et la morphologie des épines dendritiques (Muddashetty et al., 2011).

A l'aide de protéines recombinantes, *in vitro*, il a été montré que FMRP peut aider à l'assemblage d'un miARN sur un ARNm cible, une activité dépendante des domaines KH (Plante et al., 2006). En 2009, au laboratoire, Didiot et al., ont montré que le complexe RISC et FMRP ne colocalisaient pas dans les cellules. En effet, il semblerait que FMRP ne soit pas présente dans les P-bodies, sites cellulaires majeurs de localisation du complexe RISC et des ARNm soumis à son action (Didiot et al., 2009). De plus, dans les cellules, en absence de FMRP, on observe une activité RISC normale au niveau des ARNm rapporteurs contenant des sites de miARN.

Une étude a montré que différents miARN (plus d'une dizaine testée) sont co-immunoprécipités spécifiquement avec FMRP dans le cerveau Wt en comparaison avec le cerveau *Fmr1*-KO (Edbauer et al., 2010). La surexpression ou la réduction de miR125b et miR132 ont pour conséquence des altérations de la morphologie des épines dendritiques qui seront corrigées en supprimant FMRP dans des cultures d'hippocampes. Notons qu'en plus, miR125b et FMRP ont pour cible la région 3'UTR de l'ARNm Nr2a (N-méthyl-D-aspartate Receptor 2A). Lorsque FMRP se fixe sur cette région cela favoriserait l'assemblage du complexe RISC et la répression de la traduction (Edbauer et al., 2010). De manière similaire, FMRP a été montrée avoir un effet sur l'action de miR125a au niveau de la région 3'UTR de la protéine PSD95 afin de permettre la répression de la traduction. Effectivement, cette région est une cible commune de FMRP et du miR125a, avec le site du miARN chevauchant une

structure G-quadruplex correspondant au site de fixation de FMRP (Muddashetty et al., 2011 ; Subramanian et al., 2011). De plus, une proportion de l'ARNm Psd95, que l'on retrouve au niveau des fractions légères dont la traduction est inhibée dans un gradient de sucrose, est déplacée vers les polyribosomes actifs en traduction après stimulation au DHPG des neurones. Une réduction du niveau de miR125a dans les fractions légères après activation mGluR-I montre une libération de l'ARN réprimé au niveau de l'initiation de la traduction. Ces données suggèrent la présence de FMRP dans un complexe miARN-RISC inhibé au niveau de l'initiation de la traduction. On remarquera ici que ce modèle est en désaccord avec le modèle de répression au niveau de l'élongation où l'ARNm réprimé par FMRP est présent dans les polysomes.

La stimulation neuronale passant par l'activation des mGluR-I entraîne la déphosphorylation médiée par la protéine phosphatase 2A (PP2A) de FMRP, qui favorise par la suite la libération du complexe RISC à partir des ARNm cibles (Muddashetty et al., 2011). Ces événements de déphosphorylation améliorent également l'ubiquitination de FMRP et sa dégradation par le protéasome (Nalavadi et al., 2012).

Récemment, une équipe a montré l'implication de FMRP dans le processus de maturation de pri-miARN (miARN primaires) (Wan et al., 2017). FMRP contrôle l'expression d'une ribonucléase III DROSHA qui va cliver les pri-miARN afin de les libérer sous forme de pre-miARN en épingle à cheveux (Lee et al., 2003). Une expression anormale de DROSHA conduit à une altération de la voie des miARN (Wu et al., 2012). En utilisant l'immunoprécipitation et les analyses de polysomes, il a été montré que FMRP améliore la traduction de DROSHA en interagissant avec l'ARNm de DROSHA et les polysomes. Il a également été observé que les niveaux de précurseurs de miARN étaient modifiés chez les souris *Fmr1*-KO. Ces travaux, suggèrent une implication de FMRP dans le processus de maturation des miARN permettant un contrôle plus précis et stable de l'expression des gènes pendant le développement du cerveau et la plasticité synaptique (Wan et al., 2017).

L'ensemble de ces différents modèles d'inhibition de la répression de la traduction par FMRP ne sont pas mutuellement exclusifs, différents mécanismes pourraient agir à différents moments au cours du métabolisme des ARNm. FMRP pourrait être localisé à différents endroits de la cellule et dans les mRNP avec des fonctions différentes. Par conséquent, FMRP pourrait réguler différemment un même ARNm cible. Par exemple, au niveau des granules de stress, FMRP est associée à des ARNm bloqués à l'étape d'initiation de la traduction. Mais elle pourrait également réprimer l'initiation de ses ARNm cibles au cours du transport vers les

dendrites via CYFIP1 ou via la voie des miARN. Au niveau synaptique, FMRP serait associée à des ARNm engagés avec des ribosomes bloqués à l'étape d'élongation de la traduction qui permettrait une réponse traductionnelle rapide après stimulation synaptique. Notons également que FMRP est proposée pouvoir reconnaitre ses ARNm cibles à différents endroits, au niveau de la région 5'UTR, de la phase codante et de la région 3'UTR. L'association de FMRP à la région 3'UTR pourrait moduler le mécanisme de miARN. Au niveau de la région 5'UTR, ou de la phase codante, la reconnaissance d'une structure stable pourrait avoir comme conséquence un encombrement stérique, et bloquer le ribosome au cours de l'initiation ou l'élongation de la traduction, respectivement. De plus, FMRP est également proposée reconnaitre différents éléments sur les ARN, avec plusieurs contradictions évidentes à ce sujet dans la littérature. En conclusion, FMRP pourrait réguler différents pools d'ARNm en fonction de la structure/séquence reconnue et/ou de sa position sur l'ARNm, mais le ou les mécanismes d'action restent à éclaircir.

## VII. Les modifications post-traductionnelles modulant l'activité de FMRP

### 1. Phosphorylation

Dans les neurones, FMRP peut être présente sous forme phosphorylée et non-phosphorylée, mais la forme phosphorylée est prédominante dans les granules au niveau des dendrites (Narayanan et al., 2007). L'analyse de la phosphorylation de FMRP a révélé qu'une région de 38 acides aminés constitue le domaine de phosphorylation localisé entre les domaines NES et RGG, ce domaine peut être phosphorylée sur un, deux ou trois résidus phosphate. Dans cette région, le premier résidu phosphorylé est une serine qui est conservée de la drosophile à l'Homme (ser406 chez la drosophile, ser499 chez la souris et ser500 chez l'Homme) (Ceman et al., 2003). Même si la phosphorylation de FMRP n'impacte pas clairement et de manière sûre sa capacité de liaison aux ARN, elle altérerait son association aux polyribosomes (Ceman et al., 2003) c'est pour cette raison que la phosphorylation de cette serine est décrite dans la littérature comme un élément régulateur de la fonction de FMRP. Chez la drosophile, *in vitro*, la phosphorylation de la ser406 modulerait son efficacité d'interaction avec les ARN et d'homo-dimérisation (Siomi et al., 2002). L'utilisation de mutants murins pour FMRP mimant l'état constitutivement phosphorylé de la protéine (S499D) ou non-phosphorylé (S499A) montre que seul le mutant S499D reste associé aux polyribosomes après traitement par l'azide de sodium,

induisant l'arrêt de la traduction (Ceman et al., 2003). Ces résultats suggèrent que FMRP-phosphorylée est associée à des polysomes bloqués sur les ARNm, alors que FMRP-non phosphorylée est associé à des polysomes actifs en traduction. Ces données coïncident avec les observations de Muddashetty et al., montrant que la surexpression de FMRP-S499D inhibe la traduction d'un ARNm rapporteur comportant la région 3'UTR de PSD-95 dans des lignées neuronales, mais non celle de FMRP-S499A. De plus, FMRP-S499D déplace cet ARN rapporteur vers les fractions légères dans un gradient de sucrose, suggérant une inhibition de l'initiation de la traduction de Psd-95 (Muddashetty et al., 2011). Ces différentes données suggèrent un modèle où FMRP phosphorylée inhiberait la traduction de ces ARNm cibles, alors que la forme non-phosphorylée permettrait à la traduction de se poursuivre.

Après stimulation des récepteurs mGluR-I, FMRP est déphosphorylée en moins d'une minute, probablement dû à l'augmentation de l'activité de la phosphatase 2A (PP2A) (Narayanan et al., 2007). Par contre, une plus longue activation des récepteurs mGluR-I (entre 1 à 5 min) induit la diminution de l'activité de PP2A, médiée par mTOR, ce qui conduit à la phosphorylation de FMRP. Ces résultats suggèrent que PP2A dont l'activité est induite par mTOR, serait la principale phosphatase de FMRP. Par ailleurs, le fait que FMRP ne soit pas phosphorylé dans les neurones hippocampiques de souris KO pour la kinase de la protéine ribosomale S6 (S6K1), suggère que S6K1 pourrait être la principale kinase de FMRP (Narayanan et al., 2008). L'inhibition pharmacologique des protéines mTOR et ERK1/2 (Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase) inhibe la phosphorylation de S6K1 et de FMRP. En revanche, l'inhibition de PP2A conduit à des formes phosphorylées de S6K1 et FMRP. Par conséquent, l'activité de S6K1 sur la phosphorylation de FMRP dépend des activités des protéines mTOR, ERK1/2 et PP2A (Narayanan et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggère un modèle selon lequel S6K1 et PP2A s'affronteraient pour contrôler la phosphorylation de FMRP sous le contrôle de l'activité de mTOR, elle-même régulée par les mGluR-I. Ce modèle a récemment été contredit par une équipe qui suggère que la cible de la voie mTORC1 ne régule pas FMRP en S499 et que les voies précédemment impliquées, mGluR-I et PP2A n'ont apparemment aucun effet sur l'état de phosphorylation de S499 (Bartley et al., 2016). En effet, Bartley et al., ont identifié que la caséine kinase II (CK2) phosphoryle FMRP S499 mammifère. Bien que CK2 ait été précédemment identifiée comme la kinase d'une sérine de FMRP chez la drosophile, qu'elle soit également la kinase de FMRP S499 chez les mammifères est assez surprenant. En effet, la divergence entre les séquences de FMRP drosophile (S406) et souris (S499) suggère que bien que les régions soient fonctionnellement liées, elles seraient à priori phosphorylées par des kinases distinctes. De plus, CK2 est

considérée comme une kinase constitutivement active non régulée par l'activité neuronale. Par conséquent, le mécanisme par lequel CK2 phosphorylerait FMRP en réponse à l'activité neuronale n'est pas clair. De plus, une étude précédente a rapporté que la CK2 ne phosphorylait pas FMRP S499 murin, étant donné une phosphorylation persistante après traitement des neurones avec l'inhibiteur DRB de CK2 (Narayanan et al., 2008). A ce jour, il n'est pas clair si la phosphorylation de FMRP est due à une re- phophorylation du pool de FMRP ou à une phosphorylation de protéines FMRP nouvellement synthétisées.

## 2. Méthylation

Dans des extraits de réticulocytes de lapin, FMRP est méthylée au niveau de la boite RGG codé par l'exon 15 (Denman, 2002 ; Denman et al., 2004 ; Dolzhanskaya et al., 2006b ; Stetler et al., 2006). FMRP est également méthylée *in cellulo* (HeLa et COS-7) et ceci sans avoir d'impact sur sa localisation cellulaire (Dolzhanskaya et al., 2006c ; Stetler et al., 2006). FMRP est principalement méthylée au niveau de 4 arginines de la boite RGG (dans la séquence FMRP murine au niveau des arginines 533, 538, 543 et 545). La substitution de ces positions abolit 90% de la méthylation de FMRP (Blackwell et al., 2010). Les isoformes de FMRP ne comportant pas le site majeur de phosphorylation (Ser499) sont tout de même méthylés, ce qui indique que la phosphorylation n'a pas d'influence sur la méthylation de la protéine. L'utilisation de différentes méthyltransférases recombinantes a montré que le domaine RGG peut être méthylé *in vitro* par les protéines PRMT1, PRMT3 et PRMT4 (Protein aRginine n-MethylTransferase 1, 3 et 4) (Dolzhanskaya et al., 2006b). La méthyltransférase principale de FMRP serait PRMT1. En effet, cette enzyme coimmunoprécipite avec FMRP à partir des cellules COS-7, et l'utilisation de siRNA contre PRMT1 induit une réduction significative de FMRP méthylée (Blackwell et al., 2010). PRMT1 mono-méthyle et di-méthyle de manière asymétrique FMRP de la même manière in vitro et in cellulo. La méthylation semble altérer les interactions protéines-protéines de FMRP, notamment l'hétéro-dimerisation avec FXR1P et l'efficacité de liaison aux ARNm cibles (ARNm *Fmr1*, Ef1α : Translation elongation factor-1 alpha) (Denman et al., 2004 ; Dolzhanskaya et al., 2006c ; Stetler et al., 2006). En 2010, Blackwell et al., ont montré que les Arg 533 et 538 sont nécessaires pour le recrutement normal de FMRP aux polyribosomes, et que les 4 arginines interviennent dans la fixation aux ARN en fonction de la cible ARNm concernée. *In vitro*, il a été montré par Brown et al., que la méthylation de FMRP affecte sa fixation à l'ARN Sc1 contrairement à un autre ARN cible de FMRP, l'ARNm Aatyk (Apoptosis-Associated TYrosine Kinase, identifié par

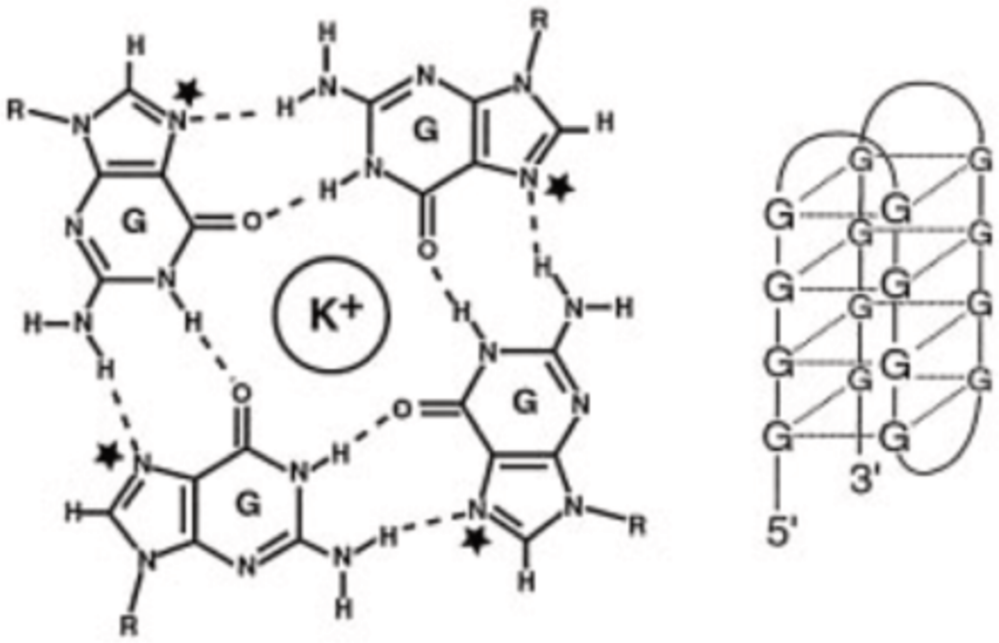



**Figure 22: Schéma de la structure G-quadruplex**

Schéma des liaisons hydrogène dans le G-quartet (gauche) et modèle structural schématique du G-quadruplex (droite). Les guanines sont reliées par des appariements de type Hoogsteen dans un réseau symétrique carré plane. Les positions N7 sont indiquées par des étoiles. Le G-quartet est stabilisé par la coordination d'un ion monovalent ($K^+$) situé dans le plan de la tétrade de guanine (Laughlan et al., 1994), issu de Schaeffer et al., 2001.

coimmunoprécipitation (Brown et al., 2001)). Contrairement aux phosphorylations qui sont des modifications mobiles et équilibrées par les activités kinases et phosphatases, les méthylations apparaissent, elles, être irréversibles.

# VIII. ARN cibles de FMRP

## 1. Les sites de fixation de FMRP

### A. Structure G quadruplex

Les G-quadruplex sont une classe unique de structures formées par les acides nucléiques riches en guanines. Ces structures sont dites polymorphes car elles peuvent adopter différentes topologies selon les conditions physico-chimiques (Roxo et al., 2019). La structure d'un G-quadruplex repose sur des appariements de quatre guanines appartenant à quatre brins différents (G-quadruplex intermoléculaire) ou sur la même molécule (G-quadruplex intramoléculaire) par appariement de type Hoogsteen pour former l'unité de base constituée de quatre résidus guanine, le G-quartet. Un empilement d'au moins deux G-quartets est requis pour former un G-quadruplex. En 2001, dans notre laboratoire, après des expériences de délétions progressives, le site de fixation de FMRP à son propre messager a été mis en évidence. En effet, de premières études *in vitro* avaient montré que FMRP se fixe à son propre ARNm *Fmr1* avec une très forte affinité (Ashley et al., 1993b ; Ceman et al., 1999). Ce site sur lequel FMRP se fixe correspond à une structure de G-quadruplex riche en guanine et en adénine (Schaeffer et al., 2001) (**Figure 22**). Le motif G-quadruplex est probablement le motif lié par FMRP le mieux étudié et caractérisé à l'heure actuelle. Ce motif est supposé avoir un rôle dans la régulation de multiples processus biologiques tels que la réplication, la transcription et la traduction. Par la suite, Darnell et al., ont confirmé par SELEX (une technique d'évolution systématique des ligands par enrichissement exponentiel permettant de produire des oligonucléotides d'ADN ou d'ARN simple brin appelés aptamères se liant spécifiquement à un ligand cible (Oliphant et al., 1989 ; Ellington et al., 1990 ; Tuerk et Gold, 1990) et ayant permis de déterminer de nombreux site de fixation de protéine sur les acides nucléiques), que FMRP se fixe sur une structure G-quadruplex (Darnell et al., 2001). *In vitro*, les mutations perturbant la formation de cette structure G-quadruplex diminue de 100 fois l'affinité de fixation de FMRP. De manière intéressante, la mutation I304N dans le domaine KH2 de FMRP n'altère pas la fixation de FMRP à un ARN comportant un G-quadruplex et le domaine de fixation RGG est nécessaire et suffisant pour cette interaction (Darnell et al., 2001). De nombreux autres ARNm cibles de

FMRP ont été montrés posséder des motifs G-quadruplex. On peut par exemple citer les ARNm Map1b, Sapap3/4 (Disks large-associated protein 3/4), Nap-22 (Neuronal axonal membrane protein), Munc13 (Protein unc-13 homolog A), Pp2a, Sema3f (Semaphorin-3F) et dans la majorité des cas, ces motifs ont été découverts en utilisant des programmes bio-informatiques sur des banques de données.

### B. Séquence riche en uridines

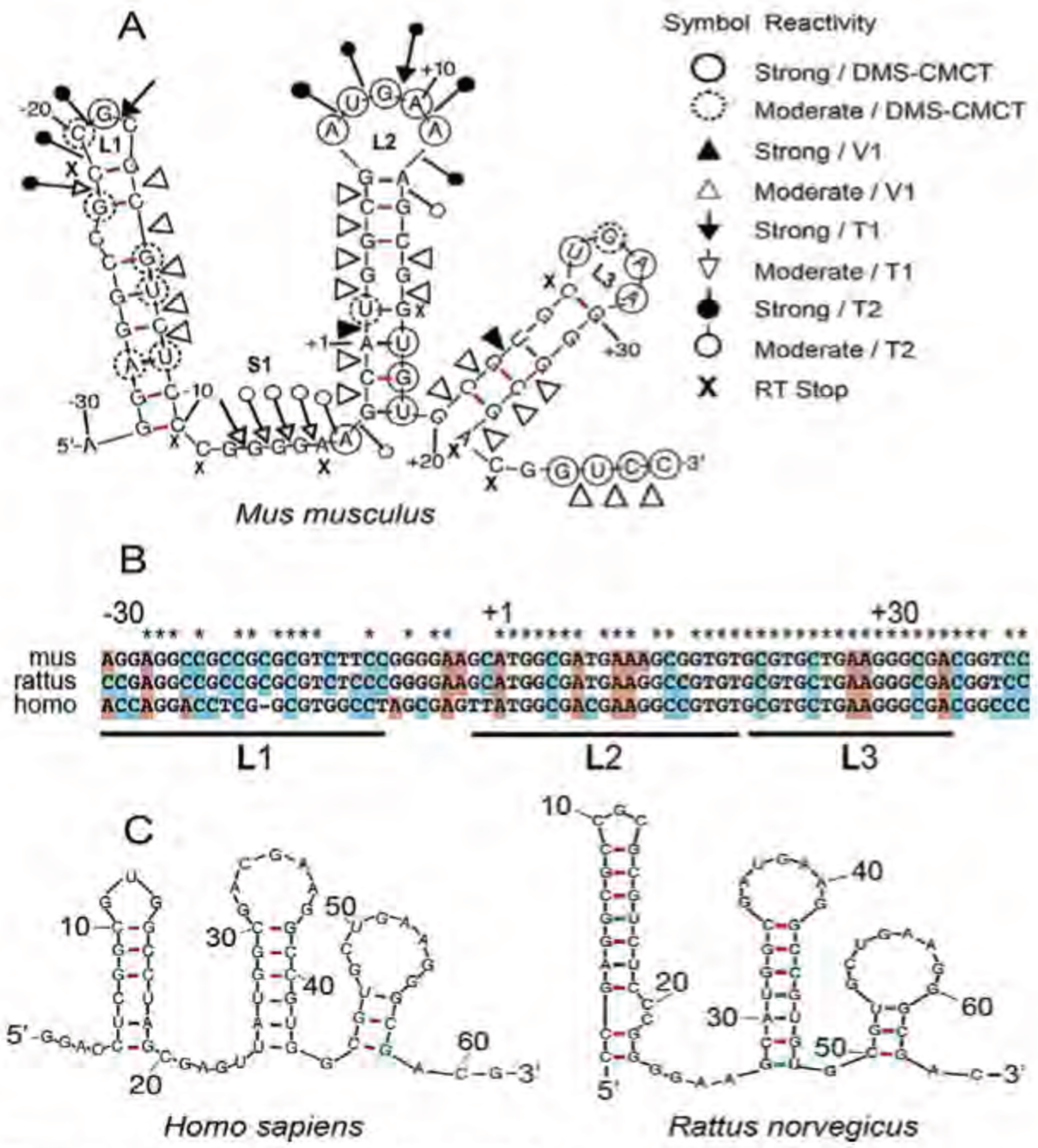
En utilisant l'ADNc-SELEX, Chen et al., ont identifié un autre motif de fixation de FMRP dans des ARNm humains issus de cerveaux de fœtus et adultes. Ce motif est composé de séquences riches en uridine (Chen et al., 2003). Cette technique, contrairement au SELEX classique, permet l'identification de cibles FMRP à partir de pools d'ARNm. Par la suite en 2009, Fahling et al., ont montré que FMRP interagissait effectivement avec des séquences riches en uridine au niveau de l'ARNm hAsh1 (human Achaete-scute homologue-1) par analyses de pontages covalents aux UV (ultra-violets) et par mutagenèse (Fahling et al., 2009). L'affinité de FMRP pour de tels ARN et le rôle de ces interactions *in vivo* n'ont pas été déterminés.

### C. Structure « kissing complex »

Une structure appelée « kissing complex » sur laquelle le domaine KH2 de FMRP se fixe a été identifié par SELEX et par programmes de prédiction de structure secondaire d'ARN. Un « kissing complex » est une structure composée de deux tiges boucles avec un duplex de 4 paires de bases formé par des interactions entre les deux boucles (« loop-loop pseudoknot » ou « kissing complex ») (Darnell et al., 2005). Notons que cette structure n'a pas été retrouvée dans des ARNm endogènes cibles de FMRP. Cela pourrait être expliqué par le fait que cette structure nécessite l'interaction entre deux molécules d'ARN telles qu'un ARNm cible et un ARN adaptateur ou un microARN. Pour l'instant l'étude de ces cibles n'ont pas été poursuivies.

### D. Structure SoSLIP (Sod1 mRNA Stem Loops Interacting with FMRP)

En 2009, l'équipe de Barbara Bardoni a identifié dans l'ARNm Sod1 (superoxyde dismutase 1) une structure secondaire d'ARN appelée SoSLIP (Bechara et al., 2009) avec laquelle FMRP se lie spécifiquement et avec une haute affinité. Ce motif permettant à FMRP




## Figure 23: Structure secondaire du fragment d'ARN SoSLIP

(A) Modèle de la structure secondaire de l'ARN du fragment d'ARN Sod1–64 de souris (SoSLIP). (B) Alignement de la séquence SoSLIP chez la souris, le rat et l'homme. (C) Conservation de la structure secondaire de l'ARN SoSLIP chez le rat et l'homme, adapté de Bechara et al., 2009.

de lier l'ARNm Sod1 est replié en trois structures tige-boucle indépendantes. Lors de son interaction avec ce motif, FMRP induit une modification structurelle de ce dernier qui a pour conséquence l'activation de la traduction (Bechara et al., 2009). Cette structure est constituée d'un domaine minimal de 64 nucléotides chevauchant le codon d'initiation AUG de l'ARNm Sod1 (**Figure 23**). A ce jour, la structure SoSLIP a été identifiée uniquement dans l'ARNm Sod1.

### E. Les motifs ACUK et WGGA

En 2012, une étude a permis d'identifier des sites de fixation de 33 nucléotides localisés entre les séquences codantes et la région 3' des ARNm cible de FMRP dans des cellules HEK293. Par l'utilisation de la technique PAR-CLIP (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation) Ascano et al., ont proposé que FMRP cible des séquences d'ARN distinctes pour réguler l'expression des protéines. Dans plus de 50% des sites de fixation les motifs ACU**K** et **W**GGA ont été retrouvés (où K = Guanine ou Uridine et W = Adénine ou Uridine) (Ascano et al., 2012). Cette étude, réalisée dans des cellules où FMRP est fortement surexprimée (conduisant à la formation de granules de stress), est très sujette à caution, d'autant plus que les motifs identifiés sont statistiquement présents dans tous les ARNm.

De nombreux sites de fixation de FMRP ont été proposés dans la littérature depuis 2001, montrant la complexité de reconnaissance des ARN par FMRP. Malgré cela, à ce jour, la structure G-quadruplex (Darnell et al., 2001 ; Schaeffer et al., 2001) reste le site de fixation ayant la plus forte affinité pour FMRP et la mieux caractérisée. De plus, cette structure est le site de fixation le plus fréquent dans les ARNm cibles de FMRP validés incluant son propre messager. Cependant de nombreuses questions subsistent autour des structures G-quadruplex car leur formation *in vivo* demeure difficile à démontrer et tous les ARNm contenant des motifs G-quadruplex putatifs ne sont pas liés par FMRP.

## 2. Techniques d'identification des ARNm cibles de FMRP

J'ai regroupé dans le tableau ci-dessous les principales techniques de CLIP (CrossLinking ImmunoPrecipitation) utilisées pour identifier les ARNm cibles d'une protéine **(Figure 24).** Depuis, de nombreuses avancées technologiques concernant l'étude des interactions

protéine-ARN ont vu le vu jour sur lesquelles je ne vais pas m'attarder dans ma rédaction (Lee et al., 2018).

| Techniques | Protocole | Principe | Référence |
|---|---|---|---|
| **RIP-Chip**<br>RNA-Binding Protein Immunoprecipitation | Technique d'immunoprécipitation des RBP suivi par une analyse microarray ou un RIP-seq (séquençage directe) | Identifier des sous-ensembles d'ARN qui ont des fonctions liées et sont potentiellement co-régulés, ainsi que des protéines qui leur sont associées dans des complexes RNP | Brown et al., 2001 |
| **APRA**<br>Antibody Positioned RNA Amplificatio | Technologie d'amplification d'ARN par un anticorps reconnaissante une séquence dégénérée à proximité des ARN séquestrés par une RBP spécifique | Identification des cargos associés à une RBP | Miyashiro et al., 2003 |
| **HITS-CLIP**<br>High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation | Technique d'irradiation in vivo de tissus ou cellules aux UV, permettant un pontage covalent entre les ARN et les protéines en contact direct suivie d'une immunopurification des complexes ARN-protéines d'intérêt et d'un séquençage haut-débit des fragments d'ARN isolés | Cartographie à l'échelle génomique les sites d'interaction protéines-ARN | Darnell et al., 2010 |
| **PAR-CLIP**<br>Antibody Positioned RNA Amplification | La méthode repose sur l'incorporation d'analogues de ribonucléosides photoréactifs dans les transcrits d'ARN naissant par des cellules vivante, Suivi d'une irradiation, d'une immunoprécipitation de la RBP d'intérêt et de l'isolement de l'ARN | Méthode biochimique pour identifier les sites de liaison des RBP et des complexes de ribonucléoprotéines contenant des microARN (miRNP) | Ascano et al. 2012 |

**Figure 24: Différentes techniques d'identification des ARNm cible d'une protéine d'intérêt par approche CLIP**

| ARN | Nom complet | Référence |
|---|---|---|
| ADCY1 | Adenylyl cyclase type 1 | Sethna et al., 2016 |
| App | Amyloid protein precursor | Westmark et Malter, 2007 |
| Arc | Activity-regulated cytoskeleton-associated *protein* | Steward et Worley, 2001; Park et al., 2008; Waung et al., 2008 |
| BMPR2 | Bone morphogenetic protein type II receptors | Kashima et al., 2016 |
| CamkII | $Ca^{2+}$/calmodulin-dependent protein kinase II | Zalfa et al., 2003 ; Muddashetty et al., 2007 ; Subramanian et al., 2011 |
| CALB1 | Calbindin | Tessier et al., 2011 |
| CaM | Calmodulin | Tessier et al., 2011 |
| Dgkk | Diacylglycerol kinase kappa | Tabet et al., 2016 |
| Dglα | Diacylglycerol lipase | Jung et al., 2012 |
| Dscam | Down syndrome cell adhesion molecule | Cvetkovska et al., 2013 |
| eEF1α | Elongation factor 1-alpha 1 | Tsai et al., 2016 |
| Fmr1 | Fragile mental retardation protein | Weiler et al., 1997 ; Schaeffer et al., 2001 ; Antar et al., 2004 |
| $Gaba_A$ | Gamma-aminobutyric acid A | Miyashiro et al., 2003 ; Dictenberg et al., 2008 |
| GluR1/2 | Glutamate receptor 1/2 | Muddashetty et al., 2007 |
| Kv3.1b mRNA | Potassium voltage-gated channel subfamily 3 | Strumbos et al., 2010 |
| Kv4.2 mRNA | Potassium voltage-gated channel subfamily 4 | Lee et al., 2011 ; Gross et al., 2011 |
| L-type $Ca^{2+}$ channel | Calcium channel | Chen et al., 2003 |
| Map1b | Microtubule associated protein 1b | Darnell et al., 2001, Antar et al., 2005 ; Hou et al., 2006 ; Davidkova et Carroll, 2007 ; Menon et al., 2008 |
| NCS-1 | Neuronal calcium sensor 1 | Dason et al., 2009 |
| PDE2A | Phosphodiesterase A2 | Maurin et al., 2018 ; Maurin et al., 2019 |
| Pp2a | Protein phosphatase 2A | Castets et al., 2005 |
| Psd95 | Postsynaptic density protein 95 | Todd et al.,2003 ; Muddashetty et al., 2007 ; Zalfa et al., 2007 ; Subramanian et al., 2011 |
| Rac1 | Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 | Majumber et., 2016 |
| Ric-8a | Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A | Dason et al., 2009 |
| Sapap3/4 | Disks large-associated *protein* 4 | Brown et al., 2001 ; Kindler et al.,2004 ; Narayanan et al., 2007 ; Dictenberg et al., 2008 |
| Sema3F | Semaphorin-3F | Darnell et al., 2001 ; Menon et Mihailescu, 2007) |
| Sod1 | Superoxyd dismutase 1 | Miyashiro et al., 2003 ; Bechara et al.,2009 |

**Figure 25: Liste des ARNm validés comme cible de FMRP**

## 3. ARNm validés comme cible de FMRP

Depuis plusieurs années, de nombreux ARNm cibles de FMRP ont été découverts, certains à partir de logiciels de prédiction et d'autre expérimentalement validés. Au travers des nombreuses études réalisées à ce jour, les ARNm proposés comme cibles de FMRP se comptent aujourd'hui en milliers et il est difficile de savoir si toutes ces cibles sont bien réelles ou le produit de criblage peu stringent. Une validation fonctionnelle n'a été réalisée que sur un petit nombre de ces cibles et de manière plus ou moins poussée (**Figure 25**) (Davis et Broadie, 2017). A l'heure actuelle, il n'a toujours pas été possible de dégager un consensus à partir de l'ensemble des cibles proposées. Par ailleurs, au vu de l'ensemble de toutes les cibles proposées de FMRP, une question majeure subsiste : Les perturbations produites par la perte d'action de FMRP sont-t-elles la résultante d'un effet combinatoire d'une dérégulation de l'ensemble de ces cibles ou bien de seulement un petit nombre d'entre elles ?

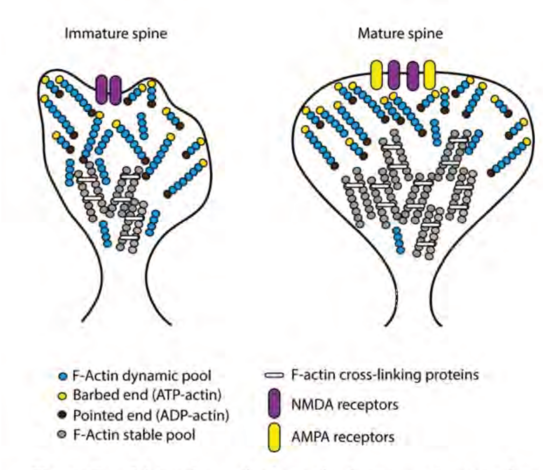



**Figure 26: Dynamique des épines dendritiques lors de la maturation neuronale**

La taille relative du pool d'actine fibrillaire (F-actin) stable (cercles gris) augmente pendant la maturation neuronale de manière simultanée avec le pool d'actine fibrillaire dynamique (cercles bleus). Cela suggère une dynamique de la composition en actine fibrillaire impliquée dans la maturation des épines dendritiques. Adapté de Hlushchenko et al., 2016.

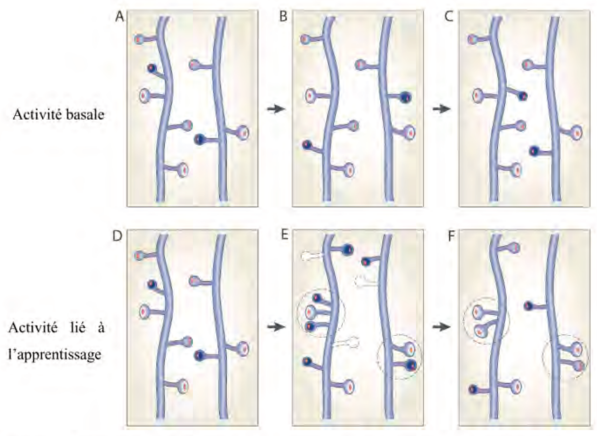



**Figure 27: Remodelage des épines dendritiques au cours du processus d'apprentissage**

A-C, représentation schématique du renouvellement des épines dendritiques durant l'activité basale. Certaines sous population d'épines transitoires sont concernées par la perte et le gain de nouvelles épines (de couleur bleu foncé) tandis que les autres sous populations présentent des épines plus stables et persistantes. D-F, durant le processus d'apprentissage, le renouvellement des épines dendritiques est plus marqué avec l'apparition de nouvelles épines (de couleur bleu foncé) et la disparition d'épines pré-existantes (en pointillée). Même si la connectivité entre les épines est modifiée, la densité peut rester inchangée. Les épines nouvellement formées apparaissent groupées (épines encerclées) adapté de Caroni et al., 2012.

# Chapitre III : La voie des mGluR et les différents axes thérapeutiques dans le FXS

## I. Les mGluR dans la physiopathologie du FXS

### 1. Le syndrome de l'X fragile : une synaptopathie

Les synaptopathies sont un groupe de maladies caractérisées par des altérations de la morphologie et de la fonction synaptique en conséquence des anomalies des épines dendritiques et/ou des connexions synaptiques. Les épines dendritiques sont des petites protrusions membranaires émergeant des dendrites neuronales qui établissent la majorité des connexions synaptiques excitatrices. Elles sont le siège de la communication inter-neuronale.

Les épines dendritiques, lorsqu'elles établissent une connexion synaptique avec une terminaison axonale, ont un aspect qualifié de mature, généralement avec l'aspect d'une tête sphérique mesurant de l'ordre du µm de diamètre, une structure renflée faisant face à la partie présynaptique et portant à sa surface des récepteurs aux neurotransmetteurs. Cette tête est reliée à la base de la dendrite par un cou étroit généralement de l'ordre de la centaine de nm. Ces deux parties des épines dendritiques peuvent présenter une grande variabilité structurale au cours du développement et en réponse à une activité neuronale, comme lors de l'apprentissage ou de la mémorisation (Rostaing et al., 2006 ; Caroni et al., 2012 ; Rochefort et Konnerth, 2012 ; Hlushchenko et al., 2016) **(Figures 26 et 27)**. Dans l'épine dendritique, une région particulièrement développée juste sous la membrane postsynaptique, d'environ 400nm de diamètre et 50nm d'épaisseur, forme la densité post-synaptique (PSD, postsynaptic density). La composition de cette région va définir et caractériser la force ainsi que la stabilité synaptique.

Diverses anomalies des épines dendritiques ont été rapportées chez les patients FXS. La méthode d'imprégnation de Golgi ainsi que la microscopie électronique sur des tissus de cerveaux post-mortem de patients FXS ainsi que dans le modèle murin knock-out du FXS *Fmr1*-KO *(cf. partie « Les différents modèles animaux du FXS »)* montrent des anomalies des épines dendritiques dans les neurones de différentes régions du cortex (épines des neurones pyramidaux dans les couches III et V du néocortex pariéto-occipital) (Rudelli et al., 1985 ; Hinton et al., 1991 ; Irwin et al., 2001, 2002) **(Figure 28)** et de l'hippocampe ( He et Portera-Cailliau, 2012).

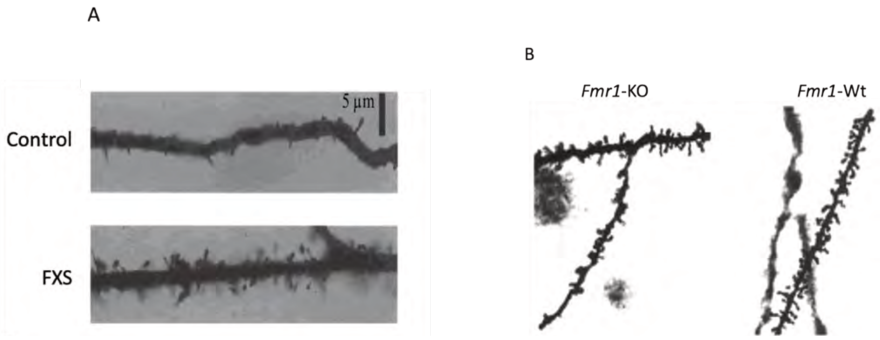



**Figure 28: Morphologie des épines dendritiques**

Épines dendritiques chez un sujet saint et un patient FXS (A) et chez la souris *Fmr1*-KO et la souris Fmr1-Wt (B) visualisées à l'aide de la technique d'imprégnation de Golgi adapté de Irwin et al., 2001 ; Irwin et al., 2002.

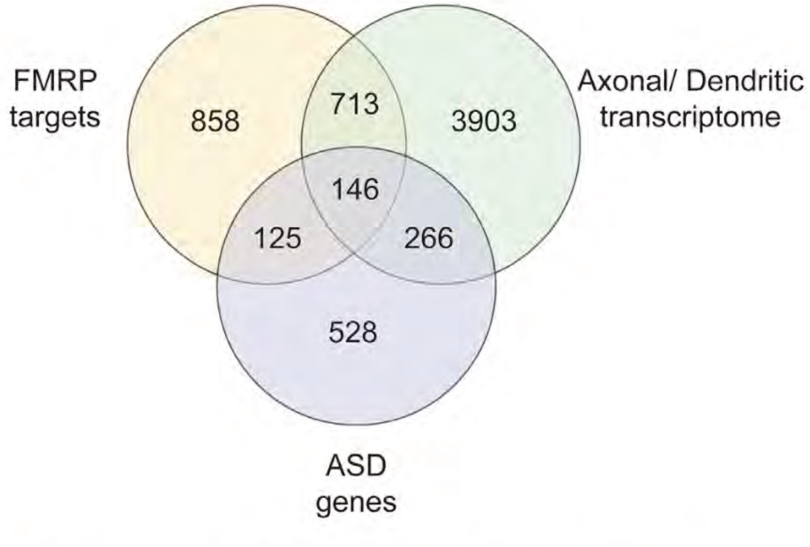



**Figure 29: Expression des gènes communs aux cibles de FMRP, au transcriptome axonale/dendritique et aux gènes du spectre de l'autisme (ASD, autism spectrum disorders)**

Parmi les 1 842 cibles putatives de FMRP identifiées, 271 sont communes avec les gènes des ASD et 859 sont communes avec le transcriptome axonale/dendritique. De plus, 146 gènes sont partagés avec les trois catégories. Les 1 842 cibles de FMRP sont issues des travaux d'Ascano et al., 2012 ; Brown et al., 2001 ; Chen et al., 2003 ; Darnell et al., 2011 ; Miyashiro et al., 2003 ainsi que la liste d'Ascano et al., 2012 filtré pour l'expression cérébrale. Les 1065 gènes de ASD proviennent de la base de données SFARI, de la base de données AutDB, Pereanu et al., 2018 et de Mahfouz et al., 2015. Les 5 028 gènes du transcriptome axonale et dendritique sont basés sur les travaux de Cajigas et al., 2012 et Gumy et al., 2011, adapté de Bagni et al., 2019.

Chez les patients FXS, une densité plus élevée d'épines dendritiques est décrite dans les segments distaux des dendrites apicales et basales dans le cortex cingulaire, temporal et visuel, avec une augmentation du nombre d'épines dendritiques anormalement plus longues et plus fines, évoquant des épines immatures et pouvant refléter des anomalies dans les mécanismes de maturation, de stabilisation ou encore d'élimination des synapses (Martinez-Cerdeno et al., 2017). Les anomalies des épines dendritiques potentiellement impliquées dans les altérations de la plasticité synaptique pourraient être l'une des causes de la déficience intellectuelle observée chez les patients FXS.

De plus, de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la fonction synaptique (NMDAR : récepteur au N-méthyl-D-aspartate, mGluR5 : récepteur métabotrobique au glutamate de type 5, PSD-95, Shank1-3 : SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1-3, Homer1 : Homer protein homolog 1 , NLGN1 : Neuroligin 1 , NRXN : Neurexin, entre autres) ainsi que de gènes associés au spectre de l'autisme sont des cibles proposées de FMRP, ce qui conforte l'idée que l'absence de FMRP chez les patients FXS est responsable de la DI ainsi que des troubles cognitifs et comportementaux associés (Dictenberg et al., 2008 ; Ascano et al., 2012 ; Brown et al., 2001 ; Bagni et Zukin, 2019) **(Figure 29)**.

## 2. La signalisation mGluR

Plusieurs manifestations cliniques du FXS apparaissent liées à une signalisation glutamatergique excessive. En effet, la dépression à long terme appelée LTD mGluRI-dépendante est un paramètre de plasticité synaptique retrouvé augmenté dans l'hippocampe et le cervelet des souris *Fmr1*-KO (Huber al., 2002 ; Kaufmann et al., 2017). Les mGluR-I constituent un groupe de récepteurs métabotropiques du glutamate composés des récepteurs mGluR 1 et 5. Il existe deux autres groupes de mGluR (II et III) composés respectivement des mGluR 2, 3 et 4, 6, 7, 8 (**Figure 30**). Le rôle majeur de la signalisation mGluR-I dans le FXS a été mis en évidence par la réduction génétique et le blocage pharmacologique de ces récepteurs qui corrigent plusieurs phénotypes chez la souris *Fmr1*-KO comme les crises audiogéniques, l'hyperactivité et les modifications morphologiques neuronales (Santoro et al., 2012 ; Hagerman et al., 2017).

Chez les vertébrés, le glutamate est le neurotransmetteur le plus répandu du système nerveux central, représentant près de 50% des neurotransmetteurs libérés. Les neurotransmetteurs ont un rôle essentiel dans la transformation de signaux chimiques pré-synaptiques en signaux électriques post-synaptiques. Le glutamate se fixe sur plusieurs sous-

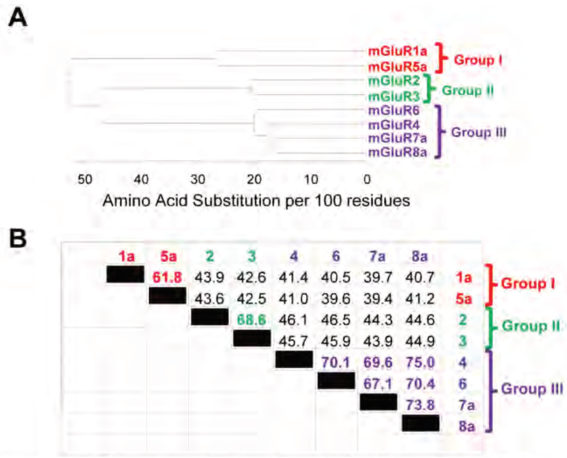



**Figure 30: Les récepteurs mGluR, homologie de séquence d'acides aminés entre divers récepteurs métabotropiques du glutamate**

Le phénogramme dans le panneau (A) illustre la relation entre les trois sous-groupes mGluR (groupes I, II et III) et les récepteurs individuels au sein de chaque groupe. La longueur de la branche indique le degré d'identité des acides aminés entre les séquences protéiques. Le tableau du panneau (B) illustre le pourcentage d'identité d'acides aminés entre toutes les combinaisons de récepteurs par paires. La similitude la plus élevée est observée entre les membres d'un même groupe (e.g. mGluR1 vs mGluR5). Le phénogramme dans le panneau A et le tableau dans le panneau B ont été générés en utilisant la suite logicielle DNAStar (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) et les séquences d'acides aminés obtenues auprès de NCBI. Issu de Willard&Koochekpour, 2013.

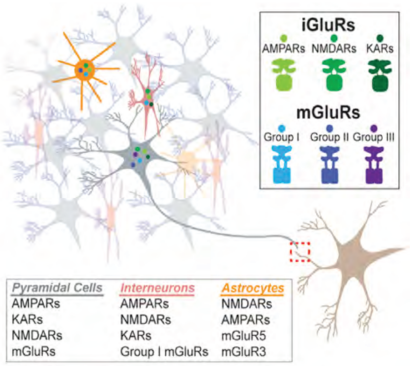



**Figure 31: Signalisation glutamatergique dans la synapse**

Les iGluRs et mGluRs s'expriment de manière chevauchante dans tous les principaux types de cellules neuronales ainsi que les astrocytes. Les niveaux d'expression exacts et les sous-types de récepteurs ne sont pas connus et peuvent varier entre les cellules mais aussi entre synapses individuelles. L'expression des iGluR dans la glie est particulièrement mal définie et semble être régionale. Les NMDAR gliaux, qui pourraient inclure les sous-unités GluN2C / D et GluN3 restent controversés. À droite, les iGluR et les mGluR sont présents dans tous les compartiments synaptiques ; ce qui correspond à la terminaison présynaptique, à la densité postsynaptique, aux régions périsynaptiques et dans les processus astrocytaires, adapté de Reiner et Levitz, 2018.

types de récepteurs différents : les récepteurs canaux ioniques (iGluR), NMDAR, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPAR) et kainate et mGluR (**Figure 31**). Tous les mGluRs partagent une architecture de base commune. A l'extrémité N-terminale, on retrouve un grand domaine extracellulaire connu sous le nom de domaine amino-terminal (ATD), suivi d'un domaine riche en cystéine (CRD) critique pour la dimérisation et l'activation du récepteur. Du CRD à la région C-terminale on trouve le classique « 7 domaines transmembranaires (TMD) » et enfin, une extrémité cytoplasmique intracellulaire appelée domaine CTD (Willard et Koochekpour ,2013) (**Figure 32**). La région N-terminale extracellulaire sert de site de fixation des différents ligands tandis que la région C-terminale intracellulaire permet la transduction du signal (Willard et Koochekpour ,2013). Contrairement aux récepteurs ionotropiques, les récepteurs métabotropiques du glutamate ne sont pas des canaux ioniques, ils activent des cascades biochimiques en agissant sur d'autres protéines. Certaines isoformes des mGluR1 et 5 (1a et 5a) contiennent un très long domaine qui a été étudié pour ses interactions complexes protéine-protéine (Shiraishi-Yamaguchi et Furuichi, 2007). Ce domaine, appelé motif de liaison Homer1, facilite le couplage des mGluR avec les récepteurs NMDA (Willard et Koochekpour ,2013).

Comme dit précédemment, le groupe I comprend les récepteurs mGluR1 et mGluR5 localisés essentiellement au niveau de la membrane post-synaptique des neurones glutamatergiques excitateurs. Ces récepteurs sont couplés à la phospholipase C beta (PLCβ) par des protéines G hétérotrimériques de type $G_q/G_{11}$. La cascade de réaction suivant l'activation de ces récepteurs consiste en l'activation de la PLCβ qui va induire l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en inositol-triphosphate (IP3) et en 1,2-diAcyl-sn-glycerol (DAG). L'IP3 et le DAG sont des seconds messagers qui agissent à leur tour en se le liant à des canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE), ce qui permet d'augmenter la concentration cytoplasmique en calcium pour l'IP3 et pour le DAG en agissant sur la protéine kinase C (PKC) et favorisant l'ouverture de canaux calciques membranaires. D'autres signalisations sont activées par le biais de plusieurs protéines comme par exemple MEK/ERK. Notons que d'autres protéines peuvent interagir avec les mGluR-I comme la protéine HOMER qui aura pour conséquence l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR aboutissant à la régulation de la traduction coiffe-dépendante des ARNm localisés au niveau du compartiment post-synaptique (Bear et al., 2004) (**Figure 33**). Cette traduction locale est déterminante de l'induction de la LTD-mGluR.

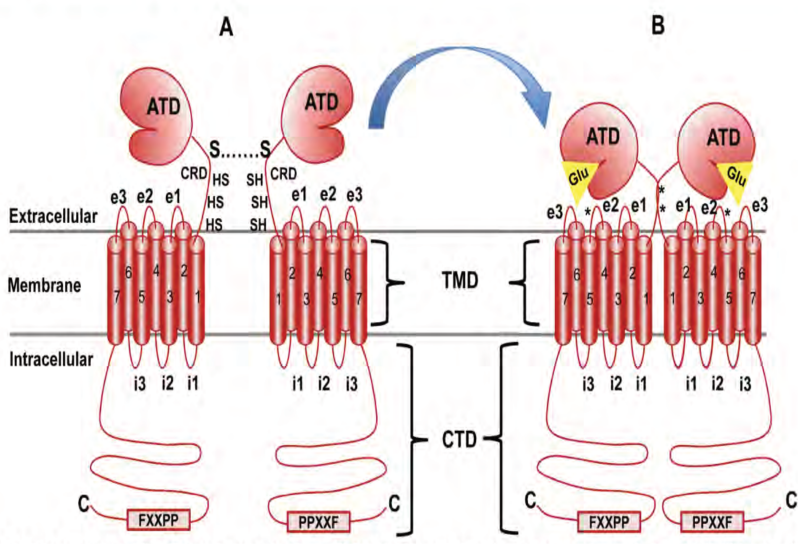


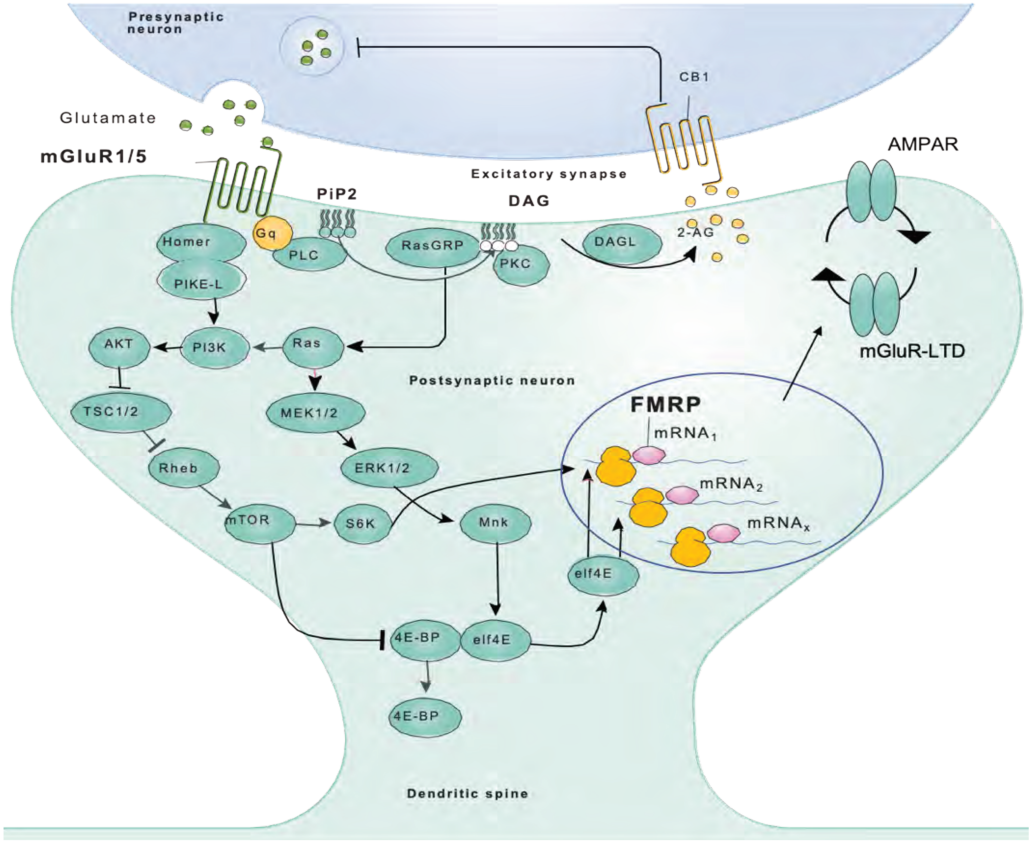

**Figure 32: Structure des mGluR et activation conformationnelle**

Les membres de la famille des mGluR partagent la même structure de base : à partir de l'extrémité N terminale (N), le domaine amino-terminal (ATD) est suivi par le domaine riche en cystéine (CRD), les sept domaines transmembranaires (TMD ; numérotés) et le domaine C-terminal (CTD). i1, i2, etc., indiquent des boucles intracellulaires entre les régions couvrant la membrane tandis que e1, e2, etc., indiquent des boucles extracellulaires. L'étoile au niveau de la boucle e2 désigne le résidu cystéine qui est important dans la transmission des informations d'activation au complexe de protéines G ancrées. Le panneau A illustre la conformation native au repos de mGluR1a. Les résidus cystéine dans le CRD aident à la dimérisation, comme indiqué par la liaison S-S. Lors de la liaison du Glutamate (Glu) (panneau B), un changement de conformation de l'ATD impliquant le CRD (les étoiles indiquent des ponts disulfures créés par la liaison de Glu) provoque l'activation des protéines G liées. Issu de Willard et Koochekpour, 2013.

La signalisation mGluR est donc un phénomène complexe impliquant de nombreux partenaires protéiques. Les observations concernant les corrections de cette signalisation excessive ont pu mettre la lumière sur des antagonistes mGluR-I comme traitement potentiel du FXS (Braat et Kooy, 2014 ; Pop et al., 2013). Malheureusement, les divers essais cliniques ciblant les mGluR-I n'ont pas été concluants et ont été arrêtés (*voir partie « Essais cliniques pour le FXS »*). Bien que l'implication de cette signalisation dans la physiopathologie du FXS ne soit pas remise en cause, il semble que les molécules utilisées ne soient pas adaptées et les mécanismes altérés pas totalement compris.

## 3. La LTD-mGluR

Dans les années 70-80, deux formes majeures de plasticité synaptique ont été mises en évidence dans le cerveau des mammifères, la LTP et la LTD, qui sont caractérisées respectivement par une augmentation et une diminution durable de l'efficacité de la transmission synaptique faisant suite à certains types de stimulation. Ces mécanismes ont été très étudiés car ils ont été postulés être reliés aux phénomènes de mémorisation (Collingridge et al., 2010). La LTD peut être induite de différentes manières. Je vais me focaliser ici sur la LTD-mGluR-I dépendante de la traduction locale. Après activation des mGluR-I par un stimulus externe ou par un traitement pharmacologique comme des agonistes mGluR-I (acide quiscalic ou DHPG), il y a une internalisation à long terme des AMPAR et des sous-unités GluR1/2 associée à une activation rapide de la traduction locale (Waung et Huber, 2009). Les protéines nouvellement synthétisées sont nécessaires à l'arrêt de l'internalisation et par conséquent à l'équilibre entre la LTD et l'état synaptique. Cette traduction est régulée à plusieurs niveaux via les RBP comme FMRP et à travers deux voies de signalisation majeures, les voies ERK-MAPK et PI3K-mTOR. Pour initier la traduction, les mGluR-I déclenchent la phosphorylation d'eIF4E et de la protéine de liaison à eIF4E, 4EBP, et stimulent ainsi la formation du complexe d'initiation de la traduction (eIF4F) (Ronesi et al., 2008 ; Banko et al., 2006). ERK phosphoryle et active Mnk1 interagissant avec la MAPK qui à son tour phosphoryle eIF4E (Richter et al., 2009). D'autre part, les mGluR-I stimulent également la voie PI3K-mTOR (Ronesi et al., 2008 ; Banko et al., 2006 ; Hou et al., 2004). L'activation de l'initiation de la traduction semble nécessaire pour la mGluR-LTD car l'inhibition de PI3K, mTOR, ERK ou eIF4E empêche l'établissement de la mGluR-LTD (Hou et al., 2004 ; Gallagher et al., 2004 ; Huber et al., 2000 ; Waung et Huber, 2009) (**Figure 34**).




## Figure 33: La signalisation mGluR

Les mGluR-I (comprennant les récepteurs mGluR1 et mGluR5) localisés essentiellement au niveau de la membrane post-synaptique des neurones glutamatergiques excitateurs sont couplés à la phospholipase C beta (PLC β) par des protéines G hétérotrimériques de type $G_q/G_{11}$. L'activation de PLC β induit l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en inositol-triphosphate (IP3) et en 1,2-diAcyl- sn-glycerol (DAG). Le DAG active la protéine kinase C (PKC) qui à son tour active les voies MEK/ERK et PI3K/AKT/mTOR (cette dernière impliquant aussi la protéine HOMER) avec pour conséquence l'activation de la synthèse protéique à partir des ARNm localisés dans le compartiment post-synaptique. Ces protéines sont nécessaires à l'internalisation des récepteurs AMPAR, sous-jacent de la mGluR-LTD. La théorie mGluR est l'hypothèse que FMRP agit comme répresseur de la traduction protéique en aval de la signalisation mGluR, adapté de Bear et al., 2004.

En l'absence de FMRP, le niveau d'activation des effecteurs en aval de la signalisation mGluR-I est altéré. La phosphorylation de eIF4E par Mnk1 interagissant avec MAPK est augmentée (Gkogkas et al., 2014) et la phosphorylation de ERK est également augmentée dans des échantillons post-mortem de cerveaux de patients FXS (Sawicka et al., 2016 ; Hoeffer et al., 2012). Une conséquence possible de l'augmentation de la phosphorylation de eIF4E et de S6K est un excès de synthèse protéique des ARNm cibles de FMRP observé *in vivo* et *in vitro* dans plusieurs zones du cerveau des souris *Fmr1*-KO, notamment dans les neurones hippocampiques et corticaux (Qin et al., 2005 ; Dölen et al., 2007). Cette augmentation de la synthèse protéique semble être très importante pour la physiopathologie du FXS, car plusieurs inhibiteurs de la traduction ont montré des effets correcteurs sur les phénotypes FXS chez la souris (Richter et al., 2015 ; Hagerman et al., 2017) (*voir partie « Essais cliniques pour le FXS »*). L'ensemble de ces observations a conduit à proposer que FMRP agit comme un régulateur de la traduction locale nécessaire à la LTD-mGluR (Bear et al., 2004). Dans ce modèle appelé « théorie mGluR » du FXS, FMRP est proposé réprimer la traduction des ARNm importants pour l'internalisation des AMPAR en absence de stimulation neuronale. Après l'activation des mGluR-I, la répression exercée par FMRP sur la traduction est levée pour permettre la production locale des protéines cibles. En absence de FMRP, la synthèse des protéines apparait « déréprimée » en absence de stimulation neuronale. Comme dit précédemment, même si les tentatives d'inhibition de cette activation excessive des mGluR-I n'ont pas été concluantes, cette théorie a tout de même permis des avancées dans l'étude de la physiopathologie du FXS. Plusieurs études ont montré une correction comportementale même si incomplète ainsi qu'une correction des défauts cognitifs dans différents modèles animaux comme chez la drosophile et la souris (McBride et al., 2005 ; Chuang et al., 2005 ; de Vrij et al., 2008) et une correction des altérations de la plasticité synaptique et la morphologie des épines dendritiques (Dölen et al., 2007).

## II. Autres dérégulations dans le FXS

### 1. Les endocannabinoïdes

D'autres dérégulations ont été observées dans le cadre du FXS. Ainsi, le système endocannabinoïde, essentiel à la plasticité synaptique et impliqué dans de nombreuses performances cognitives, dans l'anxiété, la nociception, et la susceptibilité aux crises audiogéniques (Hagerman et al., 2017), a été montré être altéré dans les modèles FXS. Les

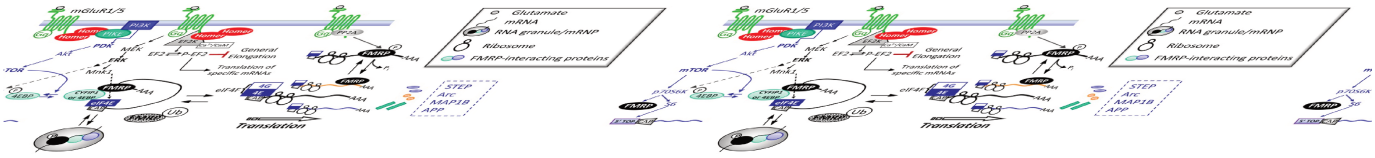



**Figure 34: Les mGluR-I stimulent la traduction à travers de multiples voies dans les neurones**

Les mGluR5 régulent l'initiation de la traduction par l'activation des voies PI3K, mTOR et ERK qui convergent vers le facteur d'initiation, eIF4E. Les mGluR stimulent également la p70S6K qui améliore généralement le taux de traduction par la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 et conduisant à la traduction de 5'TOP contenant des ARNm codant pour les composants de la machinerie traductionnelle, tel que eF1α. Les mGluR stimulent rapidement PP2A, ce qui entraîne une déphosphorylation de FMRP et une traduction des ARNm interagissant avec FMRP. Les mGluR inhibent également l'étape d'élongation généralement par l'activation d'EF2K. L'inhibition maximale de l'élongation rend disponibles les facteurs d'initiation pour la traduction d'ARNm spécifiques, tels que Arc et Map1b. Les interactions de mGluR5 avec Homer sont nécessaires pour la capacité des mGluR à réguler l'initiation de la traduction et peut-être aussi l'élongation. Issu de Waung et Huber, 2009.

endocannabinoïdes se lient aux récepteurs couplés aux protéines G, CB1 et CB2 (Cannabinoid receptor 1 et 2) et modulent l'activité synaptique (Mouslech et al., 2009 ; Pacher et al., 2006). Le 2-AG est l'endocannabinoïde le plus abondant dans le cerveau, il est produit localement dans les épines dendritiques après activation des mGluR-I. Dans le modèle souris FXS, la stimulation endogène des récepteurs 2-AG est altérée par l'absence de FMRP et a pour conséquence des anomalies de plasticité synaptique 2-AG-dépendantes et mGluR-I-dépendantes, y compris une augmentation de la LTD au niveau des synapses inhibitrices et une diminution de la LTD aux synapses excitatrices (Zhang et Alger, 2010 ; Busquets-Garcia et al., 2013 ; Jung et al., 2002). Des expériences dans lesquelles les récepteurs CB1 ou CB2 ont été bloqués ou que l'activité 2-AG a été modulée, montrent une normalisation de plusieurs phénotypes chez la souris FXS (Busquets-Garcia et al., 2013 ; Jung et al., 2002).

## 2. Dysfonctionnement des canaux ioniques

Les canaux ioniques voltage-dépendants jouent un rôle clé dans de nombreux aspects de la transmission neuronale et sont impliqués dans la physiopathologie du FXS. FMRP peut se lier directement au canal potassique activé par le sodium Slack26 et le canal calcique $Ca_v2.2$ de type N (Myrick et al., 2015 ; Ferron et al., 2014). L'absence de FMRP chez les patients atteints de FXS a été proposée entrainer une perte de ces interactions protéine-protéine. En effet, FMRP se lie aux ARNm de plusieurs canaux ioniques, y compris Kv3.1 et Kv4.2 potassium dépendant, les canaux non séléctifs HCN1 et les canaux calcium dépendant $Ca_v1.3$ par exemple (*cf. partie « ARN cibles de FMRP »*) (Darnell et al., 2001 ; Brown et al., 2001 ; Suhl et al., 2014). Par conséquent, l'absence de FMRP est susceptible d'altérer le transport et / ou la traduction de ces ARNm cibles, ce qui pourrait influencer l'excitabilité des neurones (Hagerman et al., 2017).

## 3. Le système GABA

La contribution du système GABAergique (GABA : acide γ-aminobutyrique) à un déséquilibre de la balance excitatrice-inhibitrice a été proposée jouer un rôle important dans la physiopathologie du FXS et des troubles du spectre autistique en général (Nomura et al., 2016 ; Braat et Kooy, 2015). Plusieurs anomalies de la signalisation GABAergique ont été trouvés dans le cerveau des souris *Fmr1*-KO, y compris une réduction de l'expression de plusieurs sous-unités du récepteur GABA et une réduction de la signalisation GABAergique (Hagerman et al.,

2017). Des enregistrements électrophysiologiques ont montré que le signal médié par le récepteur $GABA_A$ est altéré chez la souris *Fmr1*-KO (les courants $GABA_A$ toniques (soutenus durant la durée de stimulation) étaient diminués dans les neurones KO par rapport aux neurones Wt, alors qu'aucune différence significative n'a été observée dans les courants phasiques $GABA_A$ (transitoires au début de la stimulation) (Curia et al., 2009 ; Gibson et al., 2008). Ces altérations électrophysiologiques semblent dépendantes de l'âge et de la région du cerveau (He et al., 2014 ; Tyzio et al., 2014). Des études précliniques ont suggéré que le récepteur $GABA_A$ pourrait être une cible dans le traitement du FXS, même si l'ensemble des altérations FXS-like ne sont pas corrigées (par exemple, l'utilisation du Gaboxadol ou du Ganaxolone (*voir partie « Essais cliniques pour le FXS*) (Braat et al., 2014 ; D'Hulst et al., 2017 ; Lozano et al., 2014 ; Olmos-Serrano et al., 2011).

### 4. AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

L'AMP cyclique (AMPc) est un second messager impliqué dans de nombreux processus cérébraux incluant mémorisation et anxiété. L'équipe de Bhattacharyya a mis en évidence une altération de la cascade AMPc dans le FXS et l'autisme (Kelley et al., 2008,2007). L'équipe de Barbara Bardoni a montré que la phosphodiestérase PDE2A, un des ARNm cible de FMRP, est déréprimée chez les souris FXS et l'administration d'un inhibiteur de PDE2A améliore les capacités de communication, d'interaction et de discrimination entre individus ainsi que la morphologie des épines dendritiques et la plasticité synaptique dans les régions cérébrales étudiées (Maurin et al., 2018) suggérant que cette voie serait une cible thérapeutique intéressante.

Ces axes thérapeutiques potentiels sont parmi les principaux étudiés, il existe d'autres signalisations et protéines dérégulées sur lesquelles je ne m'attarderai pas, l'ensemble des cibles ayant été testé en clinique sont regroupés dans le tableau (**Figure 35).**

## III. Essais précliniques et cliniques pour le FXS

Actuellement, il n'y a pas de traitement pour le FXS. Pourtant, plusieurs essais précliniques et cliniques ont déjà été réalisés. De précédents essais (*voir le chapitre « Thérapie génique »*) pour restaurer la fonction de FRMP chez la souris utilisant une approche de thérapie génique ont pu compenser certains des phénotypes FXS, mais en raison de la surexpression de la

**Figure 35: Essais cliniques effectués à ce jour dans le cadre du FXS**

Adapté de Clinicaltrials.gov.

| Molecule name | Phase | Aim | Age | Mechanism | Year | Country | Status |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Acamprosate | II-III | Inattention, hyperactivity,social impairment | 5-23 years | NMDA receptor inhibitor | 2013-2020 | USA | Active Not recruiting |
| Metadoxine (MG01CI) | II | ADHD | 15-55 years | Selective antagonist of subtype 5-HT2B serotonin and high affinity for GABA receptors | 2014-2016 | USA | Completed |
| Metformin | II-III | Abnormal behavior , cortical excitability, EEG, excecutive and cognitive test | 10-40 years | Increase insulin sensitivity and neoglucogenesis inhibitor | 2018-2019 | Canada | Recruiting |
| Arbaclofen or STX209 | II | Aberrant behavior | 6-40 years | GABA derived, agonist GABAb receptor | 2009-2013 | USA | Terminated |
| AZD7325 | I | Aberrant behavior,anxiety and APP protein | 18-50 years | GABAa 2,3 positive modulator, high affinity with GABAa 2,3 | 2017-2020 | USA | Recruiting |
| Acamprosate+Minocyclin+Lovastatin | II | Inattention, hyperactivity,social impairment, EEG, global improvment | 15-55 years | Combined | 2016-2020 | USA | Enrolling by invitation |
| Sertralin | II | Expressive langage,early learning, global improvment | 2-6 years | Psychotropic, selective serotonin reuptake inhibitor | 2017 | USA | Completed |
| Ganaxolone | II | Global improvment, anxiety, visual scale | 6-17 years | Positive allosteric modulator GABAa R | 2012-2018 | USA | Completed |
| Mavoglurant (AFQ056) or STX107 | I-III | Aberrant behavior | Child and adult | mGluR5 antagonist | 2009-2020 | USA/SPAIN | Completed |
| Trofinetide (NNZ-2566) | II | Aberrant behavior, anxiety, obsessive disorders, langage | 12-45 years | Analog IGF1 neuropeptide | 2013-2018 | USA | Completed |
| Gaboxadol | II | Aberrant behavior and global improvment | 13-22 years | Act on GABA system | 2018-2019 | USA | Active Not recruiting |
| Basimglurant (RO4917523 ,RG7090) | II | Altered neuropsychological behavior | 5-13 years | Negative allosteric modulator of mGluR5 | 2012-2016 | USA | Completed |
| Acid ascorbic+Alpha-trocophenol (SXF-TRA152) | II | Hyperactivity, cognitive and behavior development | 6-18 years | Antioxydant, to treat hypercholesterolemia and depression | 2011-2015 | SPAIN | Completed |
| Riluzole | IV | Repetitive behavior, anxiety, hyperactivity | Adult | Interaction with glutamate using | 2009-2017 | USA | Completed |
| Donepezil | II | Aberrant behavior, excecutive function | 12-29 years | Inhibitor of acetylcholinesterase | 2010-2016 | USA | Completed |
| Aripiprazole | II | Aberrant behavior: social, irritability,speech,hyperactivity,sterotypies | 5-35 years | Partial agonist dopaminergic D2, serotoninergic 5HT1 and antagonist serotoninergic 5HT2A | 2001-2017 | USA | Completed |
| Fenomab (NPL-2009) | I-II | PPI and neuropsyhomotor tests | 18-45 years | Selective antagonist mGluR5 | 2008-2012 | USA | Completed |
| BPN14770 | II | Cognition, attention, global improvment, visual scale, anxiety, eye tracking | 18-45 years | Phosphodiesterase 4D allosteric inhibitor | 2018-2020 | USA | Active Not recruiting |
| Zygel=ZYN002-CBD Transdermal Gel | II-III | Aberrant behavior | 3-17 years | Non-euphoric canabinoid | 2018-2020 | USA | Active Not recruiting |
| Ampalex (CX516) | II | Attention, memory, langage and behavior | 18-50 years | Correction of synaptic transmission | 2003-2005 | USA | Completed |
| Epigallocatechin Gallate (EGCG) | II | PPI, cognitive test, psychomotor speed, learning, langage, memory, quality of life | 18-60 years | Enzymatic inhibitor (glutamate deshydrogenase) | 2013-2019 | SPAIN | Completed |
| Minocyclin | NA | Decrease of MMP9 level and strengthening of brain connexion in mice | 1,5-16 years | Brain anti-inflammatory | 2010-2017 | USA | Completed |
| Lovastatin+PILI (parent implementing langage) | IV | Aberrant behavior, langage, visual scale | 10-17 years | Inhibitor of HMG-CoA reductase | 2015-2019 | USA | Completed |
| Minocyclin+Lovastatin | II | Decrease of MMP9 level and strengthening of brain connexion in mice , aberrant behavior | 8-45 years | Combined | 2016-2018 | Canada | Completed |

protéine (> 2 fois niveau endogène), ils ont été accompagnés d'effets secondaires toxiques (Gholizadeh et al., 2014). Plusieurs essais cliniques ont ciblé les récepteurs mGluR dont la signalisation est excessive et dont la réduction génétique ou le blocage pharmacologique a montré la correction de plusieurs phénotypes de la souris *Fmr1*-KO (crises, hyperactivité, changements structurels neuronaux). Mais l'utilisation de divers antagonistes des mGluR-I n'a pas permis de montrer d'effet positif dans plusieurs essais cliniques à grande échelle (Pfeiffer et al., 2006 ; Braat et Kooy, 2014). La voie inhibitrice GABA a été également décrite affectée chez les personnes atteintes de FXS car des problèmes tels que les crises d'épilepsie, les troubles du sommeil sont associés à cette voie, et il a été montré que FMRP cible les ARNm des sous-unités du récepteur $GABA_A$. Dans les études précliniques chez la souris et la drosophile, la modulation positive des récepteurs $GABA_A$ corrige certaines altérations comportementales et neurophysiologiques. Les activateurs de $GABA_B$ ont également corrigé un éventail de phénotypes, y compris la morphologie des épines dendritiques, les crises audiogéniques et les anomalies cellulaires. Mais aucun des candidats-médicaments ciblant la signalisation GABAergique n'a démontré une amélioration significative dans des essais cliniques (Braat et Kooy, 2014 ; D'Hulst et al., 2017 ; Lozano et al., 2014 ; Olmos-Serrano et al., 2011).

Une majorité des études a ciblé le déséquilibre excitateur / inhibiteur via les antagonistes de mGluR5 (Mavoglurant ; Basimglurant) ou les agonistes GABA (agoniste Arbaclofen-$GABA_B$ ; agoniste Ganaxolone-$GABA_A$). L'ensemble des essais cliniques réalisés ou en cours est représenté dans le tableau (www.Clinicaltrials.gov) (**Figure 35**).

# Chapitre IV : Identification d'une cible unique, DGKκ, et importance de la signalisation lipidique dans les neurones

## I. Identification de la diacyl-glycérol kinase kappa comme cible unique de FMRP

Dans notre laboratoire, dans le but d'identifier les cibles ARN de FMRP, l'utilisation de la technique de CLIP sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris a permis d'identifier l'ARNm DGKκ comme une cible préférentielle de FMRP. De manière intéressante, cette cible n'avait pas été identifiée par les études réalisées auparavant (Brown et al., 2001 ; Miyashiro et al., 2003 ; Darnell et al., 2011 ; Ascano et al., 2012) ni après (Li et al., 2020; Maurin et al., 2018; Sawicka et al., 2019). Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer pourquoi l'ARNm DGKκ n'a pas été retrouvé par d'autres équipes. Tout d'abord, il est important de noter que la protéine DGKκ n'a été découverte qu'en 2005 (Imai et al., 2005), ainsi elle n'a pas pu être identifiée par les premières études. Un deuxième facteur est le matériel biologique de départ. Ainsi notre équipe a utilisé des cultures de neurones pures, tandis qu'Ascano et al., ont réalisé le CLIP dans des cellules rénales où DGKκ peut avoir été facilement manquée car son expression est 100 fois plus faible dans les reins que dans les tissus neuronaux (Tabet et al., 2016). Darnell et al., ont effectué un CLIP sur un homogénat cérébral où DGKκ aurait dû apparaître, cependant, on ne sait pas si l'efficacité du CLIP est inférieure dans les homogénats de cerveau par rapport aux cultures de neurones ou si DGKκ a été perdue pendant l'étape de purification des polyribosomes. Un autre facteur est le traitement bioinformatique des données car DGKκ présente des problèmes d'annotation dans les bases de données. *DGKκ* humaine est annotée en tant que gène non codant dans le GRCh37 (Genome reference consortium 37), mais cette erreur a été corrigée dans GRCh38, et chez la souris le gène *Dgkκ* est annoté comme n'ayant pas d'exon 1 (noté comme non séquencé). Ces problèmes peuvent avoir éliminé DGKκ lors des analyses bio-informatiques. Enfin, d'autres facteurs peuvent avoir été critiques pour l'identification de DGKκ. Tout d'abord, notre équipe a conservé les ARNm intacts dans les cas où les régions seraient difficiles à amplifier (Tabet et al., 2016). Deuxièmement, la normalisation des ARNm cibles peut être critique. La méthode de

normalisation utilisée au laboratoire est faite à partir des neurones de souris Wt et *Fmr1*-KO et avec les ARNm totaux (Input). La différence entre les deux conditions et par rapport aux ARNm totaux a été prise en compte pour réaliser la normalisation des résultats (Tabet et al., 2016). De plus, Tabet et al., ont réalisé le CLIP en parallèle sur des extraits de cerveaux et de cultures primaires de neurones, et lorsque le matériel est immunoprécipité avec FMRP dans des extraits de cerveaux, d'avantage d'ARN aspécifiques sont récupérés, il est donc très difficile de distinguer le bruit de fond d'un vrai signal. Seul le CLIP sur les neurones semble donner une immunoprécipitation spécifique (Tabet et al., 2016). Enfin l'âge des neurones, c'est-à-dire le stade de développement neuronal, pourrait être également un facteur jouant au niveau du niveau d'expression de la cible ARNm et ainsi dans l'efficacité de sa visualisation dans le CLIP.

## II. DGKκ et lipides

Les travaux de notre équipe ont permis de proposer une nouvelle hypothèse dans la fonction de FMRP : FMRP, cette protéine conservée entre de nombreuses espèces au cours de l'évolution, possèderait un ARNm cible privilégié, la diacyl-glycérol kinase kappa (DGKκ), qu'elle régulerait de manière unique dans les neurones corticaux.

Depuis sa découverte en 2005 par l'équipe de Sakane, très peu d'études ont été réalisées sur la protéine DGKκ (Imai et al., 2005). DGKκ est une kinase appartenant à la famille des diacyl-glycerol kinases (DGK) composée de 10 isozymes chez les mammifères (Sakane et al., 2018). Les DGK régulent une grande variété d'événements physiologiques et sont impliquées dans de nombreuses pathologies, tels que les cancers, le diabète de type II, les troubles neuronaux et les réponses immunitaires (Sakane et al., 2018). Les DGK sont conservées chez les bactéries, appuyant un rôle essentiel des DGK dans les organismes vivants (Cai et al., 2009). Ces enzymes diffèrent entre elles par leur structure, leurs propriétés enzymatiques, leur localisation et leur expression cellulaire. Leur fonction est de phosphoryler le diacylglycérol (DAG) en acide phosphatidique (PA), deux lipides essentiels à l'équilibre de la transduction du signal cellulaire (Sakai et Sakane, 2012).

La fonction principale des DGKs est de convertir le DAG (diacyl-glycérol) en PA (acide phosphatidique). Le DAG est un diglycéride formé d'un résidu glycérol et deux acides gras liés de façon covalente par des liaisons esters et un groupement hydroxyle libre. Les DAG sont des lipides neutres (ne comportent pas de fonctions ionisables, apolaires) avec des fonctions de second messager impliqués dans un grand nombre de voies métaboliques dans de nombreux

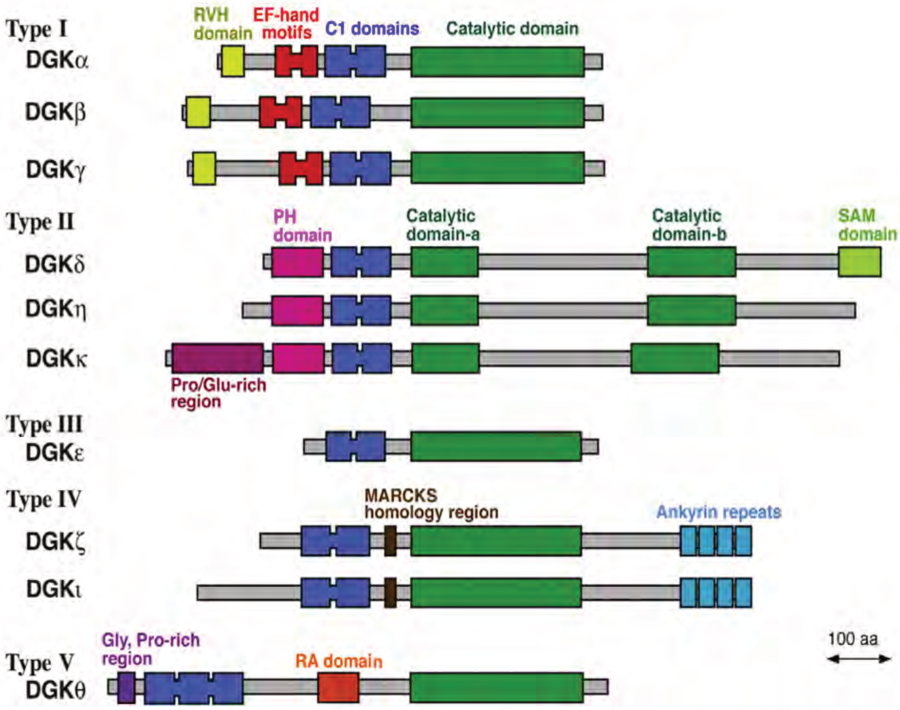



**Figure 36 : Protéines de la famille des diacylglycérol kinases de mammifères**

MARCKS : substrat C-kinase myristoylé riche en alanine ; PH : domaine d'homologie de la pleckstrine; RA: associé à Ras; RVH: domaine d'homologie recoverin; SAM: Sterile Alpha Motif. Issu de Sakane et al., 2018

types cellulaires et sont essentiels à de nombreux processus biologiques tels que la formation et l'activité des synapses immunitaires et neuronales (Almena et Merida, 2011 ; Vitale et Moine, 2019). Le glycérol possédant les acides gras liés aux positions sn1 et sn2 (sn 1,2 isomère) correspond à l'isomère du DAG produit naturellement dans l'organisme (Vom Dorp et al., 2013). La phosphorylation du groupement hydroxyle par les DGK produit le phosphoglycéride PA.

## 1. Les domaines fonctionnels des DGK

Les dix isoenzymes DGK sont classées en cinq groupes en fonctions de leurs fonctions et de leurs structures. Le groupe I est constitué des DGK α, β, γ, le groupe II des DGK δ, η, κ, le groupe III de la DGK ε, le groupe IV des DGK ζ, ι et le groupe V de la DGK θ (Sakane et al., 2018) (**Figure 36).** En plus de ces différentes isoenzymes, certaines DGK possèdent également des isoformes différentes qui les rendent par ce fait, très diverses (δ1, δ2, η1, η2...) (Cai et al., 2009 : Sakane et al., 2018). Du point de vue de leur structure, les DGK ont en commun le domaine catalytique et au moins deux domaines riches en cystéines (homologues du domaine C1 en N- terminale de la protéine kinase C (PKC)). Le domaine C1 présents chez la PKC et d'autres protéines, permet la fixation du DAG et a un rôle important dans la translocation de ce dernier vers la membrane après activation de récepteurs en amont (Colón- González and Kazanietz, 2006). La fonction du domaine C1 n'est pas claire à ce jour. Le domaine catalytique des DGK fixe une molécule d'ATP nécessaire à la phosphorylation du DAG en PA. Les mutations en dehors du domaine catalytique peuvent provoquer une altération de l'activité enzymatiques ce qui sous-entend que le domaine catalytique n'est pas le seul impliqué dans cette activité (Los et al., 2004).

Par ailleurs, les DGK α, β et γ faisant partie du groupe I ont la spécificité de fixer le calcium à l'aide du domaine EF en N-terminal. DGKε appartenant au groupe III est la seule enzyme qui ne possède pas de domaine de régulation, mais qui possède une préférence pour l'arachidonoyl-DAG (Tang et al., 1996).

Les DGK du groupe VI (ζ et ι) comportent 4 répétitions ankyrines, un PDZ et un signal NLS chevauchant avec une région homologue au site de phosphorylation de la protéine MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate ; correspondant à un substrat de la PKC) (Cai et al., 2009).

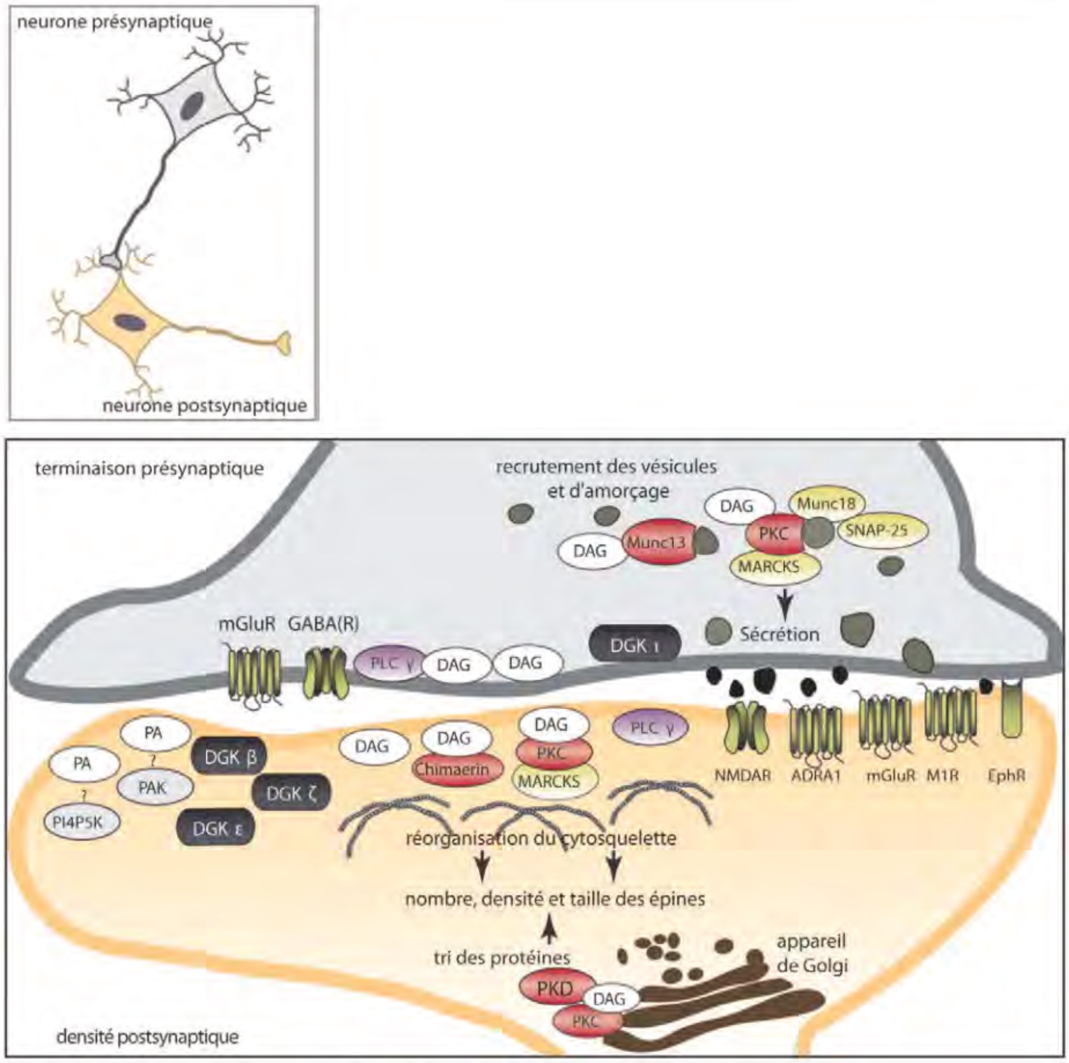
La DGKθ du groupe V comporte trois domaines C1 et un motif ressemblant au domaine PH. Les DGK peuvent donc avoir différentes fonctions selon les domaines de régulation qu'elles possèdent et selon leur localisation cellulaire et tissulaire.

## 2. La diacylglycérol kinase kappa : DGKκ

La DGKκ est la dernière enzyme découverte parmi les DGK (Imai et al., 2005). Elle fait partie de la classe II des DGK avec les enzymes DGKδ et DGKη (Sakane et al., 2018). La phase codante du gène *DGKκ* code pour une protéine de 1271 acide aminés et son poids moléculaire est de 142 kDa. En plus des deux domaines C1, les isoenzymes appartenant à la classe II ont la caractéristique commune de comporter un domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH) en N-terminal, quatre structures « coiled-coil » (enroulements de plusieurs hélices) et un domaine catalytique divisé en deux parties. Le domaine PH composé a été montré fixer d'une manière faible et non sélective des phosphatidylinositols (Cai et al., 2009). Pour DGKδ1, le domaine PH est nécessaire et suffisant pour une localisation au niveau de la membrane plasmique de la protéine après stimulation des cellules au tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA, diester de phorbol et puissant promoteur de tumeur souvent utilisé pour activer la PKC). Cependant, ce même domaine n'intervient pas dans la localisation membranaire de DGKκ (Sakai et Sakane, 2012).

La protéine DGKκ possède des motifs uniques au niveau de sa région N-terminale. Elle possède 33 répétitions du motif « Acide glutamique-Proline-Alanine-Proline » (des répétitions EPAP), une région riche en prolines (Pro24-Pro44), ainsi que cinq répétitions Serine-Proline (Ser196- Pro205) (Imai et al., 2005 ; Sakai et Sakane, 2012). Aucune autre protéine connue ne possède ces différents motifs en N-terminal et par conséquent leur fonction reste inconnue pour le moment. Du côté C- terminal, DGKκ comporte un domaine PDZ (Postsynaptic density protein-95/Disks/large/Zonula occludens-1) correspondant au module d'interaction protéine-protéine le plus commun dans les protéines mammifères et il est plus particulièrement présent dans les protéines neuronales (Imai et al., 2005 ; Chi et al., 2012 ; Sakai et Sakane, 2012).

Malgré une forte similitude structurale avec les deux autres DGK du groupe II, DGKκ ne possède pas la capacité de s'homodimériser, en effet, elle ne possède pas de domaine SAM (Sterile Alpha Motif) comme les DGK δ et η qui serait le domaine impliqué dans l'homo ou hétéro-dimérisation. De plus, une autre différence est que DGKκ possède une activité catalytique sensible au stress oxydatif. Concernant la localisation, DGKκ se retrouve




## Figure 37: Implication des DGK dans la fonction des synapses neuronales

L'activation de différents récepteurs induit l'accumulation du DAG, notamment les récepteurs mGluR-I. Les DGK phosphorylent le DAG pour terminer la voie de signalisation de ce lipide et débuter celle du PA. La régulation du niveau de ces deux messagers lipidiques au niveau des synapses modulerait la structure des épines dendritiques, issu de Almena et Mérida, 2011.

naturellement au niveau de la membrane plasmique dans les cellules HEK293 et COS7, grâce à un domaine situé entre un domaine coiled-coil et le PDZ. Des études de délétions progressives de DGKκ ont mis en évidence qu'une petite séquence de la région C-terminal de 69 acides aminés est nécessaire et suffisante pour sa localisation au niveau de la membrane plasmique (Imai et al., 2005). Les DGK δ et η se localisent au niveau de la membrane uniquement après stimulation au TPA des cellules.

## III. L'implication des DGK dans le cerveau

Les DGK sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires et physiologiques et en particulier dans le système nerveux (**Figure 37**). En effet, la plupart des DGK sont exprimées de manière abondante au niveau du cerveau, avec un niveau élevé des ARNm DGK β, γ, ζ, ι et θ. DGKβ est exprimée au niveau du noyau caudé, du noyau accumbens et de l'hippocampe (Goto et Kondo, 1993 ; Adachi et al., 2005 ; Shirai et al., 2010), elle est précocement exprimée entre le 14ème et le 28ème jour du développement embryonnaire et est localisée au niveau des sites péri-synaptiques, suggérant un rôle important pour le réseau neuronal (Hozumi et al., 2008).

DGKγ est essentiellement localisée dans cellules de Purkinje et les cellules de l'hippocampe. Elle est présente à la naissance, puis augmente progressivement au cours du temps (Goto et al., 1994 ; Adachi et al., 2005). DGKζ est fortement exprimée dans le thymus et le cerveau (au niveau du cervelet, de l'hippocampe et du bulbe olfactif), dans le muscle squelettique, le cœur et le pancréas (Bunting et al., 1996 ; Goto et Kondo, 1996). DGKι est essentiellement exprimée dans le cerveau, en particulier au niveau de l'hippocampe et du gyrus denté (Sommer et al., 2001). Concernant DGKθ, son ARNm est fortement exprimé dans le cervelet et l'hippocampe de rat adulte (Houssa et al., 1997).

Au niveau cellulaire, les DGK β, ζ, ε et ι ont été montrées impliquées directement dans la fonction synaptique en modulant la morphologie ainsi que la transmission synaptique des neurones. La souris Dgkβ-KO présente une réduction de la LTP au niveau de la région CA1(Corne d'Ammon 1) de l'hippocampe, ayant pour conséquence des altérations des fonctions cognitives, notamment des défauts de la mémoire spatiale et à long terme, une hyperactivité et une diminution de l'anxiété (Shirai et al., 2010 ; Kakefuda et al., 2010). Dans les cultures de neurones d'hippocampes de souris Dgkβ-KO, Shirai et al., observent une diminution des branchements et des épines dendritiques, ces altérations sont corrigées après la surexpression de la DGKβ (Shirai et al., 2010). Kim et al., en 2009 ont montré que les souris

déficientes en DGKζ présentent également des défauts du nombre d'épines et que la surexpression de la DGKζ aboutit quant à elle à une augmentation du nombre des épines dendritiques (Kim et al., 2009b). Seo et al., en 2010 ont montré qu'en plus des altérations de la morphologie des épines dendritiques, les souris Dgkζ KO montrent une exagération de la LTP et une réduction de LTD au niveau de la région CA1 de l'hippocampe (Seo et al., 2010). Ces altérations de LTP et LTD sont corrigées par l'inhibition de la phospholipase C (PLC), et l'inhibition de la PKC est montrée corriger ces altérations de la transmission synaptique (Seo et al., 2010). La souris Dgkε-KO, présente des altérations de la plasticité synaptique également. En effet une réduction de LTP au niveau du gyrus denté a été observé confortant bien l'importance du rôle de la phosphorylation du DAG en PA dans cette plasticité (Rodriguez de Turco et al., 2001). Enfin, les souris Dgkι-KO présentent une légère augmentation du relâchement de neurotransmetteurs à partir du compartiment présynaptique, à l'âge de deux semaines, ces souris présentent une réduction de la mGluR-LTD en comparaison avec les souris Wt probablement dû à des altérations de ces mécanismes présynaptiques (Yang et al., 2011). Malgré leur appartenance au même groupe de DGK, DGKζ a une fonction essentielle au niveau du compartiment postsynaptique alors que DGKι serait plutôt impliquée dans une régulation présynaptique de la signalisation du DAG (Yang et al., 2011).

Sakai et al., 2012, ont décrit l'implication de DGKδ dans l'épilepsie, ce trouble caractérisé par des décharges d'influx nerveux anormaux qui touche environ 3% de la population au cours de leur vie (Brami et al., 1993). En effet, une patiente présentant un ensemble de symptômes dont des convulsions, présente une altération du gène codant pour *DGKδ2* (Leach et al., 2007). Des analyses EEG (électro-encéphalogramme) des souris DGKδ mutantes ont montré des décharges épileptiques anormales et des crises. *L'hybridation in situ* a confirmé que l'ARNm de DGKδ était très fortement exprimé dans les neurones pyramidaux du néocortex et de l'hippocampe, ainsi que dans le cervelet des souris adultes. Ces résultats suggèrent qu'une altération de DGKδ pourrait avoir un rôle dans l'étiologie des crises étant donné son importante expression dans la condition Wt, cependant le mécanisme par lequel le manque de DGKδ provoque des crises d'épilepsie n'est pas connu à l'heure actuelle (Leach et al., 2007 ; Sakai et al., 2012). Hormis l'épilepsie, DGKη a été associée à des troubles bipolaires, qui sont des maladies neuropsychiatriques fortement héréditaires caractérisées par des épisodes récurrents de dépression et de manie ou d'hypomanie (Baum et al., 2008 ; Sakai et al., 2012). DGKη est essentiellement exprimée au niveau du cerveau mais sa localisation précise n'est pas encore déterminée (Klauck et al., 1996). Une forte association a été établie entre troubles bipolaires et trois SNP (single nucleotide polymorphism) localisés dans le premier intron du gène *DGKH*

codant pour la DGKη (Baum et al., 2008). Une autre étude a montré dans des échantillons de cerveaux post-mortem de patients atteints de troubles bipolaires, que les niveaux d'expression génique de *DGKH* étaient augmentés de 25% comparé aux témoins contrôles, notons que cette augmentation a été retrouvée également chez des patients atteint de schizophrénie, elle n'est donc pas spécifique aux troubles bipolaires mais parait être liée aux maladies neurologiques (Moya et al., 2010).

Malheureusement peu de données existent dans la littérature sur la protéine DGKκ. Jusqu'à présent, son ARNm était essentiellement détecté au niveau des testicules et du placenta et faiblement voire inexistant dans les autres tissus et dans les lignées tumorales (Imai et al., 2005). Récemment, les bases de données, montrent la présence de l'ARNm de DGKκ majoritairement dans les glandes surrénales, la glande pituitaire et le cerveau en plus des testicules chez l'Homme. Au laboratoire, la détection et la quantification de l'ARNm DGKκ ont été effectuées par PCR quantitative dans les neurones primaires corticaux murins (Tabet et al., 2016). Ils ont observé qu'il n'y avait pas de différence significative du niveau d'ARNm Dgkκ entre conditions Wt et *Fmr1*-KO (Tabet et al., 2016). En revanche, dans les polysomes neuronaux *Fmr1*-KO une diminution du niveau d'ARNm Dgkκ a été observée, indiquant une diminution de la traduction de DGKκ en absence de FMRP, en accord avec une baisse de la traduction de la protéine.

Ces données montrent que différentes DGK sont nécessaires à la régulation synaptique en régulant la conversion du DAG en PA et que l'altération du niveau de ces messagers lipidiques aboutit à des anomalies de la structure des épines dendritiques, de la transmission synaptique et des troubles du comportement. Les altérations observées suite aux défauts des DGK évoquent fortement les phénotypes cellulaires et électrophysiologiques majeurs du FXS. C'est ce qui a été observé dans notre équipe en 2016, dans les neurones *Fmr1*-KO après activation mGluR-I (*voir partie « Rôle de DGKκ dans le FXS »*) (Tabet et al., 2016). L'ensemble de ces données associé au résultat de CLIP de FMRP et l'altération de l'expression de DGKκ en absence de FMRP soutient l'hypothèse de l'implication de DGKκ dans les défauts observés du FXS. Afin de démontrer le rôle physiologique exact de DGKκ, une souris Dgkκ-KO a été générée dans notre laboratoire afin de confirmer le rôle de cette enzyme (notamment dans la morphologie des épines dendritiques, la transmission synaptique et les troubles comportementaux), ces études sont en cours. Il est intéressant de préciser que les ARNm des autres DGK ne sont pas enrichis avec le CLIP de FMRP, indiquant que ces ARNm ne sont pas cibles de FMRP dans les neurones corticaux.

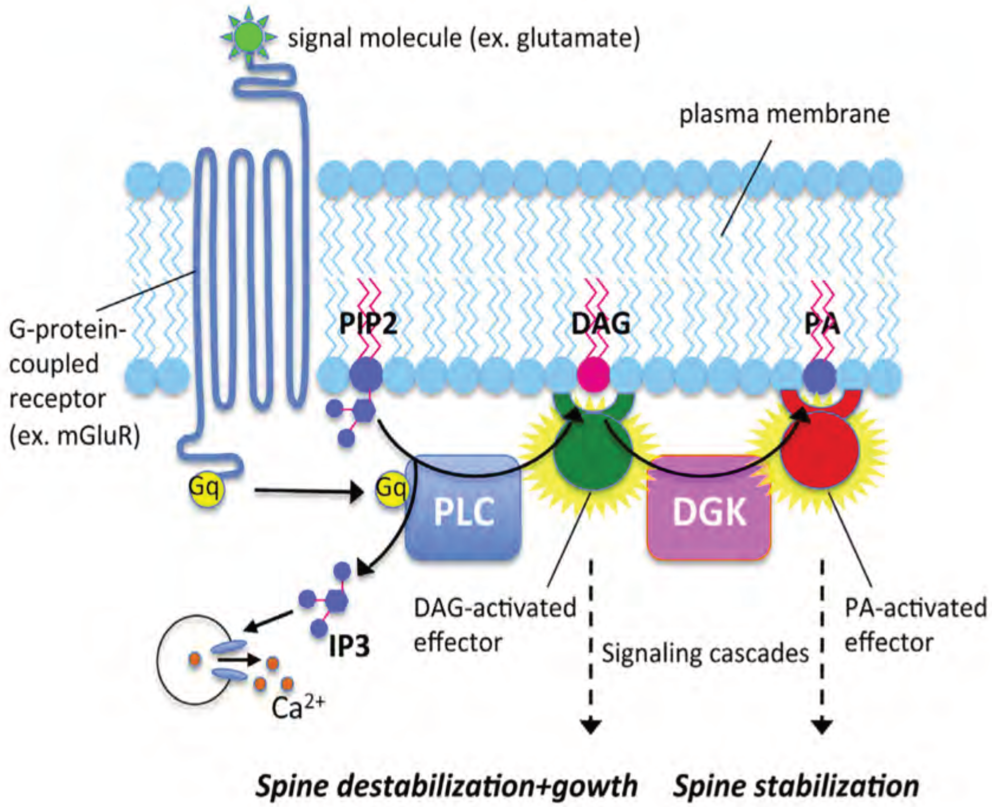



**Figure 38: Schéma général de la signalisation du DAG et du PA**

Issu de Tabet et al., 2016b.

## IV. Les rôles du DAG et du PA dans la régulation des épines

La production de DAG dans les neurones résulte de l'activation des récepteurs couplés aux protéines Gq, notamment les récepteurs mGluR-I présents dans les synapses excitatrices au niveau de la membrane post-synaptique, et déclenche la cascade de transduction du signal en activant les phospholipases C (PLC β/γ) (Conn et al., 1997 ; Rhee et al., 2001 ; Yang et al., 2013). Après activation des PLC, ces derniers convertissent le PIP2 en DAG et en IP3. L'IP3 cytoplasmique conduit à la mobilisation du $Ca^{2+}$ à partir des réserves intracellulaires tandis que le DAG, ancré à la face interne de la membrane plasmique, recrute et / ou active le domaine C1 contenant des protéines cibles (Tabet et al., 2016b) (**Figure 38**). Le DAG va par la suite à son tour activer différents effecteurs impliqués dans plusieurs voies biologiques (remodelage des épines dendritiques, motilité, stabilité) et l'IP3 va permettre le relâchement du calcium à partir du réticulum endoplasmique (Hotulainen et al., 2010). Parmi les effecteurs du DAG, la PKC va phosphoryler différents substrats et majoritairement la protéine MARCKS (Myristoylated, Alanine-Rich C-Kinase Substrate). La protéine MARCKS déphosphorylée favoriserait la stabilisation des épines, et est proposée jouer un rôle important dans la régulation du cytosquelette et plus précisément des filaments d'actine (Calabrese et Halpain, 2005). En ce qui concerne les PKC, la PKCε a été montré jouer un rôle dans la croissance des neurites (Larsson et al., 2006). Notons que la signalisation du DAG est un phénomène très rapide car la conversion du DAG en PA par les DGK se produit en quelques secondes (Kim et al., 2009b). Les résultats obtenus par ces différentes équipes suggèrent que les effecteurs du DAG seraient plutôt associés à la déstabilisation des épines dendritiques. La phosphorylation du DAG en PA par les DGK doit donc être parfaitement régulée (Almena et Mérida, 2011). Le processus d'activation de la DGKκ n'est actuellement pas connu, peut-être que son recrutement au niveau des sites d'activation synaptique pourrait se faire comme pour la DGKz via la protéine PSD95 (Kim et al., 2009b).

Le PA est également un important messager lipidique pouvant agir sur différents effecteurs pour réguler la structure des épines dendritiques (Almena et Mérida, 2011). Un grand nombre d'effecteurs de PA a déjà été identifié dont les protéines PAK1 (p21-activated kinase 1), PKCζ, PKCε, mTOR entre autres (Kim et al., 2010). PAK1 est une kinase régulant la polymérisation de l'actine (Bokoch, 2003). Au niveau des neurones, PAK1 est proposée être un régulateur positif des épines dendritiques (Boda et al., 2006), elle phosphoryle et induit la dissociation de

son inhibiteur RhoGDI (Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor) (Chuang et al., 1993). Des études ont montré l'implication de ces protéines cibles du PA dans la régulation de processus cellulaires différents incluant la structuration du cytosquelette d'actine (Di Paolo et De Camilli, 2006 ; Ackermann et Matus, 2003 ; Nakagawa et al., 2004). Toutes ces données montrent que le DAG et le PA sont tous les deux impliqués dans la structure des épines dendritiques et que leur niveau doit être finement contrôlé dans les synapses pour le bon fonctionnement de ces structures.

Après activation des mGluR-I, un défaut de conversion du DAG en PA dans les neurones FXS pourrait donc expliquer les anomalies de structure et de fonction des épines dendritiques observées chez les patients FXS et dans les modèles animaux. De manière intéressante, un autre lipide peut être produit à partir du DAG après activation des mGluR-I, le 2-AG. Le 2-AG active les récepteurs endocannabinoïdes localisés au niveau de la membrane présynaptique. Un défaut du 2-AG a été observé dans les préparations de synaptoneurosomes de souris FXS après activation des mGluR-I. Cet effet a été justifié par un défaut de l'activité de la diacylglycérol lipase α (DGLα) suite à l'absence de FMRP fixant son ARNm. Ce défaut pourrait aussi résulter de l'accumulation de DAG suite au défaut d'activité DGKκ (Tabet et al., 2016).

## V. L'implication du PA dans la régulation de la traduction dendritique

Le complexe mTOR occupe un rôle important dans la gestion des niveaux de nutriments dans la cellule qui sont nécessaires à la division cellulaire ainsi que dans les modifications morphologiques neuronales liées à la signalisation cellulaire. A ce titre, mTOR régule les niveaux de synthèse protéique nécessaires à la cellule (Sharma et al., 2010 ; Polak et Hall, 2009). La stabilité ainsi que l'activité de mTOR dépendent du niveau de PA présent dans la cellule (Foster, 2007, 2009, 2013). Classiquement, la voie PI3K/AKT est la plus connue et la plus étudiée régulant l'activité du complexe mTOR, mais ce dernier reconnait également d'une manière directe le PA via son domaine de fixation à la rapamycine permettant son activation (Fang et al., 2001 ; Veverka et al., 2008). Le PA est donc essentiel. Dans les neurones, la stimulation des mGluR-I peut activer la voie mTOR afin de contrôler la traduction coiffe-dépendante et la LTD-mGluR (Sharma et al., 2010). Il est décrit dans la littérature que les souris *Fmr1*-KO présentent une augmentation de la phosphorylation de la voie mTOR (Dölen et al., 2007 ; Sharma et al., 2010). Au laboratoire, Tabet et al., ont montré que les neurones issus de souris *Fmr1*-KO présentent un défaut de production du PA après stimulation

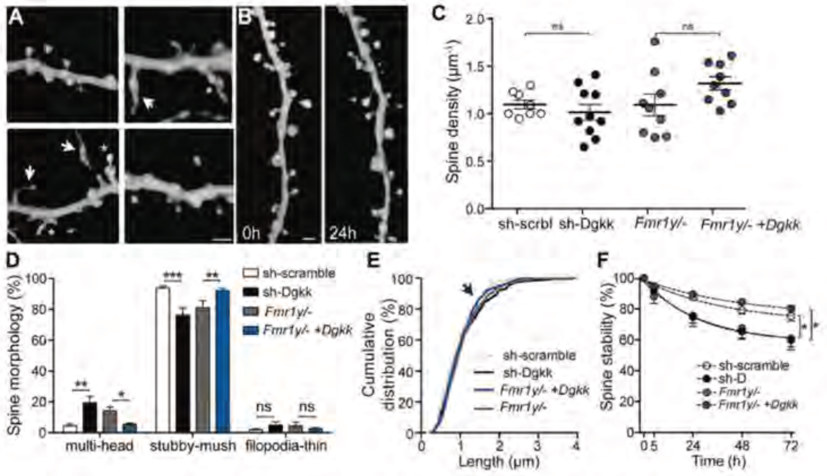



**Figure 39: Altérations des épines dendritiques et correction de ce phénotype en modulant l'expression de Dgkκ**

(A) Illustration des changements dans la morphologie des épines dendritiques chez la souris Fmr1$^{-/y}$ (gauche) ou Fmr1$^{-/y}$ (droite) dans les neurones pyramidaux CA1 transfectés avec pAAV-EGFP-shRNA-scramble (en haut à gauche), pAAV-EGFP-shRNA-Dgkκ (en bas à gauche), pAAV-EGFP (en haut à droite) et pAAV-Dgkκ (en bas à droite). On observe la présence d'épines multi-têtes (étoiles) ainsi que de très longues épines fines (flèches) (échelle : 2 µm). (B) Modifications des épines dendritiques (nouvelles épines, + et épines perdues, -) survenant dans les neurones pyramidaux exprimant le shRNA-scramble (échelle : 2 µm.) (C) Absence de changements de densité synaptique des épines dendritiques dans les quatre conditions. ns, non significatif. (D) Augmentation des épines multi-têtes et diminution des épines matures (forme de champignon) dans les cellules transfectées shRNA – Dgkκ (sh-Dgkκ) vs shRNA – scramble et dans cellules transfectées Fmr1$^{-/y}$ vs Fmr1$^{-/y}$ + Dgkκ. Issu de Tabet et al., 2016.

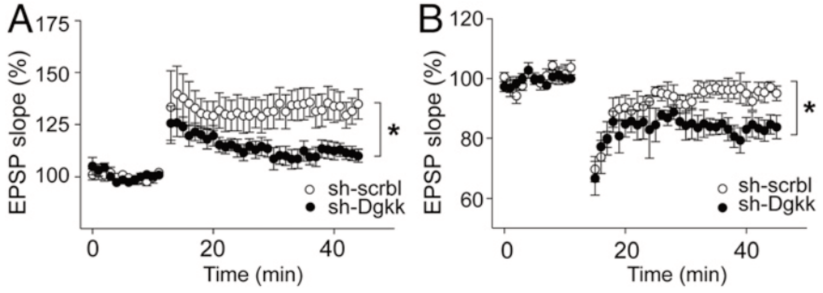



**Figure 40 : Altérations synaptiques induites par l'interférence avec l'expression de Dgkκ (absence d'expression de Dgkκ)**

(A) Diminution de la LTP dans les tranches d'hippocampe en cultures infectées avec shRNA – Dgkκ vs shRNA– scramble exprimant les virus AAV (B) Augmentation de LTD dans les tranches d'hippocampe en cultures infectées par shRNA – Dgkκ vs shRNA– scramble exprimant les virus AAV. EPSP = excitatory postsynaptic potentials. Issu de Tabet et al., 2016.

mGluR-I. Ce défaut pourrait donc expliquer la suractivation de la voie mTOR et suggérer ainsi que l'augmentation de la traduction globale serait secondaire au défaut de synthèse de PA (Tabet et al., 2016).

## VI. Rôle de DGKκ dans le FXS

Notre équipe a montré que DGKκ est vraisemblablement une cible importante de FMRP dans les neurones corticaux. En effet, l'ARNm DGKκ est celui qui a été trouvé le plus fortement associé à FMRP, très distinctement devant tous les autres ARN neuronaux, et FMRP est nécessaire à l'expression de DGKκ dans ces cellules : l'absence de FMRP conduit à une perte d'expression de DGKκ dans les neurones corticaux de souris (Tabet et al., 2016). Par ailleurs, l'affinité de FMRP pour l'ARNm DGKκ a été mesurée être la plus forte trouvée à ce jour pour un ARN (subnanomolaire), devant le motif G-quadruplex.

Plusieurs données suggèrent que DGKκ joue un rôle important dans la pathologie FXS :

- Le silencing de DGKκ dans la région CA1 sur des tranches organotypiques d'hippocampe de souris Wt entraîne une augmentation d'anomalies des épines dendritiques anormalement longues et une diminution de la proportion d'épines matures comme ce qui est observé dans les neurones *Fmr1*-KO (Tabet et al., 2016). De plus, ces anomalies sont accompagnées d'une augmentation de la dynamique des épines dendritiques (instabilité). Ces données indiquent que DGKκ est nécessaire à la maturation et au maintien de l'équilibre entre formation et élimination des épines dendritiques qui sont essentiels à une bonne plasticité synaptique (**Figure 39**).
- La surexpression de DGKκ dans le même type de tranches d'animaux *Fmr1*-KO corrige ces mêmes défauts, indiquant que DGKκ est en mesure de compenser le manque de FMRP pour ces anomalies (Tabet et al., 2016)
- Le silencing de DGKκ dans la région CA1 sur des tranches organotypiques d'hippocampe de souris Wt entraîne des anomalies de LTD et LTP similaires à celles observées chez les souris *Fmr1*-KO (Tabet et al., 2016) (**Figure 40**)
- Le silencing de DGKκ dans la région striatale de souris Wt induit des altérations de comportement (perte d'interactions sociales, augmentation des stéréotypies, hyperactivité, incapacité à faire un nid) similaires à celles observées chez les souris *Fmr1*-KO (Tabet et al., 2016) (**Figure 41**)

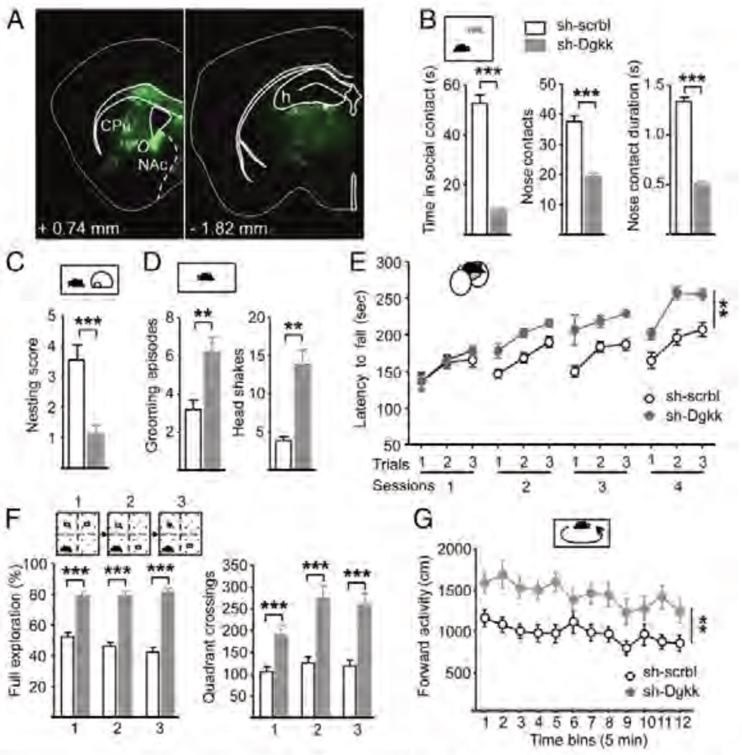



**Figure 41: Interférence avec l'expression de Dgkκ (absence d'expression de Dgkκ) dans le striatum conduit à un comportement de type FXS**

(A) La distribution de la GFP, 4 semaines après l'injection stéréotaxique d'AAV montre l'expression du shRNA dans le striatum au centre, sans atteindre le cortex et l'hippocampe. Les coordonnées se réfèrent au Bregma. CPu, putamen caudé ; h, hippocampe ; NAc, noyau accumbens. (B) Les souris exprimant le shRNA – Dgkκ (sh-Dgkκ) montrent une diminution du temps passé dans le contact social, en raison notamment de la diminution du nombre et de la durée des contacts nasaux par rapport aux souris exprimant le shRNA – scramble (sh-scrbl). (C) Les souris exprimant le shRNA – Dgkκ (sh-Dgkκ) ne parviennent pas à construire des nids appropriés. (D) Les souris exprimant shRNA – Dgkκ (sh-Dgkκ) présentent des épisodes de toilettage stéréotypés spontanés et des secousses de tête. (E et F) Conformément au comportement stéréotypé, les animaux injectés sh-Dgk-κ montrent une facilité d'apprentissage des habiletés motrices sur le rotarod accéléré (E) et des schémas d'exploration répétitifs dans le test NOR, associés à une activité locomotrice accrue telle que mesurée par le nombre de croisements dans les quadrants (F).(G) L'hyperactivité est confirmée dans les boîtes d'activité, où les souris knockdown striatal pour Dgkκ parcourent une plus longue distance en 60 min par rapport aux animaux exprimant le shRNA – scramble. Issu de Tabet et al., 2016

- Les souris *Fmr1*-KO présentent un niveau basal de diacylglycerol (DAG) augmenté dans leurs neurones corticaux et une augmentation similaire du niveau de diacylglycerol a été observée dans le cerveau de patients FXS. Un tel effet est en accord avec une diminution de l'activité DGK (Tabet et al., 2016)

- Les souris *Fmr1*-KO présentent un niveau d'acide phosphatidique (PA) diminué dans leurs neurones corticaux (après activation mGluRI) en accord avec une diminution de l'activité DGK (Tabet et al., 2016)

En raison des rôles majeurs joués par les lipides DAG et PA dans la signalisation cellulaire, l'identification de la dérégulation de DGKκ a permis de proposer un nouveau mécanisme moléculaire du FXS (Tabet et al., 2016b). Dans ce modèle (**Figure 42**), la dérégulation de DGKκ explique les anomalies des épines dendritiques et les altérations de plasticité synaptique observées dans le FXS. L'augmentation du niveau de DAG observé dans les neurones serait un facteur déclenchant l'augmentation de la synthèse protéique observée dans les neurones FXS (par exemple, en activant les PKC ou d'autres effecteurs) et l'induction d'anomalies de croissance des épines dendritiques. Le manque de synthèse de PA après l'activation des mGluR-I, à l'inverse, pourrait être responsable du défaut de maturation des épines dendritiques et des perturbations associées de la plasticité synaptique en impactant la polymérisation de l'actine par exemple. Dans ce modèle, FMRP, au lieu de réprimer la traduction synaptique de centaines voire milliers d'ARNm par interaction directe (le modèle actuellement proposé) agirait sur la traduction de ces ARNm de manière indirecte. En permettant d'activer la traduction de l'enzyme DGKκ (par un mécanisme encore inconnu), FMRP agirait avant tout indirectement sur l'arrêt de la signalisation du DAG, produit lors de l'activation des récepteurs mGluR-I (et possiblement d'autre récepteurs couplés aux protéines G). En absence de FMRP, DGKκ n'est plus produite correctement. Le niveau de DAG augmente alors localement autour des récepteurs mGluR-I provoquant une signalisation du DAG exacerbée. Cette signalisation exacerbée serait responsable de l'augmentation de la synthèse protéique locale des ARNm dendritiques indépendamment de leur capacité à être associé à FMRP. L'excès de DAG pourrait également provoquer un excès de signalisation du 2-AG puisque le 2-AG est principalement issu du DAG. Le défaut de synthèse de PA empêcherait la stabilisation des épines en perturbant la polymérisation normale de l'actine. Ce modèle permet globalement de prendre en compte les principales altérations observées à ce jour dans la pathologie.

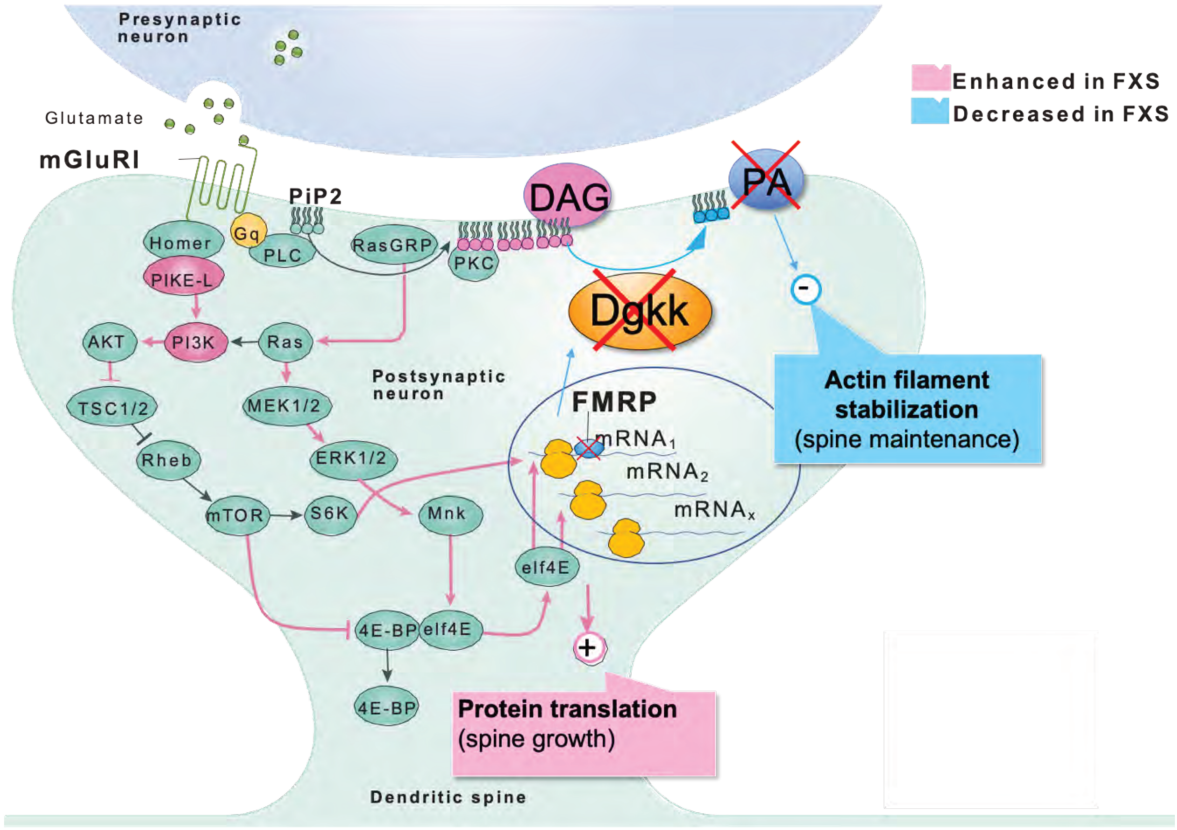



**Figure 42 : Nouveau modèle de la physiopathologie du FXS proposé**

En absence de FMRP, il y aurait une perte de traduction de DGKκ qui provoquerait d'une part une accumulation de DAG expliquant remarquablement la suractivation des voies de signalisation (en rose) et qui conduirait à un excès de traduction protéique impliqué dans la plasticité synaptique et d'autre part un manque de PA qui pourrait expliquer l'altération du maintien de la morphologie des épines dendritiques. Adapté de (Moine et Vitale, 2019).

Par rapport à ce modèle, les approches thérapeutiques envisagées jusqu'à présent ont ciblé certains aspects des dérégulations du FXS (par exemple l'excès de DAG avec les antagonistes mGluR-I ou l'excès de synthèse protéique avec l'antibiotique minocycline). Le modèle proposé par le laboratoire suggère que ce type de stratégie est probablement insuffisant car les défauts résultant du manque de PA n'ont pas été pris en compte. Ainsi, sur la base de ces données, DGKκ apparait comme une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt. C'est la pertinence de cette nouvelle cible que j'ai décidé de valider dans mon projet de thèse.

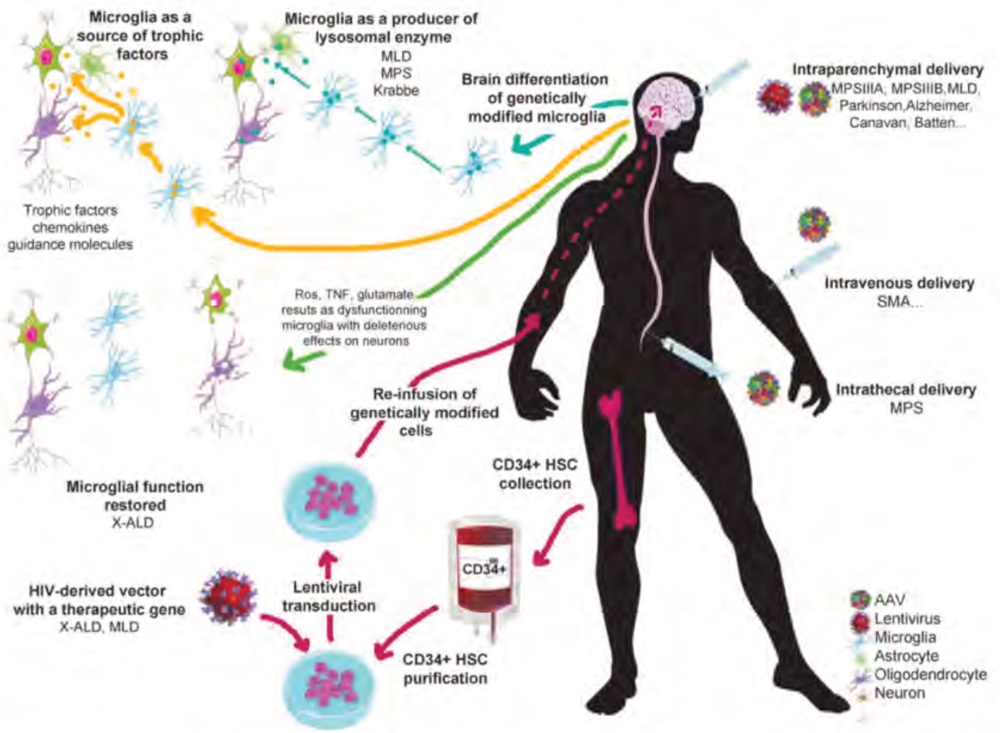



**Figure 43: Stratégies de thérapie génique in vivo et ex vivo pour le traitement des maladies du système nerveux central (SNC)**

La thérapie génique *in vivo* (à droite) implique la perfusion directe de vecteurs (vecteurs lentiviraux ou vecteurs de virus adéno-associés) codant pour le gène thérapeutique. Trois modes d'administration sont présentés : l'administration intraparenchymateuse directe, l'administration intraveineuse et l'administration intrathécale. Du côté gauche, la thérapie génique *ex vivo* est basée sur la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) génétiquement modifiées pour traiter les maladies du SNC. Après la récolte des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse du patient, la fraction cellulaire CD34 + contenant des CSH est purifiée et transduite avec un vecteur dérivé du virus de l'immunodéficience humaine portant le gène thérapeutique. Les cellules génétiquement modifiées sont réinjectées dans le patient et reconstituent le compartiment des cellules souches de la moelle osseuse. Une fraction des cellules souches ou des progéniteurs myéloïdes est capable de migrer vers le SNC, de traverser la barrière hémato-encéphalique et de se différencier localement en cellules génétiquement modifiées ressemblant à des microglies. La microglie peut être génétiquement corrigée (comme dans l'adrénoleucodystrophie liée à l'X) pour restaurer une fonction normale, entraînant des conséquences bénéfiques pour les neurones. Dans le cas des maladies lysosomales, la microglie est utilisée comme source d'enzyme sécrétée pour corriger les cellules déficientes voisines. La microglie pourrait également être utilisée pour sécréter des facteurs thérapeutiques tels que des facteurs trophiques ou des chimiokines. ROS, espèces réactives de l'oxygène ; TNF, facteur de nécrose tumorale. Issu de Piguet et al., 2017.

# Chapitre V : La thérapie génique

## I. Principe de la thérapie génique

L'agence européenne des médicaments (EMA) définit la thérapie génique comme un médicament de thérapie ayant deux caractéristiques principales : 1) contenir du matériel génétique (appelé transgène) qui est administré à l'aide d'un vecteur chez des êtres humains afin de réguler, de corriger, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique et 2) que l'effet thérapeutique observé soit la conséquence directe de l'introduction de ce transgène dans l'organisme (Wirth et al., 2013). L'approche de thérapie génique a pour but de soigner une maladie, de ralentir sa progression ou d'améliorer les conditions de vie d'un malade atteint de maladies dites incurables ou pour lesquelles aucun traitement n'est actuellement disponible (Verma et Weitzman, 2005 ; Kumar et al., 2016).

La thérapie génique peut être utilisée *in vivo* pour modifier des cellules directement après injection systémique ou localisée chez le patient, ou elle peut être utilisée *ex vivo*, c'est-à-dire que des cellules de patients sont prélevées pour être cultivées et dans lesquelles le transgène sera transféré avant d'être réimplantées chez le patient. L'approche *ex vivo* est notamment utilisée dans le contexte de transfert de gènes dans des cellules souches ayant des capacités d'auto-renouvellement. En effet, la modification génétique apporté sera transmise aux cellules filles après division des cellules souches ce qui permettra d'obtenir une modification théoriquement stable et homogène. De nombreuses pathologies sont concernées par cette approche *ex vivo*, en l'occurrence les maladies immunitaires et les hémopathies (**Figure 43**) (Piguet et al., 2017).

La thérapie génique peut être également germinale ou somatique. En ciblant les cellules somatiques le transfert de matériel génétique ne sera pas transmis aux cellules filles après division cellulaire contrairement aux cellules germinales. A ce jour, seule la thérapie génique somatique est autorisée par la loi. Le transgène apporté par la thérapie génique peut être de différentes natures : jusqu'à récemment, il s'agissait surtout de moduler l'expression d'un gène par introduction du gène lui-même ou bien de le cibler et le dégrader par ARN interférence, mais plus récemment d'autres types de séquences comme le système CRISPR-Cas9 ont été utilisées pour corriger un gène altéré (Yang et al., 2016 ; Lannoy et Hermans, 2017).

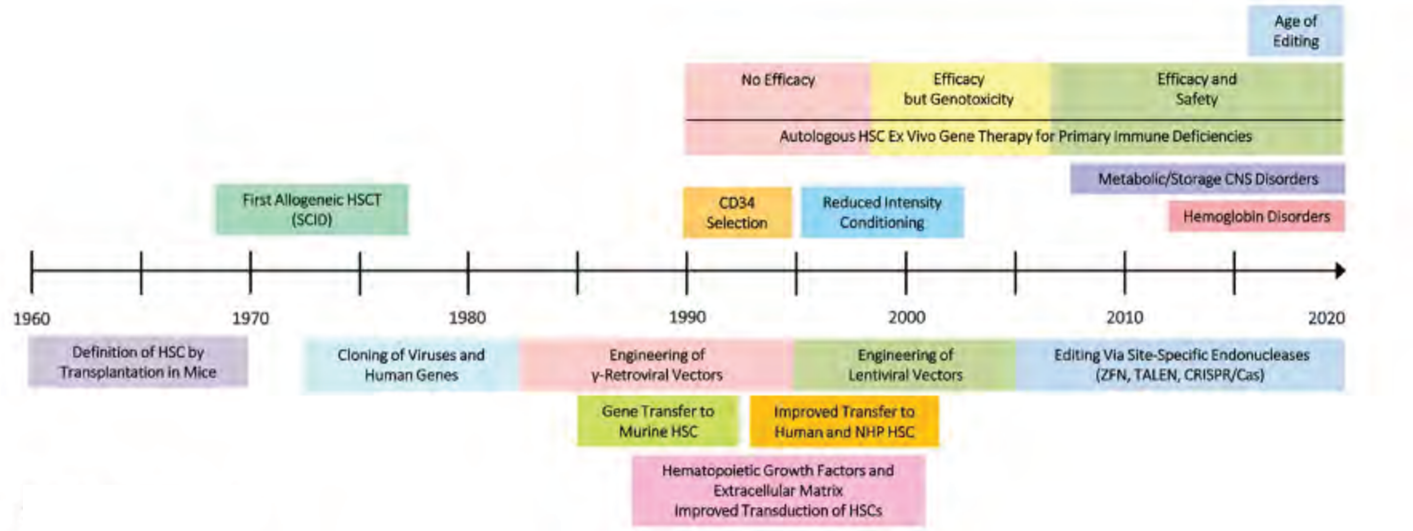



**Figure 44: Aperçu historique de la thérapie génique**

HSCT : greffe de cellules souches hématopoïétiques ; HSC : cellule souche hématopoïétique ; SCID : immunodéficience combinée sévère ; NHP : primate non humain ; ZFN : nucléase à doigt de zinc ; TALEN : nucléase effectrice de type activateur de transcription ; CRISPR / Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindoromic Repeats-CRISPR-associated protein9. Adapté de Dumbar et al., 2018.

## II. Historique de la thérapie génique

Le concept de thérapie génique apparait en 1972, quand Theodore Friedmann and Richard Roblin mettent en évidence qu'au moins 1500 maladies chez l'homme sont dues à des altérations génétiques et proposent d'utiliser de l'ADN exogène afin de remplacer l'ADN endogène défectueux chez les personnes atteintes de maladies génétiques (Friedmann et Roblin, 1972) (**Figure 44**). Pour des raisons éthiques et de risques biologiques il a fallu attendre les années 90 pour voir le premier essai clinique de thérapie génique chez l'Homme. Cet essai s'est déroulé dans le cadre d'une maladie immunitaire appelée déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine desaminase appelé l'ADA-SCID par thérapie génique *ex-vivo* et a été mené par l'équipe du Dr. French Anderson aux États-Unis, ce sera le premier succès de thérapie génique.

Malheureusement, cette approche novatrice a été par la suite marquée par de nombreux résultats décourageants qui ont causé l'arrêt partiel des thérapies géniques chez l'Homme. En effet, en 1999, un essai de traitement par thérapie génique chez un patient âgé de 18 ans atteint de déficit en ornithine transcarbamylase (OTC, une enzyme impliquée dans la régulation des chaînes de réaction du foie) avec un adénovirus de type 5 comme vecteur de transfert génétique du gène OTC conduit au décès du patient 4 jours après l'injection. Ce n'est que plusieurs années plus tard que les causes de la mort ont pu être élucidées : l'injection hépatique d'adénovirus a provoqué un syndrome de réponse inflammatoire systémique, entrainant une coagulation intravasculaire disséminée avec pour conséquence une défaillance multiple d'organes, entraînant la mort du patient (Raper et al., 2003).

L'année 2000 voit le retour de la thérapie génique avec un premier succès mondial de cette approche dans le cadre d'un essai clinique entreprit par Alain Fischer pour le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (SCID-X1) (Cavazzana-Calvo et al., 2000 ; Fisher et al., 2001). Mais, deux ans plus tard, quatre patients traités sur dix ont développé une leucémie et pour deux d'entre eux cette leucémie fait suite à l'intégration du vecteur dans un proto-oncogène LIM-domain only 2 (LMO2) (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). Enfin, après des débuts assez hésitants, durant la dernière décennie, les recherches ont permis de mieux connaitre le fonctionnement des vecteurs thérapeutiques, d'améliorer les techniques utilisées ainsi que les protocoles thérapeutiques, plaçant la thérapie génique à nouveau sur le devant de la recherche biomédicale. Suite au succès de la thérapie génique *ex vivo* pour l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (Cartier et al., 2009 ; Naldini, 2009), plusieurs centaines

| | Injection site | Disease | Clinical trial | Inclusion | Serotype | Transgene | Promoter[a] | Dose, min vg | Dose, max vg | Volume, µL | Speed, µL/min | IS | Status | Identifier | Ref. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Intraparenchymal | WM (*n*=6) | Can | Phase I | 13 | 2 | ASP | NSE | $9\times10^{11}$ | | 900 | 2 | NA | C | NA | 15 |
| | WM (*n*=12) | LINCF | Phase I | 11 | 2 | CLN2 | CAG | $1.8\times10^{12}$ | $3.2\times10^{12}$ | 600 | 2 | NA | C | NCT00151216 | 17 |
| | WM (*n*=12) | LINCF | Phase I/II | 16 | rh10 | CLN2 | CAG | $2.85\times10^{11}$ | $9\times10^{11}$ | 1800 | 2 | NA | O | NCT01414985 | NA |
| | WM (*n*=12) | MPS IIIA | Phase I/II | 4 | rh10 | SGSH | PGK | $7.2\times10^{11}$ | | 720 | 0.5 | Y | C | NCT01474343 | 16 |
| | WM (*n*=12)/ Cer (*n*=4) | MPS IIIB | Phase I/II | 4 | 5 | NAGLU | PGK | $4\times10^{12}$ | | 960 | 0.5 | Y | O | ISRCTN19853672 | NA |
| | WM (*n*=12) | MLD | Phase I/II | 5 | rh10 | ARSA | CAG | $1\times10^{12}$ | $4\times10^{12}$ | NA | NA | NA | O | NCT01801709 | NA |
| | StN (*n*=2) | Par | Phase II | 16 | 2 | GAD | CAG | $2\times10^{12}$ | | 70 | 0.23 | NA | C | NCT00643890 | 162 |
| | Str (*n*=4) | Par | Phase I | 10 | 2 | AADC | CMV | $9\times10^{10}$ | $3\times10^{11}$ | 200 | 1 | N | C | NCT00229736 | 163 |
| | Put (*n*=8) | Par | Phase I&II | 70 | 2 | NTN (CERE-120) | CAG | $1.3\times10^{11}$ | $5.4\times10^{11}$ | 80 | 2 | NA | C | NCT00252850 NCT00400634 | 106,164 |
| | Put (*n*=6)/ SN (*n*=4) | Par | Phase I/II | 57 | 2 | NTN (CERE-120) | CAG | $9.4\times10^{11}$ | $2.4\times10^{12}$ | 360 | 2/3 | NA | O | NCT00985517 | 165 |
| | Str (*n*=2) | Par | Phase I | 24 | 2 | GDNF | CMV | $9\times10^{10}$ | $3\times10^{12}$ | NA | NA | NA | O | NCT01621581 | NA |
| | Str (*n*=2) | Par | Phase I | 10 | 2 | AADC | NA | $7.5\times10^{11}$ | $1.5\times10^{12}$ | NA | NA | NA | O | NCT01973543 | NA |
| | Put (*n*=4) | Par | Phase I/II | 6 | NA | AADC | NA | $3\times10^{11}$ | $9\times10^{11}$ | 200/600 | 3 | NA | O | NCT02418598 | NA |
| | Put (*n*=2) | Par | Phase I | 10 | 2 | AADC | NA | NA | | NA | NA | NA | O | NCT01395641 | NA |
| | NBM (*n*=4/6) | Alz | Phase I | 10 | 2 | NGF (CERE-110) | CAG | $1.2\times10^{10}$ | $1.2\times10^{11}$ | 40/80 | 2 | NA | C | NCT00087789 | 79 |
| | NA | Alz | Phase II | 25 | 2 | NGF (CERE-110) | CAG | $2\times10^{11}$ | | NA | NA | NA | NA | NCT00876863 | NA |
| IT | NA | GAN | Phase I | 20 | 9 | Gigaxonin | JeT | NA | | NA | NA | NA | O | NCT02362438 | NA |
| | Lom | CLN6 | Phase I/II | 6 | 9 | CLN6 | CAG | $1.5\times10^{13}$ vg/kg | | NA | NA | NA | O | NCT02725580 | NA |
| IV | PeV | SMA I | Phase I/II | 15 | 9 | SMN | CAG | $6.7\times10^{13}$ | $3.3\times10^{14}$ vg/kg | NA | NA | NA | O | NCT02122952 | NA |
| | PeV | MPS IIIA | Phase I/II | 9 | 9 | SGSH | U1a | $5\times10^{12}$ | $1\times10^{13}$ vg/kg | NA | NA | Y | O | NCT02716246 | NA |

[a]The CAG promoter designation includes the CBA and CB promoter.

Alz, Alzheimer; C, completed; Can, Canavan; Cer, cerebellum; CLN6, Batten CLN6 disease; GAN, giant axonal neuropathy; IS, immunosupressor; IT, intrathecal; IV, intravenous; LINCF, Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis; MLD, metachromatic leukodystrophy; max vg, maximum vector genome; min vg, minimum vector genome; MPS IIIA, mucopolysaccharidosis IIIA; MPS IIIB, mucopolysaccharidosis IIIB; Lom, lombar; N, no; NA, not available; NBM, nucleus basalis of meynert; O, ongoing; Par, Parkinson; PeV, peripheral vein; Put, Putamen; SMA I, spinal muscular atrophy type I; SN, substancia nigra; StN, subthalamique nucleus; Str, striatum; WM, white matter; Y, yes.

**Figure 45: Essais cliniques pour les maladies du système nerveux central utilisant des AAV**

Issu de Hocquemiller et al., 2016.

d'essais cliniques ont vu le jour, sur un grand panel de maladies, des cancers aux maladies neurologiques en passant par les pathologies cardiaques et ophtalmiques (certains de ces essais sont présentés dans la **Figure 45**) (Hocquemiller et al., 2016 ; Kumar et al., 2016 ; Piguet et al., 2017).

Le syndrome de l'X fragile étant une maladie monogénique, je m'intéresserai dans ce chapitre principalement aux approches de thérapie génique pour les maladies monogéniques.

## III. Les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique

Afin de pouvoir transférer un transgène à une cellule/tissu hôte, des vecteurs viraux ou non viraux sont utilisés. Par définition, un virus a la capacité de transmettre son matériel génétique à une cellule hôte s'il a la capacité à infecter cette cellule. Les virus apparaissent ainsi comme un excellent outil pour la thérapie génique. Les différents types de vecteurs viraux sont génétiquement modifiés afin de les rendre non réplicatifs. Toutefois, les vecteurs viraux peuvent montrer une toxicité et/ou une immunogénicité, c'est pour cette raison que de nombreuses équipes se sont intéressées aux caractéristiques des différents virus afin de développer les vecteurs les moins dangereux possibles tout en étant efficaces. Aujourd'hui, même si plusieurs virus sont potentiellement utilisables, quatre catégories de virus sont les plus utilisés en thérapie génique : les rétrovirus (RV), les lentivirus (LV), les adénovirus (AV) et les virus adéno-associés (AAV). Et parmi eux, les LV et les AAV offrent les meilleures caractéristiques dans le but d'une utilisation chez l'homme (**Figure 46**) (Choudhury et al., 2017).

L'infection par le virus consiste en l'introduction du génome viral dans la cellule hôte et au détournement de la machinerie cellulaire afin de se répliquer et produire une multitude de virions. La cellule hôte va généralement être détruite et les virions nouvellement synthétisés vont conserver la capacité infectieuse des virus sauvages tout en perdant leur capacité réplicative. Afin d'obtenir une expression stable du transgène, idéalement le vecteur viral devrait s'intégrer dans le génome nucléaire de la cellule hôte. L'inconvénient de ces virus intégratifs est qu'ils peuvent provoquer des mutations par insertion en s'intégrant dans des protooncongènes qu'ils peuvent potentialiser, et donc devenir dangereux dans le cadre d'une thérapie génique.

Les vecteurs non viraux, quant à eux, sont des acides nucléiques « nus » ou associés à des composés chimiques lipidiques pour former des liposomes ou associés à des composés

| Virus | Genome | Insert Capacity | Features | Reference |
|---|---|---|---|---|
| **Adenoviruses**<br>Ad5 | dsDNA | <7.5 kb | broad host range<br>transient expression<br>strong immunogenicity | [4–6] |
| **AAV**<br>AAV2, 3, 5, 6, 8, 9 | ssDNA | <4 kb | relatively broad host range<br>slow expression onset<br>chromosomal integration<br>immune response | [7–10] |
| **Herpes simplex**<br>HSV1, HSV | dsDNA | >30 kb | broad host range<br>latent infection, long-term expression<br>low toxicity, large insert capacity | [12,13] |
| **Retroviruses**<br>MMSV<br>MSCV | ssRNA | 8 kb | transduces only dividing cells<br>long-term expression<br>random integration | [14,15] |
| **Lentiviruses**<br>HIV-1, HIV-2 | ssRNA | 8 kb | broad host range<br>low cytotoxicity, integration<br>long-term expression | [16,17] |
| **Alphaviruses**<br>SFV, SIN,<br>VEE, M1 | ssRNA | 8 kb | broad host range<br>extreme transient expression<br>low immunogenicity<br>neuron- and glial-specific mutants | [54] |
| **Flaviviruses**<br>Kunjin, West Nile,<br>Dengue virus | ssRNA | 6 kb | relatively broad host range<br>transient expression<br>packaging system | [18] |
| **Rhabdoviruses**<br>Rabies, VSV | ssRNA | 6 kb | relatively broad host range<br>high transient expression<br>low immunogenicity | [18] |
| **Measles virus**<br>MV-Edm | ssRNA | 6 kb | transient expression<br>oncolytic strains | [18] |
| **Newcastle disease Virus** | ssRNA | 6 kb | replication in tumor cells<br>improved oncolytic vectors | [20,21] |
| **Poxviruses**<br>VV | dsDNA | >30 kb | broad host range, large inserts<br>replication-competent vectors | [24–26] |
| **Picornaviruses**<br>Coxsackievirus | ssRNA | 6 kb | oncolytic strains | [22,23] |

AAV, adeno-associated virus; HIV, human immunodeficiency virus; HSV, herpes simplex virus; MMSV, Moloney murine sarcoma virus; MSCV, murine stem cell virus; SFV, Semliki Forest virus; SIN, Sindbis virus; VEE, Venezuelan equine encephalitis virus; VSV, vesicular stomatitis virus; VV, vaccinia virus.

**Figure 46: Exemples de vecteurs viraux utilisés dans le cadre de thérapies géniques**

Issu de Lundstrom, 2018.

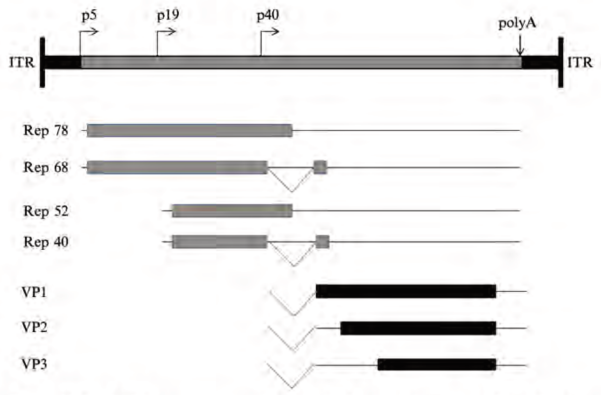



**Figure 47: Organisation du génome AAV2**

Les flèches horizontales indiquent les trois promoteurs transcriptionnels (p5, p19 et p40). Les lignes pleines noires représentent les transcrits et les introns sont représentés par les lignes inclinées. Le signal de polyadénylation est commun à tous les transcrits. Le premier cadre de lecture ouvert code pour les quatre protéines de réplication issues des promoteurs p5 et p19 et de l'épissage alternatif. Le deuxième cadre de lecture ouvert utilise le promoteur p40 et code pour les trois protéines de capside de deux transcrits. VP1 est initiée à partir du premier transcrit de capside et VP2 et VP3 sont initiées au niveau de deux sites d'initiation différents à partir du deuxième transcrit de capside. Issu de Gieger et Samulski, 2012.

peptidiques afin de faciliter leur entrée dans la cellule cible. Leur toxicité, tout comme leur efficacité, est faible comparativement aux vecteurs viraux (Verma et Weitzman, 2005). Zinder et Lederberg ont introduit le terme de « transduction » pour décrire le processus de délivrance d'un transgène par un vecteur et ainsi que son expression génique. Mais afin d'obtenir une transduction réussie cela nécessite que le vecteur réponde à plusieurs critères. En effet, Varma et Weitzman en 2005, ont décrit un vecteur idéal comme étant un vecteur capable de cibler le bon type de cellule (mitotique ou non) dans une pathologie donnée, d'être intégratif dans le meilleur des cas ou sous forme d'épisome stable, d'avoir une expression durable dans le temps, d'être le moins immunogénique et pathogénique possible et de ce fait éviter les risques potentiels de mutagenèse insertionnelle et enfin de pouvoir être produit en quantité suffisante et en qualité la plus irréprochable possible (Verma et Weitzman, 2005).

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons utilisé des virus adéno-associés (AAV). Je me focaliserai sur ce type de virus pour la suite de mon exposé.

## 1. Les virus adéno-associés (AAV)

Les vecteurs AAV apparaissent parmi les plus intéressants pour le traitement des troubles neurologiques. En effet, ce sont les vecteurs les plus souvent utilisé lors d'essais cliniques sur le système nerveux central (SNC) et ce pour plusieurs raisons que je vais aborder ici (Choudhury et al., 2017). Les AAV sont des parvovirus appartenant au genre des Dependoparvovirus, qui ce sont de petits virus non enveloppés d'environ 25 nm de diamètre avec une capside icosaédrique. Leur capacité d'encapsidation (taille maximale du transgène) est de 4,7 kb flanquée de part et d'autre en 3' et 5' de deux ITRs (inverted terminal repeats) d'environ 145 pb chacune correspondant aux origines de réplication du virus (Grieger et al., 2006). Le génome de l'AAV de type sauvage est un ADN monocaténaire linéaire constitué de deux cadres de lecture ouverts (ORF). Les ORF d'AAV codent pour quatre protéines de réplication (Rep) nécessaires à la réplication et à l'encapsidation et trois protéines de capside (Cap) qui sont des protéines structurales appelées VP1, VP2 et VP3 et composant la structure de la capside avec un ratio 1:1:10 respectivement (5VP1, 5 VP2 et 50 VP3). Un transcrit alternatif du gène Cap code pour la protéine APP (assembly activating protein) qui joue un rôle majeur dans l'assemblage de la capside (Penaud-Budloo et al., 2018 ; Agbandje-McKenna et Kleinschmidt, 2011) (**Figure 47**).

Les AAV sont des vecteurs de choix pour la thérapie génique du SNC car ils ciblent à la fois les cellules mitotiques (même si le transgène sera perdu avec le temps et les divisions) et post-mitotiques (Choudhury et al., 2017), ils sont spontanément neurotropes (se dirigent préférentiellement vers le système nerveux) après une injection directe dans le parenchyme cérébral (*voir paragraphe « Différentes voies d'administration des AAV dans le système nerveux central »*) (Zeabner et al., 2000). Ils existent sous forme stable dans un état épisomique avec un faible taux d'intégration génomique (McCarty et al., 2004), ils n'ont montré à ce jour aucune pathogénicité ou cytotoxicité chez l'Homme et ont une immunogénicité très légère, principalement humorale (Bessis et al., 2004). Enfin, les AAV peuvent être produits à des titres élevés ($10^{13}$ à $10^{14}$ particules par ml selon la méthode de production) et avec une pureté également élevée (Xiao et al., 1999 ; Urabe et al., 2002).

Leone et al., ont montré en 2012 que les vecteurs AAV étaient stables et avaient une expression efficace au-delà de 10 ans dans le cerveau humain ce qui est une caractéristique importante dans le contexte actuel où une seconde injection thérapeutique n'est pas encore envisageable en raison d'une réponse immunitaire potentielle (Leone et al., 2012). Une limitation des AAV est leur capacité d'encapsidation, le transgène ne pouvant dépasser 4,7 kb avec les ITR, ce qui empêche l'utilisation de ces vecteurs dans certaines pathologies comme pour la myopathie de Duchenne dont le gène d'intérêt, la dystrophine, a une taille de 2,4 Mb.

Notons qu'il existe d'autres vecteurs viraux ayant la capacité d'infecter les neurones, comme les virus à ARN, tels que le vecteur réplicon du poliovirus (Bledsoe et al., 2000; Jackson et al., 2001), le Semliki Forest virus (SFV) (Ehrengruber et al., 1999, 2001), le virus Sindbis (Altman-Hamamdzic et al., 1997) ou encore des virus à ADN, tels que SV40 (Cordelier et al., 2003; Louboutin et al., 2010 ; Choudhury et al., 2017).

## 2. Cycle infectieux des AAV

Les AAV nécessitent une co-infection par des virus « helper » afin d'infecter efficacement une cellule mammifère (Grieger et al., 2006). Ces virus helper peuvent être des adénovirus ou des herpesvirus (Grieger et Samulski, 2012 ; Verma et Weitzman, 2005). Après interaction spécifique avec des récepteurs de surface sur la cellule hôte, les AAV entrent en contact avec la cellule hôte et des corécepteurs facilitent l'internalisation du virus, la nature des récepteurs et des corécepteurs va dépendre du sérotype viral et à ce jour seulement certains récepteurs de surface ont été identifiés (Asokan et al., 2012). L'AAV est ensuite internalisé dans la cellule

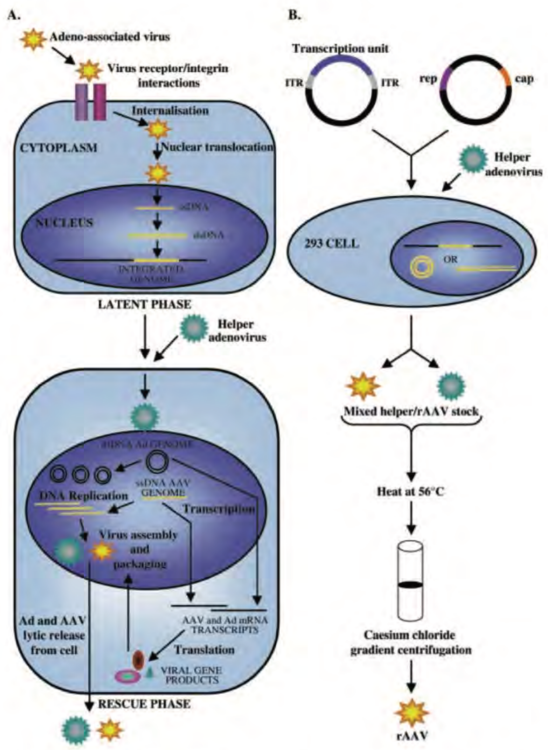



**Figure 48: Cycle de vie de l'AAV**

(A) Après infection par l'AAV de la cellule cible, le matériel viral est transloqué sous forme d'épisome dans le noyau et une phase de latence est établie. Le cycle d'infection reprend après une infection ultérieure par un virus auxiliaire, qui fournit les séquences en trans nécessaires à la poursuite de la réplication virale. (B) Représentation schématique de la production de rAAV. Les cellules permissives sont co-transfectées avec un plasmide contenant l'unité de transcription (bleu) flanquée par les ITR d'AAV (gris) et d'un plasmide contenant le génome d'AAV sans les ITR. Une infection ultérieure de ces cellules avec un adénovirus auxiliaire permet le sauvetage des virions de rAAV, après l'empaquetage du plasmide contenant l'ITR, avec le virus auxiliaire. Les virions auxiliaires et rAAV peuvent ensuite être séparés après chauffage à 56°C par centrifugation sur un gradient de chlorure de césium. Issu de Stone et al., 2000.

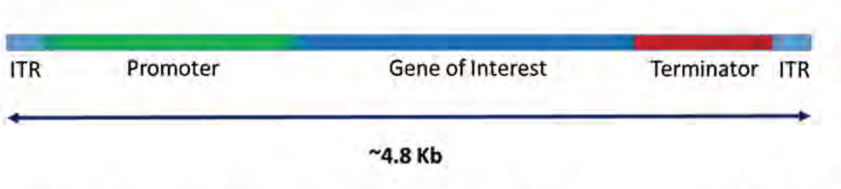



**Figure 49: Représentation schématique des composants de base d'un vecteur de transfert de gène AAV recombinant**

Virus adéno-associé AAV, répétition terminale inversée ITR. Issu de Naso et al., 2017.

par endocytose à l'aide de vésicules à clathrine et les microtubules vont permettre le transport de ces vésicules vers le noyau de la cellule hôte. Ce mécanisme sera facilité par des signaux de localisation nucléaire présents au niveau des protéines VP1 et VP2. Une fois le virus dans le noyau, il y a décapsidation et libération du génome viral dans le noyau de la cellule. Les AAV étant des virus à ADN simple brin ils ne peuvent pas se répliquer seuls et nécessitent les protéines Rep et la machinerie de la cellule hôte pour synthétiser le brin complémentaire pour permettre l'expression des gènes viraux (Stone et al., 2000). L'ADN viral se trouve sous forme d'épisome et dans de rare cas peut s'intégrer au génome nucléaire au niveau d'un site unique dans le chromosome 19 (q13.4) appelé AAVS1. Le virus helper apporte les protéines nécessaires à la réplication du génome viral, à la synthèse de la capside et à l'encapsidation de l'ADN, permettant ainsi à l'AAV de compléter son cycle viral (**Figure 48**) (Stone et al., 2000).

Une infection dite latente et non pathogène par les AAV4th est particulièrement commune dans la population humaine avec par exemple 90% des adultes séropositifs pour l'AAV2 (Lykken et al., 2018). L'ensemble des étapes du cycle d'infection du virus est critique et chacune peut être limitante dans des approches de thérapie génique utilisant des AAV.

## 3. Les virus adéno-associés recombinants (AAVr)

Plusieurs grandes avancées ont permis l'utilisation de l'AAV comme vecteur recombinant (AAVr) pour les applications de transfert de gène : la capacité de créer plusieurs sérotypes d'AAV en employant des capsides d'AAV d'origine naturelle ou synthétique (Gao et al., 2002, 2004; Rabinowitz et al., 2019; Calcedo et al., 2009), le clonage et la caractérisation de gènes auxiliaires adénoviraux qui sont minimalement requis pour la génération de particules infectieuses d'AAV (Xiao et al., 1998), et la compréhension de comment les ITR agissent en cis pour un conditionnement réussi d'un transgène dans une capside d'AAV (Xiao et al., 1997 ; Murlidharan et al., 2014).

Ces optimisations permettent désormais de produire des vecteurs AAV recombinants et leur génome composé des 2 ITR provenant des AAV sauvages et du transgène (promoteur, séquences régulatrices, gène thérapeutique et site polyA) remplaçant les séquences rep et cap (Naso et al., 2017 ; Grieger et al., 2006) (**Figure 49**). Les vecteurs produits ne contiennent aucun gène viral, empêchant ainsi leur réplication dans les cellules transduites sans l'aide d'un virus helper. Les virus recombinants formés sont ensuite extraits et soumis à une purification par centrifugation à gradient de densité (par exemple avec de l'iodixanol) suivie d'une

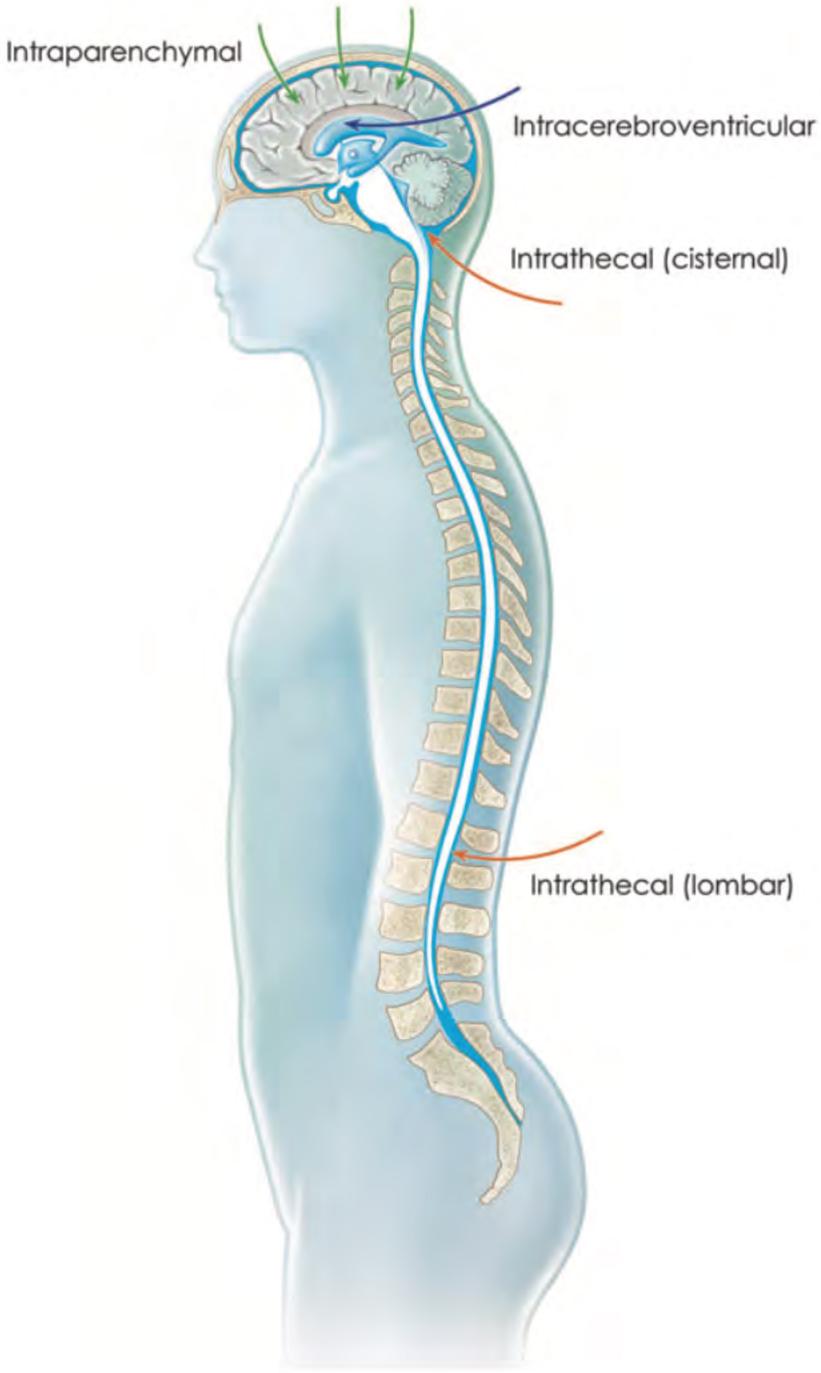



**Figure 50: Différents modes d'administration des virus en thérapie génique**

Issu de Hocquemiller et al., 2016.

chromatographie liquide haute performance avec chromatographie d'échange d'ions (Hocquemiller et al., 2016).

Les progrès continus dans la compréhension de la biologie de l'infection par les AAV au cours des deux dernières décennies ont fourni à la communauté scientifique et clinique un arsenal de souches d'AAV qui offrent des caractéristiques intéressantes pour le transfert de gènes dans le SNC (Lentz et al., 2012). En plus des isolats naturels, plusieurs souches d'AAV dérivées de laboratoires ont été conçues ou développées pour des applications spécifiques de transfert de gène dans le SNC (Murlidharan et al., 2014).

## IV. Différentes voies d'administration des AAV dans le système nerveux central

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me focaliserai sur la thérapie génique utilisant les AAV dans le système nerveux central et les administrations dites *in vivo*. De manière générale, le système nerveux reste particulièrement difficile d'accès et donc par conséquent difficile à traiter, en particulier le système nerveux central, auquel s'ajoute la présence de la barrière hématoencéphalique (blood brain barrier, BBB) (Hocquemiller et al., 2016). Plusieurs études utilisant les injections directes d'AAV dans le SNC afin d'atteindre des niveaux élevés d'expression transgénique ont été réalisées dans différents modèles animaux (McCown et al., 1996 ; Chamberlin et al., 1998 ; Tenenbaum et al., 2004 ; Bockstael et al., 2012 ; Murlidharan et al.,2014). Ces résultats ont permis le lancement de nombreux essais cliniques. Mais avant tout, le choix de la voie d'administration du vecteur est un critère essentiel. Il existe trois grandes voies d'administration du vecteur, l'injection intraparenchymale IP, l'injection dans le liquide céphalo-rachidien LCR en intracérébroventriculaire, intrathécale ou intracisternale) et l'injection intraveineuse IV (**Figures 50 et 51 (Tableau ci-dessous)**).

| Injections | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|
| Intraparenchymales (IP) | • Maximise les chances d'avoir le transgène au bon endroit (Hudru et al., 2019)<br>• Bonne distribution du virus<br>• Contourne la BBB<br>• Nécessite faible dose de virus<br>• Utilisé chez l'Homme (Janson et al., 2002)<br>• Meilleure tolérance immunologique<br>• Précision de l'injection suivi par IRM (Piguet et al., 2017) | • Difficile si plusieurs zones à injecter<br>• Stéréotaxie, chirurgie lourde |
| Liquide cephalorachidien (LCR) (par voie intracérébroventriculaire, intrathécale et intracisternale) | • Non invasif<br>• Distribution dans le cerveau et la moelle épinière (Hardcastle et al., 2018)<br>• Potentiellement transposable chez l'Homme | • Efficacité âge-dépendante de l'animal (Chakrabarty et ala., 2013)<br>• Necessite 30 fois plus de virus que l'IP (Hocquemiller et al., 2016)<br>• Rapide taux de renouvellement des cellules épendymaires à l'interface du LCR et du SN, potentielle perte de l'expression du transgène (Chauhan et Lewis, 1979) |
| Intraveineuse (IV) | • Non invasif<br>• Intéressant dans le contexte des maladies multifocales (Foust et al., 2010 ; Mattar et al., 2013; Murrey et al., 2014)<br>• Intéressant dans le cadre des maladies rétiniennes par injection orbitale (Hudru et al., 2019) | • Ne traverse pas la BBB sauf si serotype viral le permet (Foust et al., 2009)<br>• Vecteur distribué à l'ensemble de l'organisme et très hépatotrope (risque de toxicité hépatique)<br>• Nécessite d'importante dose de virus (risque de toxicité, coût et limitation technique)<br>• Exposition à des anticorps anti-AAV pour les sujets ayant déjà été en contact avec des AAV<br>• Possible expression ectopique du transgène potentiellement risqué |

**Figure 51: Avantages et inconvénients des différents mode d'administration des virus en thérapie génique**

| Serotype | Primary receptor | Intra-CSF or intra-parenchymal administration | | Intravascular administration | | Axonal transport |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Neuronal transduction | Glial transduction | Neuronal transduction | Glial transduction | |
| AAV1 | α2,3/α2,6 *N*-linked SA | ++ | + | + | + | A–,R+ |
| AAV2 | Heparan sulfate | + | – | – | – | A+,R– |
| AAV4 | α2,3 *O*-linked SA | – | + | – | – | ? |
| AAV5 | α2,3 *N*-linked SA | ++ | + | – | – | ? |
| AAV6 | α2,3/α2,6 *N*-linked SA/heparan sulfate | ++ | – | + | + | A–,R+ |
| AAV8 | ? | ++ | ++ | ++ | ++ | A+, R+ |
| AAV9 | Galactose | +++ | ++ | +++ | +++ | A+,R+ |
| AAVRh.8 | ? | ++ | ++ | +++ | +++ | ? |
| AAVRh.10 | ? | +++ | + | +++ | +++ | ? |

*? Receptor usage/axonal transport has not been characterized; + low levels of transduction; ++ moderate levels of transduction; +++ high levels of transduction; – no transduction; ? A+ or R+ (AAV vector undergoes axonal transport in the anterograde (A) or retrograde (R) direction during in vivo characterization).*

**Figure 52: Récepteurs aux capsides, profil de transduction et propriétés du transport axonal des sérotypes d'AAV les mieux caractérisés utilisés pour le système nerveux central des mammifères**

Issu de Murlidharan et al., 2014.

En résumé, le choix de la voie d'administration est critique et nécessite une bonne étude de la balance bénéfice-risque. Historiquement, les voies locales d'injection ont été préférées car elles minimisent les risques sanitaires et maximisent les chances d'administration du vecteur (Hudru et al., 2019). Dans certains cas, diverses voies d'administration sont combinées lorsque soit les technologies limitent les outils, soit la maladie est syndromique et nécessite que plusieurs organes soient ciblés (Biferi et al., 2017 ; Gurdaet al., 2016). Pour ces raisons, de nombreux paramètres précliniques devront être pris en compte afin d'exclure toute toxicité potentielle du virus et de définir une dose nécessaire et suffisante à la correction de la pathologie.

Dans le cadre de mon projet de thèse, deux types d'injections seront utilisées, l'injection IP bilatérale par stéréotaxie dans le cortex et le striatum ainsi que l'injection IV dans la veine rétro-orbitale dans le modèle murin *Fmr1*-KO du FXS.

## V. Sérotype et tropisme des AAV

Les sérotypes d'AAV diffèrent par la structure de leur capside. Chaque sérotype présente donc un profil antigénique unique et un tropisme cellulaire spécifique (Castle et al., 2016). L'AAV5 semble posséder un fort tropisme glial dans les cultures de neurones (Howard et al., 2008). Les sérotypes d'AAV 1, 2, 6, 7, 8 et 9 transduisent à la fois les neurones et les astrocytes en culture primaire (Howard et al., 2008 ; Royo et al., 2008). *In vitro*, les AAV 1, 6 et 7 semblent avoir le tropisme neuronal le plus fort, 75% au moins des cellules transduites sont des neurones (Royo et al., 2008). L'AAV9, cependant, a un tropisme neuronal relativement faible *in vitro*, avec moins de 50% des cellules transduites représentant des neurones (Royo et al., 2008). L'AAV5 est donc recommandé pour la transduction d'astrocytes en culture, et les AAV 1, 6 et 7 sont recommandés pour la transduction de neurones en culture (Castle et al.,2016). *In vivo*, après injection cérébrale intraparenchymateuse, les AAV 1, 2, 5, 7, 8, 9 et rh10 présentent tous un fort tropisme neuronal (Bartlett et al., 2018 ; Burger et al., 2004 ; Passini et al., 2003 ; Cearley et al., 2006). Cependant, l'AAV4 *in vivo* possède un fort tropisme glial et entraîne principalement l'expression génique dans les astrocytes (Liu et al., 2005 ; Castle et al., 2016).

Alors que la plupart des sérotypes d'AAV semblent transduire préférentiellement les neurones dans le cerveau, l'efficacité de transduction neuronale varie considérablement d'un sérotype à l'autre (**Figure 52**) (Murlidharan et al., 2014). On peut tout de même conclure que les sérotypes AAV 1, 9 et rh10 sont les mieux recommandés pour cibler des neurones par

injection intraparenchymateuse cérébrale c'est pour cette raison que dans mon projet de thèse j'ai utilisé l'AAVrh10 ainsi que l'AAV-PHPeB qui est un variant capsidique de l'AAV9 (Chan et al., 2017), je reviendrai sur ces variants dans les paragraphes suivants.

Notons une petite précision concernant les nomenclatures, les autres AAVr utilisés en thérapie génique correspondent généralement à des pseudovecteurs. En effet, ils sont composés d'une capside alternative à celle de l'AAV2 (correspondant à un autre sérotype d'AAV) et du génome recombinant de l'AAV2 (transgène entouré des ITR provenant de l'AAV2). Par exemple le vecteur AAVr2/9 correspond au génome recombinant de l'AAV2 avec la capside de l'AAV9, par simplification ils sont appelés AAV9 et non AAVr2/9.

En plus du sérotype, il est important de prendre en compte l'âge des animaux à injecter, en effet plusieurs équipes ont rapporté un changement de tropisme d'un vecteur viral suite à une injection IV selon que cette dernière ait été faite à la naissance ou plusieurs jours après jusqu'à l'âge adulte car en effet les chances de traverser la BBB sont plus fortes à un âge précoce (Hordeaux et al., 2015). Par exemple, l'efficacité de transduction ainsi que le type cellulaire transduit après utilisation de l'AAV9 vont dépendre de l'âge des animaux, les neurones vont être efficacement transduits chez des souris jeunes tandis que ce seront plutôt des cellules gliales qui seront transduites chez la souris adulte pour le même virus (Zincarelli et al., 2008).

Le choix du promoteur est également un élément clé pour cibler spécifiquement une population cellulaire. Dans mon projet, j'ai utilisé un promoteur synapsine afin de restreindre l'expression dans les neurones.

## VI. Émergence de nouveaux vecteurs viraux

Récemment, afin d'améliorer l'efficacité de transduction des AAV et de traverser la BBB, plusieurs approches ont été utilisées pour modifier les AAV :

- Des modifications chimiques visant à améliorer les propriétés tropiques des vecteurs adénoviraux, lentiviraux et AAV ont été réalisées, mais avec des résultats mitigés dans l'ensemble et leur utilisation *in vivo* dans le SNC reste à ce jour limitée (Castle et al., 2016)
- Des hybrides d'AAV ont été réalisés. Les capsides d'AAV sont assemblées sous forme de particules icosaédriques à partir de 60 sous-unités des protéines structurales VP1, VP2 et VP3 (Castle et al., 2016). Les capsides hybrides sont conçues pour exploiter la similitude structurelle entre les AAV, en combinant les propriétés bénéfiques de deux sérotypes différents ou plus en

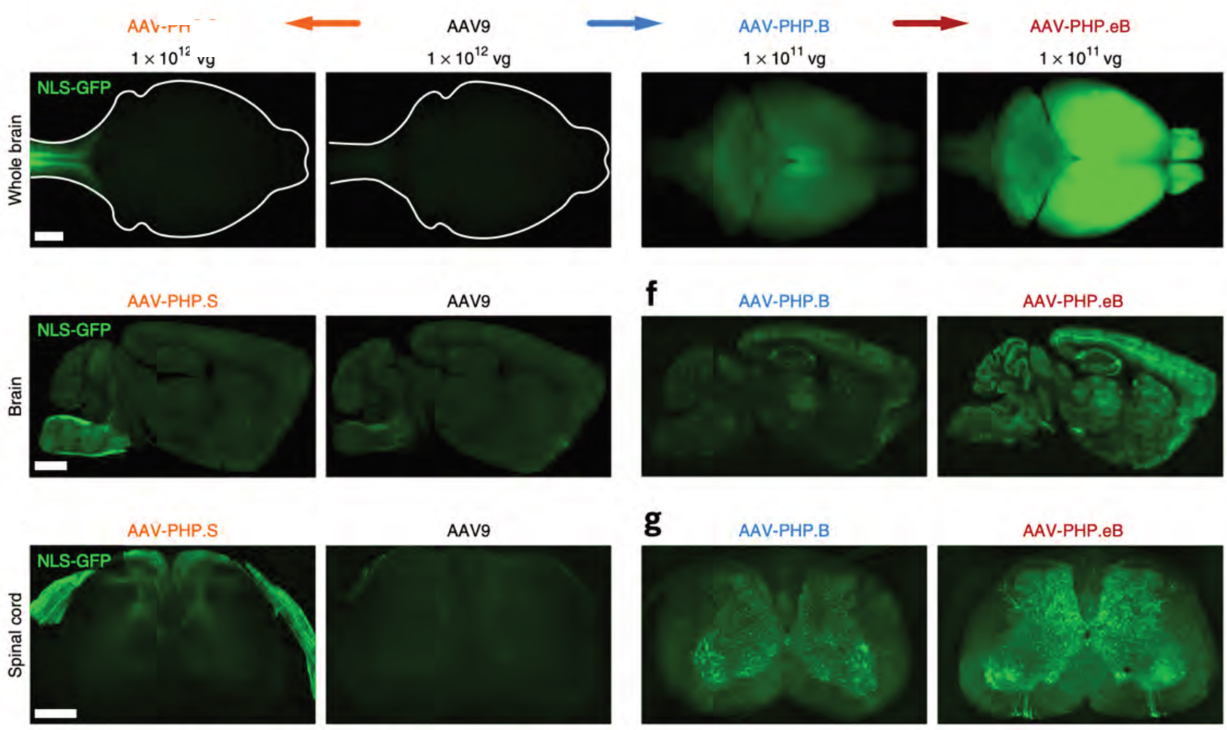



**Figure 53: Des variants d'AAV9 contribuent à une meilleure transduction à travers le SNC et du SNP**

Expression d'une GFP à localisation nucléaire dans le cerveau et la moelle épinière trois semaines après des injections en IV d'AAV9, AAV-PHP.S, AAV-PHP.B, AAV-PHP.eB codant pour une NLS-GFP ; $1x10^{12}$vg par souris pour les deux premiers vecteurs et $1x10^{11}$vg par souris pour les deux derniers vecteurs. Issu de Chan et al., 2017.

co-exprimant leurs protéines de capside pendant la production de vecteurs (Rabinovitz et al., 2000). Cependant la composition des capsides individuelles ne peut pas être directement contrôlée et des arrangements de capside indésirables sont susceptibles de se produire. Pour cette raison que les capsides d'AAV hybrides sont rarement utilisées (Castle et al.,2016)

- La modification des protéines de la capside est sûrement la plus marquante des innovations concernant les AAV. Ces modifications consistent en l'insertion de peptide court dans la capside permettant à l'AAV d'avoir un meilleur tropisme et une meilleure affinité avec son récepteur (Yang et al., 1998). Des grandes bibliothèques de peptides ont été créées mais cependant, malgré ces études prometteuses de preuve de principe in vitro, peu de mutants d'AAV avec un tropisme accru in vivo ont été publiés (Castle et al., 2016)
- La méthode CREATE (Cre Recombinase based AAV Targeted Evolution) est à l'origine de la création du vecteur AAV-PHP.B (Deverman et al., 2016). L'AAV- PHP.B est un variant capsidique de l'AAV9 c'est-à-dire que la séquence en acide aminé de sa capside et plus précisément de la protéine VP1 a été modifiée. Ce virus montre une très forte efficacité de transduction (environ 40 fois plus) comparativement à l'AAV9 après injection IV (Deverman et al., 2016). A la suite de cette impressionnante caractéristique, un nouveau variant a vu le jour à l'aide de la même méthode de modifications de capside, le PHP.eB (Chan et al., 2017). Ce variant a été également généré en modifiant la séquence en acides aminés de l'AAV-PHP.B. Il est montré comme transduisant la majorité des neurones du système nerveux central. Nous discuterons de ces efficacités obtenues plus tard dans le manuscrit.En effet, de plus en plus d'études montrent que différents facteurs jouent en faveur de cette forte efficacité de transduction observé dans l'étude de Chan. Il semblerait que le promoteur utilisé, l'âge de l'animal ainsi que le type de transgène soient propices à une forte efficacité de transduction. En effet, dans notre étude nous verrons qu'en réalité nous sommes loin de ce qui est observé par le groupe de Chan en ce qui concerne le PHP.eB. L'intérêt majeur de l'utilisation de ces vecteurs modifiés est leur capacité à traverser la BBB et par conséquent l'absence de chirurgie et la facilité d'accès au système nerveux central (**Figure 53**).

## VII. Réponse immunitaire aux AAV

Comme dit précédemment, les AAV sont décrits comme étant très faiblement immunogènes (Zaiss et al., 2002). Mais malgré tout, les premiers essais cliniques ont tout de même montré

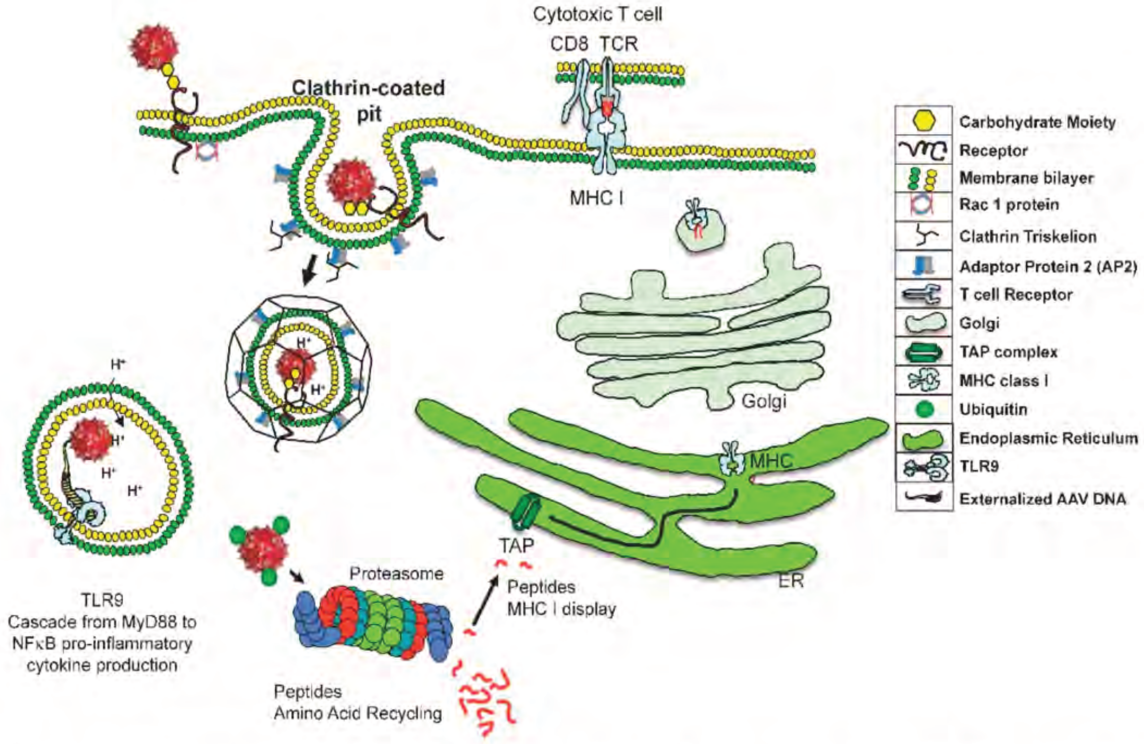



**Figure 54: Les deux risques associés à l'entrée d'AAV dans une cellule cible**

Premièrement, le système immunitaire inné est activé via la reconnaissance par les TLR9 de l'externalisation du génome viral et NF-kβ sera activé rapidement suite à une production de cytokines inflammatoires. Pour les virions qui n'ont pas été reconnu, un second risque existe qui sera dû à la dégradation lente de la capside par le protéasome. En effet, suite à cette dégradation, il y aura transport des fragments de capside vers le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP (transporteur associé à « l'antigen processing ») et en interaction avec les molécules du CMH-I. Ces fragments peptidiques seront retrouvés à la surface et éventuellement reconnus par les cellules cytotoxiques T. Adapté de Rabinovitz et al., 2019.

qu'il y avait une réponse immunitaire déclenchée non seulement contre la capside mais également contre le transgène.

## 1. La réponse immunitaire innée

Pendant le trafic endosomal des AAV, le désempaquetage du virion et / ou l'exposition partielle du génome peut entraîner la détection du TLR9 (Toll like receptor 9) ayant un rôle fondamental dans l'activation de la réponse immunitaire innée après contact avec un pathogène (Rabinovitz et al., 2019). Plusieurs études chez les animaux ont montré le déclenchement d'une réponse immunitaire innée TLR dépendante (Kawai et al., 2010 ; Zhu et al., 2009 ; Faust et al., 2013 ; Mays et al., 2009). Enfin, une étude a rapporté que les cellules hépatiques humaines primaires peuvent montrer une réponse immunitaire innée contre la capside AAV2 et AAV8 *in vitro* via le TLR2 (Hosel et al., 2012). Ces expériences démontrent que le génome de l'ADN et la capside protéique peuvent provoquer l'activation d'une réponse immunitaire innée, qui est essentielle pour façonner la réponse immunitaire adaptative (**Figure 54**) (Rabinovitz et al., 2019).

## 2. Réponse immunitaire adaptative de l'hôte à la capside de l'AAV

En dépit des travaux décrivant que les AAV recombinants sont faiblement immunogène (Rabinovitz et al., 2019), des études ont montré la présence d'anticorps neutralisants chez des sujets sains exposés à une infection naturelle aux AAV (Calcedo et al., 2009 ; 2011) ainsi que chez des patients ayant bénéficié d'une thérapie génique (Boutin et al., 2010). Par conséquent, il n'est pas surprenant que l'efficacité de la thérapie génique puisse être compromise dans plusieurs essais cliniques précoces en raison de réponses immunitaires. Par exemple, dans des essais cliniques sur le facteur IX (facteur de coagulation déficient dans l'hémophilie B) utilisant l'AAV2, l'expression transgénique a été perdue après huit semaines chez un sous-ensemble de patients. Par la suite, il a été déterminé qu'il s'agissait d'une réponse des lymphocytes T cytotoxiques CD8 + spécifiques de la capside de l'AAV qui a probablement conduit au déclin de l'expression du facteur IX par la destruction des hépatocytes transduits (Li et al., 2013).

## 3. Réponse immunitaire adaptative de l'hôte au transgène

La réponse immunitaire contre le transgène est différente en fonction de la quantité de transgène, de l'expression et du mode d'administration. Il peut ainsi y avoir absence totale de réponse immunitaire tout comme il peut y avoir lyse des cellules contenant le transgène

| Disease | Vector | Transgene | Phase | Trial code |
|---|---|---|---|---|
| ***Ex vivo*** | | | | |
| Alzheimer's disease | Retrovirus | NGF | I | US-0322 |
| Metachromatic leukodystrophy | Lentivirus | ARSA | I, II | Biffi et al., 2013 |
| Multiple sclerosis | Retrovirus | MBP | I, II | US-0851 |
| Wiskott-Aldrich syndrome | Lentivirus | WASP | I, II | Aiuti et al., 2013 |
| X-linked adrenoleukodystrophy | Lentivirus | ABCD1 | I, II | Cartier et al., 2009 |
| ***In vivo*** | | | | |
| AADC deficiency | AAV | AADC | I, II | NCT01395641 |
| Alzheimer's disease | AAV | NGF | I, II | NCT00087789, NCT00876863 |
| Batten disease | AAV | CLN2 | I | NCT00151216 |
| Batten disease | AAV | CLN2 | I, II | NCT01414985 |
| Canavan disease | AAV | ASPA | I | Leone et al., 2012 |
| Giant axonal neuropathy | AAV | GAN | I | NCT02362438 |
| Glioblastoma | Oncolytic poliovirus | – | I | NCT01491893 |
| Glioblastoma multiforme (GBM), other gliomas | Oncolytic adenovirus | – | I | NCT00805376, NCT01956734, NCT02197169 |
| Glioblastoma multiforme, other gliomas | Retrovirus | CD | I, II/III | NCT01470794, NCT02414165 |
| Glioblastoma, other gliomas | Oncolytic HSV | – | I | NCT02031965 |
| Glioblastoma, other gliomas | Oncolytic HSV | – | I | NCT00028158, NCT00157703 |
| Leber's hereditary optic neuropathy | AAV | MT-ND4 | I | NCT02161380 |
| Metachromatic leukodystrophy | AAV | ARSA | I, II | NCT01801709 |
| MPS IIIA (Sanfilippo Disease Type A) | AAV | SGSH, SUMF1 | I, II | NCT01474343, NCT02053064 |
| Parkinson's disease | AAV | GAD | I, II | NCT00195143, NCT00643890 |
| Parkinson's disease | AAV | NTRN | I, II | NCT00252850, NCT00400634 |
| Parkinson's disease | Lentivirus | TH, AADC, CH1 | I, II | NCT00627588, NCT01856439 |
| Parkinson's disease | AAV | GDNF | I | NCT01621581 |
| Parkinson's disease | AAV | AADC | I, II | NCT02418598 |
| Parkinson's disease | AAV | AADC | I | NCT00229736 |
| Pompe disease | AAV | GAA | I, II | NCT00976352 |
| Pompe disease | AAV | GAA | I | NCT02240407 |
| Spinal muscular atrophy type 1 | AAV | SMN | I | NCT02122952 |

**Figure 55: Essais cliniques utilisant des vecteurs viraux dans les maladies neurologiques**

Issu de Choudhury et al., 2017

(mécanisme d'immunité cellulaire) suivie de la neutralisation du transgène (mécanisme d'immunité humorale) (Choudhury et al., 2017). La présence initiale de la protéine chez les patients, même à faible concentration, permet d'éviter ce type de réponse immunitaire car le transgène sera considéré comme du soi étant donné que la protéine n'est pas inconnue. Par contre dans le cadre d'une mutation entrainant une absence totale de la protéine, le transgène pourrait être reconnu comme du non soi et provoquer une réponse immunitaire (Choudhury et al., 2017).

## VIII. Essais cliniques pour des maladies neurodégénératives basés sur l'utilisation d'AAV

À ce jour, on dénombre plus d'une centaine d'essais cliniques de thérapie génique toutes maladies confondues. En ce qui concerne les maladies du système nerveux, les essais cliniques sont présentés dans le tableau ci-dessous provenant de Choudhury et al., 2017 (Choudhury et al., 2017). Notons que de récentes innovations en termes de thérapie génique ont vu le jour. Jusqu'à présent, il était surtout question d'apporter une expression génique manquante, mais de plus en plus d'études précliniques montrent l'utilisation de shRNA ou de miRNA, d'oligonucléotides antisens modifiés (ASO), comme dans le cadre de la maladie d'Huntington par exemple (Hocquemiller et al., 2016 ; Merienne et Déglon, 2015). On retrouve également des AAV contenant des ARN guide pour le système CRISPR-Cas9 (Yang et al., 2016). Afin de connaitre plus en détails le statut des essais cliniques en cours ainsi que les caractéristiques principales des essai (critères d'inclusion, dates de recrutement, pays concernés etc…) on peut se référer au site ClinicalTrials.gov (**Figure 55**).

## IX. Utilisation des AAV dans le syndrome de l'X fragile

L'utilisation d'un AAV pour exprimer FMRP dans les neurones FXS est apparue comme une solution thérapeutique intéressante et a été testée chez la souris. Afin d'avoir recours à la thérapie génique pour réexprimer la protéine FMRP, plusieurs considérations doivent être prises en compte. Etant donné que FMRP est exprimé de manière ubiquitaire et à travers tout le système nerveux, il est important de bien choisir le mode d'administration adéquat. Les IP semblent exclues car elles constituent un mode d'administration a priori trop localisé. Il serait donc préférable d'utiliser l'IV mais de très grandes quantités de virus seraient nécessaires et cela deviendrait très couteux en plus du risque potentiel de toxicité lié à de fortes doses virales (Zincarelli et al., 2008). L'autre possibilité reste l'injection dans le LCR mais cela ne résoudra

pas le problème d'une importante dose de virus nécessaire, de la diffusion non contrôlée du virus auquel se rajouterait le manque d'efficacité de transduction lié à l'âge tout comme il a déjà été rapporté par l'équipe d'Arsenault et al., en 2016 et Gholizadeh et al., en 2014. En effet, l'injection intracérébroventriculaire d'AAV9-FMRP chez des souris au deuxième jour post-natal a donné une meilleure distribution cérébrale du vecteur que l'injection au cinquième jour postnatal (Gholizadeh et al., 2014), possiblement à cause de la muqueuse épendymaire entourant les parois des ventricules dans le cerveau de la souris et/ou à la difficulté à traverser la BBB à cet âge (Hampson et al., 2018).

Un deuxième problème qui doit être pris en compte est le dosage approprié du transgène dans le but d'atteindre des niveaux de FMRP « normaux », dans une majorité du cerveau (Hampson et al., 2018). En effet, la modulation de la dose n'est pour le moment pas possible en thérapie génique à moins de lourds traitements immunosuppresseurs pas toujours efficaces. Il est donc important de trouver une dose nécessaire et suffisante pour corriger les symptômes du syndrome sans être toxique.

La sélectivité du type cellulaire est une autre variable à prendre en compte. Les vecteurs viraux ont la possibilité d'être conçus avec des promoteurs sélectifs pour diriger l'expression du transgène dans un type cellulaire précis. Dans le cas du FXS, la sélection d'un promoteur approprié à utiliser peut paraître compliquée, car l'expression de FMRP varie au cours du développement chez la souris (Hampson et al., 2018). Au début du développement cérébral postnatal, FMRP est exprimée dans pratiquement tous les types de neurones et de cellules gliales. Au cours des quatre premières semaines après la naissance, à quelques exceptions près comme le corps calleux, l'expression gliale diminue progressivement de sorte que dans le cerveau mature, l'expression de FMRP dans la glie est faible par rapport à l'expression modérée à élevée dans les neurones (Gholizadeh et al., 2015).

## 1. Utilisation de l'AAV5 en thérapie génique pour le FXS

La première étude utilisant des AAV dans la souris *Fmr1*-KO a été publiée par l'équipe de Zeier et al., en 2009. Dans cette étude, les auteurs ont utilisé un vecteur AAV5 avec le promoteur de la β-actine de poulet combiné à des éléments régulateurs du cytomégalovirus (CMV), la séquence codante de *Fmr1* était quant à elle taggée par un FLAG. Le virus a été injecté de manière bilatérale directement dans l'hippocampe de souris *Fmr1*-KO âgées de 5 semaines. D'un point de vue des corrections phénotypiques, il est connu que les souris *Fmr1*

KO présentent une altération de la plasticité synaptique se manifestant par LTP dérégulée et une augmentation de la LTD. Zeier et al., montrent que 3 à 5 semaines après injection, il y a correction de la LTD dans la région CA1 de l'hippocampe (Zeier et al., 2009). Dans cette étude aucun autre phénotype n'a été analysé.

## 2. Utilisation de l'AAV9 en thérapie génique pour le FXS

Une seconde étude, menée par le groupe de Gholizadeh et al., en 2014, a testé l'administration d'un AAV9 contenant l'isoforme 1 du gène *FMR1* sous le promoteur neurone spécifique synapsine en injection intracérébroventriculaire au cinquième jour postnatal (Gholizadeh et al., 2014). Les analyses effectuées sur des animaux âgés de 4 à 8 semaines. L'expression du transgène dans la partie antérieure du cerveau visualisé en immunohistochimie et westernblot, est toujours détectée 7 mois après l'injection démontrant la stabilité du transgène (Hampson et al., 2018). Les souris *Fmr1*-KO ainsi traitées montrent une correction des stéréotypies ainsi que la dominance sociale mais aucun effet n'a été observé pour l'activité motrice qui est un élément important du comportement altéré chez la souris et chez l'Homme (qui reflète l'hyperactivité, caractéristique majeure du syndrome de l'X fragile) ainsi que pour les crises audiogéniques (Gholizadeh et al., 2014).

La troisième étude publiée à ce jour a également été réalisée par le groupe de Gholizadeh et Arsenault en 2016, toujours avec le virus AAV9 exprimant l'isoforme 1 du gène *FMR1* sous contrôle du promoteur synapsine (Arsenault et al., 2016). Le but de cette étude était d'effectuer des injections à différents âge afin de comparer l'efficacité de transduction du virus. Un traitement au jour 2 ou 3 postnatal donnait les meilleurs résultats concernant les niveaux d'expression du transgène ainsi que la diffusion du virus. Notons tout de même que cet âge en postnatal précoce chez la souris correspond à peu près au troisième trimestre d'un fœtus humain, et donc, que cette approche n'est a priori pas transposable à la thérapie génique chez l'Homme. Ils ont par la suite effectué d'autres tests comportementaux comme l'elevated plus maze (EPM) qui est un test d'anxiété ainsi que le pre-pulse inhibition (PPI) qui est un test évaluant le réflexe de sursaut à un stimulus. L'AAV9-FMRP corrige « l'anxiété réduite » anormale et la réponse réflexe élevée observée chez les souris KO. Enfin, ils ont cherché à observer l'effet de l'expression de FMRP sur des ARNm cibles dérégulés, et ils ont pu montrer que les niveaux protéiques de PSD-95 et MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2) sont revenus à des niveaux comparables aux souris WT, 4 semaines après l'injection. Le traitement par AAV-FMRP apparait donc capable de corriger l'expression de protéines régulées par FMRP (Arsenault et

al., 2016). Enfin, une correction partielle du phénotype de la souris *Fmr1*-KO a été observée chez les souris avec des niveaux de FMRP dans le cerveau antérieur d'environ 35 à 70% comparativement à la protéine Wt, alors qu'une surexpression modérée allant jusqu'à 120 ou140% n'induit pas d'anomalies comportementales. Cependant, une surexpression de 200 à 600% entraine des comportements aberrants tels que de l'hyperactivité et une réponse de sursaut anormalement réduite (Arsenault et al., 2016 ; Hampson et al., 2018).

En conclusion, les études de thérapie génique menées jusqu'à présent ont utilisé le modèle murin *Fmr1*-KO du FXS et ont démontré une correction partielle de certains déficits après un traitement postnatal précoce avec l'AAV9-FMRP. L'expression non homogène de FMRP à travers le cerveau est possiblement un frein à la correction phénotypique, se rajoute à cela un ajustement précis de la dose qui semble être compliquée à évaluer ainsi qu'un âge de traitement pouvant être transposable à l'Homme pour un éventuel essai clinique.

## Objectifs de la thèse

Comprendre comment l'absence de FMRP conduit aux altérations du fonctionnement des synapses est un enjeu majeur pour définir les bases moléculaires du FXS et identifier un traitement. Notre laboratoire a précédemment montré que la protéine FMRP s'associe majoritairement à l'ARNm de la diacylglycerol kinase kappa (DGKκ) dans les neurones corticaux et régule son expression (Tabet et al., 2016). L'ensemble des données obtenues à ce jour suggère que DGKκ est un acteur potentiellement clé de la pathologie. En effet, DGKκ est une enzyme appartenant à la famille DGK ; des masters régulateurs qui contrôlent l'équilibre entre la voie de signalisation du diacylglycerol (DAG) et de l'acide phosphatidique (PA) au niveau membranaire de nombreux types cellulaires et en particulier au niveau des neurones où DGKκ est majoritairement exprimée. Notre laboratoire a également montré que l'absence de FMRP abolit l'activité DGK dépendante des récepteurs au glutamate mGluR-I, entrainant un excès de DAG et un défaut de PA dans les neurones *Fmr1*-KO (Tabet et al., 2016). De plus, l'inactivation de DGKκ dans les neurones WT récapitule les anomalies des épines dendritiques, les altérations de la plasticité synaptique et les troubles comportementaux du modèle *Fmr1*-KO. Enfin, la surexpression de DGKκ dans les neurones *Fmr1*-KO corrige la morphologie anormale des épines dendritiques. L'ensemble de ces résultats soutient un modèle où FMRP, en régulant directement la traduction de DGKκ, master-régulateur de la signalisation DAG/PA, impacte indirectement les fonctions synaptiques en agissant sur les propriétés de la membrane et la synthèse des protéines neuronales. Ces résultats ouvrent la voie à une meilleure compréhension de la fonction de FMRP et suggèrent que DGKκ constitue une nouvelle cible thérapeutique possible.

Sur la base de ces résultats, mon projet de recherche vise à montrer l'importance de DGKκ dans le mécanisme physiopathologique du FXS ainsi que son potentiel intérêt thérapeutique dans le modèle murin *Fmr1*-KO. La première stratégie utilisée est une stratégie pharmacologique qui vise à augmenter l'activité DGK dans les neurones *Fmr1*-KO où cette activité a été montrée être déficiente. Dans ce but, nous avons utilisé la molécule pioglitazone (PGZ), agoniste des DGK, approuvé par la FDA (Food Drug and Administration). Cette molécule a été testée *in vitro* puis *in vivo* dans le modèle *Fmr1*-KO. La seconde stratégie est une stratégie de thérapie génique utilisant des vecteurs viraux adéno-associés AAV, qui présentent actuellement un intérêt grandissant pour une thérapie chez l'homme. Pour cette

stratégie, nous avons utilisé une forme de DGKκ rendue « indépendante » de la présence de FMRP (ΔNter- DGKκ) *in vitro* puis in vivo dans le modèle *Fmr1*-KO.

Avec l'ensemble de ces données, nous espérons valider DGKκ comme une nouvelle cible thérapeutique dans le syndrome de l'X Fragile.

## Stratégie pharmacologique : la pioglitazone (Article 1)

Comme introduit précédemment, DGKκ apparait comme une cible importante de FMRP dans les neurones car la perte de FMRP conduit à une perte d'activité DGK provoquant une dérégulation de signalisation DAG/PA dans les neurones. La signalisation excessive du DAG pouvant contribuer de manière significative au mécanisme physiopathologique du FXS, nous avons d'abord confirmé que la signalisation DAG-PKC était excessive dans les neurones *Fmr1*-KO. Pour tester si une action sur la signalisation excessive du DAG pouvait représenter une stratégie thérapeutique, nous avons essayé d'augmenter l'activité DGK dans le modèle murin *Fmr1*-KO en utilisant la pioglitazone (PGZ). La molécule PGZ disponible sous forme pioglitazone hydrochloride (C19H20N2O3S•HCl) est un anti-diabétique de la famille des thiazolidinediones (regroupant la rosiglitazone, la pioglitazone, la ciglitazone et la troglitazone) (Yki-Järvinen et al., 2004). Cette molécule est approuvée par la FDA pour le traitement du diabète de type 2 car elle diminue la résistance des cellules à l'insuline. Le mécanisme d'action de la PGZ n'est pas clairement établi. Elle est proposée agir comme agoniste du peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARɣ) et augmenter l'activité de plusieurs membres de la famille DGK (Verrier et al., 2004 ; Grommes et al., 2013). Verrier et al., ont montré que la PGZ agit sur le métabolisme des lipides en inhibant la signalisation DAG-PKC. En effet, la PGZ ainsi que d'autres thiazolidinediones entraînent une diminution des niveaux de DAG via la régulation positive des DGK et une inhibition de l'activation de la PKC (Verrier et al., 2004). Par ailleurs la PGZ a été montrée capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (Grommes et al., 2013) ce qui lui confèrerait la capacité à agir dans le cerveau. Dans cette partie de mon projet, nous avons testé l'impact de la PGZ dans les neurones *in vitro* et sur la souris *Fmr1*-KO pour corriger les défauts liés à la signalisation DAG-PKC du FXS. Nous avons montré que la PGZ corrige ces altérations et qu'elle est efficacement délivrée dans le cerveau par voie d'administration intrapéritonéale (IP). Nous avons ensuite montré que le traitement à la PGZ améliore plusieurs des principaux défauts de comportement chez la souris *Fmr1*-KO, soulignant l'importance de la dérégulation de DGKκ dans le FXS et mettant en évidence un nouveau moyen d'action possible pour traiter le FXS.

# Pioglitazone improves deficits of *Fmr1*-KO mouse model of Fragile X syndrome by interfering with excessive diacylglycerol signaling

Andréa Geoffroy[1]*, Karima Habbas[1]*, Boglárka Zámbó[1], Laetitia Schramm[2,3], Arnaud Duchon[1], Eric Flatter[1], Laetitia Fouillen[4], Julie Zumsteg[3], Dimitri Heintz[3], Jean-Louis Mandel[1], Yann Hérault[1], Hervé Moine[1§]

* These authors contributed equally to this work

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR7104), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U1258), Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France.

[2]Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ottawa, Canada

[3]Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Plant Imaging & Mass Spectrometry plateform, UPR2357 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

[4]Laboratoire de Biogènese Membranaire; UMR5200 CNRS, Plateforme Métabolome; Université de Bordeaux; Villenave D'Ornon, France.

[§]Corresponding author. Email: moine@igbmc.fr

**Running title:** Pioglitazone treatment of Fragile X mouse model

**Contact:**

To whom correspondence should be addressed

Hervé Moine, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 67404 Illkirch, France, Phone +33 3 88 65 56 78, Email : moine@igbmc.fr

## Abstract

**Fragile X syndrome (FXS), the leading cause of familial intellectual disability, is an uncured disease caused by the absence or loss of function of the FMRP protein. FMRP is an RNA binding protein that controls the translation of specific proteins in neurons. A main target of FMRP in neurons is diacylglycerol kinase kappa (DGKk) and the loss of FMRP leads to a loss of DGK activity causing a diacylglycerol excess in the brain. Excessive diacylglycerol signaling could be a significant contributor to the pathomechanism of FXS. Here we tested the contribution of DAG-signaling in *Fmr1*-KO mouse model of FXS and we show that pioglitazone, a widely prescribed drug for type 2 diabetes, has ability to correct excessive DAG signaling in the brain and rescue behavioral alterations of the *Fmr1*-KO mouse. This study highlights the role of lipid signaling homeostasis in FXS and provides arguments to support the testing of pioglitazone for treatment of FXS.**

## Introduction

Fragile X syndrome (FXS) is the leading cause of familial intellectual disability (affecting approximately 1 in 5000 males and 1 in 8000 females) and is associated with cognitive and behavioral deficits that can include anxiety, hyperactivity, hypersensitivity, stereotypies, memory deficits, sleeping problems (1). FXS is due to the transcriptional silencing of the *FMR1* gene encoding the fragile X mental retardation protein (FMRP)(2) or, more rarely, to mutations in FMRP itself (3-5). FMRP is an RNA binding protein associated with numerous mRNA species in neurons (6-10) and in other cell types (11). FMRP has been proposed to control the translation of a number of its mRNA targets in neurons and the alteration of neuronal physiology associated with FXS is linked to an excessive protein translation in neurons

resulting from the loss of FMRP control (12). A protein synthesis-dependent synaptic plasticity, group 1 metabotropic glutamate receptor long term depression (mGluR1-LTD), is altered in various areas of the brain (13-15) of *Fmr1*-KO mouse. Accordingly, several downstream effectors of the mGluR1-dependent signaling have been shown to be over-activated (e.g. PKC (16), Ras/MEK/ERK/Mnk (17, 18), PIK3K/AKT (19-21), CB1R (22-24), while others are defective (Rac/PAK (25)). In agreement with these data, the phosphorylation of eIF4E by Mnk (26) and of S6 by ERK (18) is increased and an excess of protein synthesis is observed in vitro and in vivo notably in hippocampal and cortical neurons of *Fmr1*-KO mouse (27, 28). How exactly these alterations result from the loss of FMRP remains unclear.

We previously identified that diacylglycerol kinase kappa mRNA (DGKk) is the mRNA species most bound by FMRP in dissociated cortical neurons from new born mice (8). In addition, DGKk expression is severely reduced in brain of *Fmr1*-KO mouse and the lack of FMRP leads to a decreased DGK activity in the neurons of *Fmr1*-KO mouse and in the brain of FXS patients causing a perturbation of diacylglycerol/phosphatidic acid homeostasis (8). Moreover, the knockdown of DGKk in the brain of wild-type mouse recapitulates main *Fmr1*-KO behaviors, and DGKk reexpression in *Fmr1*-KO hippocampal slices rescues the abnormal dendritic spines morphology (8). These data support a model where DGKk dysregulation plays a pivotal role in FXS pathomechanism (29).

A prediction of this model of FXS states that interfering with DGKk dysregulation could be beneficial for FXS condition. Pioglitazone (PGZ), a thiazolidinedione drug approved for type 2 diabetes treatment was shown to activate DGK activity and inhibit the DAG-PKC signaling (30). Thus, PGZ could have a potential to correct some of the defects associated with DGKk loss of activity. In this study, we tested the impact of PGZ in neurons in vitro and on the *Fmr1*-KO mouse to rescue the DAG-PKC signaling-related defects of FXS. We first confirmed that DAG-PKC signaling is excessive in *Fmr1*-KO neurons and PGZ normalized these alterations.

Then, after defining that PGZ is efficiently delivered to brain by intraperitoneal (IP) administration route, we showed that PGZ treatment improved several of *Fmr1*-KO main behavioral defects, emphasizing the importance of DGKk dysregulation in FXS and highlighting a possible new intervention mean.

## Materials and methods

### Ethics statement

Animal work involved in this study was conducted according to relevant national comité national de réflexion éthique en expérimentation animale with approval APAFIS#5874-20l6062915583967 v2 and international guidelines (86/609/CEE).

### Animal housing

In vivo experiments were conducted in *Fmr1*-KO2 male mice (E.J. Mientjes et al., 2006). C57BL/6J *Fmr1* +/y males (Janvier Labs, France) were crossed with C57BL/6J *Fmr1* +/- females. At weaning age (4 weeks), male mice were grouped by 3 or 4 individuals from same age and genotype in individually ventilated cages (GM500, Tecniplast, UK), with poplar shaving bedding (Lignocell Select, JRS, Germany), and maintained under standard conditions, on a 12-h light/dark cycle (7h/19h), with standard diet food (standard diet D04, Scientific Animal Food and Engineering, France) and water available ad libitum. Mice in the same cage received the same treatment and were transferred to the phenotyping area the following week.

### Animal treatment

Pioglitazone (E6910, Sigma-Aldrich) was administered at 20 mg/kg/day using several administration routes. Food pellets containing vehicle or PGZ (130mg PGZ/KG D04, Safe diet,

Augy, France, based on 4-5 g/day pellet consumption) were given from weaning for three weeks before starting the behavioral experiments and continued during the tests. Subcutaneous implants for 60 days treatment (Innovative Research of America, Sarasota, FL, Cat. No. SX-999) prepared with 30 mg PGZ per pellet or vehicle (based on 60 x 0,5mg/day delivery) were placed under dorsal neck skin by sterile surgery. Intraperitoneal injections of PGZ solution at 3 mg/ml in NaCl 0.9%, DMSO 30% (v/v) (or vehicle) were performed daily starting at 5-week of age for one week prior to starting the behavioral tests and continued during the tests (with injection at end of each day test). Well-being of animals was controlled by daily visual control and weekly weighing.

**Cortical neuron cultures**

Cortical neuron cultures were prepared as in (8). Briefly, cortices of WT or *Fmr1*-KO (*Fmr1*$^{-/y}$) E17.5 embryos were dissected in PBS 1X, 2.56 mg/mL D-glucose, 3 mg/mL BSA and 1.16 mM $MgSO_4$, incubated for 20 min with 0.25 mg/mL trypsin and 0.08 mg/mL DNase I and mechanically dissociated after supplementation of medium with 0.5 mg/mL trypsin soybean inhibitor, 0.08 mg of DNase I and 1.5 mM $MgSO_4$. Neurons were seeded on poly-L-lysine hydrobromide-coated six-well culture plates in Neurobasal Medium (NBM, GIBCO) supplemented with B27, penicillin/streptomycin and 0.5 µM L-glutamine. Primary cortical neurons were used for experiments after 8 days of culture at 37°C, 5 % $CO_2$. Where indicated, cultures were treated with addition of pioglitazone solution and/or puromycin at the indicated concentrations and times. After treatment, cells were immediately washed with ice-cold PBS and lysed in 4X Laemmli buffer.

**Pioglitazone measurement in brain**

Mouse brains (200 mg frozen ground homogenate) were homogenized mechanically with 1:1 w/v $H_2O$ and then diluted at 1/3 v/v in H2O. Rosiglitazone (Sigma, 2.5ng solubilized in 5µL DMSO/H2O 1:1, v/v) was added as internal standard and 500µl methanol was added to 95µl of brain homogenate. Samples were vortexed for 5min at maximum speed and centrifuged for 20min at 14.000 g at 4°C. 300µL of supernatant (equivalent to 15µg tissues) were transferred to new collecting tube. Samples for establishing standard curve of PGZ were prepared in same conditions by adding 1000ng, 500ng, 250ng, 125ng, 62.5ng or 31.25ng PGZ in (Sigma). Rosiglitazone and PGZ were identified and quantified by UPLC–MS/MS. Quantitative profiles were analyzed using an EVOQ Elite LC-TQ (Bruker Daltonics) equipped with an electrospray ionization source and coupled to an HTC Pal-xt (Bruker Daltonics) and an Advance UHPLC system (Bruker Daltonics). Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C18 column (100 × 2.1 mm, 1.7 µm; Waters) and pre-column. The mobile phase consisted of (A) water and (B) methanol, both containing 0.1% formic acid. The run started by 2 min of 95 % A, then a linear gradient was applied to reach 99 % B at 10 min, followed by isocratic run during 1,5 min. Return to initial conditions was achieved in 1 min and equilibrate for 2,5 min, with a total run time of 15 min. The column was operated at 40°C with a flow rate of 0.35 ml/min, injecting 5 µL samples. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas. The nebulizer gas flow was set to 35 L/h, and the desolvation gas flow to 30 L/h. The interface temperature was set to 350°C and the source temperature to 300°C. The capillary voltage was set to 3.5 kV; the ionization was in positive mode. Low-mass and high-mass resolution was 2 for the first mass analyzer and 2 for the second. Data acquisition was performed with the MS Workstation 8 software and data analysis with the MS Data Review software. Absolute quantifications were achieved by comparison of sample signals with dose–response curves established with pure compounds. The MS/MS MRM transitions were 357>134.10 and 357> 339 for the pioglitazone and 358>135 and 358>341.2 for the rosiglitazone.

**DAG measurements**

Mouse brains (100 mg frozen ground homogenate) were homogenized with 1 ml $H_20$ and extracted by vortexing with 2 ml of chloroform/methanol 2:1 (v/v) and 10 µl of synthetic internal standard (DAG 15:0/15:0, Sigma Aldrich), sonicated for 30 s, vortexed, and centrifuged. The lower organic phase was transferred to a new tube, and the upper aqueous phase was reextracted with 2 ml of chloroform. Organic phases were combined and evaporated to dryness under nitrogen. Lipid extracts were resuspended in 50 µL of eluent A, and a synthetic internal lipid standard (DAG 17:0/17:0, Nu-Check Prep) was added.

LC-MS/MS (MRM mode) analyses were performed with mass spectrometer model QTRAP 5500 (ABSciex) coupled to a LC system (Ultimate 3000; Dionex). Analyses were achieved in positive mode. Nitrogen was used as curtain gas (set to 20), gas1 (set to 25), and gas2 (set to 0). Needle voltage was at +5,500 V without needle heating; the declustering potential was set at +86 V. The collision gas was also nitrogen; collision energy was adjusted to +34 V. Dwell time was set to 3 ms. Reversed-phase separation was carried out at 30 °C on a Phenomenex Luna 3u C8 column (150 mm × 1 mm, 3-µm particle size, 100-Å pore size). Eluent A was ACN/MeOH/H2O (19/19/2, v/v/v) +0.2% formic acid +0.028% NH4OH, and eluent B was isopropanol +0.2% formic acid +0.028% NH4OH. The gradient elution program was 0–5min, 15% (v/v) B; 5–35min, 15–40% B; 35–40 min, 80% B; and 40–55 min, 15% B. The flow rate was 40 µL/min, and 3-µL sample volumes were injected. The relative levels of DAG species were determined by measuring the area under the peak, determined by using MultiQuant software (Version 2.1; ABSciex) and normalizing to the area of the DAG internal standard.

**Immunoblot analyses**

Immunoblot analyses were performed on 14 days-old E19 cortical primary neurons lysed in 4X Laemmli buffer (equivalent to 15 µg total proteins) or brain homogenate (30mg of frozen ground total brain) solubilized in RIPA lysis buffer (140 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 1% Nonidet P-40 (v/v), 0.1% SDS (w/v), and protease inhibitors (Roche Applied Science), lysed by three cycles of freezing/thawing, centrifuged at 4°C for 30 min at 15,000 g. Brain extracts (equivalent to 15 µg total proteins) were mixed with an equal volume of 2X Laemmli buffer. Immunoblotting were performed as described previously (8). Proteins were denatured by heating the mixture for 5 min at 95°C, and then resolved by 10% SDS-PAGE. Separated proteins were transferred using a Mini Trans-Blot (Biorad) cell onto PVDF Immobilon P membrane (Millipore). Membranes were blocked for one hour with TBS-T 1X (Tris-Buffer Saline, pH 7.4 and 0.1% Tween-20 v/v) containing 5% BSA (w/v) or 5% nonfat dry milk. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS-T buffer containing 5% w/v BSA or milk as follows: anti-FMRP (1C3, 1/10,000, in house generated antibody) anti-p-EIF4e (Ser209, 1/1000 BSA, #9741, Cell Signaling), anti-EIF4 (1/1000 BSA, #9742, Cell Signaling), anti-p-PKC pan (βII Ser660, Rb, 1/1000 BSA #9371, Cell Signaling), anti-PKCα (1/2000 BSA, sc-208, Santa Cruz), anti-puromycin (12D10, 1/2000, Sigma-Aldrich), anti-S6 (5G10, 1/1000 #2217S, Cell Signaling), anti-p-S6 (Ser235/236, 1/1000, 2211S Cell Signaling), anti-GAPDH (MAB374, 1/10000, Merck) was used as an internal standard. Membranes were washed in TBS-T buffer and then incubated for an hour at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated pre-adsorbed secondary antibody (1/2000, blocking solution corresponding, Molecular Probes). Membranes were washed in TBS-T buffer. Immunoreactive bands were visualized with the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, cat. WBKLS0100). Immunoblot pictures were acquired using LAS600 GE Amersham and density of the resulting bands was quantified using ImageJ and statistical significance assessed using repeated measures analysis

of variance (ANOVA) with Fisher's post hoc comparisons (GraphPad Prism 7 software, La Jolla, CA, USA).

**RT-qPCR**

Total RNAs were extracted with standard Trizol protocol (Trizol, Ambion) from 14 days-old E19 cortical primary neurons (equivalent to one well of 6-well plate) or ground brains (30mg). Total RNA (0,5µg) was treated with DNase (TURBO DNA-free™ Kit, Ambion) following manufacturer instructions. First strand cDNA was synthesized with SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) following manufacturer instructions used with random primer mix. qPCR was performed on cDNA dilutions of 1/20 in the presence of 7.5-pmol primers with QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) on a Lightcycler 480 (Roche), using specific primers (Table S1). Relative quantifications were performed with Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (Rplp0) and Actb as internal standards. Results were expressed as arbitrary units by calculating the ratio of crossing points of amplification curves for cDNAs and internal standard by using the LightCycler 480 software (version LCS480 1.5.0.39, Roche Diagnostics). Fold change between groups were determined by using the following 2e–ΔΔct method. Error rates were calculated with square root ((SD control/SD treated)$^2$ + (fold change)$^2$).

**Behavior analyses**

One week after starting of PGZ treatment behavior tests were conducted to evaluate locomotor activity and anxiety, cognition, autistic-like behaviors and sensori-motor gating. Animals were transferred to the experimental room 30 min before each experimental test. The tests were performed in the following order: open field, novel object recognition, rotarod, stereotypy, sociability, actimetry, pre-pulse inhibition, audiogenic seizures (**Fig. S1**). After each test,

material was cleaned with water, 50% ethanol, water, and then dried with paper towels to minimize olfactory cues. IP treatment was applied after behavioral sessions to minimize impact of injection with tests. Behaviors were either analyzed automatically or by an observer blind to the conditions.

**Open field**

Locomotor activity and anxiety of animals were evaluated in an open field test. Animals were allowed to freely explore the new environment of plexiglass square arena (44 x 44cm x 16 cm, Panlab Harvard apparatus IR ACTIMETER, Bioseb) at a luminosity of 150 +/- 15 lux. Activity was recorded for 30 min using ActiTrack software (version 2.55). Infra-red lasers at bottom and top of arena recorded vertical and horizontal activity. For the analysis, the arena was divided between a 10-cm wide peripheral zone and a central 30cm x 30cm zone to evaluate locomotion, exploration, hyperactivity and anxiety. Distance moved and time spent in center or periphery zones, velocity, speeds and rearing were scored. Parameters were quantified in cumulative (0-30min) and windows (0-10min, 10-20min and 20-30min).

**Novel Object recognition**

Learning and memory abilities of mice were evaluated using the novel object recognition test. The test was performed at a luminosity of 70 +/- 5 lux in the plexiglass square arena used for open field test (44 x 44cm x 16 cm, Panlab Harvard apparatus IR ACTIMETER, Bioseb), considered as a habituation session 24h before training session. First part of the test consisted of a learning task. Two identical objects were presented to animals. Marbles and dices used for the test were randomly placed at defined objects positions. Exploratory activity was recorded for 10min. 24 hours later, second part of the test consisted of a memory recall. Two objects were presented to animals at the same random position (left/right) with a new object replacing

one of the learning session objects (next/familiar). Exploratory activity was recorded for 10min. For each session, sniffing time spent on objects and numbers of sniffing contacts were manually scored, defined as <2 cm distance between the nose and the object. Memory capacity was defined by calculated discrimination index (percentage of exploration of the novel object) as the proportion of time that animals spent investigating the novel object minus the proportion spent investigating the familiar one in the testing period:

Discrimination Index = [(Novel Object Exploration Time – Familiar Object Exploration Time)/ Total Exploration Time] × 100.

**Rotarod**

Locomotors coordination was evaluated during 4 successive session-tests performed at a luminosity of 115 +/- 15 lux on a rotarod system composed of a rotating plastic bar covered by grey rubber foam (5 cm in diameter, Panlab Harvard apparatus LE 8200, Bioseb). The animals were first habituated to stay on the rod for 30 s at a constant speed of 4 rotations per minute (rpm), facing to the direction of rotation. The test was performed on the rotating rod with acceleration steps from 4, 10, 16, 22, 28, 34 to 40 rpm over 5 minutes. First session was considered as a training session, followed by 3 trial sessions separated by 10 min resting. The test was stopped when the mouse fell or when there was more than one passive rotation. The latency to fall and the maximal speed before falling were recorded.

**Stereotypy**

Stereotypy was evaluated on animals isolated in a new home cage (GM 500 techniplast, floor area 501 $cm^2$ at a luminosity of 70 +/- 5 lux) with sawdust bedding for 10min and measuring exploratory and care activities. Number of rearing or digging events and grooming were scored.

**Free sociability**

Sociability was performed at 70 +/- 5 lux in home-cage (GM 500 techniplast, floor area 501 $cm^2$) for 10min. For the test two animals were isolated in a new home cage with sawdust bedding for 10min. Two social partners were conspecific of the same group (genotype, treatment), housed in same conditions (4-5 individuals per cages) but were non-siblings and housed in different cages. Number of contacts and times spent in contact were scored for affiliative behaviors (sniffing or touch any part of the body, allogrooming, followings or traversing the partner's body by crawling over/under it) and aggressive behaviors (attacks, offensive or defensive postures, tail rattling).

**Actimetry**

Locomotor and circadian activities were measured in an actimetry recording systems coupled to BMB software (Imetronic). Mice were placed in activity boxes (25 x 20 x 15 cm). Infra-red lasers at the bottom and the top of the square inform about vertical and horizontal activity when cut by mouse body (15 mm for horizontal activity and 30 mm for vertical activity). Activity was recorded during 24 h, starting at 06:00 pm (1h before light switch). Rearing events, front- and back-yard activities, round trips, food and water consumption were recorded.

**Pre-Pulse inhibition (PPI)**

PPI was measured using acoustic startle test with SR-LAB apparatus and software (San Diego Instruments, USA). Mice were placed individually in the PPI test plexiglass tube (12,7cm long, 3,8cm internal diameter, 5,0cm external diameter) of the startle box (constant luminosity of 70 +/-5 lux and white noise background). Habituation phase was performed for 5 min. Then mice were exposed to pulses of white sound of 20 msec duration and varying intensity: +6, +12, +18, and +24 dB over background levels (namely 72, 78, 84, and 90 dB). Each intensity was applied

eight times, in a randomized order with variable intervals (10–20 sec) between the onset of each pulse. A total of 130 readings of the whole-body startle response were taken at 0.5-msec intervals (i.e., spanning across 65 msec), starting at the onset of the pulse stimulus. The average amplitude (in arbitrary units) over the 65 msec was used to determine the stimulus reactivity and further averaged across trials.

### Statistical analyses

Data were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) with Fisher's post hoc comparisons. ANOVA with repeated measures analysis were carried out when required by the experimental plan to assess complementary statistical effects. In some designs, statistical analysis was performed using Student's t-tests. For all analysis p-value $p<0.05$ was considered to indicate significance. All analyses were performed using Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA, USA) or GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) software.

## Results

### DAG signaling is excessive in *Fmr1*-KO neurons and is normalized by DGK-agonist pioglitazone (PGZ)

We previously showed that the level of second messenger diacylglycerol (DAG) is increased in *Fmr1*-KO cortical neurons and in cerebellum of FXS patient, in agreement with the observed loss of DGKk synthesis in FXS condition (8). DGKk is one of the ten DGK enzymes that control DAG homeostasis (31). Among the first direct effectors of DAG are protein kinase C enzymes (PKC), which are activated through sequential phosphorylation steps (31), notably at carboxy-terminal hydrophobic site Ser660 (32). In agreement with an increase of DAG-induced PKC activation, we measured an elevation of PKC phosphorylation in cultured cortical neurons from

*Fmr1*-KO mice compared to their wild-type (WT) littermate control cultures (**Fig. 1A**). As a possible mean to interfere with or compensate for the loss of DGKk in *Fmr1*-KO cortical neurons, we tested the impact of DGK-agonist pioglitazone (PGZ), a molecule with PPARg agonist activity reported to inhibits DAG-PKC signaling pathway by activating DGK activity (30). Remarkably, the treatment of cortical neuron cultures with PGZ at 10 μM for 1h normalized the phosphorylation of PKC in *Fmr1*-KO while its level in WT remained unaffected by the treatment (**Fig. 1B**). Several protein effectors of ERK pathway have been reported to be over-activated in neocortex of *Fmr1*-KO mouse (18) and in FXS patients (33). Consistent with an increased ERK activity, eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation is elevated in the brain of individuals with FXS and *Fmr1*-KO mice (26). Treatment of cortical neuron cultures with PGZ normalized phosphorylation of eIF4E in *Fmr1*-KO neurons while the WT level was non-significantly affected by the treatment (**Fig. 1C**).

As a possible consequence of increased DAG signaling and eIF4E activation, *Fmr1*-KO mice exhibit elevated basal levels of protein synthesis rate in brain (34). The 10-20% increase of protein synthesis rate previously reported in hippocampal slices (27, 28) could not be confirmed in cortical dissociated neurons cultures, possibly because the variability between neuron cultures was in the same range of effect. We did however observe a reduction of the translation rate in both *Fmr1*-KO and WT neurons after PGZ treatment (**Fig. 1D**), with a more pronounced dose reduction in WT compared to *Fmr1*-KO, possibly linked to a higher basal translation rate in *Fmr1*-KO, confirming the ability of PGZ to reduce protein synthesis rate. Not only ERK but also mTOR signaling pathways is hyper-activated in *Fmr1*-KO mice (26, 34, 35). Consistent with mTOR signaling activation, protein S6 phosphorylation is increased in *Fmr1*-KO neurons and this increase is normalized with PGZ treatment (**Fig. 1E**).

**Pioglitazone is delivered efficiently in brain of *Fmr1*-KO mouse by intraperitoneal injection**

PGZ has been demonstrated to cross blood brain barrier (36) and, based on our above data, appeared as an interesting drug to test on *Fmr1*-KO mouse FXS model. To define the best route to deliver PGZ efficiently in brain, we compared several modes of administration: subcutaneous diffusing micropellet, food (solid pellets), daily intraperitoneal injection (IP). We chose a 20 mg/kg mouse/day dose as an average upper high dose in mouse based on literature survey. Treatment was started on 5-week-old mice and continued for three weeks. PGZ quantification in brain by HPLC-MS/MS revealed that IP administration enables to reach the highest dose of PGZ in the brain (19.4±9 nM) compared to food (3.7±0.9 nM) and subcutaneous administration (0.42±0.26nM), with no significant variation between *Fmr1*-KO and WT (**Fig. 2**). Based on these data we chose to administer PGZ via IP route.

**Pioglitazone daily IP treatment ameliorates *Fmr1*-KO behaviors, macro-orchidism and DAG**

Five-week-old *Fmr1*-KO C57BL/6J hemizigous males and their wild-type (WT) littermates were injected IP with PGZ (20 mg per kg bodyweight per day) or vehicle for 7 days before starting the behavioral tests (**Fig. S1**) and IP injections were continued daily after each behavioral session (i.e. 19 d total). In the open field test, vehicle-treated *Fmr1*-KO mice did not show specific alterations compared to vehicle-treated WT mice in all the parameters analyzed (distance travelled, % time in center in arena, distance travelled in center of arena, number of rearings (**Fig. S2A-C**), suggesting that, in the conditions where the animals were handled, the influence of the genotype was not visible on the locomotor activity and anxiety of the animals. Noticeably, both WT and *Fmr1*-KO PGZ-treated mice had an average reduction of distance travelled and rearing numbers by approximately 20%, appearing as an unexpected previously

unreported effect of the drug on mouse locomotor and rearing activity.

In the novel object recognition test, vehicle-treated *Fmr1*-KO mice showed a clear alteration of their ability to discriminate a novel vs a familiar object (recognition index = 49.89±1.33, not different from chance = 50%, **Fig. 3A**) compared to vehicle-treated WT (recognition index = 66.95±2.38). This difference was not the consequence of an altered exploration time of objects since this parameter was similar in both genotype and treatment groups (**Fig. S3A**). PGZ-treated *Fmr1*-KO mice had a fully rescued ability to discriminate the novel object (recognition index =68.33±2.28 not significantly different from WT 66.95±2.38). Treatment had no visible effect on the WT mice discrimination and did not modify the exploration parameters of both genotypes.

In the free sociability dyadic reciprocal social interaction test, vehicle-treated *Fmr1*-KO mice showed an increased number of contacts with shorter contact duration time compared to WT mice (**Fig. 3B, C**). In contrast, PGZ-treated *Fmr1*-KO mice were not different from vehicle-treated WT, suggesting that treatment had normalized their social behavior. In contrast, vehicle-treated WT mice were not visibly behaving differently from their PGZ-treated WT littermates in this test.

Vehicle-treated *Fmr1*-KO mice showed a significant increase of number of digging compared to vehicle-treated WT (**Fig. 3D**) while PGZ-treated *Fmr1*-KO mice were not different from vehicle-treated WT suggesting also that treatment had normalized their digging behavior. PGZ-treated WT showed a trend to have a decreased number of digging compared to vehicle-treated WT but this was not significant. Vehicle-treated *Fmr1*-KO mice showed a significant decrease of grooming duration compared to vehicle-treated WT (**Fig. 3E**) while PGZ-treated *Fmr1*-KO mice were not different from vehicle-treated WT suggesting also that treatment had normalized their behavior. PGZ-treated WT showed no difference compared to vehicle-treated WT.

In the rotarod test, no influence of the genotype or of the treatment was observed, neither in habituation nor in the following sessions (**Fig. S3B**). Prepulse inhibition test was performed but there was no significant difference between genotypes and the treatment groups (**Fig. S3C**), but this test showed variability across the studies (37-39), possibly related to the sensitivity of recording methods used.

Macro-orchidism is a hallmark of post-adolescent male individuals with FXS (1) and is present in *Fmr1*-KO mice (40). PGZ administration for 19 d reduced the testicular weight in *Fmr1*-KO mice to the same level as the WT treated mice (**Fig. 3F**). Noticeably, PGZ had a trend to reduce the testicular weight in WT mice, suggesting a possible impact of PGZ both in normal and pathological context. Meanwhile, no significant difference for total or brain weight was observed between genotype and treatment groups (**Fig. S4A,B**). PGZ treated animals showed a trend to have a reduced weight gain during the time of tests, but this was not statistically significant. Noticeably, while the body composition of vehicle-treated *Fmr1*-KO mice was not significantly different from vehicle-treated WT mice, PGZ treatment induced a significant increase of water retention in the tissues of *Fmr1*-KO mice (**Fig. S4C-G**), a well-known side effect of PGZ treatment (41). Diacylglycerol (DAG) is increased in *Fmr1*-KO cortical neurons and in cerebellum of FXS patient, in agreement with a loss of DGKk activity in FXS neurons (8). The level of several main DAG species was found to be increased in vehicle-treated *Fmr1*-KO total brain extracts, notably main DAG species 38:4, and their level was normalized in PGZ-treated *Fmr1*-KO mice (**Fig. 4**).

## Discussion

In this study, we tested the ability of diacylglycerol kinase agonist pioglitazone (PGZ) to correct the symptoms of *Fmr1*-KO mouse model of fragile X syndrome. The rationale of this study is based on the fact that diacylglycerol kinase kappa (DGKk), a master regulator whose mRNA is

a main target of FMRP in neurons, is under-expressed in the brain of *Fmr1*-KO mouse and signs of reduction of DGK activity (namely DAG/PA imbalance) are observed both in *Fmr1*-KO mouse and in FXS patients (8). Substrate of DGKk, DAG, is a prominent modulator of synaptic transmission probably in all types of synapses (42-44) that is produced by phospholipase C (PLC) from abundant phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) membrane stores (45) after stimulation of G protein-coupled receptors such as mGluRI. The excess of DAG originating from the loss of DGKk activity could play a prominent role in FXS pathomechanism because DAG, through activation of its main effector protein kinase C (PKC) (32), could be responsible of mitogen activated protein kinase (MAPK/ERK) (46) or Ras/phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathways (47). These pathways have been demonstrated to be overactivated in *Fmr1*-KO mice (34, 35, 48, 49). In agreement with a neuronal DAG increase in FXS condition, we showed that PKC is overactivated in *Fmr1*-KO neurons (**Fig. 1A**). Overall, the excess of DAG resulting from the lack of DGKk activity in *Fmr1*-KO mouse could underlie the molecular mechanism leading to the excessive mGluRI signaling and the increase of local protein synthesis (29, 50). Based on the hypothesis that DGK activity alteration could contribute to the severity of FXS condition, we postulated that increasing DGK activity could be beneficial for the patients. We tested the impact of DGK agonist pioglitazone (PGZ) on *Fmr1*-KO mouse model and showed that PGZ corrects its molecular and behavioral alterations. In cortical neuron cultures, PGZ normalized the overactivation of PKC and eIF4E (respectively first and downstream effectors of DAG signal transduction pathway) observed in *Fmr1*-KO compared to WT neurons (**Fig. 1B,C**). These data suggest that PGZ is able to inhibits DAG-PKC signaling in neurons like in endothelial cells (30). PGZ demonstrated also the ability to reduce the protein synthesis rate in neurons cultures (**Fig. 1D**). Thus, PGZ appears to be able to counteract some of the well-established molecular alterations of *Fmr1*-KO neurons. The administration of PGZ via intraperitoneal injection

resulted in a better concentration of the molecule in the brain compared to an administration through alimentation (3.7±0.9 vs 19.4±9 nM, **Fig. 2**), however we cannot exclude that a proportion of the molecule was degraded during the food pellet preparation process that involved heating at 60°C for several minutes. Subcutaneous pellets that enable slow diffusion of the molecule while avoiding repeated injections appeared to be inappropriate for targeting the brain, giving the lowest concentration in brain.

PGZ administered daily for 7 days prior the beginning of behavioral tests and continued during the tests for a total of 19 days at 20 mg/kg/day (corresponding to approximately half the maximum recommended human oral dose of 45 mg based on mg/m$^2$, Takeda Inc.) was able to correct the elevated level of main DAG species in the brain of *Fmr1*-KO mouse (**Fig. 4**) in agreement with its DGK agonist effect (30).

PGZ normalized the observed behavioral alterations of the *Fmr1*-KO model. Notably, the recognition of novel object after 24h that was absent in *Fmr1*-KO was reestablished in *Fmr1*-KO-treated mice (**Fig. 3A**), suggesting that PGZ had effect on long term memory deficit of the FXS model. Reciprocal social interaction, stereotypical behavior (digging) and grooming were all normalized (**Fig. 3B-D**). We did not observe influence of genotype on locomotor activity but unexpectedly PGZ decreased the distance traveled and rearing numbers in both genotype, suggesting a possible adverse effect of treatment on voluntary locomotor activity (**Fig. S2A**). Whether linked or not with this effect, PGZ had an influence on free body fluid retention, this is a well-known edema causing effect of the molecule due to renal sodium retention and vascular hyperpermeability (51). However, the physical performances as assessed with rotarod test were not affected.

PGZ inhibits DAG-PKC signaling by activating DGK enzymes (30), but the mechanism of this activation is still unclear. PGZ can act by PPAR gamma dependent and independent pathways (52). In PGZ-treated neuron cultures and in brain extracts of PGZ-treated mice, no change was

observed on the transcript level of DGK enzymes (**Fig. S5**) suggesting that in neurons, unlike in endothelial cells (30), PGZ mediates DGK activity in a PPAR gamma independent manner. This is in agreement with the fact that PPAR gamma is highly expressed in adipose tissues (53) but very poorly expressed in brain (54). The exact mechanism of PGZ action in the brain remains thus to be understood.

An augmentation of cerebral DAG has been observed to coincide with the appearance of mild cognitive impairment in Alzheimer's (AD) (55), Parkinson's and Lewy Body disease (56) and this increase has been proposed as a triggering factor of neuroinflammation (57). PGZ has established anti-inflammatory effects and had been shown to have positive cognitive effects on mouse models of AD (58, 59), that like the FXS model have aberrantly elevated glutamatergic neurotransmission (60). Neuroinflammation has been evoked to play a role in FXS and other form of ID and autism (61). In fact, GSK3, a strong promoter of inflammation in various tissues (62) has been shown to be overactivated in *Fmr1*-KO brain (63). GSK3 activity has been demonstrated to be trigered by DAG/PA balance, notably by its impact on PI4P5-kinase to activate AKT/phosphatidynositol 3-kinase (PI3K) controlling GSK3 activity status (64, 65). Moreover, knock-out of DGKß, an isozyme of DGKk also expressed in brain, leads to an increase of GSK3ß activity proposed to contribute to the hyperactivity and reduced anxiety observed in the model (66). Thus, the loss of DGKk activity could be also responsible for this type of neuroinflammation related phenotypes and PGZ may also contribute to interfere with these alterations.

In conclusion, in this study we provide lines of evidence that pioglitazone, one of the most widely used US Food & Drug Administration (FDA)-approved anti-diabetic corrects main molecular and phenotypic deficits of the FXS *Fmr1*-KO model. To our knowledge, this is the first study to report that acting on the DAG signaling in the brain can correct the behavioral

alterations associated with FXS. Upregulating DGK activity may thus represent a potential therapeutic strategy for the treatment of FXS.

**References**

1. Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Hazlett HC, Bailey DB, Jr., Moine H, Kooy RF, et al. Fragile X syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17065.

2. Nelson DL, Orr HT, Warren ST. The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. Neuron. 2013;77(5):825-43.

3. De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, et al. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. Nat Genet. 1993;3(1):31-5.

4. Myrick LK, Nakamoto-Kinoshita M, Lindor NM, Kirmani S, Cheng X, Warren ST. Fragile X syndrome due to a missense mutation. Eur J Hum Genet. 2014;22(10):1185-9.

5. Quartier A, Poquet H, Gilbert-Dussardier B, Rossi M, Casteleyn AS, Portes VD, et al. Intragenic FMR1 disease-causing variants: a significant mutational mechanism leading to Fragile-X syndrome. Eur J Hum Genet. 2017;25(4):423-31.

6. Maurin T, Lebrigand K, Castagnola S, Paquet A, Jarjat M, Popa A, et al. HITS-CLIP in various brain areas reveals new targets and new modalities of RNA binding by fragile X mental retardation protein. Nucleic Acids Res. 2018;46(12):6344-55.

7. Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KY, Mele A, Fraser CE, et al. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. Cell. 2011;146(2):247-61.

8. Tabet R, Moutin E, Becker JA, Heintz D, Fouillen L, Flatter E, et al. Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(26):E3619-28.

9. Li M, Shin J, Risgaard RD, Parries MJ, Wang J, Chasman D, et al. Identification of FMR1-regulated molecular networks in human neurodevelopment. Genome Res. 2020;30(3):361-74.

10. Sawicka K, Hale CR, Park CY, Fak JJ, Gresack JE, Van Driesche SJ, et al. FMRP has a cell-type-specific role in CA1 pyramidal neurons to regulate autism-related transcripts and circadian memory. Elife. 2019;8.

11. Ascano M, Jr., Mukherjee N, Bandaru P, Miller JB, Nusbaum JD, Corcoran DL, et al. FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. Nature. 2012;492(7429):382-6.

12. Darnell JC, Klann E. The translation of translational control by FMRP: therapeutic targets for FXS. Nat Neurosci. 2013;16(11):1530-6.

13. Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(11):7746-50.

14. Koekkoek SK, Yamaguchi K, Milojkovic BA, Dortland BR, Ruigrok TJ, Maex R, et al. Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. Neuron. 2005;47(3):339-52.

15. Cea-Del Rio CA, Nunez-Parra A, Freedman SM, Kushner JK, Alexander AL, Restrepo D, et al. Disrupted inhibitory plasticity and homeostasis in Fragile X syndrome. Neurobiol Dis. 2020;142:104959.

16. Deng PY, Klyachko VA. Increased Persistent Sodium Current Causes Neuronal Hyperexcitability in the Entorhinal Cortex of Fmr1 Knockout Mice. Cell Rep. 2016;16(12):3157-66.

17. Osterweil EK, Krueger DD, Reinhold K, Bear MF. Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome. J Neurosci. 2010;30(46):15616-27.

18. Sawicka K, Pyronneau A, Chao M, Bennett MV, Zukin RS. Elevated ERK/p90 ribosomal S6 kinase activity underlies audiogenic seizure susceptibility in fragile X mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(41):E6290-E7.

19. Sharma A, Hoeffer CA, Takayasu Y, Miyawaki T, McBride SM, Klann E, et al. Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. J Neurosci. 2010;30(2):694-702.

20. Gross C, Nakamoto M, Yao X, Chan CB, Yim SY, Ye K, et al. Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. J Neurosci. 2010;30(32):10624-38.

21. Gross C, Chang CW, Kelly SM, Bhattacharya A, McBride SM, Danielson SW, et al. Increased expression of the PI3K enhancer PIKE mediates deficits in synaptic plasticity and behavior in fragile X syndrome. Cell Rep. 2015;11(5):727-36.

22. Busquets-Garcia A, Gomis-Gonzalez M, Guegan T, Agustin-Pavon C, Pastor A, Mato S, et al. Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. Nat Med. 2013;19(5):603-7.

23. Zhang L, Alger BE. Enhanced endocannabinoid signaling elevates neuronal excitability in fragile X syndrome. J Neurosci. 2010;30(16):5724-9.

24. Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Rapino C, Musella A, et al. Abnormal mGlu 5 receptor/endocannabinoid coupling in mice lacking FMRP and BC1 RNA. Neuropsychopharmacology. 2010;35(7):1500-9.

25. Chen LY, Rex CS, Babayan AH, Kramar EA, Lynch G, Gall CM, et al. Physiological activation of synaptic Rac>PAK (p-21 activated kinase) signaling is defective in a mouse model of fragile X syndrome. J Neurosci. 2010;30(33):10977-84.

26. Gkogkas CG, Khoutorsky A, Cao R, Jafarnejad SM, Prager-Khoutorsky M, Giannakas N, et al. Pharmacogenetic inhibition of eIF4E-dependent Mmp9 mRNA translation reverses fragile X syndrome-like phenotypes. Cell Rep. 2014;9(5):1742-55.

27. Qin M, Kang J, Burlin TV, Jiang C, Smith CB. Postadolescent changes in regional cerebral protein synthesis: an in vivo study in the FMR1 null mouse. J Neurosci. 2005;25(20):5087-95.

28. Dolen G, Osterweil E, Rao BS, Smith GB, Auerbach BD, Chattarji S, et al. Correction of fragile X syndrome in mice. Neuron. 2007;56(6):955-62.

29. Tabet R, Vitale N, Moine H. Fragile X syndrome: Are signaling lipids the missing culprits? Biochimie. 2016.

30. Verrier E, Wang L, Wadham C, Albanese N, Hahn C, Gamble JR, et al. PPARgamma agonists ameliorate endothelial cell activation via inhibition of diacylglycerol-protein kinase C signaling pathway: role of diacylglycerol kinase. Circ Res. 2004;94(11):1515-22.

31. Merida I, Arranz-Nicolas J, Rodriguez-Rodriguez C, Avila-Flores A. Diacylglycerol kinase control of protein kinase C. Biochem J. 2019;476(8):1205-19.

32. Keranen LM, Dutil EM, Newton AC. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. Curr Biol. 1995;5(12):1394-403.

33. Wang X, Snape M, Klann E, Stone JG, Singh A, Petersen RB, et al. Activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the behavioral deficit of fragile x-syndrome. J Neurochem. 2012;121(4):672-9.

34. Bhattacharya A, Kaphzan H, Alvarez-Dieppa AC, Murphy JP, Pierre P, Klann E. Genetic removal of p70 S6 kinase 1 corrects molecular, synaptic, and behavioral phenotypes in fragile X syndrome mice. Neuron. 2012;76(2):325-37.

35. Osterweil EK, Chuang SC, Chubykin AA, Sidorov M, Bianchi R, Wong RK, et al. Lovastatin corrects excess protein synthesis and prevents epileptogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. Neuron. 2013;77(2):243-50.

36. Grommes C, Karlo JC, Caprariello A, Blankenship D, Dechant A, Landreth GE. The PPARgamma agonist pioglitazone crosses the blood-brain barrier and reduces tumor growth in a human xenograft model. Cancer Chemother Pharmacol. 2013;71(4):929-36.

37. Frankland PW, Wang Y, Rosner B, Shimizu T, Balleine BW, Dykens EM, et al. Sensorimotor gating abnormalities in young males with fragile X syndrome and Fmr1-knockout mice. Mol Psychiatry. 2004;9(4):417-25.

38. de Vrij FM, Levenga J, van der Linde HC, Koekkoek SK, De Zeeuw CI, Nelson DL, et al. Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in Fmr1 KO mice. Neurobiol Dis. 2008;31(1):127-32.

39. Spencer CM, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, Oostra BA, Nelson DL, Paylor R. Exaggerated behavioral phenotypes in Fmr1/Fxr2 double knockout mice reveal a functional genetic interaction between Fragile X-related proteins. Hum Mol Genet. 2006;15(12):1984-94.

40. Mientjes EJ, Nieuwenhuizen I, Kirkpatrick L, Zu T, Hoogeveen-Westerveld M, Severijnen L, et al. The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. Neurobiol Dis. 2006;21(3):549-55.

41. Niemeyer NV, Janney LM. Thiazolidinedione-induced edema. Pharmacotherapy. 2002;22(7):924-9.

42. Kim K, Yang J, Kim E. Diacylglycerol kinases in the regulation of dendritic spines. J Neurochem. 2010;112(3):577-87.

43. de Jong AP, Verhage M. Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission. Curr Opin Neurobiol. 2009;19(3):245-53.

44. Almena M, Merida I. Shaping up the membrane: diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling. Trends Biochem Sci. 2011;36(11):593-603.

45. Kadamur G, Ross EM. Mammalian phospholipase C. Annu Rev Physiol. 2013;75:127-54.

46. Schonwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. Molecular and Cellular Biology. 1998;18(2):790-8.

47. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. Genes Cancer. 2011;2(3):261-74.

48. Hou L, Klann E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. J Neurosci. 2004;24(28):6352-61.

49. Gantois I, Khoutorsky A, Popic J, Aguilar-Valles A, Freemantle E, Cao R, et al. Metformin ameliorates core deficits in a mouse model of fragile X syndrome. Nat Med. 2017;23(6):674-7.

50. Moine H, Vitale N. Of local translation control and lipid signaling in neurons. Adv Biol Regul. 2019;71:194-205.

51. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. Circ Res. 2008;102(3):283-94.

52. Turturro F, Oliver R, 3rd, Friday E, Nissim I, Welbourne T. Troglitazone and pioglitazone interactions via PPAR-gamma-independent and -dependent pathways in regulating physiological responses in renal tubule-derived cell lines. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(3):C1137-46.

53. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(15):7355-9.

54. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. Mol Cell Proteomics. 2014;13(2):397-406.

55. Wood PL, Medicherla S, Sheikh N, Terry B, Phillipps A, Kaye JA, et al. Targeted Lipidomics of Fontal Cortex and Plasma Diacylglycerols (DAG) in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Validation of DAG Accumulation Early in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2015;48(2):537-46.

56. Wood PL, Tippireddy S, Feriante J, Woltjer RL. Augmented frontal cortex diacylglycerol levels in Parkinson's disease and Lewy Body Disease. PLoS One. 2018;13(3):e0191815.

57. Wood PL, Cebak JE, Woltjer RL. Diacylglycerols as biomarkers of sustained immune activation in Proteinopathies associated with dementia. Clin Chim Acta. 2018;476:107-10.

58. Masciopinto F, Di Pietro N, Corona C, Bomba M, Pipino C, Curcio M, et al. Effects of long-term treatment with pioglitazone on cognition and glucose metabolism of PS1-KI, 3xTg-AD, and wild-type mice. Cell Death Dis. 2012;3:e448.

59. Searcy JL, Phelps JT, Pancani T, Kadish I, Popovic J, Anderson KL, et al. Long-term pioglitazone treatment improves learning and attenuates pathological markers in a mouse model of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2012;30(4):943-61.

60. Lipton SA. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. Nat Rev Neurosci. 2007;8(10):803-8.

61. Di Marco B, Bonaccorso CM, Aloisi E, D'Antoni S, Catania MV. Neuro-Inflammatory Mechanisms in Developmental Disorders Associated with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorder: A Neuro- Immune Perspective. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2016;15(4):448-63.

62. Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. Neurochem Res. 2007;32(4-5):577-95.

63. Min WW, Yuskaitis CJ, Yan Q, Sikorski C, Chen S, Jope RS, et al. Elevated glycogen synthase kinase-3 activity in Fragile X mice: key metabolic regulator with evidence for treatment potential. Neuropharmacology. 2009;56(2):463-72.

64. Jenkins GH, Fisette PL, Anderson RA. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. J Biol Chem. 1994;269(15):11547-54.

65. Frame S, Cohen P, Biondi RM. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. Mol Cell. 2001;7(6):1321-7.

66. Kakefuda K, Oyagi A, Ishisaka M, Tsuruma K, Shimazawa M, Yokota K, et al. Diacylglycerol kinase beta knockout mice exhibit lithium-sensitive behavioral abnormalities. PLoS One. 2010;5(10):e13447.

**Acknowledgements**

We thank Dr. F. Sakane, Dr. R. Willemsen, Dr N. Vitale, Dr F. Riet for materials and discussions, N. Banquart-Ott and C. Nahy for mice care. PGZ analyses were performed at the Plant Imaging & Mass Spectrometry, PIMS, CNRS Strasbourg. We are very grateful to all colleagues of the team for discussions and suggestions. The DAG analyses were performed at the Metabolome Facility-MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010). This work was supported by ANR-18-CE12-0002-01 and Fondation Jérôme Lejeune funding to HM, by FRAXA Foundation post-doc fellow to AG and by Fond Paul Mandel to KH. This study was also supported by ANR-10-LABX-0030-INRT under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

**Author contributions**

AG and KH performed most experiments and analyzed the data. DH LS and JZ performed PGZ mass spec analyses. LF performed diacylglycerol analyses. BZ, EF, assisted with molecular biology work. AD and YH helped with behavioral analyses. HM supervised the study and wrote the manuscript with AG, KH, BZ. All authors read the manuscript and approved the content.

**Competing interests**

The authors declare no competing financial interests.

**Correspondence and requests for materials** should be addressed to HM.

**Figure legends**

**Figure 1**: **Pioglitazone corrects the excessive downstream DAG signaling in *Fmr1*-KO neurons. A)** Phosphorylation of PKC is enhanced in *Fmr1*-KO compared to WT neurons. Representative immunoblots of lysates from WT and *Fmr1*-KO cortical neurons with the indicated antibodies (3 biological replicates are presented, molecular weight marker positions (kDa) are shown) and quantification of phosphorylation of PKC and total levels of PKCa. GAPDH was used as a loading control. For quantification, the phospho-protein signal was normalized first against PKCa protein signal and is presented relative to the signal of WT neurons (n = 6 embryos in each group). **B)** PGZ (10 μM, 1h) normalizes PKC phosphorylation of *Fmr1*-KO neurons. Representative immunoblots of lysates from WT and *Fmr1*-KO cortical neurons (2 biological replicates for WT and 4 for *Fmr1*-KO are shown). Quantifications were made as in A with n ≥ 6 embryos in each group. **C)** PGZ (10 μM, 1h) normalizes eIF4E phosphorylation of *Fmr1*-KO neurons. Representative immunoblots of lysates from WT and *Fmr1*-KO cortical neurons (3 biological replicates for WT and *Fmr1*-KO are shown). Quantifications of p-eIF4E signal were normalized first against GAPDH protein signal and are

presented relative to the signal of WT with n = ≥ 5 embryos in each group. **D)** PGZ reduces protein synthesis rate in WT and *Fmr1*-KO neurons. Representative immunoblots of puromycin-labelled neuron lysates from WT and *Fmr1*-KO cortical neurons treated with pioglitazone for 1h at indicated doses. Quantifications of puromycin signal were normalized first against GAPDH protein signal and are presented relative to the signal of WT with n = 2 embryos. **E)** PGZ (24h) normalizes S6 phosphorylation of *Fmr1*-KO neurons. Representative immunoblots of lysates from WT and *Fmr1*-KO cortical neurons. Quantifications of p-S6 signal were normalized as in C with n = ≥ 3 embryos in each group. In A-E, each point represents data from an individual neuron culture, all values shown as mean ± s.e.m. ***p< 0.001, **p< 0.01, *p< 0.05 vs Wt, ## p< 0.01, ### p< 0.001, #### p< 0.0001 vs *Fmr1*-KO untreated; ns, not significant; in A calculated by Student test and in B-E by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

**Figure 2: Pioglitazone concentration in total brain extracts**. PGZ concentration (nM) was measured by mass spectrometry after subcutaneous (Subcut.), alimentation (food), or intraperitoneal (IP) administration (+) or mock treatment (0) in WT compared to *Fmr1*-KO n≥5.

**Figure 3: Pioglitazone corrects main phenotypes of *Fmr1*-KO mouse. A**) Novel object recognition. Recognition index and duration of objects exploration during the acquisition and retention trials. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-sample t, **** p<0.0001 vs chance (50%), one outlier in *Fmr1*-KO vehicle was removed (ROUT Q=1%). **B, C**) Free sociability dyadic reciprocal social interaction test. Number (**B**) and duration (**C**) of contacts. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. * p<0.05 vs WT vehicle. Number of digging (**D**) and digging duration (**E**). Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and

Tukey's multiple comparisons test. **** p<0.0001, *** p<0.001, ** p<0.01, ns non-significant. **F**) Pioglitazone corrects macro-orchidism. Mean testicular weight of vehicle- and PGZ-treated WT and *Fmr1*-KO mice. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, **** p<0.0001, * p<0.05, ns non-significant.

**Figure 4**: **Pioglitazone corrects elevated DAG level in brain of *Fmr1*-KO mouse.** Measure of diacylglycerol species in WT and *Fmr1*-KO mouse total brain extracts by LC-MS/MS. The level of DAG species analyzed by LC-MS/MS is expressed as arbitrary units relative to DAG standard added to samples prior lipid extraction and normalized to weight of samples. An increase of most abundant DAG species (36:2 and 38:4) is observed in *Fmr1*-KO compared with WT neurons. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using ordinary 2way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, n = 5-6 biological replicates, ****P < 0.0001 *Fmr1*-KO vs WT, ####P < 0.0001, ##P < 0.01, #P < 0.05 *Fmr1*-KO +Pio vs *Fmr1*-KO.

**Supplementary materials**

**Table S1. Primers used for qRT-PCR analysis**

| Genes (ID Ensembl) | 5′–3′ sequence |
|---|---|
| Dgka (ENSMUST00000026414) | Rev: TGTACAGGGTGCCTGCATCCA |
| | Fw: ATACATGTGAGATCAACCAGGCA |
| Dgkb (ENSMUST00000040500) | Rev: ACGTGCATCATCTGACCAATAA |
| | Fw: TTCATGACCACTGTGCCATGA |
| Dgkg (ENSMUST00000089925) | Rev: GGCCACACTGCCATCGGACT |
| | Fw: CGTCAAGTGTGACCGGTGCC |
| Dgkκ (ENSMUSG00000062393) | Rev: GATGCCTTGAAGGTTTGGC |
| | Fw: GAAGAACATCCAGAACAATAC |
| Dgkz (ENSMUST00000111303) | Rev: ATGGTGCGCTGACCCAGGG |
| | Fw: TGACCTCATGCACCGTGACC |
| Actb (ENSMUSG00000029580) | Rev: GCCAGAGCAGTAATCTCCTTC |
| | Fw: GACGGCCAGGTCATCACTATT |
| Rplp0 (ENSMUSG00000067274) | Rev: CCGATCTGCAGACACACACT |

| | |
|---|---|
| | Fw: AATCTCCAGAGGCACCATTG |
| *Fmr1* (ENSMUST00000088546) | Rev: GAGACAACTTAGTGCGCAGACT |
| | Fw: CAGTTGGTGCCTTTTCTGTAA |

**Figure S1: Phenotyping scheme**

**Figure S2**: **Influence of pioglitazone on locomotor activity in open field test. A)** Locomotor activity (distance travelled) in the whole arena, **B)** number of rearings and **C)** percentage of time spent in the center of the bowl during 30 min. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. * $p<0.01$ vs WT vehicle, ## $p<0.01$, # $p<0.05$ vs *Fmr1*-KO vehicle; ns, non-significant.

**Figure S3**: **Influence of pioglitazone on novel object recognition, rotarod, prepulse inhibition tests. A**) Novel object recognition. Mean sniffing duration per object passage (sec) during acquisition and retention phases. **B**) Rotarod test. Latency to fall during 4 training sessions. **C**) Acoustic startle reflex (ASR) and prepulse inhibition (PPI) analysis (BN, background noise; P*x*, stimuli of *x*dB such as P70 = 70 dB; ST110, acoustic startle pulse of 110 dB; %PP*x*, prepulse of *x*dB followed by a pulse of 110 dB, Glb, global fit). A, B, C, data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test.

**Figure S4**: **Influence of pioglitazone on weight and body composition. A)** Weight evolution of vehicle- and PGZ-treated WT and *Fmr1*-KO mice throughout treatment (D, day of treatment). **B)** Mean brain weight of vehicle- and PGZ-treated WT and *Fmr1*-KO mice. **C)** Body composition determined by quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR). Lean, free body fluid (FBF), fat and rest (other) are represented as % of the total body weight (means of n=3) and as total weight (g) **D**, **E**, **F**, **G**, respectively, expressed as mean ± SEM and analyzed with one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, ** $p<0.01$ vs *Fmr1*-KO vehicle.

**Figure S5**: **Influence of pioglitazone on DGK transcripts level in total brain extracts and cortical neuron cultures.** The level of indicated DGK mRNAs was determined by qRT-PCR on total mRNAs extracted from **A)** total brain homogenates of mice treated with vehicle or PGZ 20mg/kg/day during 21 days and **B)** from 15 DIV cortical neuron cultures treated with 20µM PGZ for 1h. Fold change of expression was calculated by using the ΔΔCT method and with gene ActB as normalizer. Error bar is SD, n = 6 biological replicates.

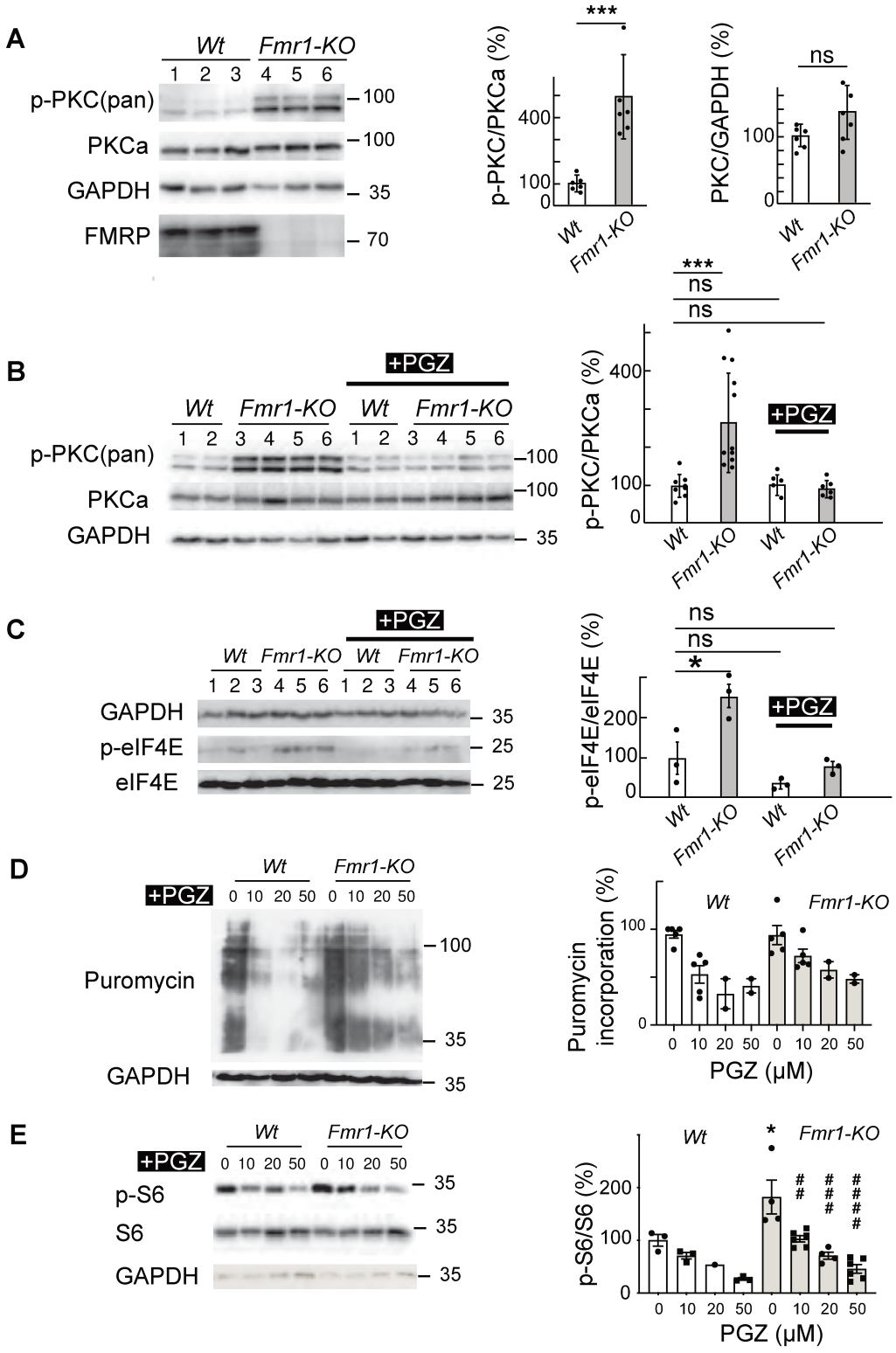
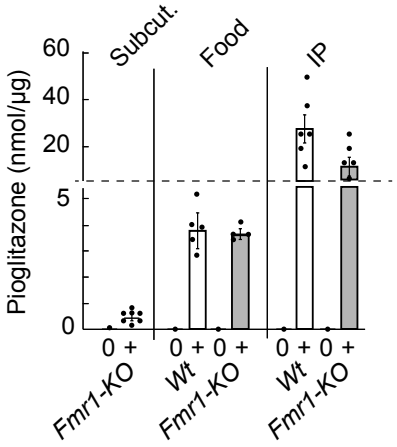

A
Wt
Fmr1-KO
1 2 3 4 5 6
p-PKC(pan)
PKCa
GAPDH
FMRP
100
100
35
70
p-PKC/PKCa (%)
***
400
100
0
Wt
Fmr1-KO
PKC/GAPDH (%)
ns
100
0
B
+PGZ
Wt Fmr1-KO Wt Fmr1-KO
1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6
p-PKC(pan)
PKCa
GAPDH
100
100
35
***
ns
ns
C
GAPDH
p-eIF4E
eIF4E
35
25
25
p-eIF4E/eIF4E (%)
*
200
D
0 10 20 50 0 10 20 50
Puromycin
100
35
Puromycin incorporation (%)
PGZ (μM)
E
p-S6
S6
GAPDH
p-S6/S6 (%)
#

**Fig. 2**

Geoffroy, Habbas et al.



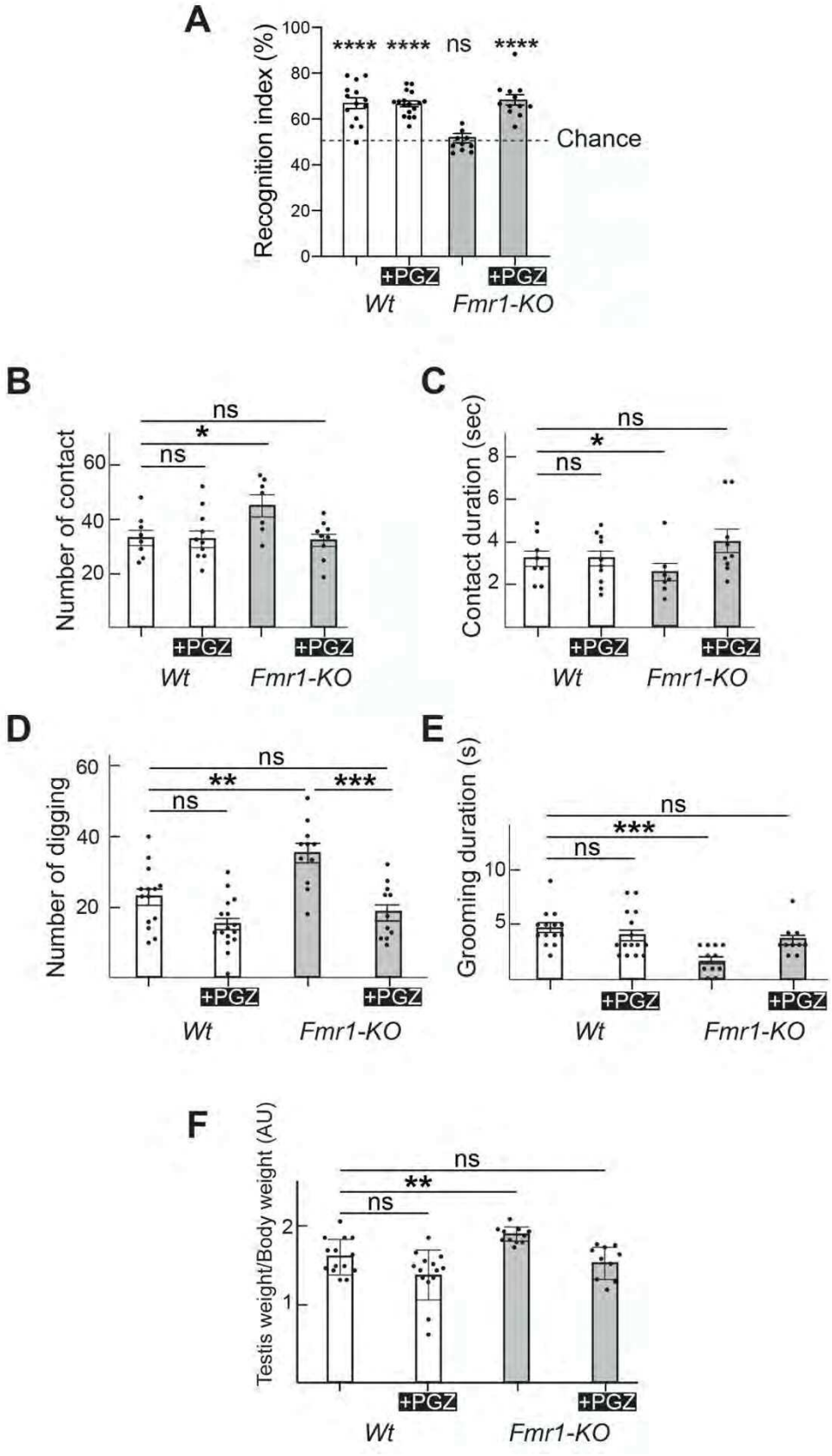

A
Recognition index (%)
100
80
60
40
20
0
**** **** ns ****
Chance
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO
B
Number of contact
60
40
20
ns
*
ns
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO
C
Contact duration (sec)
8
6
4
2
ns
*
ns
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO
D
Number of digging
60
40
20
ns
**
***
ns
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO
E
Grooming duration (s)
10
5
ns
***
ns
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO
F
Testis weight/Body weight (AU)
2
1
ns
**
ns
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO

**Fig. 4**

Geoffroy, Habbas et al.

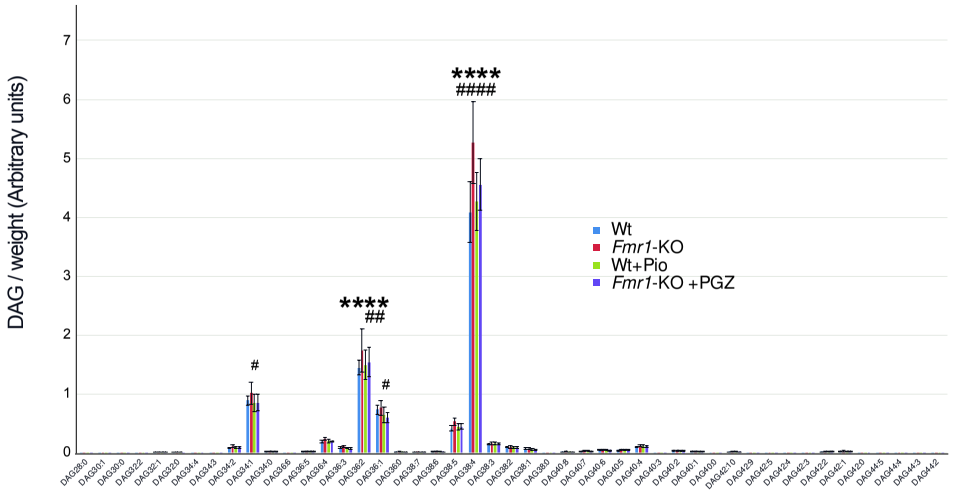
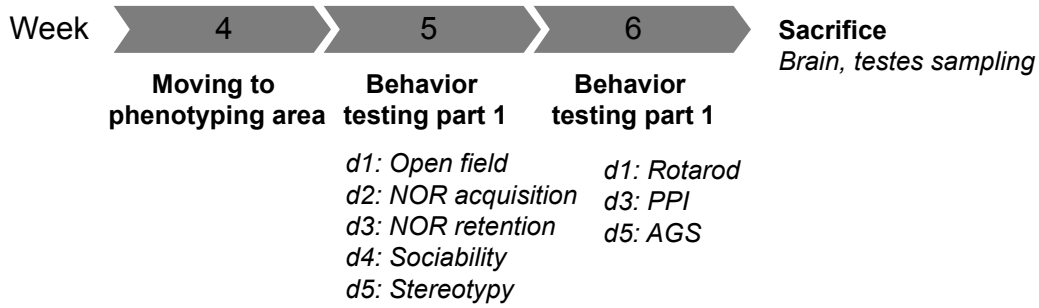
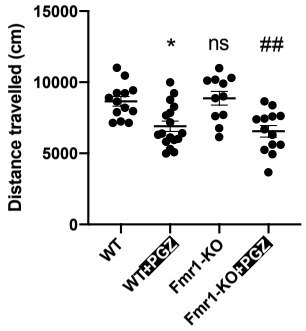


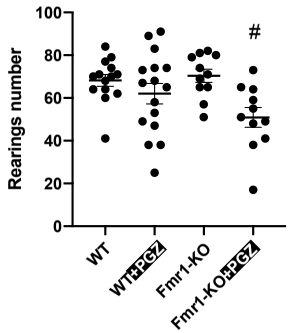
**Fig. S1** Geoffroy, Habbas et al.



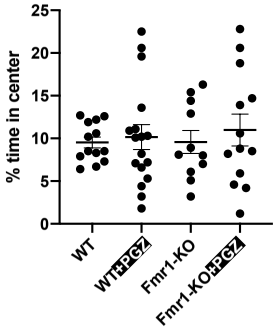
**A**

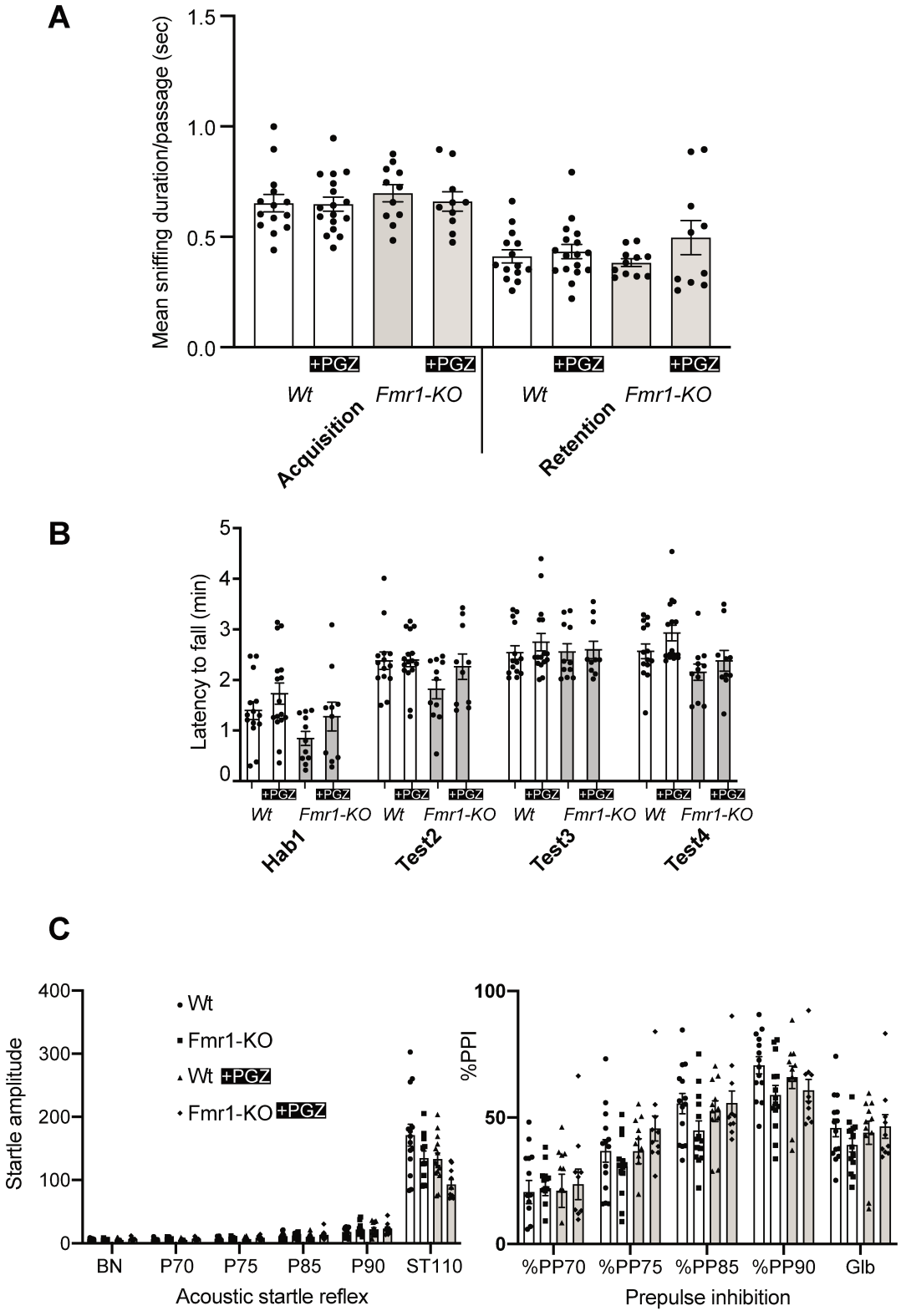

Distance travelled (cm)
15000
10000
5000
0
*
ns
##
WT
WT+PCZ
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PCZ

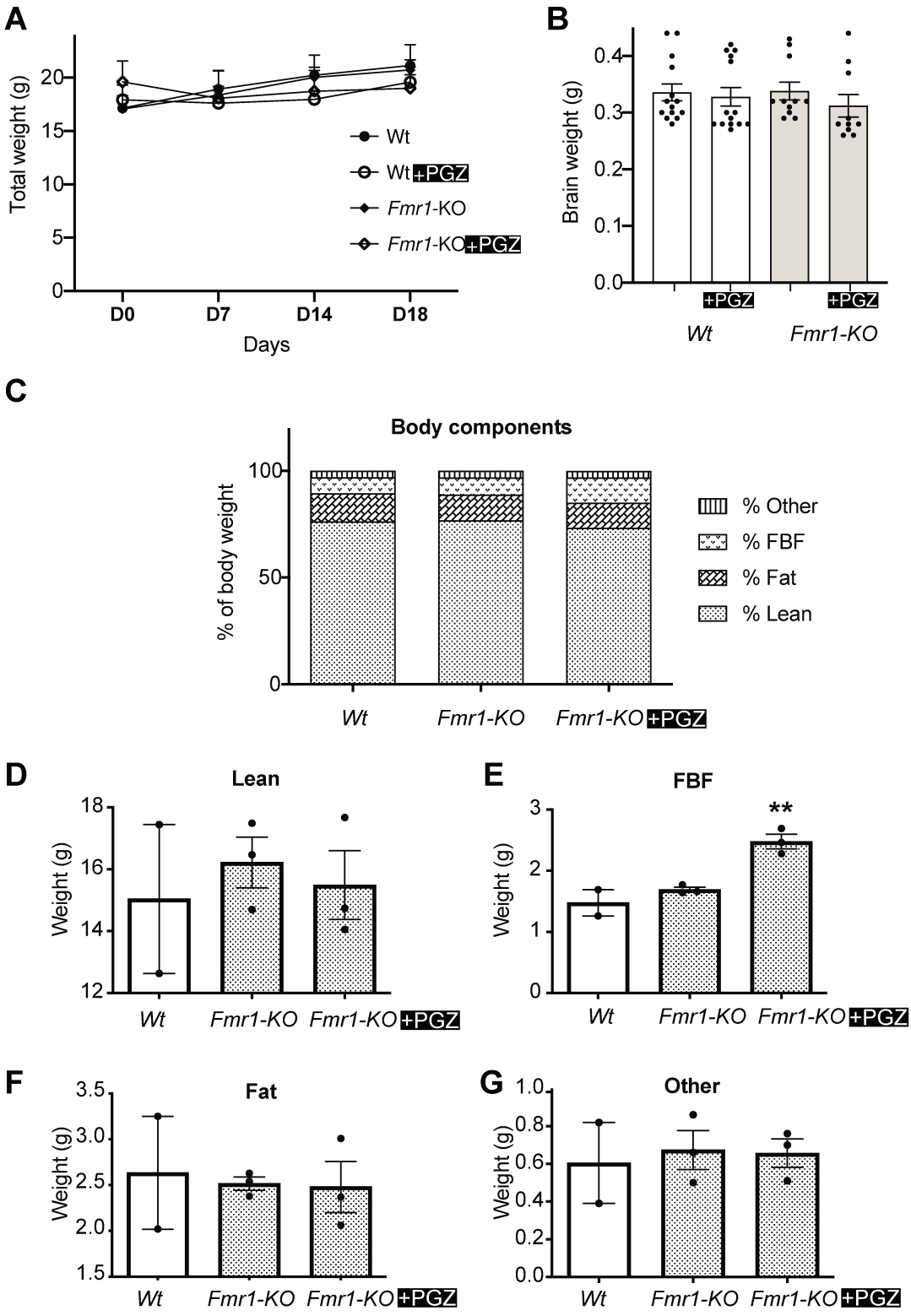
**B**


Rearings number
100
80
60
40
20
0
#
WT
WT+PCZ
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PCZ

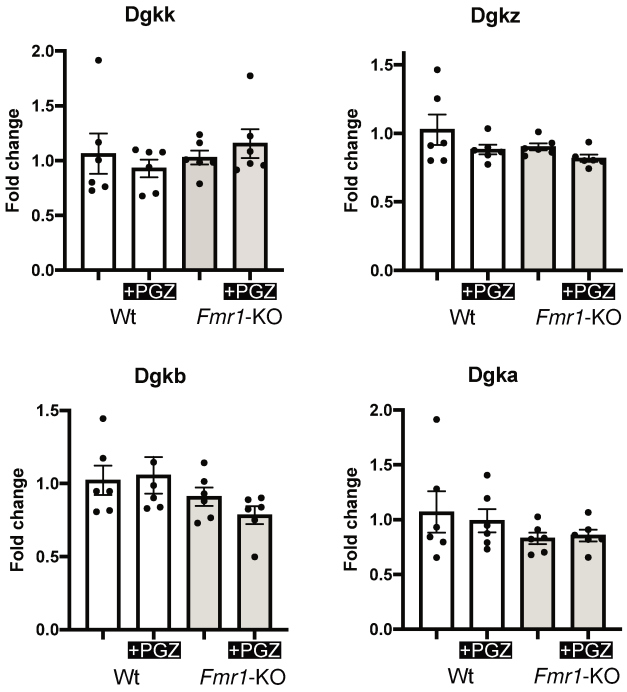
**C**


% time in center
25
20
15
10
5
0
WT
WT+PCZ
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PCZ

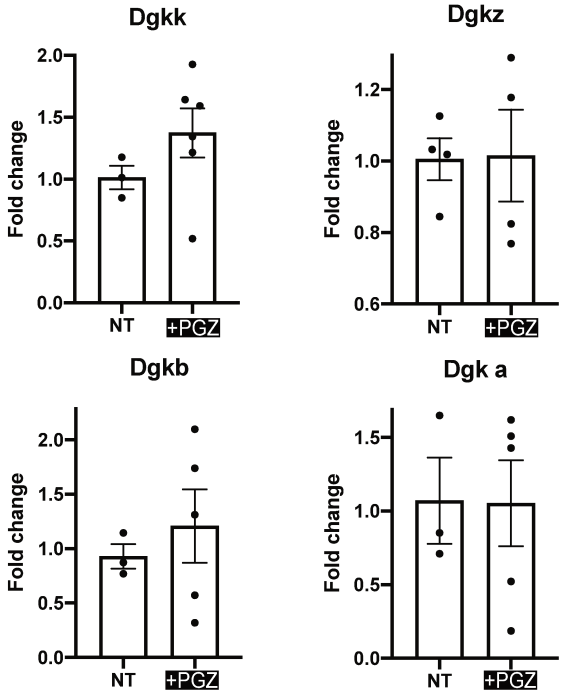

A
Mean sniffing duration/passage (sec)
1.5
1.0
0.5
0.0
+PGZ
+PGZ
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO
Wt
Fmr1-KO
Acquisition
Retention
B
Latency to fall (min)
5
4
3
2
1
0
+PGZ
+PGZ
+PGZ
+PGZ
+PGZ
+PGZ
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO
Wt
Fmr1-KO
Wt
Fmr1-KO
Wt
Fmr1-KO
Hab1
Test2
Test3
Test4
C
Startle amplitude
400
300
200
100
0
Wt
Fmr1-KO
Wt +PGZ
Fmr1-KO +PGZ
BN
P70
P75
P85
P90
ST110
Acoustic startle reflex
%PPI
100
50
0
%PP70
%PP75
%PP85
%PP90
Glb
Prepulse inhibition


A
Total weight (g)
20
15
10
5
0
D0
D7
D14
D18
Days
Wt
Wt +PGZ
Fmr1-KO
Fmr1-KO +PGZ
B
Brain weight (g)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
+PGZ
+PGZ
Wt
Fmr1-KO
C
Body components
% of body weight
100
50
0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO +PGZ
% Other
% FBF
% Fat
% Lean
D
Lean
Weight (g)
18
16
14
12
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO +PGZ
E
FBF
**
Weight (g)
3
2
1
0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO +PGZ
F
Fat
Weight (g)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO +PGZ
G
Other
Weight (g)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO +PGZ

**A**


Dgkk
Dgkz
Dgkb
Dgka
Fold change
+PGZ
Wt
Fmr1-KO

**B**


Dgkk
Dgkz
Dgkb
Dgk a
Fold change
NT
+PGZ

## Discussion article 1

La stratégie pharmacologique utilisée dans cette étude repose sur la propriété de la PGZ à agir comme agoniste des enzymes DGK. Nous avons testé la capacité de la PGZ à corriger les phénotypes FXS du modèle murin *Fmr1*-KO. Notre équipe a précédemment montré que la diacylglycérol kinase kappa (DGKk) est sous-exprimée en l'absence de FMRP et que l'activité DGK serait diminuée dans le cerveau de la souris *Fmr1*-KO selon l'observation d'une augmentation du diacylglycérol (DAG) et une diminution de l'acide phosphatidique (PA) dans les neurones (Tabet et al., 2016). Une augmentation du DAG a également été observée dans le cervelet des patients FXS (Tabet et al., 2016). L'excès de DAG résultant de la perte d'activité de DGKk pourrait ainsi jouer un rôle majeur dans la physiopathologie du FXS. Le DAG est un lipide de signalisation présent à faible concentration dans les membranes cellulaires et jouant un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire. Une mauvaise régulation de sa concentration a été proposée être à l'origine de plusieurs pathologies (maladie d'Alzheimer, cancer) (Koss et al., 2014 ; Yang et al., 2016). L'excès de DAG résultant du manque d'activité DGKk chez la souris *Fmr1*-KO a été proposé sous-tendre le mécanisme moléculaire menant à la signalisation excessive mGluR-I et à l'augmentation de la synthèse des protéines locales (Moine et Vitale, 2019 ; Tabet et al., 2016b). Augmenter l'activité DGK pourrait donc être bénéfique dans le contexte du FXS.

Au niveau moléculaire, nous avons pu montrer que la PGZ est capable de corriger plusieurs altérations moléculaires dans les neurones corticaux de souris *Fmr1*-KO. La PGZ a normalisé la suractivation de PKC et eIF4E (respectivement premier et dernier effecteur de la voie de transduction du signal DAG) observés dans les neurones *Fmr1*-KO par rapport aux neurones *Fmr1*-WT, ce qui indique que la PGZ est capable d'inhiber la signalisation DAG-PKC dans les neurones comme ce qui a été montré dans d'autres types cellulaires (Verrier et al., 2004). L'hyperphosphorylation d'eIF4E est associée à l'augmentation du taux global de synthèse protéique (Sonenberg et al., 2009) et nous avons pu montrer que la PGZ réduit le taux de synthèse des protéines dans les cultures de neurones. Ainsi, la PGZ semble être en mesure de corriger certaines des altérations moléculaires bien établies dans la physiopathologie du FXS (Gantois et al., 2017).

L'administration de PGZ par voie intrapéritonéale donne une meilleure concentration de la molécule dans le cerveau par rapport à une administration par alimentation comme utilisé

dans d'autres études (Schutz et al., 2005). Le traitement PGZ que nous avons administré aux souris *Fmr1*-KO correspond à environ la moitié de la dose orale humaine maximale recommandée de 45 mg basée sur mg / m2 (Takeda Inc.) et a montré une correction du niveau élevé des principales espèces de DAG dans le cerveau de la souris *Fmr1*-KO ce qui conforte son effet agoniste sur les DGK.

La PGZ a corrigé les altérations comportementales du modèle *Fmr1*-KO. Notamment, la mémoire à long terme, comme observé dans le test de reconnaissance du nouvel objet (NOR). L'interaction sociale réciproque, le comportement stéréotypé (creuser) et le toilettage ont également été corrigés. Nous n'avons pas observé d'influence du génotype sur l'activité locomotrice mais de manière inattendue la PGZ a diminué la distance parcourue et le nombre de redressement des souris dans les deux génotypes, suggérant un effet indésirable possible du traitement sur l'activité locomotrice volontaire. Cet effet observé pourrait être lié à l'impact connu de la PGZ sur la rétention de liquide corporel, en raison de la rétention rénale de sodium et de l'hyperperméabilité vasculaire (Duan et al., 2008). Notons tout de même que l'état général des animaux n'est pas impacté et que les performances physiques évaluées avec le test du rotarod n'ont pas été affectées.

La PGZ inhibe la signalisation DAG-PKC en activant l'activité DGK (Verrier et al., 2004), mais le mécanisme par lequel l'activité DGK est activée n'est pas clair. La PGZ peut agir par des voies dépendantes et indépendantes des PPARɣ (Turturro et al., 2007). Dans les cultures de neurones traités par PGZ et dans les extraits de cerveau de souris traitées par la PGZ, nous n'avons observé aucun changement sur le niveau de transcription des enzymes DGK suggérant que dans les neurones, la PGZ agit sur l'activité de la DGK d'une manière PPARɣ-indépendante, peut-être parce que les récepteurs PPARɣ sont très peu exprimés dans le cerveau (Villapol et al., 2018). Le mécanisme exact de la PGZ dans le cerveau reste donc à élucider.

De manière intéressante, l'altération des lipides cérébraux et plus particulièrement l'augmentation du DAG semble jouer un rôle important dans plusieurs maladies neurologiques. En effet, l'augmentation du DAG a été montrée être liée à l'apparition de troubles cognitifs légers dans la maladie d'Alzheimer (Wood et al., 2015), la maladie de Parkinson et la maladie à corps de Lewy (Wood et al., 2018) et cette augmentation a été proposée comme facteur déclenchant de la neuroinflammation (Wood et al., 2018). La PGZ a des effets anti-inflammatoires et montre des effets positifs sur la cognition dans des modèles murins

d'Alzheimer (Masciopinto et al., 2012 ; Searcy et al., 2012), qui, comme dans le modèle FXS, ont une neurotransmission glutamatergique anormalement élevée (Lipton, 2007). Quan et al., ont montré que la PGZ atténuait l'apoptose neuronale des neurones primaires de l'hippocampe de rat induite par Aβ1–42 (beta amyloïde 1-42), diminuait l'expression de la CDK5 (Cyclin-dependent-like kinase 5), et diminuait la liaison CDK5-PPARγ ayant ainsi un effet neuroprotecteur dans le modèle rat de la maladie d'Alzheimer (Quan et al., 2019).

Concernant les altérations de la plasticité synaptique dans le contexte FXS, une altération de la LTP et une augmentation de la LTD dans l'hippocampe et le cortex sont connues, nous avons donc initiés une étude électro-physiologique sur des souris *Fmr1*-KO traités à la PGZ afin d'évaluer l'effet du traitement sur les plasticités synaptiques altérées. Ces études sont en cours, elles sont effectuées en collaboration avec le Dr. Olivier Manzoni à l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (Marseille) et devraient compléter l'étude.

Par ailleurs, d'autres études ont montré l'efficacité des agonistes PPARγ dans le traitement des troubles neurologiques (Landreth et al., 2008). Ainsi la PGZ a été montrée avoir une action protectrice sur les cellules contre le stress oxydatif et l'inflammation dans les tissus périphériques (Schütz et al., 2005). Une autre étude a montré que la PGZ peut prévenir les lésions neuronales, la perte de myéline, les douleurs neuropathiques, l'inflammation, les déficits de l'apprentissage et de la mémoire (Strum et al., 2007). Il a ainsi été montré que la PGZ induit une inhibition de l'expression des cytokines inflammatoires (IL-1b, IL-6 et IL-8) (Schutz et al., 2005) et une réduction du TNF-α (Wu et al., 2010), et agit également sur la fonction mitochondriale et le récepteur du glutamate NMDA (Almasi- Nasrabadi et al., 2012 ; Ghosh et al., 2007), des fonctions considérées importantes en physiopathologie des TSA et du syndrome de l'X Fragile (Siddiqui et al., 2016 ; Rossignol et al., 2012).

L'utilisation de la PGZ pour la sclérose en plaque (SEP) associée à un syndrome métabolique (coexistence de plusieurs troubles d'origines lipidiques, glucidiques ou vasculaires associés à une surpoids ou une obésité) préviendrait le développement d'une réponse immunitaire inappropriée. En 2016, Negrotto et al., ont évalué l'effet de la PGZ et de la metformine sur la SEP par imagerie par résonance magnétique cérébrale chez des patients avec SEP et syndrome métabolique. Vingt patients ont reçu du chlorhydrate de metformine de 850 à 1500 mg / jour, et 10 patients ont reçu du chlorhydrate de PGZ de 15 à 30 mg / jour et 20 patients non traités ont servi de témoins. Les patients ont été suivis pendant une durée de 24 à

33 mois. Après 6 mois de traitement, les 20 patients traités à la metformine et les 10 patients ayant reçu la PGZ, montrent une diminution significative des plaques de démyélinisation, ainsi qu'une diminution des lésions gadolinium positives (correspondant à une diminution des lésions actives, positives au produit de contraste gadolinium) par rapport aux témoins. Les deux traitements ont conduit à une diminution du taux moyen de leptine et une augmentation des taux sériques moyens d'adiponectine ainsi qu'une diminution de plusieurs facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-17, l'interféron γ et l'IL-6 (Negrotto et al., 2016). Les traitements par PGZ et metformine montrent des effets anti-inflammatoires correcteurs chez les patients atteints de SEP et de syndrome métabolique qui nécessiteraient plus d'investigation et d'analyses complémentaires.

La PGZ a une approbation pour le traitement du diabète de type 2 et à ce titre n'a pas d'autorisation spécifique pour une utilisation chez l'enfant. De manière intéressante cependant, plusieurs études cliniques ont testé l'utilisation de la PGZ chez l'enfant dans les troubles du spectre de l'autisme (TSA). Les patients avec TSA présentent des taux élevés de chimiokines pro-inflammatoires comme la protéine chimio-attractive macrophage 1 (MCP-1), la cytokine pro-inflammatoire interleukine-6 (IL-6) et plusieurs altérations des niveaux d'autres marqueurs d'inflammation (IL-10, MCP3, MDC…) (Capano et al., 2018). Dans une étude portant sur 65 enfants avec TSA par rapport à des témoins sains, le niveau d'IL-8 dans le sang est trouvé significativement plus élevé, tandis que l'IL-10 est significativement plus bas. Ashwood et al, ont constaté que l'augmentation du niveau d'IL-6 chez les enfants TSA était associée à une augmentation des stéréotypies (Ashwood et al., 2011). En 2007, Boris et al., ont utilisé la PGZ sur 25 enfants de 7 à 8 ans traités à la PGZ à 30 ou 60 mg par jour pour son action anti-inflammatoire dans les cellules gliales ainsi que son action d'inducteur d'apoptose des lymphocytes T activés. Cette étude a montré une diminution significative de l'irritabilité, de la léthargie, des stéréotypies et de l'hyperactivité et de manière très intéressante, plus les patients étaient jeunes plus les effets visibles de la PGZ sur le comportement étaient forts (Boris et al, 2007). En 2015, l'équipe de Ghaleiha a utilisé la PGZ dans le traitement de l'irritabilité chez des patients autistes en administrant une dose de 30 mg / jour associée à un anti-psychotrope, la rispéridone administrée à la dose de 0,5 mg / jour et augmentée de manière hebdomadaire jusqu'à atteindre la dose de 1 à 2 mg/ jour. Cet essai clinique randomisé en double aveugle et contrôlé par placebo a été mené sur 44 patients atteints d'autisme des deux sexes âgés de 4 à 12 ans durant 10 semaines. Cette étude a montré une diminution significative de l'irritabilité, de la léthargie, du retrait social et de l'hyperactivité mais pas d'effet significatif pour les

comportements stéréotypés (Ghaleiha et al., 2015). Parmi les effets secondaires rapportés dans ces études, les vomissements et les maux de tête étaient les plus fréquents mais non significatifs par rapport aux groupes contrôles (Ghaleiha et al., 2015) et la présence de taux élevés de globules blancs, de glucose et d'enzymes hépatiques qui ont pu être corrigé sans intervention médicale (Boris et al., 2007). Dans ces deux études menées sur la PGZ dans le traitement des TSA, l'une utilisait des doses supérieures à la dose maximale recommandée par la FDA pour les adultes (45mg/ jour), tandis que l'autre utilisait la PGZ comme traitement d'appoint. Par conséquent, l'innocuité et l'efficacité de la PGZ dans les TSA nécessitent des études plus approfondies.

En 2018, Capano et al., ont mené une autre étude dans laquelle ils ont évalué la dose maximale tolérée basée sur le poids des patients. En plus des tests comportementaux, Capano et al., ont également mesuré les taux de cytokines IL-1β, IL-6, TNF-α et IL-10 avant et après le traitement en tant que prédicteurs potentiels de la réponse au médicament. Cette étude de phase II effectuée en simple aveugle et sans groupe placebo a été menée au Canada sur des enfants autistes âgés de 5 à 12 ans durant 16 semaines. La dose maximale tolérée identifiée de PGZ est de 0,75 mg / kg chez les enfants et, conformément aux deux études précédentes, une amélioration significative de l'irritabilité, de l'hyperactivité et du sevrage social a été observée dans la gamme de doses approuvées par les organismes de réglementation. De plus, ils ont pu montrer une amélioration significative des comportements répétitifs et de l'anxiété mesurés par les échelles standardisées et aucun effet secondaire grave indésirable n'a été rapporté (Capano et al., 2018). Le traitement a également diminué le niveau de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et augmenté le niveau de la cytokine inflammatoire IL-10, mais aucun effet n'a été observé sur le TNF-α pro-inflammatoire. Ces résultats doivent tout de même être répétés dans une étude plus large, randomisée et avec un groupe placebo (Capano et al., 2018).

L'ensemble de ces études, combinées à nos résultats, suggèrent que l'utilisation de la PGZ dans le traitement du FXS apparait intéressante d'autant plus que la dose administrée peut être ajustée à tout moment au cours de l'âge et en fonction de l'importance des symptômes, qu'elle peut être administré chez l'enfant et, dans le cas où des effets indésirables apparaitraient, son administration peut être stoppée. D'autre part, le fait que la PGZ est une molécule bien connue et approuvée « FDA », son utilisation dans le cadre d'un potentiel essai clinique sur des patients pourrait être facilitée et plus rapide.

On peut signaler cependant qu'en Europe, contrairement aux USA et un certain nombre d'autres pays européens, la PGZ a fait l'objet d'une décision de retrait du marché en raison d'un

risque accru à développer des cancers de la vessie. En effet, l'avertissement est basé sur l'analyse des données épidémiologiques sur 10 ans de la FDA. Les résultats ont montré que bien que l'utilisation de la PGZ n'ait pas été associé à un risque global accru de cancer de la vessie, il y avait une augmentation du risque de malignité chez les patients avec la plus longue exposition à la PGZ et chez ceux exposés à une dose cumulée la plus élevée (Stephenson, 2011). Une autre étude montre que la PGZ augmenterait le risque de développer un cancer de la vessie, avec une incidence de 121.0 pour 100000 personnes traitées à la PGZ comparé à une incidence de 88.9 pour 100000 personnes traitées avec d'autres anti-diabétiques sur une année (Tuccori et al., 2016). Par conséquence, la FDA a donné de nouvelles recommandations concernant la PGZ : ne pas commencer un traitement à la PGZ chez les patients atteints d'un cancer de la vessie actif et de l'utiliser avec prudence chez les patients ayant des antécédents de cancer de la vessie tandis qu'en France elle a été retirée du marché (Nanjan et al., 2018). Mais plusieurs études ont remis en cause la fiabilité de ces statistiques concernant l'incidence de développer un cancer de la vessie chez les patients traités à la PGZ. Une première étude dans laquelle les auteurs ont évalué l'effet de la PGZ concernant le risque d'augmenter l'incidence dans les 10 cancers les plus fréquents,portait sur une cohorte de 252467 patients âgés de 40 ans et plus. Les auteurs de cette étude ont conclu qu'aucune preuve claire d'une association entre l'utilisation de la PGZ et le risque des cancers incidents n'a été trouvé (Ferrara et al., 2011). La deuxième étude s'est concentrée sur les cas de cancer de la vessie enregistré dans le système de notification des événements indésirables de la FDA (base de données associée au traitement antidiabétique). Cette étude a analysé les données de 2004 à 2009, selon les rapports, le reporting odds ratio (ROR) correspondant au risque relatif d'avoir un cancer de la vessie était significativement supérieur à 1 pour la PGZ (ROR = 4,30) et de même pour la gliclazide et l'acarbose (deux autres antidiabétiques couramment utilisés). Parmi les 31 cas de cancer signalés chez les utilisateurs de PGZ (âge moyen de 70 ans), 23 sont survenus chez des hommes et 8 chez des femmes. Lorsqu'il est analysé par âge (seuil de 65ans), le ROR de la PGZ n'était significatif que chez les patients les plus âgés. Cependant, les auteurs eux-mêmes ont admis que l'analyse ROR a plusieurs limites, y compris l'utilisation de générique, l'effet Weber (une médiatisation élevée qui augmente la sensibilisation et la tendance naturelle à rapporter les évènements indésirables suspectés ; par ailleurs, le nombre absolu de rapports augmente proportionnellement avec l'augmentation de l'utilisation du médicament dans la population), données manquantes ou mal orthographiées, et manque d'informations sur les habitudes des patients (tabagisme) ou risques

professionnels. En outre, ils suggèrent également plus d'études pour valider ces résultats (Piccini et al., 2011 ; Shukla et Kalra, 2011).

Des études plus récentes semblent toutefois minimiser ce risque. En effet, Dankner et Roth montrent qu'actuellement il existe des preuves non concluantes concernant une association possible de la PGZ au risque accru de cancer, au même titre que les autres molécules utilisées comme les sulfonylurées, la metformine et les inhibiteurs du co-transporteur sodium-glucose-2. Les contradictions concernant les associations de médicaments antidiabétiques avec le risque de cancer sont apparemment attribuables à la fois à des problèmes méthodologiques et à la complexité du sujet. Des études plus récentes et mieux conçues ont affaibli les preuves des liens entre les médicaments antidiabétiques et le risque de cancer (Dankner et Roth, 2019).

Dans le cadre d'un traitement du FXS l'utilisation d'une telle molécule comme un médicament orphelin (orphan drug selon la FDA), qui apparaît par ailleurs relativement sure (par rapport aux autres types de traitement déjà envisagés pour le FXS), resterait très intéressant.

En conclusion, dans cette étude, nous apportons plusieurs éléments indiquant que la PGZ, un des antidiabétiques les plus utilisés dans le monde, approuvé par la FDA, corrige les principaux déficits phénotypiques du modèle FXS *Fmr1*-KO. À notre connaissance, il s'agit de la première étude qui rapporte qu'agir sur la signalisation du DAG dans le cerveau peut corriger les altérations comportementales associées au FXS. La régulation positive de l'activité DGK peut donc représenter une stratégie thérapeutique potentielle pour le FXS. Il serait intéressant et important maintenant de mieux définir les doses nécessaires et suffisantes pour obtenir un effet chez l'animal. Il serait intéressant également de montrer l'action de la PGZ sur un système cellulaire humain comme par exemple des neurones dérivés de cellules iPS de patients.

## Stratégie de thérapie génique : AAVrh10 et PHPe.B- DGKκ (Article 2)

La deuxième stratégie utilisée dans ce projet pour augmenter l'activité DGK dans le modèle *Fmr1*-KO est l'utilisation d'un virus adéno-associé (AAV) capable d'exprimer DGKκ de manière FMRP- indépendante. Des résultats préliminaires obtenus précédemment au sein de notre équipe indiquaient qu'il n'y a pas d'expression de la protéine DGKκ dans les cellules en absence de FMRP. La présence d'une grande extension N-terminale non-conservée dans les autres membres de la famille DGK non régulés par FMRP suggérait un rôle possible de cette région dans le contrôle. Effectivement, la délétion de la région N-terminale permet une forte expression de la protéine et la rend indépendante de la présence de FMRP, suggérant l'implication de cette région dans le contrôle. Ces résultats ont permis de proposer une application thérapeutique de l'utilisation de cette forme de DGKκ délétée en N-terminal (ΔNter- DGKκ) pour le FXS (Moine et Tabet, Brevet 2017). Nous avons montré ici que l'expression de ΔNter- DGKκ en cellules Cos-1 agit sur la voie de signalisation du DAG (eIF4E et synthèse protéique) et dans les neurones *Fmr1*-KO corrige la phosphorylation excessive de eIF4E quand elle est délivrée à partir d'un vecteur AAV. Sur la base d'une étude pilote en collaboration avec le Dr. Françoise Piguet, des injections intracérébrales dans l'hippocampe et le striatum de souris *Fmr1*-KO de virus AAV9 et AAVrh10 exprimant ΔNter-DGKκ, montrant une bonne efficacité de transduction des AAVs au niveau des structures injectées (qPCR et immunofluorescence) et des résultats comportementaux encourageants (diminution de l'anxiété, de l'hyperactivité, effet sur la mémoire), une étude à grande échelle (effectif d'animaux important) a été entreprise. Cette étude s'inscrit dans un programme de maturation soutenu par la SATT Conectus Alsace (avec le Dr. Antonina Federova) en partenariat avec la société de biotechnologie Lysogène, spécialisée dans le développement de thérapies géniques pour le traitement des maladies neurologiques rares. Pour cette étude, nous avons décidé d'utiliser le virus Rh10 pour lequel une bonne expertise était disponible auprès de notre partenaire industriel, ainsi que le virus PHPe.B, qui a une meilleure capacité à passer la barrière hémato- encéphalique et à transduire efficacement l'ensemble du cerveau (Chan et al., 2017). Nous avons validé l'efficacité de transduction virale *in vitro* sur cultures primaires de neurones corticaux (qPCR, immunofluorescence, western blot) et vérifié l'absence de toxicité cellulaire (analyses de survie neuronale, relargage de la lactate déshydrogénase, apoptose). Après comparaison dans une seconde étude pilote des différentes voies d'administration des virus,

nous avons décidé sur la base de résultats homogènes en termes d'expression et de structures ciblées, d'utiliser l'injection intracérébrale dans l'hippocampe et le striatum de l'AAVrh10-ΔNter-DGKκ (correspondant à une expression plus forte du transgène) et l'injection rétro-orbitale du PHPe.B-ΔNter-DGKκ (correspondant à une expression plus faible du transgène). Avec l'aide de la Clinique de la Souris (ICS, IGBMC), des cohortes d'animaux de 5 semaines d'âge ont été injectées et une batterie de tests comportementaux a été réalisée à 4 semaines après injections, ainsi qu'à 8 semaines, afin d'évaluer l'effet sur le long terme de la stratégie de thérapie génique. A l'issue des tests comportementaux, des analyses moléculaires ainsi qu'une analyse lipidomique ont été réalisés sur les cerveaux de ces animaux pour évaluer l'efficacité d'expression et de corrections des approches.

# Title: AAV-delivery of diacylglycerol kinase kappa achieves long-term rescue of *Fmr1*-KO mouse model deficits of fragile X syndrome

**Authors:** Karima Habbas[1], Oktay Cakil[1], Boglarka Zambo[1], Fabrice Riet[1], André Geoffroy[1], Jean-Louis Mandel[1], Ricardos Tabet[1*] Françoise Piguet[2], Hervé Moine[1§]

**Affiliations:**

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Département de Médecine Translationelle et Neurogénétique, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR7104), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U1258), Université de Strasbourg, Illkirch, France.

[2]NeuroGenCell, INSERM U1127, Paris Brain Institute (ICM), Sorbonne University, CNRS, AP-HP, University Hospital Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

[*] Present address : Pfizer, Inc, Cambridge, MA, USA.

[§]Corresponding author. Email: moine@igbmc.fr

**Running title:** *DGKk* gene therapy proof of concept in *Fmr1*-KO mouse model

**Keywords:**

Fragile X syndrome, FMRP, AAV, diacylglycerol kinase, *Fmr1*-KO

**Contact:**

Hervé Moine, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 67404 Illkirch, France, Phone +33 3 88 65 56 78, Email: moine@igbmc.fr

**Summary**

**Fragile X syndrome (FXS) is the most frequent form of familial intellectual disability. FXS is an uncured disease resulting from the lack of the RNA binding protein FMRP and associated with the overactivation of signaling pathways downstream of mGluRI receptors and upstream of mRNA translation.**

**Here we show that diacylglycerol kinase kappa (DGKk), a main mRNA target of FMRP in cortical neurons, corrects the brain diacylaglycerol and phosphatidic acid homeostasis and the main phenotypic behaviors of the *Fmr1*-KO mouse model of FXS when modified as to become FMRP-independent and delivered in the brain of post-adolescent mouse by adeno-associated vector administration. Thus, DGKk appears as a key triggering factor of FXS pathomechanism while providing a possible mean of intervention for FXS gene therapy.**

## Introduction

Fragile X syndrome (FXS) is a main cause of familial intellectual disability and autistic spectrum disorder (ASD) with a prevalence in general population estimated as 1 in 5000 males and 1 in 8000 females (Hagerman et al., 2017; Kaufmann et al., 2004). FXS is also generally associated with variable behavioral symptoms that can include anxiety, hyperactivity, hypersensitivity, stereotypies, memory deficits and sleeping problems. FXS results from the loss of the fragile X mental retardation protein (FMRP), an RNA binding protein associated to mRNAs and the translation machinery and whose absence in *Fmr1*-deleted mice (*Fmr1*-KO) recapitulates FXS-like phenotypes (1994; Mientjes et al., 2006) with perturbation of neuronal protein translation in hippocampus and cortex (Dolen et al., 2007; Qin et al., 2005). FMRP loss

leads to mRNA translation increase of neuronal proteins resulting from an overactivation of metabotropic group 1 glutamate receptor (mGluR)-dependent local mRNA translation (Bear et al., 2004) including phosphatidylinositol 3-kinase enhancer (PIKE) (Gross et al., 2015), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) (Gkogkas et al., 2014; Sidhu et al., 2014), glycogen synthase kinase 3 (GSK3) (Guo et al., 2012) and amyloid-β A4 protein (APP) (Pasciuto et al., 2015; Westmark et al., 2011). The mGluR overactivation is one well established triggering factor of FXS pathomechanism, and we recently showed that mGluR diacylglycerol (DAG) and phosphatidic (PA) dependent signaling upstream of local mRNA translation is disrupted by FMRP loss (Tabet et al., 2016a). The diacylglycerol kinase kappa (DGKk) was identified in mouse cortical neurons as the mRNA species most bound by FMRP and with highest in vitro binding affinity. DGKk expression was found severely reduced in brain of *Fmr1*-KO mouse and a perturbation of DAG/PA acid homeostasis was observed in *Fmr1*-KO cortical neurons and in the brain of FXS individuals suggestive of a decreased DGK activity and altered DAG/PA signaling (Tabet et al., 2016a). DGKk knockdown in wild-type mouse brains recapitulated FXS-like behaviors, and overexpression of DGKk in *Fmr1*-KO hippocampal slices rescued their abnormal dendritic spines morphology (Tabet et al., 2016a). Overall, DGKk appears to play a key role in dendritic spine morphology and function and in the determination of FXS-like behaviors. In fact, DGKk loss of function was proposed to be at the origin of the various forms of abnormal synaptic signaling in FXS by causing altered DAG/PA signaling (Tabet et al., 2016b). Thus, being a deficient enzyme in FXS, DGKk could represent an interesting actionable therapeutic target for the disease.

Here we show that DGKk expression is lost in FXS patients' postmortem brains as previously shown in *Fmr1*-KO mice (Tabet et al., 2016a). We show that the N-terminal region of DGKk is important for its positive translational control by FMRP and the deletion of this region renders the protein independent of FMRP presence, suggesting that FMRP alleviates a translation

blockade within N-terminal region. ΔN-DGKk is able to modulate protein synthesis rate and eIF4E phosphorylation in neurons. Moreover, ΔN-DGKk expression in *Fmr1*-KO mouse brain using adeno-associated vector Rh10 (AAVrh10) is able to correct brain lipid profile dysregulations and achieve long time behavioral rescue (over 8 weeks after injections) of *Fmr1*-KO mouse, providing a first proof of principle of *DGKk* gene therapy in mouse model of FXS.

## Results

### DGKk mRNA translation requires FMRP and DGKk N-terminal truncation alleviates FMRP control.

We previously showed that the expression of diacylglycerol kinase kappa (DGKk) is strongly reduced in brain of *Fmr1*-KO (Tabet et al., 2016a) in agreement with the fact that DGKk mRNA was identified as the mRNA species most found associated with FMRP by crosslinking immunoprecipitation in cortical neurons and with the highest in vitro binding affinity identified. Like in *Fmr1*-KO brain, DGKK expression is also lost in FXS post-mortem cerebellum compared to unaffected controls (**Fig. 1A**). These data suggest that DGKk requires FMRP for its proper expression. DGKk is mostly expressed in neurons and is almost absent in non-neuronal cells (Tabet et al., 2016a). We then tested if it is possible to recapitulate FMRP control in a non-neuronal cell system. We analyzed the influence of FMRP on the expression of HA-tagged mouse and human DGKk (**Fig. 1B, Sup Fig. 1A**) transfected in two different lines, Cos-1 and Hela cells. Knock-down of endogenous FMRP with siRNA severely reduced the expression level of mouse DGKk (mDGKk) compared to control siRNA treated cells (**Fig. 1BC**) indicating a strong FMRP requirement for DGKk expression. Human DGKk (hDGKk) level is also affected by FMRP knock-down, indicating that FMRP control is conserved on RNA sequence from different species (**Sup Fig. 1A**). mDGKk mRNA level is not influenced

by the lack of FMRP (**Sup Fig. 1B**) while the protein level is severely reduced supporting a control mechanism at mRNA translational level. This is in agreement with our previous data in mouse brain indicating that DGKk transcript level is not affected by the loss of FMRP and DGKk mRNA is less associated with polyribosomes (Tabet et al., 2016a). Noticeably, DGKk is the only DGK isozyme interacting strongly with FMRP (Tabet et al., 2016a) and bearing a long N-terminal extension constituted of unique proline-rich and EPAP repeated motives (Imai et al., 2005) (**Fig. 1B**). The N-terminal part of the protein might play a critical role in DGKk expression considering the repetitive nature of the EPAP domain at the beginning of the coding sequence. Thus, we generated a mDGKk construct lacking the first 696 bases following start codon, encompassing the EPAP domain (ΔN-DGKk), for expression assessment in cells. ΔN-DGKk lead to a strong increase of expression (about ten-fold higher) (**Fig. 1D**). FMRP reduction did not affect ΔN-DGKk (**Fig. 1D**), suggesting that the N-ter domain of DGKk is required for FMRP control and that ΔN-DGKk expression does no longer depend on the presence of FMRP. Therefore, ΔN-DGKk represents a potential therapeutic target for FXS gene therapy by bypassing the need of FMRP.

**ΔN-DGKk counteracts with FXS-like molecular defects.**

DGKk deregulation has been proposed to play a key role in FXS pathomechanism by altering DAG/PA signaling and leading to an excess of DAG and lack of PA potentially responsible of excessive protein synthesis, major molecular hallmark of FMRP defects (Tabet et al., 2016a; Tabet et al., 2016b). To test the potential rescuing activity of ΔN-DGKk, we first analyzed its ability to modulate protein synthesis rate. Expression of ΔN-DGKk in Cos-1 cells reduced in a concentration dependent manner the protein translation rate and this effect was counteracted by pretreatment of cells with DGK specific inhibitors R59022 and R59949 (Jiang et al., 2000) (**Fig. 2A**). These data demonstrate that ΔN-DGKk activity is upstream of mRNA translation

and relies on conversion of DAG into PA as DGK inhibitors prevent ΔN-mDGKk from reducing mRNA translation by blocking its activity. To assess the biodistribution and efficacy of ΔN-DGKk in FXS mouse model, we built our expression cassette to be driven by neuronal specific promoter synapsin and packaged into two adeno-associated vectors (AAV), Rh10 and PHP.eB. Both AAV preparation harboring ΔN-DGKk demonstrated efficient neuronal transduction of in *Fmr1*-KO cortical neurons, confirming that ΔN-DGKk can be expressed without FMRP (**Fig. 2B**). Phosphorylation of initiation factor eIF4E, which regulates protein synthesis by reducing translation initiation level (Sonenberg, 1994) and is increased after DAG-signaling activation (Wang et al., 1998), is increased in *Fmr1*-KO mouse and FXS patients (Gantois et al., 2017). We show that P-eIF4E is also increased in *Fmr1*-KO cortical neurons compared to WT littermates (**Sup Fig. 2A**) and ΔN-DGKk is able to reduce their eIF4E phosphorylation (**Fig. 2C**). No sign of neuronal toxicity was observed with high multiplicity of infection (MOI) of AAV on neuronal cultures (**Sup Fig. 2B-E**). An overall reduction in NeuN positive cells is observed upon AAV delivery independent from ΔN-DGKk expression visible as well with AAV-FMTP. Such effect was visible with a 10-fold less FMRP-expressing vector (10e9 VG/ 24-well) (**Sup Fig. 2D**), additional tests (caspase 3/7, LDH) did not show signs of toxicity in vitro (**Sup Fig. 2B,C**).

**In vivo correction of phosphatidic acid level in adult mice using multiple route of administration**

ΔN-DGKk was administered to 5-week-old *Fmr1*-KO mice by intravenous injection of AAVPHP.eB-ΔN-DGKk or intracerebral injection in the striatum and hippocampus of AAVrh10-ΔN-DGKk, respectively. Single retro-orbital injection of AAVPHP.eB-ΔN-DGKk at 10^11 VG/mouse enabled 0.5-1 VG/cell throughout the brain (**Fig.3AB**) four or eight weeks after injection with low protein expression as visualized by western blot (**Fig.3C**) and

immunohistochemistry (**Fig. 3D, Sup Fig. 3A**) using HA antibody. This is expected due to the low dose of the AAV-PHP.eB injected (Chan et al., 2017). Intracerebral injection of AAVrh10-ΔN-DGKk at 5x10^11 VG/mouse enabled higher biodistribution throughout the brain with about 100 VG/cell in the hippocampus and about 25 VG/cell in rest of brain leading to high protein level (**Fig. 3BCD**). AAVrh10 vector lead to a robust ΔN-DGKk transduction throughout the hippocampus (CA1 and CA2 regions mainly), cortex and striatal areas (**Fig. 3D, Sup Fig. 3A**).

DGKk deregulation was shown to alter DAG/PA balance in neuronal cultures and human postmortem brains (Tabet et al., 2016a). We confirmed a marked decrease of total PA level (22% ±8) in the cortex of *Fmr1*-KO mice at 13 weeks of age (**Fig. 3E**). The other mouse brain regions did not show significant differences (**Sup Fig. 7AB**). The decrease in the total pool of PA is reflected by a reduction of most PA species (including abundant species 34:1, 36:2, 38:4 or low species 38:3, 40:1) (**Sup Fig. 7E-G**). Thus, DGKk loss in *Fmr1*-KO cortex lead to alteration of PA phosphorylation independent from fatty acid patterns. ΔN-DGKk delivery to the brain alleviated PA reduction in Fmr1 KO and lead to a comparable PA level to vehicle injected WT mice (**Fig. 3E**). This is true for all fatty acid PAs with undistinguishable level from control, demonstrating a complete rescue of PA by ΔN-DGKk expression (**Sup Fig. 7E-G**). Low dose delivery of PHP.eB-ΔN-DGKk showed partial correction of total PA level (**Fig. 3E**) that was further confirmed at the single PA level indicating that ΔN-DGKk overexpression is capable to balance the PA with only few neurons transduced (**Sup Fig. 7E-G**). Total DAG level was not significantly found altered in cortex (**Fig. 3F**) and other brain areas tested (**Sup Fig. 7 C,D**), and at level of individual DAG species (**Sup Fig. 7 H-J**). Nine other lipid classes tested did not show significant differences between the groups (**Sup Fig. 7K**) indicating that ΔN-DGKk expression effect is restricted to the correction of DAG/PA balance.

**AAVrh10-ΔN-DGKk achieves long-term rescue of *Fmr1*-KO behavioral defects.**

Four weeks after injections, a battery of behavioral tests was performed on the AAV injected *Fmr1*-KO mice and their vehicle injected WT or *Fmr1*-KO littermate controls (**Sup table 1**). Vehicle injected *Fmr1*-KO mice showed a two-fold increase of time spent in open arms of the elevated plus maze (EPM) compared to the WT-vehicle mice, suggesting a decreased anxiety induced by the phenotype, while AAVrh10-ΔN-DGKk treated mice showed no difference compared to WT-vehicle mice (**Fig. 4A**). A similar phenotype was observed in the open field arena of novel object recognition test (NOR) where vehicle injected *Fmr1*-KO mice showed an increase of time spent in center of the arena while AAVrh10-ΔN-DGKk treated mice was not different from WT-vehicle (**Fig. 4B**).

Vehicle injected *Fmr1*-KO mice showed increased locomotor activity compared to WT-vehicle mice. This phenotype was seen in the EPM test (**Fig. 4A**, number of entries in open and closed arms), in the open field arena of NOR (**Fig. 4B**, distance travelled in habituation, acquisition and retention phases) and in the habituation phase of three-chambers social recognition test (**Fig. 4D**, number of entries) and was in all cases corrected with AAVrh10-ΔN-DGKk treatment. Signs of hyperactivity of *Fmr1*-KO mice were also seen in the first hour of light and dark phases of actimetry test (**Sup Fig. 4AB**), suggesting this phenotype is related to novelty of environment. AAVrh10-ΔN-DGKk treated mice did not show this phenotype. No difference in recognition index was observed in the NOR test (**Fig. 4B**). Use of a different design for NOR test with smaller size arena enabled to ameliorate recognition index of objects (**Sup Fig. 4D**), but no difference was observed between the genotypes, suggesting an apparent lack of significant memory impairment of the *Fmr1*-KO mice (in this new design the hyperlocomotor activity phenotype was not visible, potentially because smaller size arena was less anxiogenic). Vehicle injected *Fmr1*-KO mice showed about a two-fold increased number of diggings compared to the WT-vehicle mice (**Fig. 4C**), a phenotype evoking hyperactivity and/or

stereotypies. AAVrh10-ΔN-DGKk treated mice showed also an increased number of diggings but with a trend toward a reduction compared to *Fmr1*-KO vehicle. *Fmr1*-KO vehicle showed a trend to bury more marbles and to spent less time in grooming but this was not significant (**Sup Fig. 4E**) and ΔN-DGKk treatment seemed to counteract these effects but the high variability of these phenotypes between mice prevented from drawing conclusion.

Vehicle injected *Fmr1*-KO mice showed an increased number of entries in the three-chambers social recognition test and this phenotype was corrected with AAVrh10-ΔN-DGKk (**Fig. 4D, Sup Fig. 4F**). For social preference over object, no difference was observed between genotype groups (**Fig. 4D, Sup Fig. 4F**) indicating there was no significant effect of mutation or treatment on social preference. In the social memory test, *Fmr1*-KO mice showed failure to recognize previously seen mice, while *Fmr1*-KO treated mice have recovered this ability.

Vehicle injected *Fmr1*-KO mice showed also a reduced ability to build a nest after 5 and 24h. AAVrh10-ΔN-DGKk treated mice did not show this phenotype (**Sup Fig. 4G**).

All these phenotypes were similar in animals tested 8 weeks after treatment (**Sup Fig. 5A-E**), indicating a stability of the phenotypes and of the effect of treatment. Accordingly, no significant variations of ΔN-DGKk protein level was observed between 8 and 12 weeks after AAV injection (corresponding respectively to animal groups phenotyped at 4 and 8 weeks) (**Sup Fig. 3AB**). *Fmr1*-KO-vehicle mice tested at 8 weeks showed reduced recognition index in NOR test compared to WT-vehicle and *Fmr1*-KO-Rh10-ΔN-DGKk (**Sup Fig. 5D**) but within a smaller test arena where *Fmr1*-KO-vehicle mice exhibit less hyperactivity (**Sup Fig. 5E**) all groups performed equally, suggesting that the memory performance alteration of *Fmr1*-KO might be caused by hyperactivity.

In animal groups phenotyped at 8 weeks after injection (13-week-old), an increase of body weight was observed in *Fmr1*-KO-vehicle group compared to WT-vehicle and *Fmr1*-KO-

Rh10-ΔN-DGKk (**Sup Fig. 5F**). WT-vehicle and *Fmr1*-KO-Rh10-ΔN-DGKk showed no weight difference, suggesting the treatment prevented this phenotype.

*Fmr1*-KO-vehicle phenotypes were reproduced in the mice injected retro-orbitally with PHP.eB-ΔN-DGKk (**Sup Fig. 6AF**). But unlike the mice which received AAVrh10-ΔN-DGKk, *Fmr1*-KO-PHP.eB-ΔN-DGKk mice did not show any improvement compared to *Fmr1*-KO-vehicle, suggesting that the level of ΔN-DGKk although well distributed throughout the brain was too low to achieve sufficient effect.

**Discussion**

FXS is currently uncured as no treatment could be validated despite several unfruitful clinical trials (Yamasue et al., 2019). Our data provide evidence that re-expression of DGKk enzyme with an AAV-based gene therapy approach is able to provide long-term correction of the main behavioral deficits in the young adult *Fmr1*-KO mouse model of FXS.

DGKk is an enzyme which was previously found as a main mRNA target of FMRP in cortical neurons (Tabet et al., 2016a). We show that DGKk expression is severely altered in FXS brain and demonstrate this expression is strongly depending on FMRP requirement. In fact, no other protein has been demonstrated to be so critically depending upon FMRP. Loss of DGKk activity could play a critical role in manifestation of FXS phenotypes because it is a master regulator of second messenger lipids DAG/PA balance and has potential to be the triggering cause of the many altered neuronal signaling pathways observed in FXS (Tabet et al., 2016b). Removal of N-terminal part of DGKk does not impact DGKk activity in vitro (Imai et al., 2005) while it abolishes FMRP requirement. The FMRP-independent ΔN-DGKk protein conserved its ability to modulate cell signaling and showed capacity to rescue a fully developed *Fmr1*-KO mouse. While no impact on animal survival was observed and no acute toxicity was observed with high ΔN-DGKk expression in neuron cultures and no neuronal loss was observed after several weeks

of expression in vivo, a sufficient dose appears however needed to achieve a corrective effect since low brain transduction efficiency, such as with AAVPHP.eB vector, was not able to provide rescue despite a homogenous brain expression. Rescuing *Fmr1*-KO mouse with AAV-based FMRP administration at P0 early stage has provided first proof of concept of gene therapy approach for FXS (Gholizadeh et al., 2014; Hampson et al., 2019), but also has drawn attention on the fact that inappropriate level of FMRP expression can worsened FXS phenotypes, possibly due to the fact that FMRP, like most RNA binding proteins, leads to cellular stress when overexpressed (Mazroui et al., 2002). Overall, rescue of *Fmr1*-KO phenotypes with ΔN-DGKk expression in neurons strengthened the idea that DAG/PA imbalance in neurons is a critical factor of the disease and acting on this imbalance is beneficial for FXS-like condition, including at a late stage of development. Use of ΔN-DGKk could offer interesting potential for FXS gene therapy, representing a very specific target in the complex pathomechanism of the disease.

## References

Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium (1994). Cell *78*, 23-33.

Bear, M.F., Huber, K.M., and Warren, S.T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. Trends Neurosci *27*, 370-377.

Chan, K.Y., Jang, M.J., Yoo, B.B., Greenbaum, A., Ravi, N., Wu, W.L., Sanchez-Guardado, L., Lois, C., Mazmanian, S.K., Deverman, B.E.*, et al.* (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. Nat Neurosci *20*, 1172-1179.

Dolen, G., Osterweil, E., Rao, B.S., Smith, G.B., Auerbach, B.D., Chattarji, S., and Bear, M.F. (2007). Correction of fragile X syndrome in mice. Neuron *56*, 955-962.

Gantois, I., Khoutorsky, A., Popic, J., Aguilar-Valles, A., Freemantle, E., Cao, R., Sharma, V., Pooters, T., Nagpal, A., Skalecka, A.*, et al.* (2017). Metformin ameliorates core deficits in a mouse model of fragile X syndrome. Nat Med *23*, 674-677.

Gaskill, B.N., Karas, A.Z., Garner, J.P., and Pritchett-Corning, K.R. (2013). Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. J Vis Exp, 51012.

Gholizadeh, S., Arsenault, J., Xuan, I.C., Pacey, L.K., and Hampson, D.R. (2014). Reduced phenotypic severity following adeno-associated virus-mediated Fmr1 gene delivery in fragile X mice. Neuropsychopharmacology *39*, 3100-3111.

Gkogkas, C.G., Khoutorsky, A., Cao, R., Jafarnejad, S.M., Prager-Khoutorsky, M., Giannakas, N., Kaminari, A., Fragkouli, A., Nader, K., Price, T.J.*, et al.* (2014). Pharmacogenetic inhibition of

eIF4E-dependent Mmp9 mRNA translation reverses fragile X syndrome-like phenotypes. Cell Rep *9*, 1742-1755.

Gross, C., Chang, C.W., Kelly, S.M., Bhattacharya, A., McBride, S.M., Danielson, S.W., Jiang, M.Q., Chan, C.B., Ye, K., Gibson, J.R.*, et al.* (2015). Increased expression of the PI3K enhancer PIKE mediates deficits in synaptic plasticity and behavior in fragile X syndrome. Cell Rep *11*, 727-736.

Guo, W., Murthy, A.C., Zhang, L., Johnson, E.B., Schaller, E.G., Allan, A.M., and Zhao, X. (2012). Inhibition of GSK3beta improves hippocampus-dependent learning and rescues neurogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. Hum Mol Genet *21*, 681-691.

Hagerman, R.J., Berry-Kravis, E., Hazlett, H.C., Bailey, D.B., Jr., Moine, H., Kooy, R.F., Tassone, F., Gantois, I., Sonenberg, N., Mandel, J.L.*, et al.* (2017). Fragile X syndrome. Nat Rev Dis Primers *3*, 17065.

Hampson, D.R., Hooper, A.W.M., and Niibori, Y. (2019). The Application of Adeno-Associated Viral Vector Gene Therapy to the Treatment of Fragile X Syndrome. Brain Sci *9*.

Herzog, R., Schwudke, D., Schuhmann, K., Sampaio, J.L., Bornstein, S.R., Schroeder, M., and Shevchenko, A. (2011). A novel informatics concept for high-throughput shotgun lipidomics based on the molecular fragmentation query language. Genome Biol *12*, R8.

Imai, S., Kai, M., Yasuda, S., Kanoh, H., and Sakane, F. (2005). Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGK kappa. J Biol Chem *280*, 39870-39881.

Jiang, Y., Sakane, F., Kanoh, H., and Walsh, J.P. (2000). Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. Biochem Pharmacol *59*, 763-772.

Kaufmann, W.E., Cortell, R., Kau, A.S., Bukelis, I., Tierney, E., Gray, R.M., Cox, C., Capone, G.T., and Stanard, P. (2004). Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. Am J Med Genet A *129A*, 225-234.

Mazroui, R., Huot, M.E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y., and Khandjian, E.W. (2002). Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. Hum Mol Genet *11*, 3007-3017.

Mientjes, E.J., Nieuwenhuizen, I., Kirkpatrick, L., Zu, T., Hoogeveen-Westerveld, M., Severijnen, L., Rife, M., Willemsen, R., Nelson, D.L., and Oostra, B.A. (2006). The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. Neurobiol Dis *21*, 549-555.

Pasciuto, E., Ahmed, T., Wahle, T., Gardoni, F., D'Andrea, L., Pacini, L., Jacquemont, S., Tassone, F., Balschun, D., Dotti, C.G.*, et al.* (2015). Dysregulated ADAM10-Mediated Processing of APP during a Critical Time Window Leads to Synaptic Deficits in Fragile X Syndrome. Neuron *87*, 382-398.

Qin, M., Kang, J., Burlin, T.V., Jiang, C., and Smith, C.B. (2005). Postadolescent changes in regional cerebral protein synthesis: an in vivo study in the FMR1 null mouse. J Neurosci *25*, 5087-5095.

Sampaio, J.L., Gerl, M.J., Klose, C., Ejsing, C.S., Beug, H., Simons, K., and Shevchenko, A. (2011). Membrane lipidome of an epithelial cell line. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 1903-1907.

Sidhu, H., Dansie, L.E., Hickmott, P.W., Ethell, D.W., and Ethell, I.M. (2014). Genetic removal of matrix metalloproteinase 9 rescues the symptoms of fragile X syndrome in a mouse model. J Neurosci *34*, 9867-9879.

Sonenberg, N. (1994). Regulation of translation and cell growth by eIF-4E. Biochimie *76*, 839-846.
Tabet, R., Moutin, E., Becker, J.A., Heintz, D., Fouillen, L., Flatter, E., Krezel, W., Alunni, V., Koebel, P., Dembele, D*., et al.* (2016a). Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A *113*, E3619-3628.
Tabet, R., Vitale, N., and Moine, H. (2016b). Fragile X syndrome: Are signaling lipids the missing culprits? Biochimie.
Wang, X., Flynn, A., Waskiewicz, A.J., Webb, B.L., Vries, R.G., Baines, I.A., Cooper, J.A., and Proud, C.G. (1998). The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. J Biol Chem *273*, 9373-9377.
Westmark, C.J., Westmark, P.R., O'Riordan, K.J., Ray, B.C., Hervey, C.M., Salamat, M.S., Abozeid, S.H., Stein, K.M., Stodola, L.A., Tranfaglia, M*., et al.* (2011). Reversal of fragile X phenotypes by manipulation of AbetaPP/Abeta levels in Fmr1KO mice. PLoS One *6*, e26549.
Yamasue, H., Aran, A., and Berry-Kravis, E. (2019). Emerging pharmacological therapies in fragile X syndrome and autism. Curr Opin Neurol *32*, 635-640.
Zolotukhin, S., Potter, M., Zolotukhin, I., Sakai, Y., Loiler, S., Fraites, T.J., Jr., Chiodo, V.A., Phillipsberg, T., Muzyczka, N., Hauswirth, W.W*., et al.* (2002). Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. Methods *28*, 158-167.

## Material and methods

**Ethics statement.** Animal work involved in this study was conducted according to relevant national Comité National de Réflexion Ethique en Expérimentation Animale and international guidelines (86/609/CEE).

**Cloning of human and mouse DGKκ mRNA**. Mouse DGKκ was subcloned from clone IMAGE IRAVp968H03163D. The missing 3′ UTR and 5′ UTR-N-ter region were cloned by PCR from mouse genomic DNA with primer sets (GCAGCTAGCTCCTTGAAAGCTGGAAGGAGA and AATAGAATGCGGCC-GCCAGCTTCAACAGCACTTGTAG) and (CCAgtcgacTTAGACCTCAGAGCTGCGCTAGC and CCAgctagcCCAGGACTCTGGGGCCCTCTCCAT), respectively. The 3' UTR region was introduced at XbaI and NotI sites of the pYX-ΔN DGKκ vector to give pYX-ΔN-DGKκ-3'UTR, and the 5'-UTR-Nter region at SalI-NheI sites of the pYX-DGKκ-3'UTR, NheI site was subsequently deleted by PCR mutagenesis. pCI-mDGKκ-HA and pCI-HA-ΔN-DGKκ were obtained by PCR subcloning into pCI vector (GenBank U47119) with addition of the HA sequence before the STOP codon or after ATG, respectively. Human hDGKκ was subcloned from plasmid pAcGFPC1humDGKk (Imai et al., 2005) into Nhe1 of pCI vector with addition of 5' and 3'UTRs by PCR cloning to produce pCI-hDGKκ.

**AAV ΔN-DGKk vectors construction and preparation.** ΔN-DGKk HA-tagged DGKκ was cloned under the control of the hSynapsin promoter replacing EGFP in the control plasmid pENN.AAV.hSynapsin.EGFP.RBG (provided by the Penn Vector Core at University of Pennsylvania, Philadelphia) to give pAAV-ΔN-DGKk. Recombinant adeno-associated virus

serotype 9 (AAV9), Rh10 (AAVrh10), PHP.eB (AAVPHP.eB) production was carried out by using the AAV Helper-Free system (Agilent Technologies) with some modifications. AAV vectors were generated by triple transfection of 293T/17 cell line using Polyethylenimine (PEI) and plasmids pAAV-hsynapsin-HA-ΔN-DGKκ or pENN.AAV.hSynapsin.EGFP.RBG together with pHelper (Agilent) and pAAV2/9 or pAAV2/Rh10 (provided by J.Wilson and J.Johnston at Penn Vector Core), or pUCmini-iCAP-PHP.eB (provided by V.Gradinaru and J.Johnston) for serotypes 9, rh10 and PHP.eB, respectively. Two days after transfection, cells were collected, lysed by three freeze/thaw cycles in dry ice-ethanol and 37 °C baths, further treated with 100 U/mL Benzonase (Novagen) for 30 min at 37 °C, and clarified by centrifugation at 3,000 x g for 15min. Viral vectors were purified by iodixanol (Optiprep, Axis Shield) gradient ultracentrifugation followed by dialysis and concentration against PBS containing 0.5 mM $MgCl_2$ using centrifugal filters (Amicon Ultra-15.100 K) and filtered through 0.22u (Zolotukhin et al., 2002). Viral particles were quantified by real-time PCR Q- PCR using LightCycler480 SYBR Green I Master (Roche) and primers targeting the flanking sequence of ITR2 (GTAGATAAGTAGCATGGC and CTCCATCACTAGGGGTTCCTTG) or the flanking sequence of rabbit β-globin polyadenylation signal (CCCTTGAGCATCTGACTTCTGG and AGGGTAATGGGTATTATGGGTGGT). To achieve comparable working concentrations, viruses were diluted to a final concentration of $1x\ 10^{13}$ viral genome per ml (VG/ml) and stored at −80°C until use.

**Cell culture and transfections.** COS-1 cells were grown in DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS and 1 g/L glucose in the presence of antibiotics at 37 °C in 5% CO2. The day before transfection, $4x10^4$ cells were plated into 24-well format plates in 500 µL of antibiotic-free medium. Transfections of plasmids were performed in triplicate with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as directed by the manufacturer with 10 pmol of siRNA (Control or On Target plus

Smart Pool mouse *FMR1*; Thermo Fisher Scientific) in a final volume of 600 µL. Twenty-four hours later, 300 ng of the reporter pCI-DGKκ-HA or pCI-HA-ΔN-DGKκ and 10 nM shRNA were cotransfected as above. Twenty-four hours later, cells washed twice in PBS were lysed directly in the loading buffer [100 mM Tris·HCl, pH 6.8, 4% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 1.4M β-mercaptoethanol, and bromophenol blue] for 3 min at 95 °C.

**Primary cortical neuron cultures and treatments.** Neuron cultures were performed as described in (Tabet et al. 2016). Briefly, cortices from C57BL/6J *Fmr1*+/y or *Fmr1*−/y mouse embryos (embryonic day E17.5) were dissected in 1xPBS, 2.56 mg/mL D-glucose, 3 mg/mL BSA, and 1.16 mM MgSO4, incubated for 20 min with 0.25 mg/mL trypsin and 0.08 mg/mL DNase I, and mechanically dissociated after supplementation of medium with 0.5 mg/mL trypsin soybean inhibitor, 0.08 mg of DNase I and 1.5 mM $MgSO_4$. The cells were plated on poly-L-lysine hydrobromide-coated six-well culture plates for 8 days in Neurobasal Medium (GIBCO) supplemented with B27, penicillin/streptomycin, and 0.5 µM L-glutamine. Where indicated, cultures were treated with addition of puromycin solution at the indicated concentrations and times. DGK inhibitors R59022 (DGK Inhibitor I; Calbiochem) and R59949 (DGK Inhibitor II; Calbiochem) were applied at concentrations of 3 and 0.2 µM each for 15 min at 37 °C. After treatment, cells were immediately washed with ice-cold PBS and lysed in 4X Laemmli buffer.

**Western blot analyses.** Immunoblotting was performed as described previously (Tabet et al., 2016a). Proteins (equivalent to 15 µg) were denatured 5 min at 95°C and resolved by 10% SDS-PAGE. Separated proteins were transferred onto PVDF Immobilon P membrane (Millipore) using a Mini Trans-Blot (Biorad) cell. Membranes were blocked for 1h with TBS-T 1X (Tris-Buffer Saline, pH 7.4 and 0.1% Tween-20 v/v) containing 5% (w/v) BSA or 5% nonfat dry

milk. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS-T buffer containing 5% w/v BSA or milk as follows: mouse anti-FMRP (1C3, 1:10,000, IGBMC), purified mouse anti-HA.11 16B12 (1:5000, Biolegend), rabbit anti-hDGKk (1:1000, PA5-25046, ThermoFisher), anti-p-EIF4e Ser209 (1:1000, #9741 Cell Signaling), anti-EIF4 (1:1000 BSA, #9742, Cell Signaling), anti-puromycin (12D10, 1:2000, Sigma-Aldrich), anti-S6 (5G10, 1:1000 #2217S, Cell Signaling), anti-p-S6 (Ser235/236, 1:1000, 2211S Cell Signaling), anti-GAPDH (MAB374, 1:10.000, Merck) was used as an internal standard. Membranes were washed in TBS-T buffer and then incubated for an hour at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated pre-adsorbed secondary antibody (1:5000, blocking solution corresponding, Molecular Probes). Membranes were washed in TBS-T buffer and immunoreactive bands were visualized with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Immunoblot pictures were acquired using LAS600 GE Amersham and density of the resulting bands was quantified using ImageJ and statistical significance assessed using repeated measures analysis of variance (ANOVA) with Fisher's post hoc comparisons.

**Analysis of cortical neuron cultures by immunofluorescence microscopy.** Primary cortical neurons grown on poly-L-lysine hydrobromide coated glass coverslips were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in 1xPBS at room temperature (RT) for 20 min, permeabilized with 1X PBS and 0.2% Triton X-100 for 10 min at RT, and blocked for 1 h in 1x PBS and 0.1% Triton X-100 with 5% (w/v) BSA. Neurons were incubated with primary antibodies rabbit anti-MAP2 AB5622 (1:500, Merck Millipore), mouse anti-HA.11 16B12 (1:500, Biolegend), mouse anti-NeuN (1:500, MAB377 Merck), rabbit anti-GFAP (1:500, 173002, Synaptic system), overnight at 4 °C. After three washes in 1X PBS and 0.1% Triton X-100 for 10 min, neurons were incubated with secondary goat antibody anti-rabbit (Alexa Fluor 594, 1:1.000, Invitrogen) and anti-mouse (Alexa Fluor 488, 1:1000, Invitrogen), for 1h at RT, and subsequently washed

three times in 1xPBS and 0.1% Triton X-100 for 10 min. Coverslips were mounted with antifading medium (Vectashield, Vector) with DAPI and analyzed by fluorescence microscopy. Images were acquired with CellInsight CX7 (Thermo Scientific) using a 10x objective and analyzed with HCS Studio Cell Analysis Software (nuclear segmentation, NeuN and GFAP intensities). Quantification of positive cells for each of these staining was done by applying a threshold manually, based on nuclear segmentation and across 81 fields. Percentage of cells positive for NeuN and GFAP staining was quantified for each well.

**Caspase 3/7 activity detection.** Caspase 3/7 positives cells were determined with CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent following manufacturer instructions. Briefly, primary neurons were pepared as for LDH assays, treated with reagent diluted at 8 µM in 5% FBS NBM. Positive control wells were treated with apoptotic inducer staurosporine at 0.1 and 1uM for 6 hours. Cells were fixed with were fixed in 4% (w/v) PFA and nuclei were counterstained with DAPI. Images were acquired with CellInsight CX7 (Thermo Scientific) using a 10x objective and analyzed with HCS Studio Cell Analysis Software (nuclear segmentation and casp3/7 intensities). Quantification of percentage of caspase-3/7 positive cells was done for each well by applying a threshold manually, based on nuclear segmentation and across 81 fields.

**Lactate dehydrogenase releasing assay.** Lactate dehydrogenase (LDH) release was determined with the Cytotoxicity Detection KitPLUS kit (Roche) following manufacturer instructions. Briefly, primary neurons from $Fmr1^{+/y}$ or $Fmr1^{-/y}$ E17.5 embryos plated at 300,000 cells/well in 24-well plate and transduced at 7 DIV with indicated AAV were tested after 7 days. LDH release was measured in microplate reader at 490 nm after 2 hours at 37°C with reaction medium. Maximum LDH release was measured in same conditions after 30min

at RT with stop solution. The % of cell death was determined using the formula: % cell death = experimental LDH release /maximum LDH release.

**Animal housing.** At weaning age (4 weeks), animals were grouped by 3 or 4 individuals from same age and genotype in individually ventilated cages (GM500, Tecniplast, UK), with poplar shaving bedding (Lignocell Select, JRS, Germany), and maintained under standard conditions, on a 12-h light/dark cycle (7h/19h), with standard diet food (standard diet D04, Scientific Animal Food and Engineering, France) and water available ad libitum. Mice from a same cage received the same treatment and were transferred in the animal facility of the phenotyping area the next week.

**Stereotaxic Surgery and AAV Injections**. Five-week old mice C57BL/6J *Fmr1*-/y or C57BL/6J *Fmr1*+/y littermates were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (Virbac/Bayer, 100/10 mg/kg, 13 mL/kg, intraperitoneal) dissolved in sterile isotonic saline (NaCl 0.9%) and mounted onto a stereotaxic frame (World Precision Instruments). AAVRh10-DGKκ were injected bilaterally into the striatum (coordinates relative to bregma: anterior-posterior + 0.5 mm; lateral = ±2.2 mm; vertical −3.5 mm) and hippocampus (coordinates relative to bregma: anterior-posterior - 1.7 mm; lateral = ±1.5 mm; vertical −2.0 mm) according to the mouse brain atlas (Paxinos G, Franklin KBJ (2001)). A volume of 2.5 µL of AAV vector (corresponding to 10$^{e}$11 Genome copies) or saline solution was delivered bilaterally per site of injection with a slow injection rate (0.2 µL/min) through a 32-gauge small hub removable needle mounted on a 10 µL Hamilton syringe connected to a micropump (World Precision Instruments). After each injection was completed, the injector was left in place for an additional 2 min to ensure optimal diffusion and minimize backflow while withdrawing the injector.

**Retroorbital AAV Injections.** Five-week old mice C57BL/6J *Fmr1*-/y or C57BL/6J *Fmr1*+/y littermates were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (Virbac/Bayer, 100/10 mg/kg, 10 mL/kg, intraperitoneal) dissolved in sterile isotonic saline (NaCl 0.9%). AAVPHP.eB-DGKκ were injected retroorbitaly with a volume of 80 µL.

**Analysis of ΔN-DGKk expression in brain sections.** Freshly dissected brains were fixed overnight in PFA 4% and stored in PBS1X prior being processed following Neuroscience Associates procedure https://www.neuroscienceassociates.com/technologies/multibrain/. Half-brains were washed in PBS1X solution and embedded in gelatin matrix. MultiBrain® cryosections were prepared with 30µ thickness for free-floating immunolabeling with anti-HA (3F10, 1:150, Sigma) and counter stained with hematoxylin/eosin. Adjacent sections were immunolabelled with anti-NeuN (1:150, MAB377 Merck).

**Behavioral Experiments**. Behavioral experiments were conducted 4 weeks or 8 weeks after AAV injections to allow sufficient time for viral transduction and DGKκ expression. Effective gene expression was assessed by q-PCR to measure viral titer, by western blot and by immuno-histochemistry in 3 different brain areas (cortex, hippocampus and rest of brain). Phenotyping pipeline is described in table 1.

**Circadian Activity.** Spontaneous locomotor activity and rears are measured using individual cages (20 x 10 x 8 cm) equipped with infra-red captors. The quantity of water and food consumed is measured during the test period using automated pellet feeder and lickometer (Imetronic, Pessac, France). Mice are tested for 32 hours in order to measure habituation to the apparatus as well as nocturnal and diurnal activities. Results are expressed per 1 h periods and/or as a total of the different activities.

**Elevated plus maze.** The apparatus used is completely automated and made of PVC (Imetronic, Pessac, France). It consists of two open arms (30 X 5 cm) opposite one to the other and crossed by two enclosed arms (30 x 5 x 15 cm). The apparatus is equipped with infrared captors allowing the detection of the mouse in the enclosed arms and different areas of the open arms. Mice were tested for 5 min during which the number of entries into and time spent in the open arms were measured and used as an index of anxiety. Closed arm entries and total arm entries were used as measures of general motor activity.

**Novel object recognition task.** Mice were tested in a circular arena (50cm diameter and 30cm height basin). The locomotor activity was recorded with the EthoVision XT video tracking system (Noldus, Wageningen, Netherlands). The arena was virtually divided into central and peripheral regions and homogeneously illuminated at 40 Lux. Animals were first habituated to the arena for 15 min. Each mouse was placed in the periphery of the arena and allowed to explore freely the apparatus, with the experimenter out of the animal's sight. The distance traveled and time spent in the central and peripheral regions were recorded over the test session. The percentage of time spent in center area was used as index of emotionality/anxiety. The next day, mice were tested for object recognition in the same arena. They were submitted to a 10-minutes acquisition trial during which they were placed in the arena in presence of a sample objects (A and A') (2.5 cm diameter marble or 2 cm edge plastic dice). The time the animal took to explore the samples (sniffing) was manually recorded. A 10-minutes retention trial was performed 24 h later. During this trial, one of the samples A and another object B (marble or dice depending on acquisition) were placed in the open-field, and the times tA and tB the animal took to explore the two objects were recorded. A recognition index (RI) was defined as (tB / (tA + tB)) x100.

**Nest building.** On the day of test, mice were singly transferred in a standard cage for the duration of nest building measurement. A block of nesting material (5x5cm hemp square, Happi Mats, Utopia) was placed in the cage. Pictures were taken and visual scoring occurred at 2, 5, 24 h without disturbing the animals. The room temperature was noted when the nest was scored, since nest building has a thermoregulatory function and therefore may be influenced by ambient temperatures. We used a 0-5 scale described by (Gaskill et al., 2013) : 0 = undisturbed nesting material; 1 = disturbed nesting material but no nest site; 2 = a flat nest without walls; 3 = a cup nest with a wall less than ½ the height of a dome that would cover a mouse; 4 = an incomplete dome with a wall ½ the height of a dome; 5 = a complete dome with walls taller than ½ the height of a dome, which may or may not fully enclose the nest.

**Social recognition test.** Social recognition test evaluates the preference of a mouse for a congener as compared to an object placed in an opposite compartment. This test is also used for evaluation of social memory by measuring exploration of a novel congener as compared to a familiar one. Social behavior is altered in several diseases such as autism and mental retardation. The apparatus is a transparent cage composed with a central starting compartment and 2 side compartments where circular grid cup (goal box) is placed at each extremity, and where the congener can be placed during testing. Testing was performed for 2 consecutive days. On the first day, the mouse was placed in central box then allowed to explore freely the apparatus for 10 min in order to attenuate their emotionality. On the second day, a C57Bl/6 congener from the same sex was placed in one goal box and an object was placed in the opposite one. The mouse was then placed in the starting central compartment and allowed to explore freely the apparatus for 10 min. The position of the congener and object boxes was counterbalanced to avoid any potential spatial preference. The duration of exploration of each goal box (when the mouse is sniffing the grid delimiting the goal box) was manually measured

and the percentage of time the mouse took to explore the congener was used as index of social preference (recognition preference). A 10min retention trial was then performed during which the object was replaced by a novel congener. The duration of exploration of each goal box was manually measured and the percentage of time the mouse takes to explore the congener was used as index of social memory. The social preference index (SR) is defined as (time Congener / (time Object + time Congener)) x100; and the social memory index as (time novel Congener / (familiar congener + time novel Congener)) x100.

**Lipidomic analyzes.** Nitrogen frozen brain samples (cortex, hippocampus, rest) were let defreeze in ice and mechanichally homogenized with 1 vol $H_20$ with Precellys 24 system during 2x15sec at 4°C and 5300 rpm. Protein concentration of sample was adjusted at 5 mg/ml concentration and lipids were analyzed on Lipotype GmbH platform. Lipids were extracted using chloroform and methanol (Sampaio et al., 2011) with Hamilton Robotics STARlet. Samples were spiked with lipid class-specific internal standards prior to extraction. After drying and resuspending in MS acquisition mixture, lipid extracts were subjected to mass spectrometric analysis. Mass spectra were acquired on a hybrid quadrupole/Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific Q-Exactive) equipped with an automated nano-flow electrospray ion source in both positive and negative ion mode. Lipid identification using LipotypeXplorer (Herzog et al., 2011) was performed on unprocessed (*.raw format) mass spectra. For MS-only mode, lipid identification was based on the molecular masses of the intact molecules. MSMS mode included the collision induced fragmentation of lipid molecules and lipid identification was based on both the intact masses and the masses of the fragments. Prior to normalization and further statistical analysis lipid identifications were filtered according to mass accuracy, occupation threshold, noise and background. Intensity of lipid class-specific internal standards was used for lipid quantification. The identified lipid molecules were

quantified by normalization to a lipid class specific internal standard. The amounts in pmol of individual lipid molecules (species of subspecies) of a given lipid class were summed to yield the total amount of the lipid class. The amounts of the lipid classes were normalized to the total lipid amount yielding mol% per total lipids.

**Statistical analyses.** Quantitative data were analyzed using single or repeated measures analysis of variance (ANOVA) and Student Newman Keuls test. For the comparison with chance, one group t-test was used. Qualitative parameters (nesting) were analyzed using $\chi 2$ test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

**Acknowledgements**

We thank Flora Tassone and for materials, Antonina Fedorova, Michael Hocquemiller, Ralph Laufer and other members of Lysogene, Yann Herault, Hélène Puccio, Sirine Souali-crespo, for discussions and suggestions. We are grateful to Tania Sorg-Guss and members of Institut Clinique de la Souris for help with the behavioral studies, Pascale Koebel for AAV preparations, Nadine Banquart-Ott and Chadia Nahy for mice care, Anne Maglott for help with toxicity analyses, Erwan Grandgirard for help with imaging, IGBMC core facilities, Zaiane Schmitt and Fumi Hoshino for technical assistance. We thank Laura Benkemoun and Fondation Maladies Rares for support and suggestions. We are grateful to colleagues of J. Chelly team for discussions. This work was supported by Satt Conectus program GETEX, ANR-18-CE12-0002-01 and Fondation Jérôme Lejeune funding to HM and by Fond Paul Mandel to KH. This study was also supported by ANR-10-LABX-0030-INRT under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

**Author contributions**

K.H., O.C, B.Z., and F.P. designed and performed experiments and helped writing the manuscript. E.F. performed experiments. R.T., J.-L.M. helped designing the experiments and writing manuscript. H.M. supervised the project, designed experiments and wrote the manuscript.

**Figure legends**

**Fig. 1 : DGKk expression is altered in FXS and FMRP is required for translation control via its N-terminal domain. A)** Western blot analysis of lysates from cerebellum from control (n = 3) and FXS patients ‘‘FXS’’ (n = 4). Hela cell extract transfected with pCI-hDGKκ is used as antibody specificity control and size marker. Representative images of immunoblots probed with antibodies against the indicated proteins are shown. GAPDH was the loading control. Quantification of western blots is shown on right. Protein amounts of DGKk are normalized to GAPDH and presented as fold change relative to control. **B)** Schematic map of DGKk constructs used for the transfection experiments and subsequent vector preparations. The different domains of the protein are indicated and represented at scale (repeated EPAPE, Pleckstrin Homology PH domain, phorbol ester/diacyl glycerol binding C1 domain, catalytic split C4 a and b domains, putative PDZ binding motive, HA-tag, grey bars interval 1kB), 5’ and 3’ UTR regions are represented with blue line, 3’UTR not at scale (3.8 kB). **C)** Immunoblots and quantification of lysates from Cos-1 cells transfected with plasmid pCI-mDGKκ-HA or mock transfected (NT) and pre-transfected 24h before with siRNA control (siC) or against FMRP (siFMR1). GAPDH was used as a loading control. For quantification, the DGKk and FMRP signals were normalized against GAPDH signal and is presented relative to the signal for siC treated cells ($n$ = 5 in each group). **D)** Immunoblots and quantification of lysates from Cos-1 cells transfected with plasmid pCI-HA-ΔN-DGKκ or pCI-mDGKκ-HA and

pre-treated with siRNA control (siC) or against FMRP (siFMR1). Quantifications as in C. Each point represents data from an individual culture, and all values are shown as mean ± SEM ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$ calculated by unpaired Student T test.

**Fig. 2 : ΔN-DGKk expression impacts cellular signaling. A)** Immunoblots and quantification of lysates from Cos-1 cells transfected with plasmid pCI-HA-ΔN-DGKκ, untransfected (NT), or plasmid pCI control, with the indicated amount of plasmid (μg) and incubated with puromycin to measure basal rates of protein synthesis. GAPDH was used as a loading control. 0 indicates no puromycin treatment, -/+ indicates treatment without or with DGK inhibitor (DGKi) 3 μM R59022 and 0.2 μM R59949 at 6 μM, 15 min. Densitogram of puromycin incorporation is presented as change relative to mock transfected conditions ($n$ = 3). **B)** Representative immunofluorescence staining of cortical neuron cultures transduced at 8 DIV with 10e9 VG/ml culture volume AAVrh10 GFP or ΔN-DGKk and assessed after 5 days using anti-MAP2 and anti-HA for ΔN-DGKk or direct 488 nm excitation for GFP, Dapi was used to visualize nuclei on merged images. Scale bar, 40 μm. **C)** Representative immunoblots of lysates from cortical neurons transduced with AAVrh10-ΔN-DGKk (AAV ΔN-DGKk), at the indicated titers (VG/ml culture volume) and quantification of phosphorylation and total levels eIF4E. GAPDH was used as a loading control. For quantification, the phospho-protein signal was normalized first against total protein signal and is presented relative to the signal for vehicle-treated cultures Each point represents data from an individual culture, and all values are shown as mean ± SEM *$P < 0.05$ calculated by One way-ANOVA with Tukey's multiple comparison test ($n$ = 3 individual cultures).

**Fig. 3 : ΔN-DGKk expression in vivo with AVV vectors corrects abnormal cortical phosphatidic acid level of Fmr1-KO mice. A)** Scheme of timeline analyses performed. **B)**

Viral titers (viral genome copy VG per cell) determined by qPCR in cortical, hippocampal and rest of brain areas of Fmr1-KO mice treated with saline solution (Vehicle), AAVPHP.eB-ΔN-DGKk (PHP.eB), AAVrh10-ΔN-DGKk (Rh10) 8 weeks after injections. Data are mean ± SEM. Each dot represents an individual mouse. **C)** Immunoblots and quantification of ΔN-DGKk protein in lysates from brain areas of mice treated as in B. GAPDH was used as a loading control. Densitogram of ΔN-DGKk expression is presented as change relative to vehicle conditions. Data are mean ± SEM ($n$ = 5). **D)** Representative coronal brain sections processed for detection of ΔN-DGKk using immunohistochemistry on Fmr1-KO mice treated with indicated treatment, 8 weeks post-injections, counter stained with eosin hematoxylin. Adjacent sections were immunolabelled with NeuN. 3 mice per genotype were processed. The sections shown are between Bregma levels –1.50 mm and –1.80 mm. Scale bar is 2 mm. Magnifications of regions of cortex (c), hippocampus (h), and striatum (s) are shown in side panels, scale bar 200 µm. **E)** Total phosphatidic acid (PA) level measure by mass spectrometry in cortex of WT mice treated with saline solution (WT) and Fmr1-KO mice treated with saline (Fmr1-KO), AAVPHP.eB-ΔN-DGKk (Fmr1-KO + PHP.eB), AAVrh10-ΔN-DGKk (Fmr1-KO + Rh10) 8 weeks after injections. Data are expressed as mean ± SEM of mol % of total lipids and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, **p<0.01, vs WT-S ; # p<0.05, ### p<0.001 vs *Fmr1*-S; n≥8 individual animals. **F)** Total diacylglycerol (DAG) level in cortex measured as in E).

**Fig. 4 : AAVrh10-ΔN-DGKk rescues behavior alterations of *Fmr1*-KO mouse 4 weeks after injections. A)** Elevated Plus Maze. Percentage of time spent in open arms and number of entries in open, closed and total (open+closed) arms. **B)** Novel object recognition. Locomotor activity (distance) in the whole arena and percentage of time spent in the center during 15 min habituation. Locomotor activity during the acquisition and retention trials. Recognition index.

**C)** Stereotypies. Number of digging. **D)** Social recognition. Number of entries in the two side compartments during preference session (left), social preference (percentage of exploration of a congener vs an object) (center) and social memory (percentage of exploration of a novel vs familiar congener) (right). Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test and one group t-test. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs WT-S; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs *Fmr1*-S; @ p<0.05, @@ p<0.01, @@@@ p<0.0001 vs chance (50%).

**Supplementary material**

**Supplementary Fig. 1 : Influence of FMRP protein on human DGKk protein expression and on level of mouse DGKk mRNA. A)** Immunoblots and quantification of lysates from Hela cells transfected with plasmid pCI-hDGKκ encoding human DGKk and pre-transfected 24h before with siRNA control (siC) or against FMRP (siFMR1). GAPDH was used as a loading control. For quantification, DGKk and FMRP signals were normalized against GAPDH signal and is presented relative to the signal for siC treated cells. Each point represents data from an individual culture, and all values are shown as mean ± SEM ***$P < 0.001$, calculated by unpaired Student T test. **B)** Quantification of mouse DGKκ mRNA by qRT-PCR in RNA extracts of Cos-1 cells transfected with plasmid pCI-mDGKκ-HA and pre-transfected with siRNA control (siC) or siRNA against FMRP (siFMR1) or mock transfected (NT). Data are means of fold change ± SEM, determined using ΔΔCt method with Actb as normalizer, n = 3 biological replicates.

**Supplementary Fig. 2 : Phosphorylation of eIF4E is increased in Fmr1-KO cortical neurons compared to WT, and ΔN-DGKk expression in neuron does not lead to toxicity.**

**A)** Representative immunoblots of lysates from WT and Fmr1-KO cortical neurons and quantification of phosphorylation and total levels of eIF4E. GAPDH was used as a loading control. For quantification, the phospho-protein signal was normalized first against total protein signal and is presented relative to the signal for WT culture. Each point represents data from an individual culture, and all values are shown as mean ± SEM $^{**}P < 0.01$ calculated by Student T test ($n = 3$ individual cultures). Quantification of caspase 3/7 activity (**B**), release of lactate dehydogenase (LDH) (**C**), percentage of NeunN (**D**) and GFAP (**E**) positive cells, in WT and Fmr1-KO cortical neurons untreated (NT) or transduced at 8 DIV for 8 DIV with indicated titers of AAV (viral genome copies) AAVrh10-ΔN-DGKk or AAVrh10-FMRP by high throughput cell imaging. Positive control wells were treated with apoptotic inducer staurosporine (STS) at 0.1 and 1uM for 6 hours. Data are mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. * $p<0.05$.

**Supplementary Fig. 3 : ΔN-DGKk expression in vivo with AVV vectors across time. A)** Representative coronal brain sections processed for detection of ΔN-DGKk at 8 and 12 weeks post-injections using immunohistochemistry on Fmr1-KO mice treated with indicated treatment, counter stained with eosin hematoxylin. Three regions a, b, c, are shown with their corresponding position on brain sagital map. Scale bar 2mm. **B)** Viral titer (viral genome copy VG per cell) determined by qPCR in cortical, hippocampal and rest of brain areas of Fmr1-KO mice treated with saline solution (Vehicle), AAVPHP.eB-ΔN-DGKk (PHP.eB), AAVrh10-ΔN-DGKk (Rh10) at 8 and 12 weeks after injections. Data are mean ± SEM. Each dot represents an individual mouse.

**Supplementary Fig. 4 : Behavioral analyses of AAVrh10-ΔN-DGKk treated *Fmr1*-KO mice (4 weeks after injection). A)** Circadian activity (locomotor activity). Evolution of

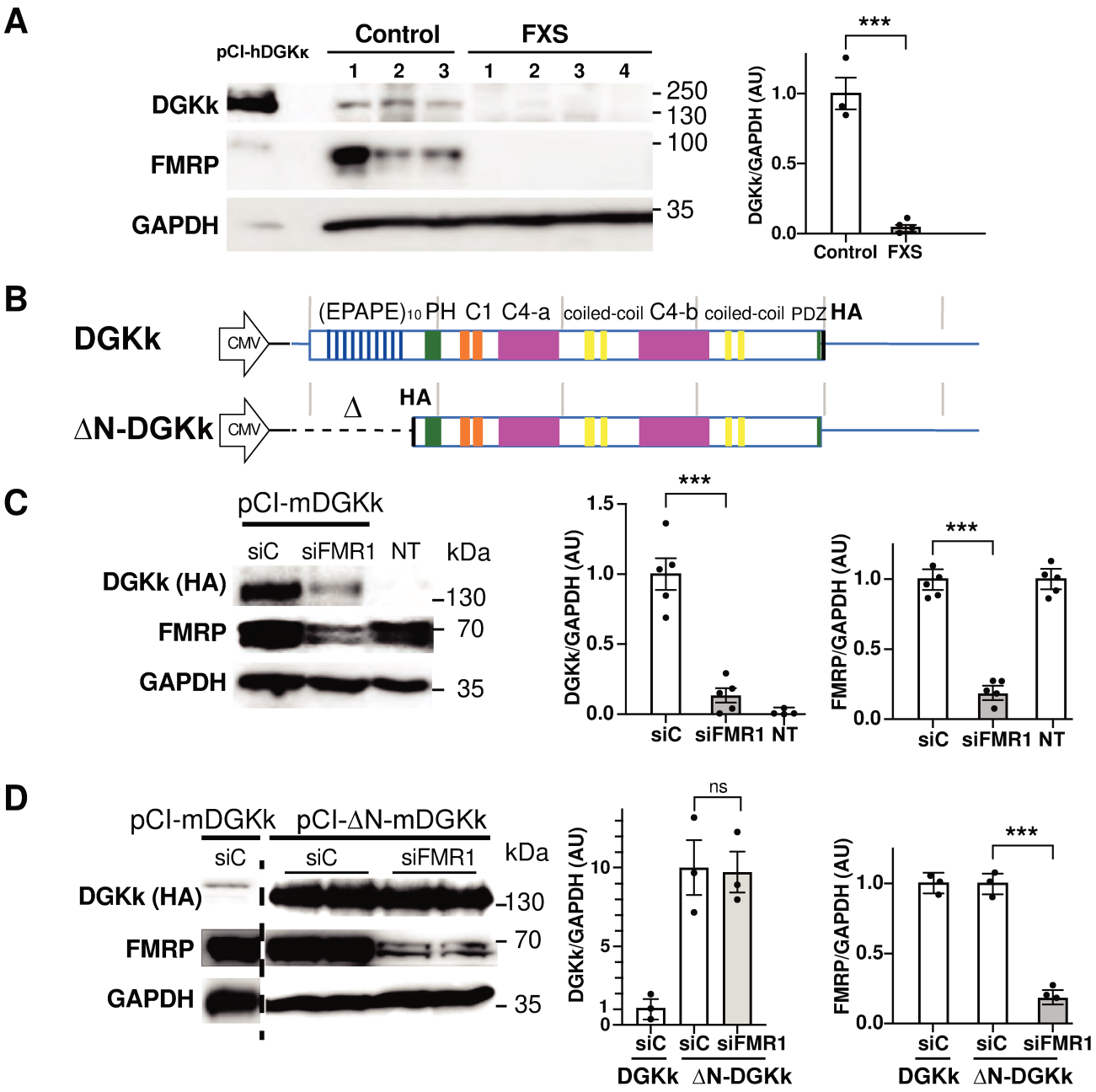
locomotor activity per hour over the 32h testing (upper panel) and total locomotor activity for the habituation, dark and light phases (mid panel) and for the first habituation hour, first dark hour and total duration (lower panel). **B)** Circadian activity (rearing activity). Evolution of rearing activity per hour over the 32h testing (upper panel) and total rearing activity for the habituation, dark and light phases (mid panel) and for the first habituation hour, first dark hour and total duration (lower panel). **C)** Novel object recognition in 50cm diameter arena (30cm height). Duration of objects exploration during the acquisition and retention trials. **D)** Novel object recognition in 30cm diameter arena (30cm height). Locomotor activity (distance) in the whole arena during the 15min habituation, acquisition and retention trials. Duration of objects exploration during the acquisition and retention trials and recognition index. **E)** Marble burying and grooming duration tests. **F)** Social recognition. Number of entries and locomotor activity (total traveled distance in cm) in the two side compartments during habituation (up), social preference (middle) and social memory (bottom) sessions. Social preference was determined as percentage of exploration of a congener vs an object (middle right) and social memory as percentage of exploration of a novel vs familiar congener (bottom right). **G)** Nest building. Scoring of nests at 2, 5 and 24h. 0-5 scale as described by Gaskill et al (2013): 0 = undisturbed nesting material; 1 = disturbed nesting material but no nest site; 2 = a flat nest without walls; 3 = a cup nest with a wall less than ½ the height of a dome that would cover a mouse; 4 = an incomplete dome with a wall ½ the height of a dome; 5 = a complete dome with walls taller than ½ the height of a dome, which may or may not fully enclose the nest. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. * $p<0.05$ vs WT-S; # $p<0.05$ vs *Fmr1*-S; one group t-test. *$p<0.05$ vs WT-S, @@@ $p<0.001$, @@@@ $p<0.0001$ vs chance (50%); and $\chi 2$ test. *$p<0.05$ vs WT-S.

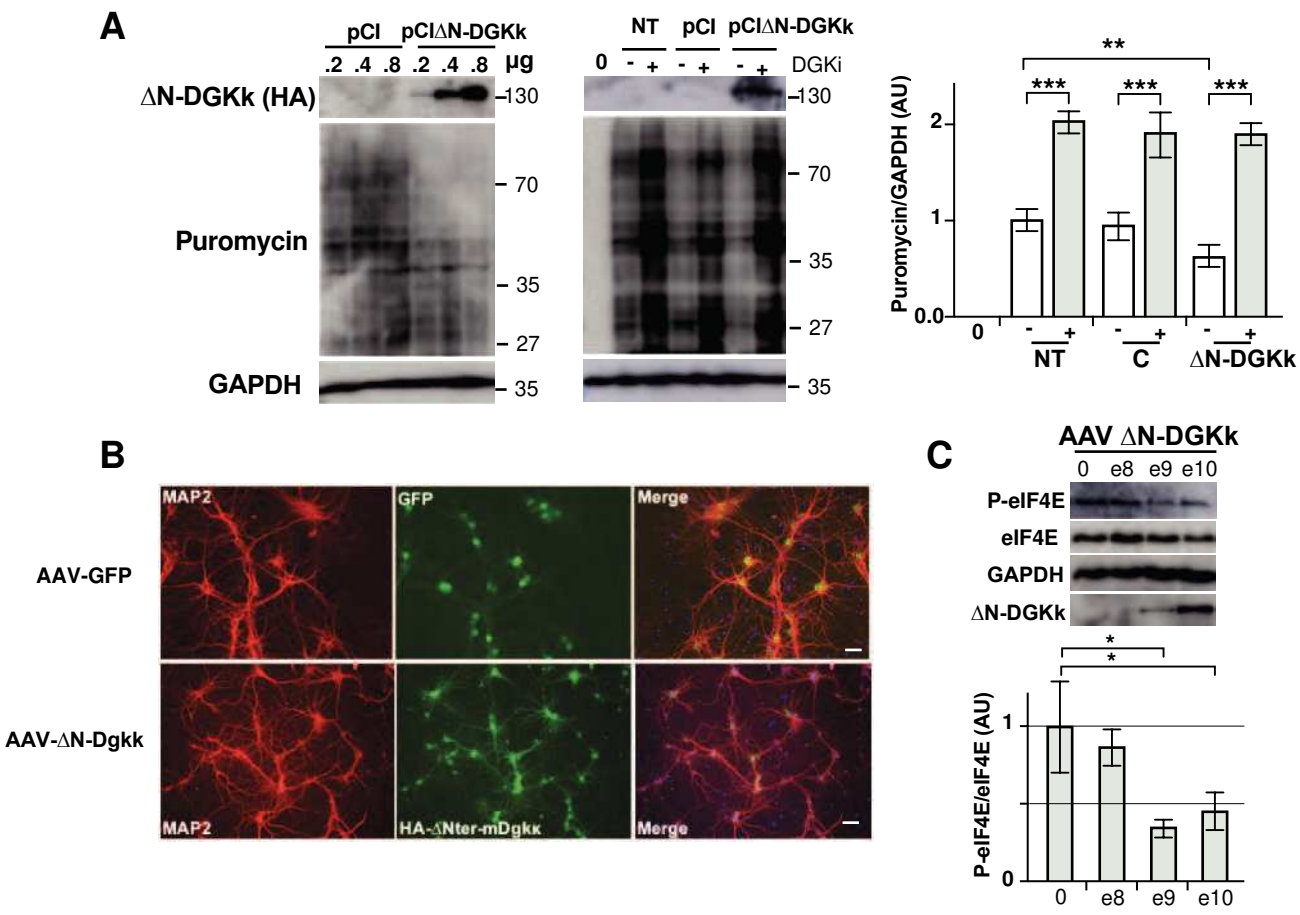
**Supplementary Fig. 5 : Behavioral analyses of AAVrh10-ΔN-DGKk treated *Fmr1*-KO mice (8 weeks after injection).** Circadian activity analysis of locomotor (**A**) and rearing (**B**) activity per hour over the 32h testing (upper panel) and total locomotor and rearing activity for the habituation, dark and light phases (mid panel) and for the first habituation hour, first dark hour and total duration (lower panel). **C**) Elevated Plus Maze. Percentage of time spent in open arms and number of entries in open, closed and total (open+closed) arms. **D**) Novel object recognition in 50cm diameter arena (30cm height). Percentage of time spent in the center during the habituation, locomotor activity (distance) in the whole arena during the habituation, acquisition and retention trials. Duration of objects exploration during the acquisition and retention trials and recognition index. **E)** Novel object recognition in 30cm diameter arena (30cm height). Locomotor activity (distance) in the whole arena during the habituation and retention trials. Duration of objects exploration during the acquisition trials and recognition index. **F**) Body weight of mice. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test and one group t-test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WT-S, # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs *Fmr1*-S, @p<0.05, @@p<0.01, @@@ p<0.001 vs chance (50%).

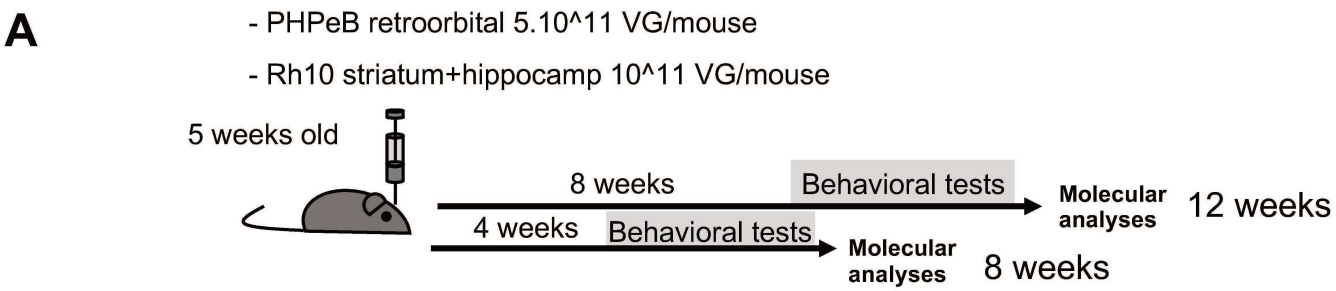
**Supplementary Fig. 6 : Behavioral analyses of AAVPHP.eB-ΔN-DGKk treated *Fmr1*-KO mice (4 weeks after injection).** Circadian activity analysis of locomotor (**A**) and rearing (**B**) activity per hour over the 32h testing (upper panel) and total locomotor and rearing activity for the habituation, dark and light phases (mid panel) and for the first habituation hour, first dark hour and total duration (lower panel). **C**) Elevated Plus Maze. Percentage of time spent in open arms and number of entries in open, closed and total (open+closed) arms. **D**) Novel object recognition in 50cm diameter arena (30cm height). Percentage of time spent in the center during the habituation, locomotor activity (distance) in the whole arena during the habituation, acquisition and retention trials. Duration of objects exploration during the acquisition and

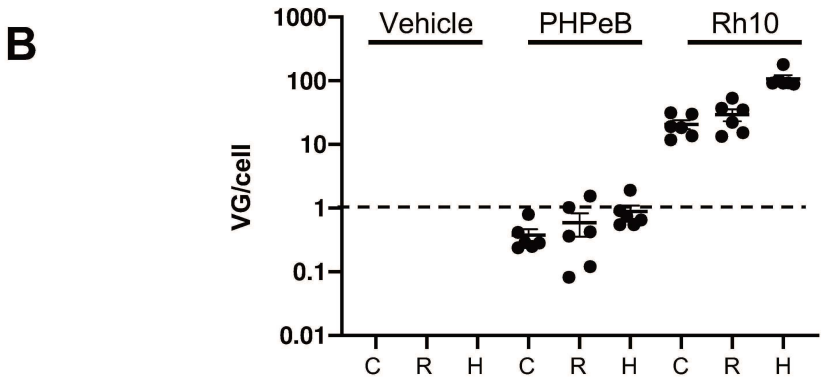
retention trials and recognition index. **E)** Nest building. Scoring of nests at 2, 5 and 24h as in Sup. Fig. 4. **F)** Social recognition. Number of entries and locomotor activity in the two side compartments during habituation (up), social preference (middle), social memory (bottom) sessions. Social preference was determined as percentage of exploration of a congener vs an object (middle right) and social memory as percentage of exploration of a novel vs familiar congener (bottom right). Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test and one group t-test (recognition index) or $\chi 2$ test (nesting). *p<0.05 vs WT-S. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs WT-S, # p<0.05 vs *Fmr1*-S.

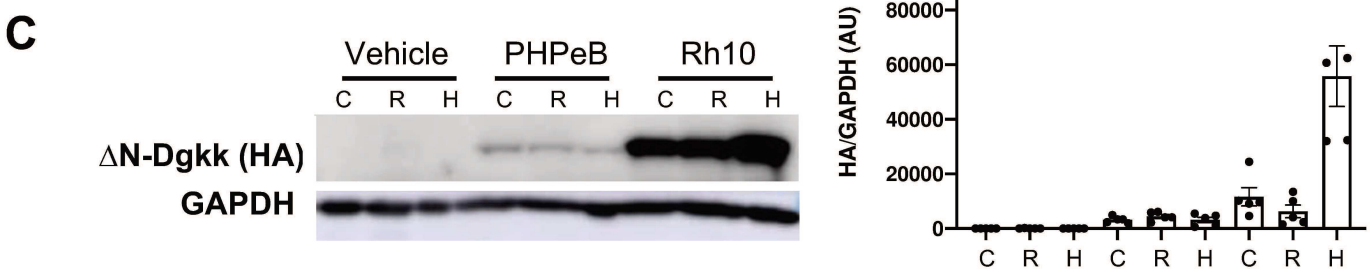
**Supplementary Fig. 7 : Measure of phosphatidic acid, diacylglycerol and 8 other lipids in brain of AAVrh10-ΔN-DGKk and AAVPHP.eB-ΔN-DGKk treated Fmr1-KO mice.** Total phosphatidic acid (PA) and diacylglycerol (DAG) levels measured by mass spectrometry in hippocampus (**A**, **C**) and rest of brain (**B**, **D**) of WT mice treated with saline solution (WT) and Fmr1-KO mice treated with saline (Fmr1-KO), AAVPHP.eB-ΔN-DGKk (Fmr1-KO + PHP.eB), AAVrh10-ΔN-DGKk (Fmr1-KO + Rh10) 8 weeks after injections. Data are expressed as mean ± SEM of mol % of total lipids and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, *p<0.05, **p<0.01, n=8 individual animals, except for WT n=7. Total diacylglycerol (DAG) level in cortex measured as in A). PA and DAG individual species level respectively in cortex (**E, H**), hippocampus (**F, I**), and rest of brain (**G, J**). **K** lipid composition (mol % of total lipid) for cholesterol esters (CE), diacylglycerol (DAG), phosphatidic acid (PA), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS), sphingomyelin (SM), triacylglycerol (TAG), measured as in **A**. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using two-way ANOVA. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs WT-S, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 vs *Fmr1*-S.

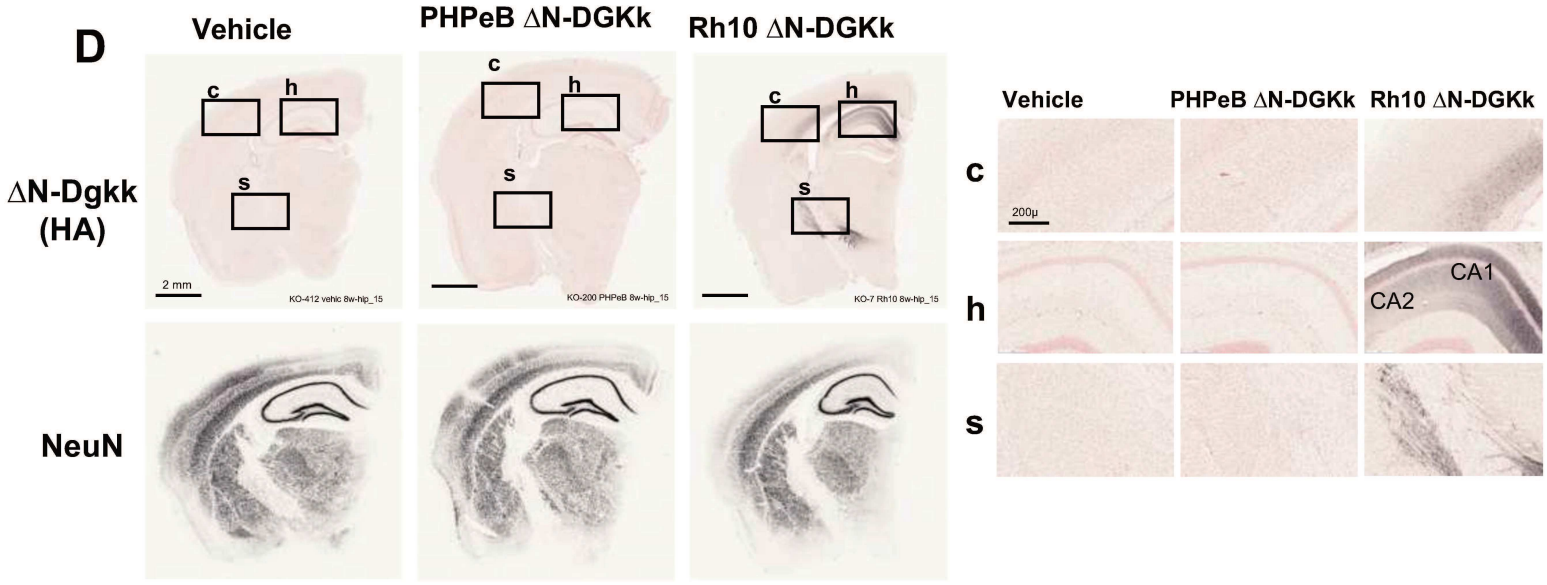

A
pCI-hDGKκ
Control
FXS
1 2 3 1 2 3 4
DGKk
FMRP
GAPDH
250
130
100
35
***
DGKk/GAPDH (AU)
1.0
0.5
0.0
Control FXS
B
DGKk
CMV
(EPAPE)10 PH C1 C4-a coiled-coil C4-b coiled-coil PDZ HA
ΔN-DGKk
CMV
Δ
HA
C
pCI-mDGKk
siC siFMR1 NT kDa
DGKk (HA)
FMRP
GAPDH
130
70
35
***
DGKk/GAPDH (AU)
1.5
1.0
0.5
0.0
siC siFMR1 NT
***
FMRP/GAPDH (AU)
1.0
0.5
0.0
siC siFMR1 NT
D
pCI-mDGKk pCI-ΔN-mDGKk
siC siC siFMR1 kDa
DGKk (HA)
FMRP
GAPDH
130
70
35
ns
DGKk/GAPDH (AU)
10
5
1
0
siC siC siFMR1
DGKk ΔN-DGKk
***
FMRP/GAPDH (AU)
1.0
0.5
0.0
siC siC siFMR1
DGKk ΔN-DGKk

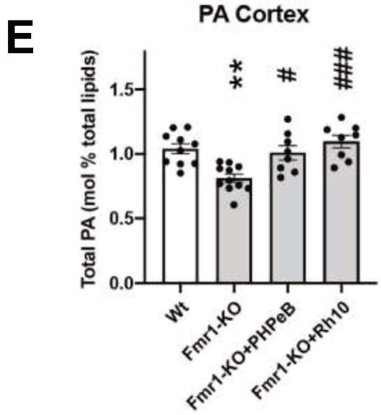

A
pCl
pClΔN-DGKk
.2 .4 .8 .2 .4 .8 µg
ΔN-DGKk (HA)
Puromycin
GAPDH
130
70
35
27
35
NT
pCl
pClΔN-DGKk
0 - + - + - + DGKi
130
70
35
27
35
Puromycin/GAPDH (AU)
2
1
0.0
**
***
***
***
0
- + - + - +
NT
C
ΔN-DGKk
B
AAV-GFP
AAV-ΔN-Dgkk
MAP2
GFP
Merge
MAP2
HA-ΔNter-mDgkk
Merge
C
AAV ΔN-DGKk
0 e8 e9 e10
P-eIF4E
eIF4E
GAPDH
ΔN-DGKk
*
*
P-eIF4E/eIF4E (AU)
1
0
0 e8 e9 e10

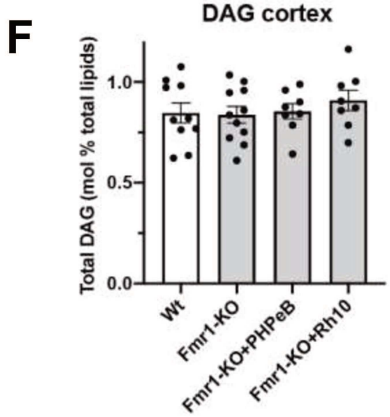

A
- PHPeB retroorbital 5.10^11 VG/mouse
- Rh10 striatum+hippocamp 10^11 VG/mouse
5 weeks old
8 weeks
Behavioral tests
Molecular analyses
12 weeks
4 weeks
Behavioral tests
Molecular analyses
8 weeks

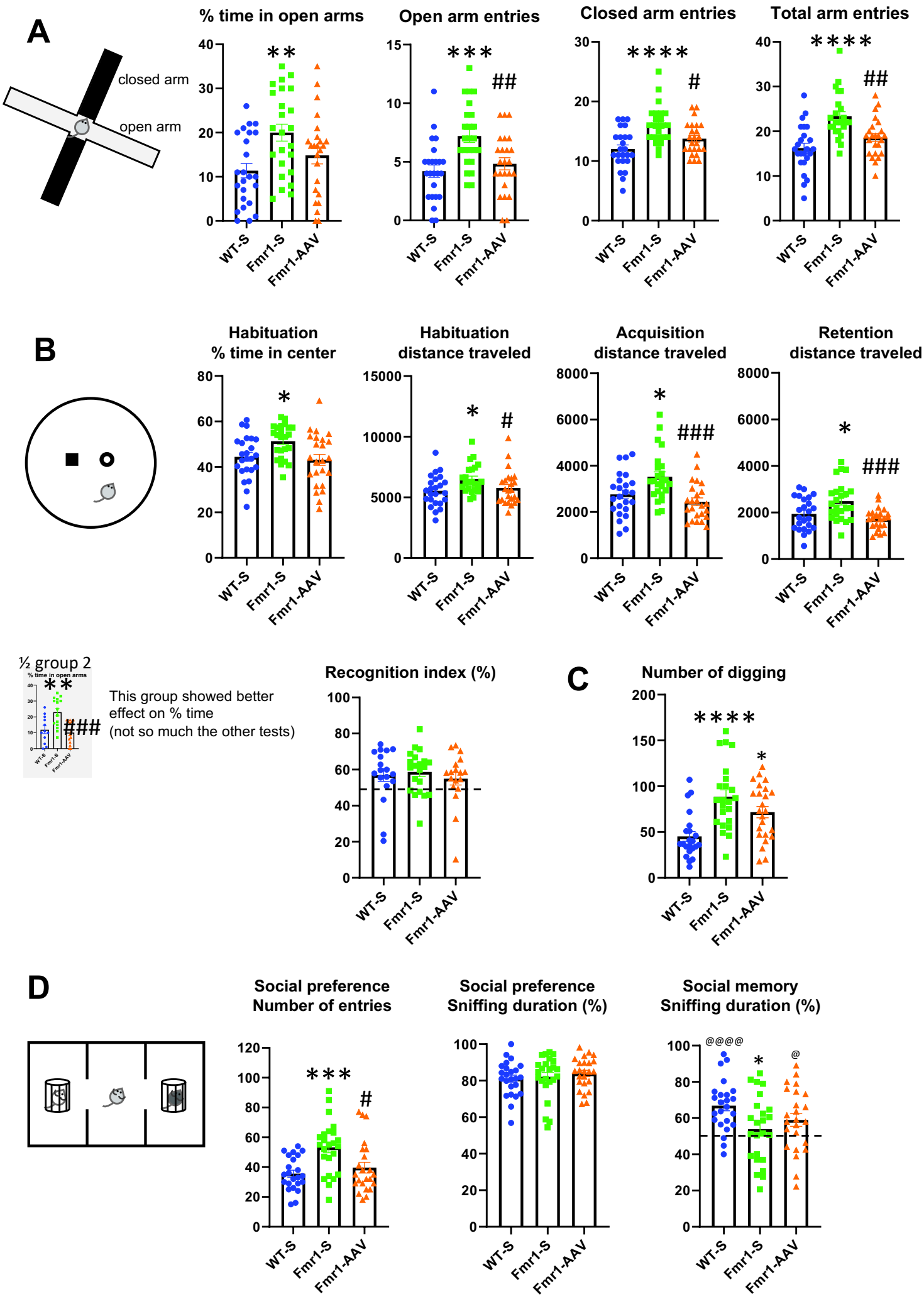

B
Vehicle
PHPeB
Rh10
VG/cell
1000
100
10
1
0.1
0.01
C R H C R H C R H

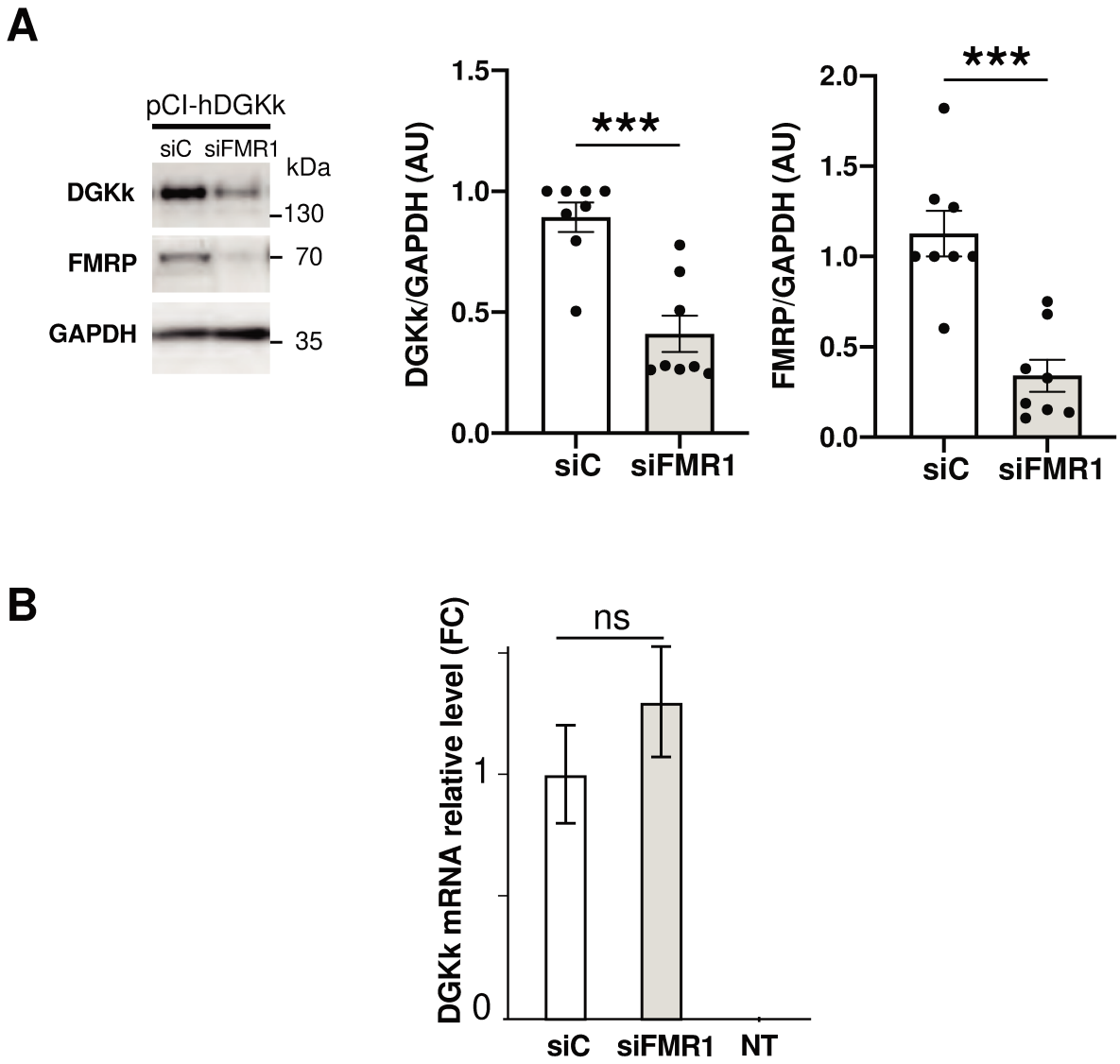

C
Vehicle
PHPeB
Rh10
C R H C R H C R H
ΔN-Dgkk (HA)
GAPDH
HA/GAPDH (AU)
100000
80000
60000
40000
20000
0
C R H C R H C R H

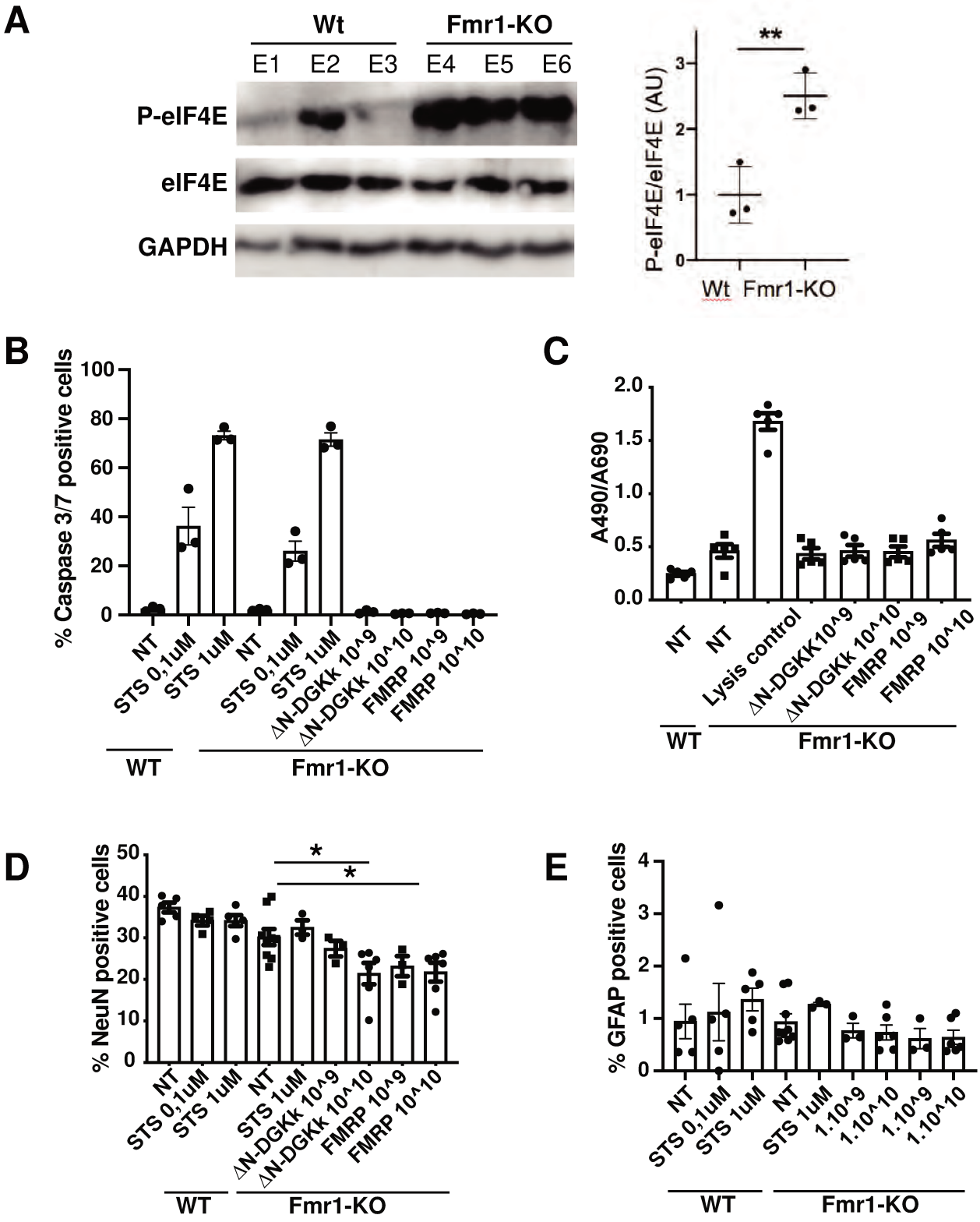

D
Vehicle
PHPeB ΔN-DGKk
Rh10 ΔN-DGKk
ΔN-Dgkk (HA)
NeuN
c
h
s
2 mm
KO-412 vehic 8w-hip_15
KO-200 PHPeB 8w-hip_15
KO-7 Rh10 8w-hip_15
Vehicle
PHPeB ΔN-DGKk
Rh10 ΔN-DGKk
200µ
CA1
CA2

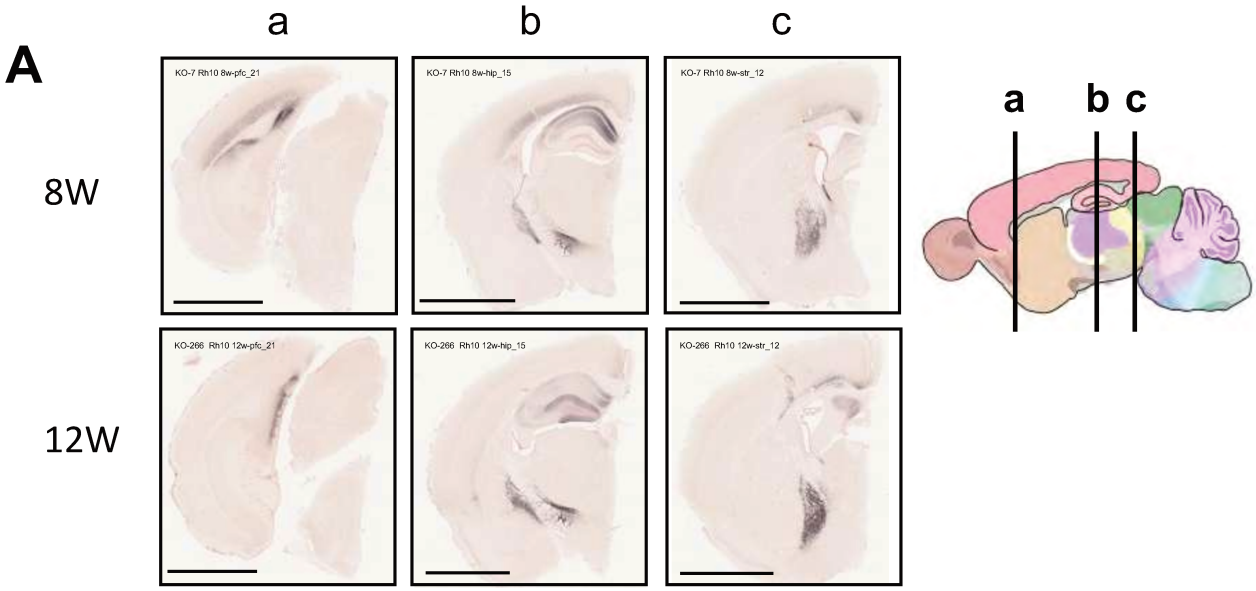

E
PA Cortex
Total PA (mol % total lipids)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
#
###
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10

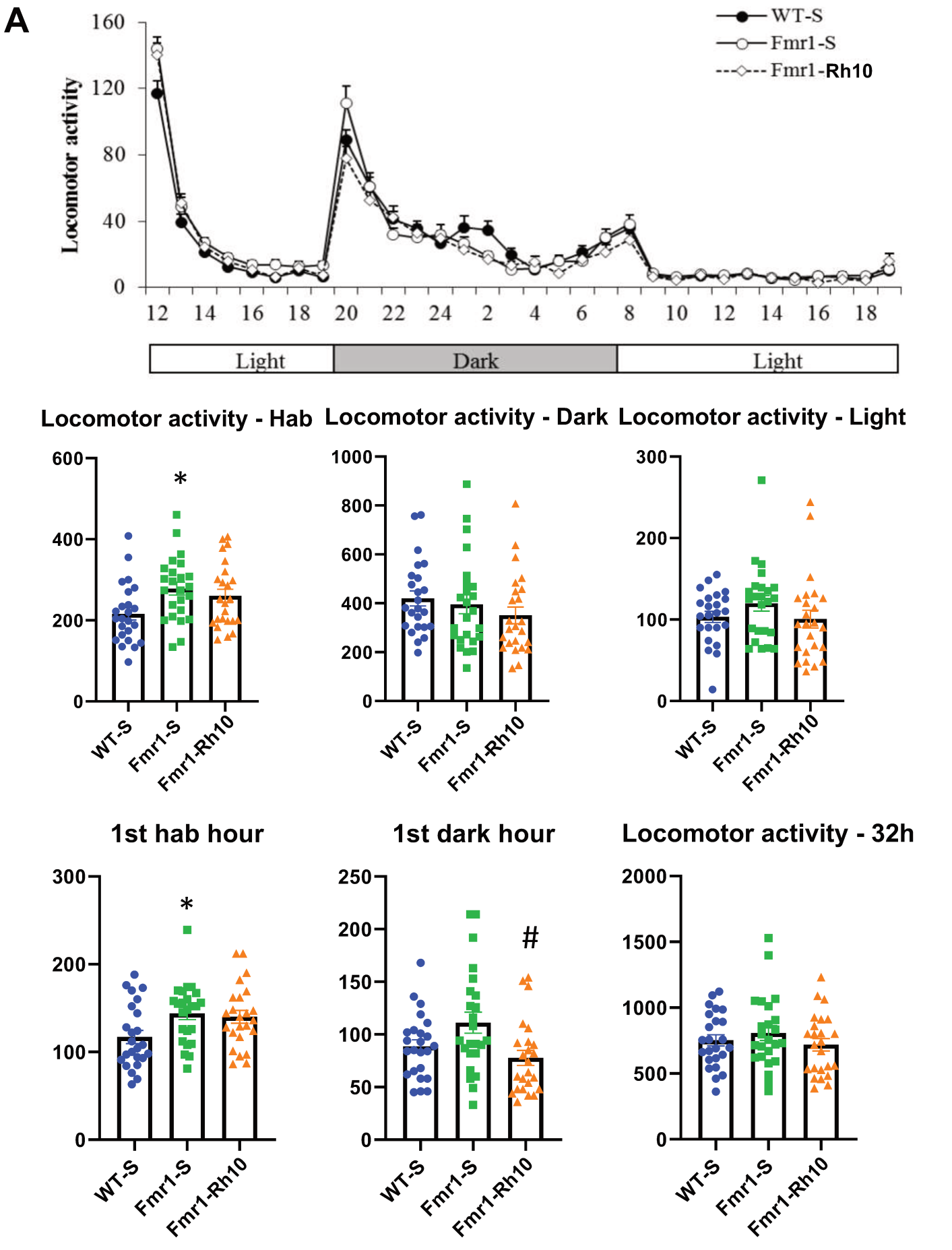

F
DAG cortex
Total DAG (mol % total lipids)
1.0
0.5
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10


A
closed arm
open arm
% time in open arms
Open arm entries
Closed arm entries
Total arm entries
B
Habituation
% time in center
Habituation
distance traveled
Acquisition
distance traveled
Retention
distance traveled
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-AAV
½ group 2
This group showed better
effect on % time
(not so much the other tests)
Recognition index (%)
C
Number of digging
D
Social preference
Number of entries
Social preference
Sniffing duration (%)
Social memory
Sniffing duration (%)

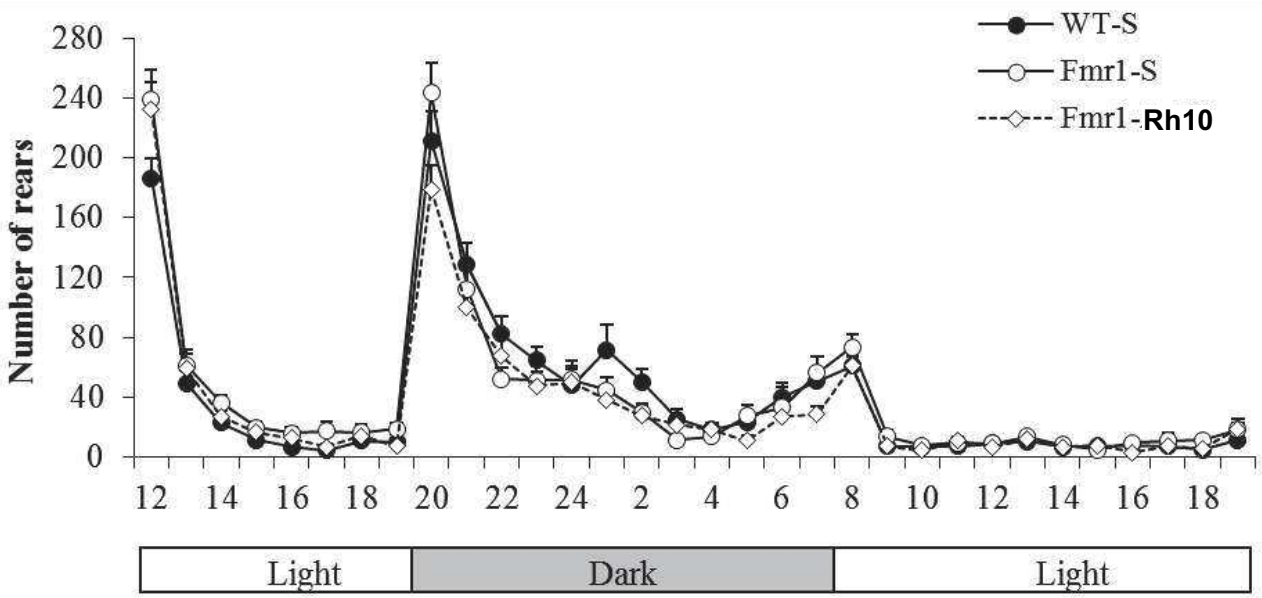

A
pCI-hDGKk
siC siFMR1
kDa
DGKk
130
FMRP
70
GAPDH
35
DGKk/GAPDH (AU)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
siC
siFMR1
FMRP/GAPDH (AU)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
siC
siFMR1
B
DGKk mRNA relative level (FC)
1
0
ns
siC
siFMR1
NT

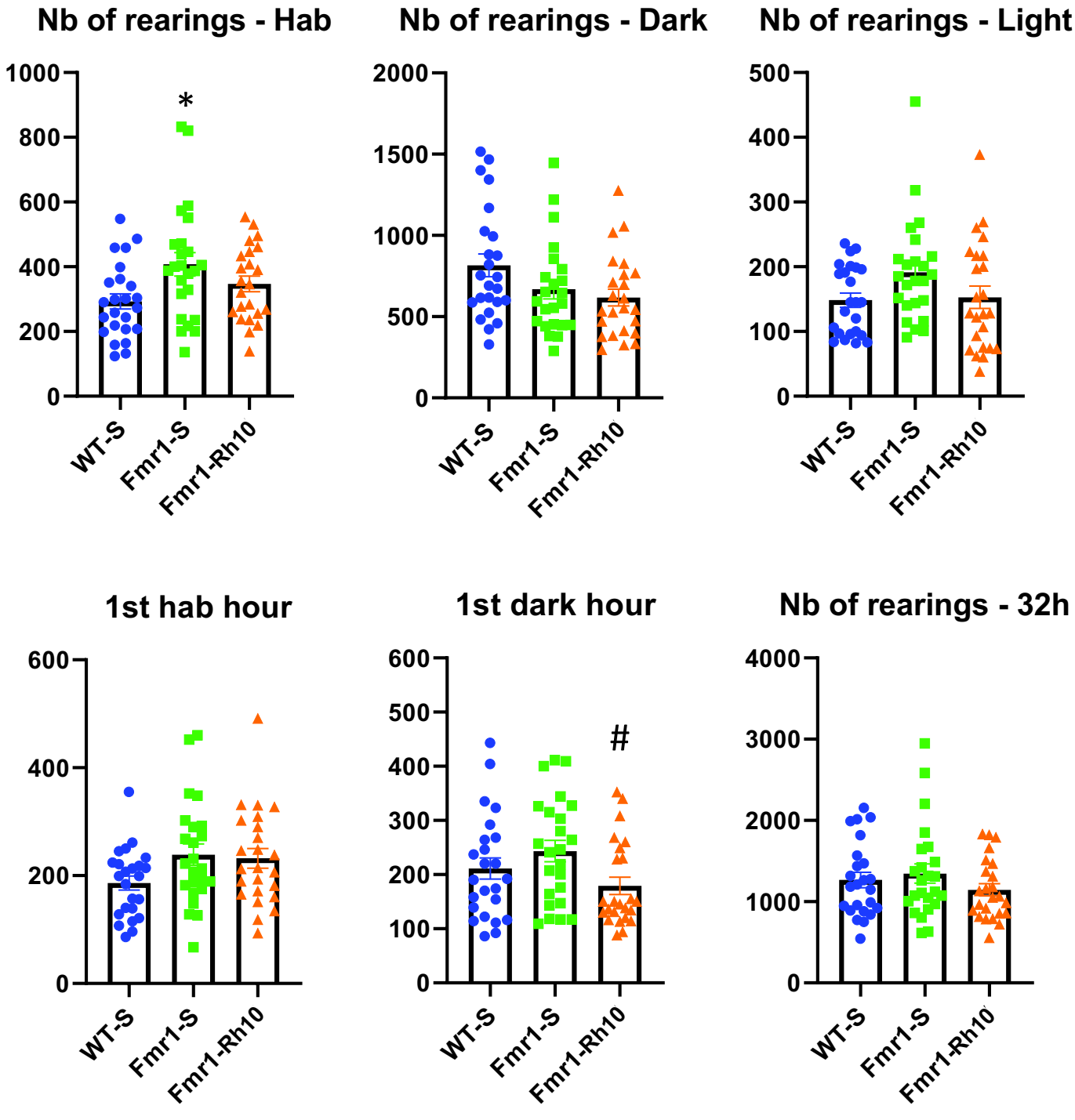

A
Wt
Fmr1-KO
E1 E2 E3 E4 E5 E6
P-eIF4E
eIF4E
GAPDH
**
P-eIF4E/eIF4E (AU)
Wt Fmr1-KO
B
% Caspase 3/7 positive cells
NT
STS 0,1uM
STS 1uM
ΔN-DGKk 10^9
ΔN-DGKk 10^10
FMRP 10^9
FMRP 10^10
WT
Fmr1-KO
C
A490/A690
Lysis control
D
% NeuN positive cells
*
*
E
% GFAP positive cells
1.10^9
1.10^10


A
a
b
c
8W
12W
KO-7 Rh10 8w-pfc_21
KO-7 Rh10 8w-hip_15
KO-7 Rh10 8w-str_12
KO-266 Rh10 12w-pfc_21
KO-266 Rh10 12w-hip_15
KO-266 Rh10 12w-str_12
a
b c

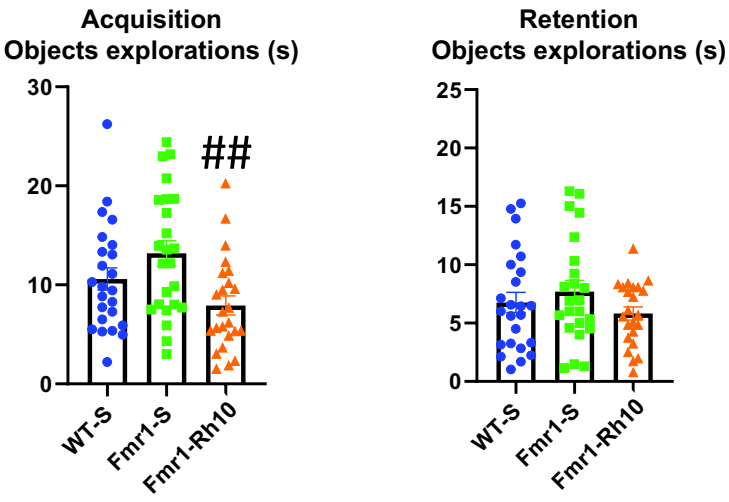

A
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10
Locomotor activity
160
120
80
40
0
12 14 16 18 20 22 24 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Light
Dark
Light
Locomotor activity - Hab
Locomotor activity - Dark
Locomotor activity - Light
600
400
200
0
1000
800
600
400
200
0
300
200
100
0
*
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10
1st hab hour
1st dark hour
Locomotor activity - 32h
300
200
100
0
250
200
150
100
50
0
2000
1500
1000
500
0
*
#

B

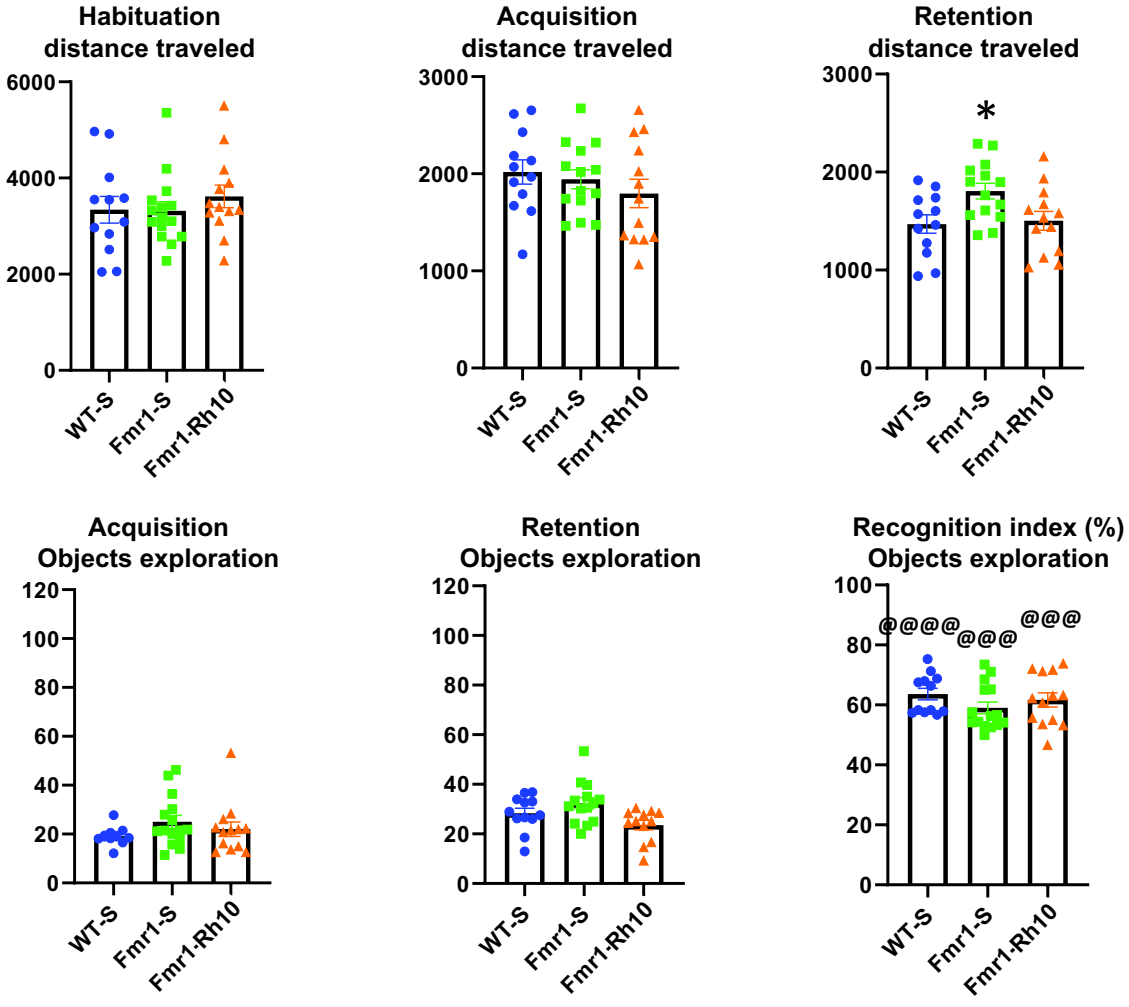

WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10
Number of rears
280
240
200
160
120
80
40
0
12 14 16 18 20 22 24 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Light
Dark
Light


Nb of rearings - Hab
Nb of rearings - Dark
Nb of rearings - Light
1st hab hour
1st dark hour
Nb of rearings - 32h
*
#
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

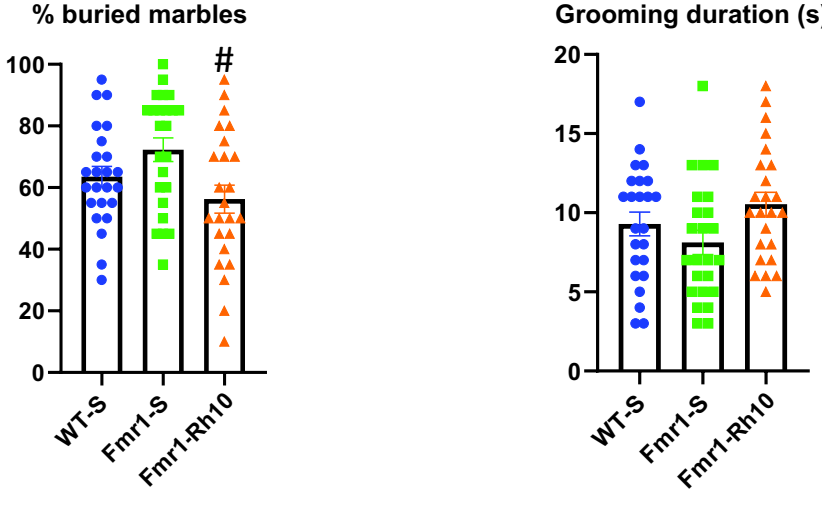
C


Acquisition
Objects explorations (s)
##
Retention
Objects explorations (s)
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

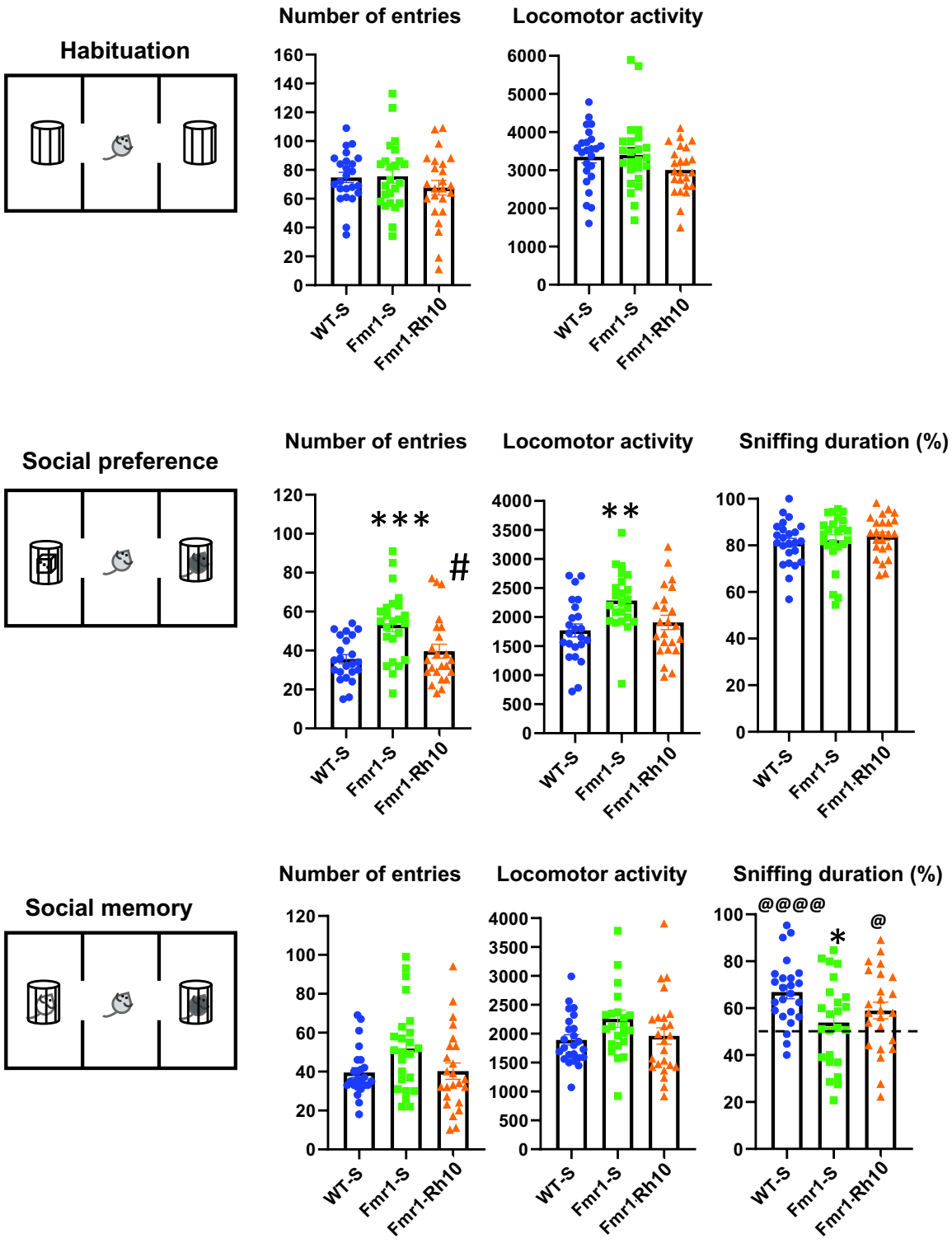
D


Habituation
distance traveled
Acquisition
distance traveled
Retention
distance traveled
*
Acquisition
Objects exploration
Retention
Objects exploration
Recognition index (%)
Objects exploration
@@@@ @@@
@@@
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

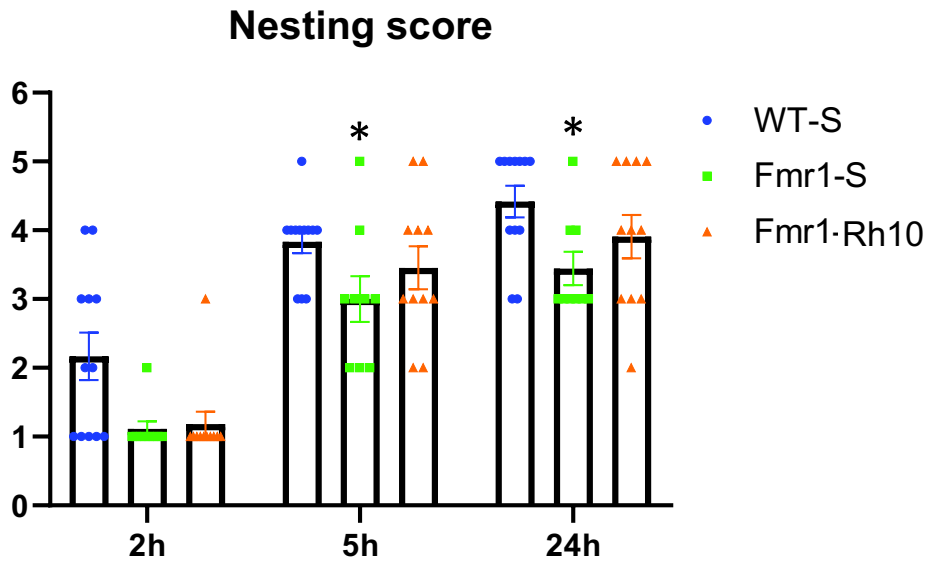
E


% buried marbles
#
Grooming duration (s)
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

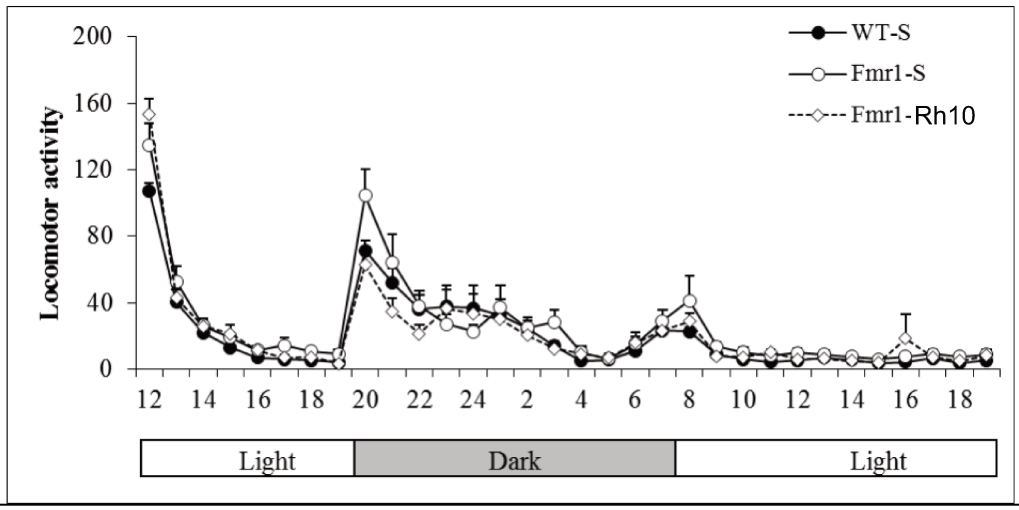
# F

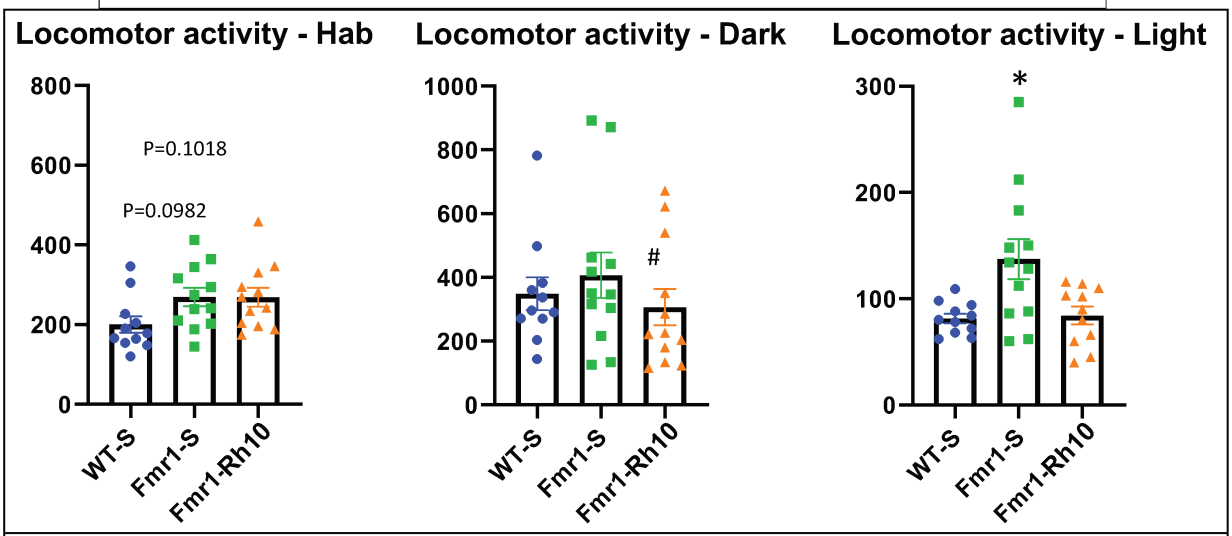

Habituation
Number of entries
Locomotor activity
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10
Social preference
Number of entries
Locomotor activity
Sniffing duration (%)
***
#
**
Social memory
Number of entries
Locomotor activity
Sniffing duration (%)
@@@@
*
@

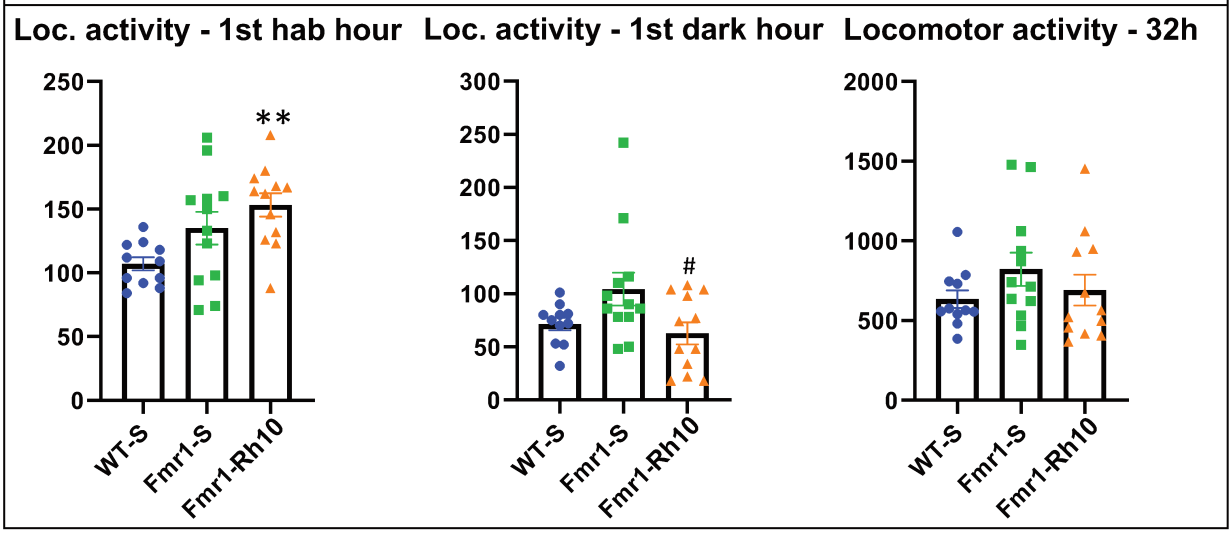
G



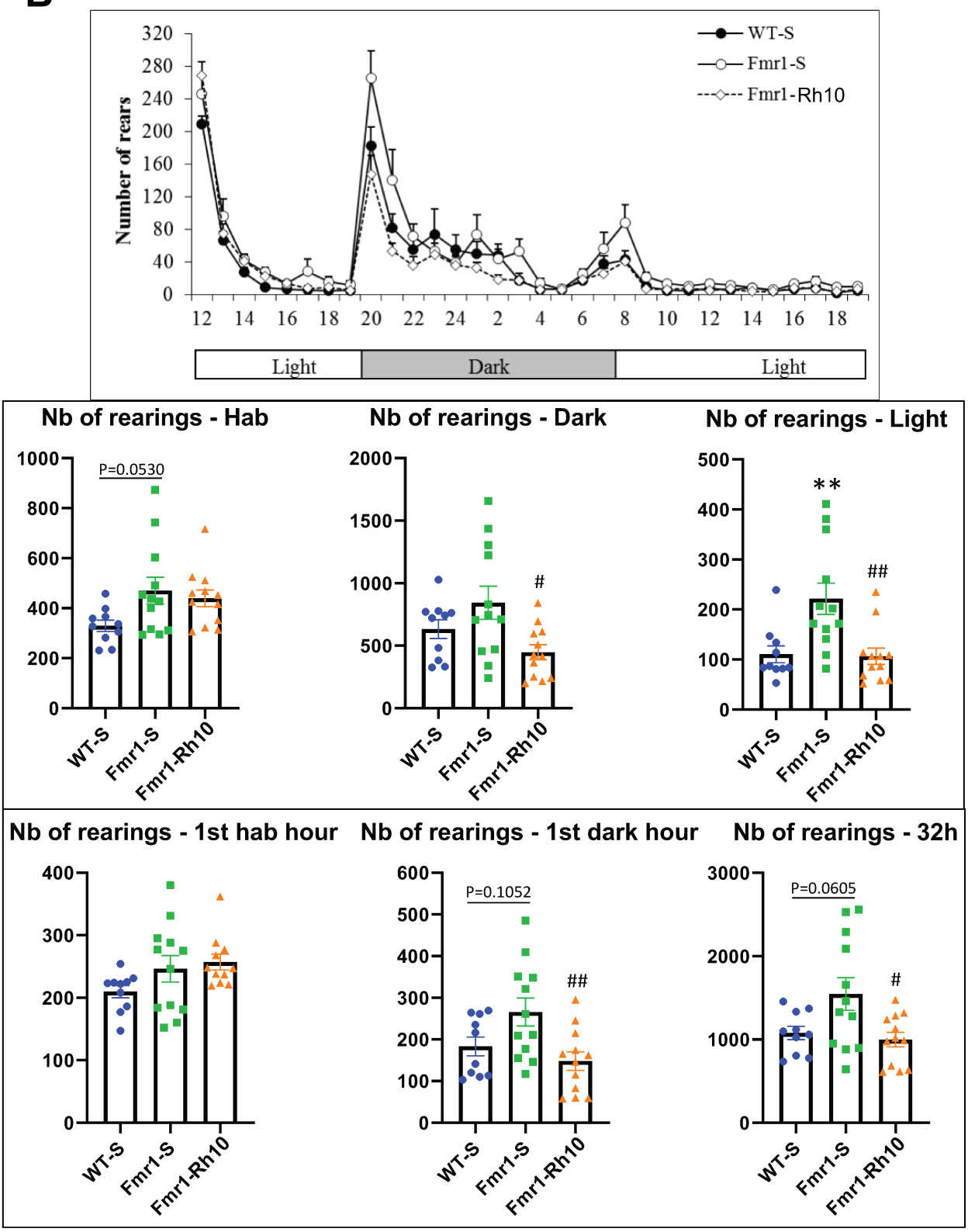
A


Locomotor activity
200
160
120
80
40
0
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10
12 14 16 18 20 22 24 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Light
Dark
Light

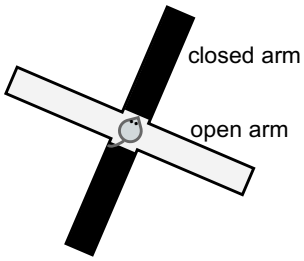

Locomotor activity - Hab
P=0.1018
P=0.0982
Locomotor activity - Dark
#
Locomotor activity - Light
*
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

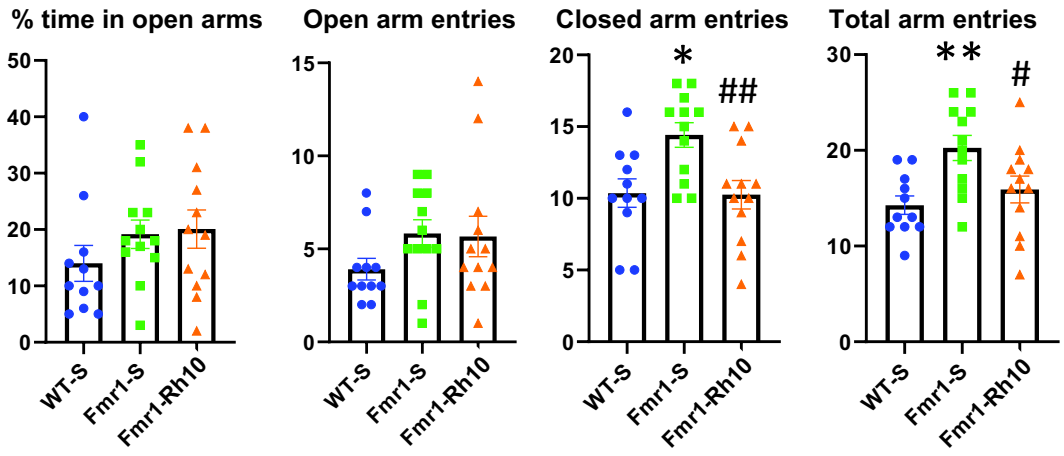

Loc. activity - 1st hab hour
**
Loc. activity - 1st dark hour
#
Locomotor activity - 32h
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

B

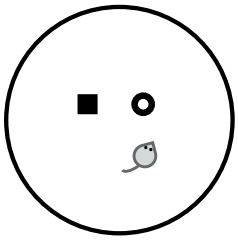

Number of rears
320
280
240
200
160
120
80
40
0
12 14 16 18 20 22 24 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Light
Dark
Light
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10
Nb of rearings - Hab
P=0.0530
Nb of rearings - Dark
#
Nb of rearings - Light
**
##
Nb of rearings - 1st hab hour
Nb of rearings - 1st dark hour
P=0.1052
##
Nb of rearings - 32h
P=0.0605
#
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

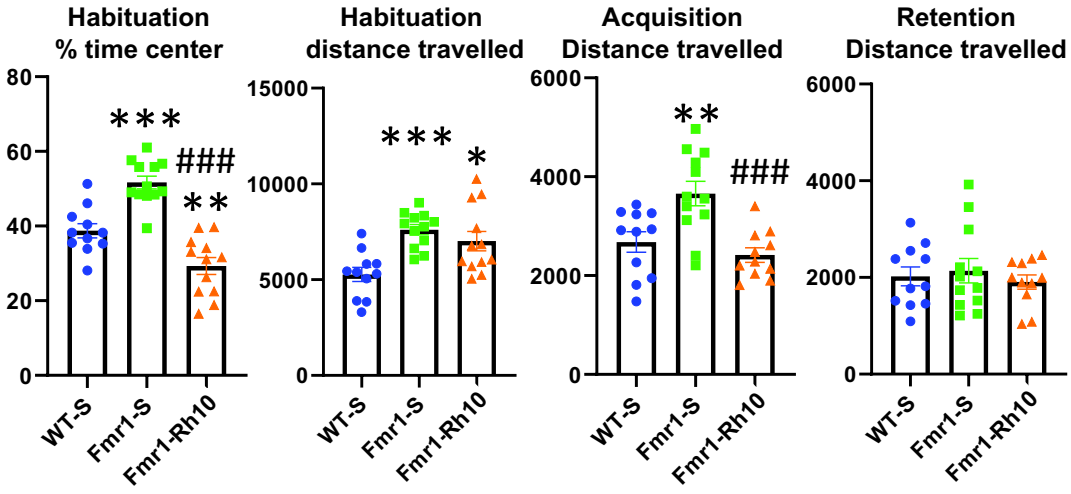
C

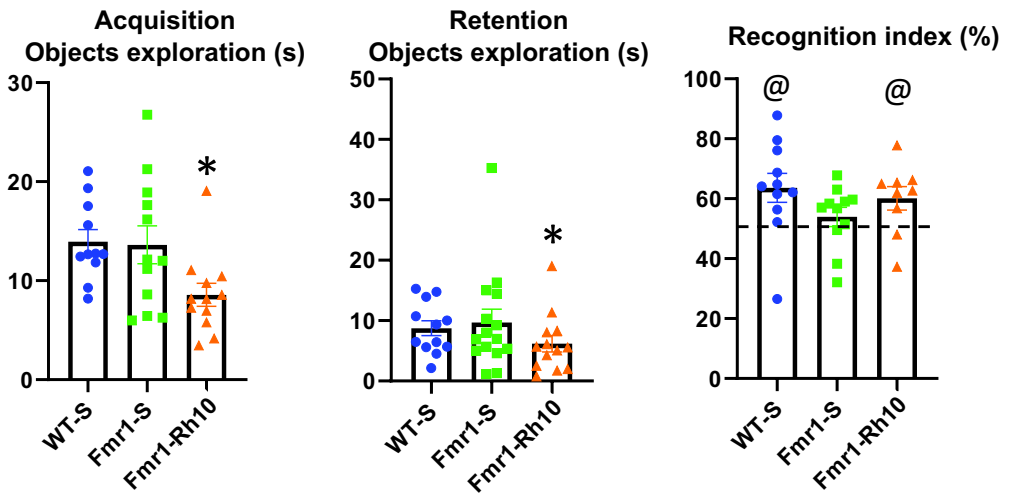

closed arm
open arm


% time in open arms
Open arm entries
Closed arm entries
Total arm entries
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

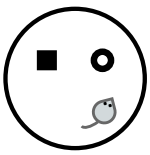
D

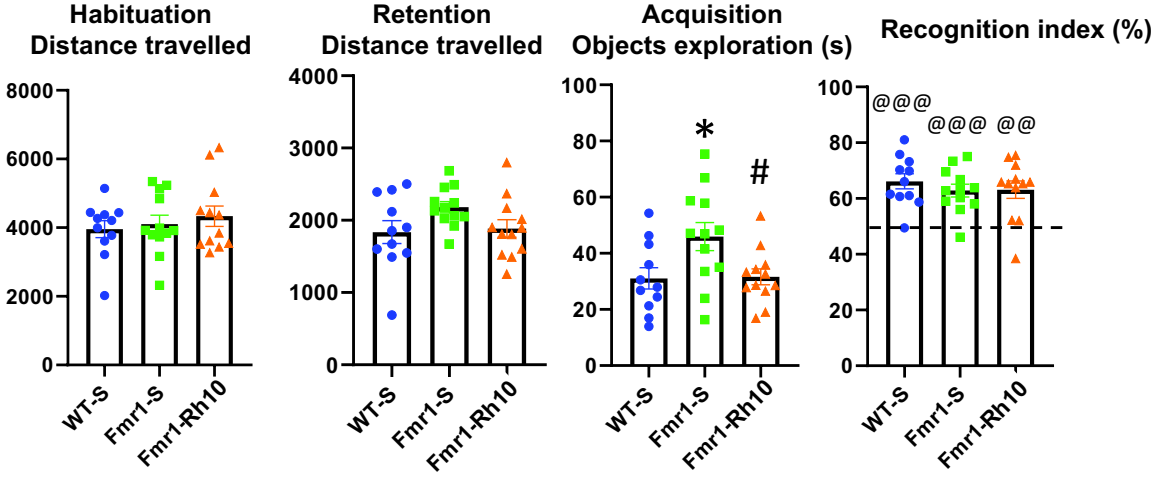



Habituation
% time center
Habituation
distance travelled
Acquisition
Distance travelled
Retention
Distance travelled
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

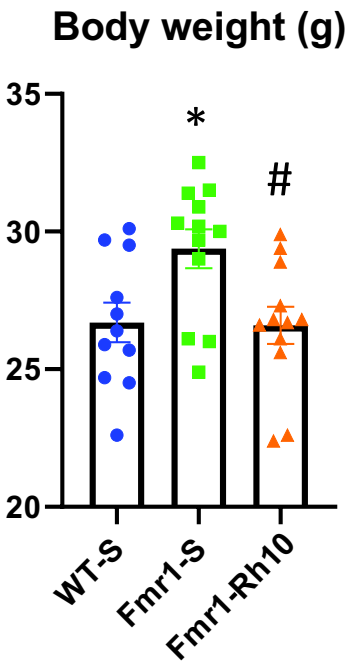

Acquisition
Objects exploration (s)
Retention
Objects exploration (s)
Recognition index (%)
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

E

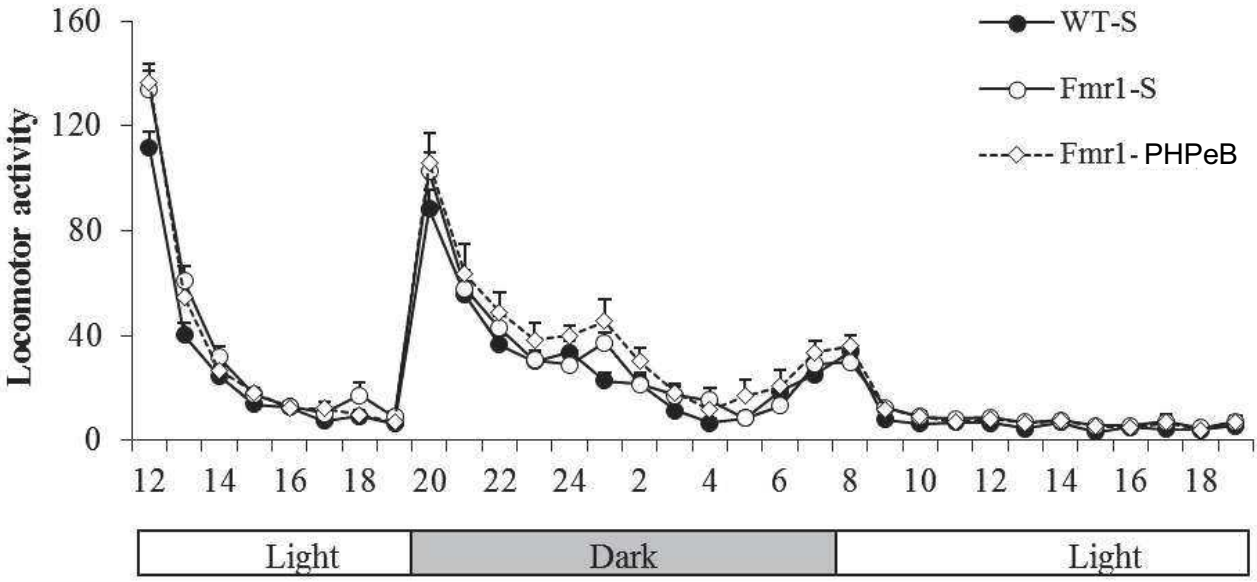


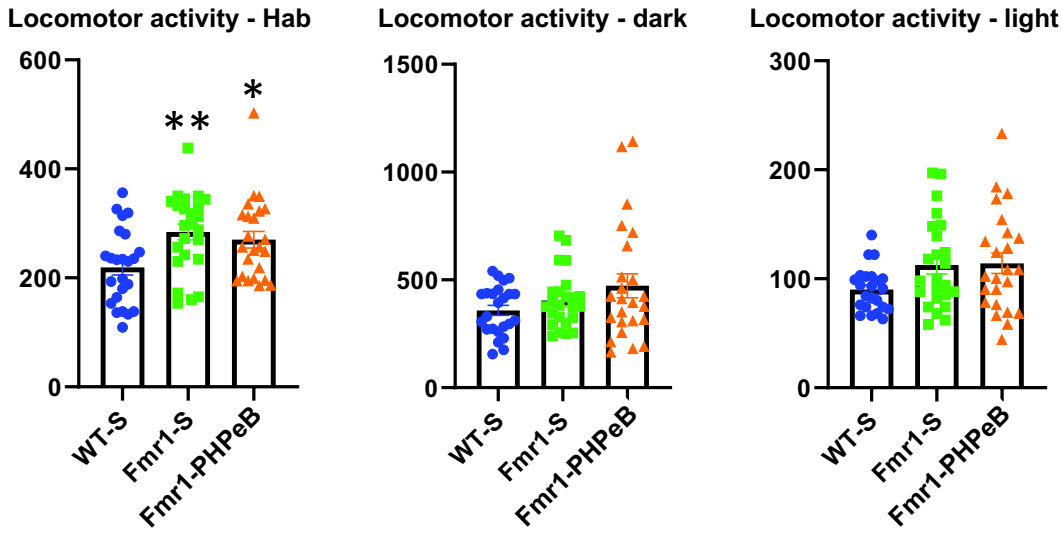

Habituation
Distance travelled
Retention
Distance travelled
Acquisition
Objects exploration (s)
Recognition index (%)
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-Rh10

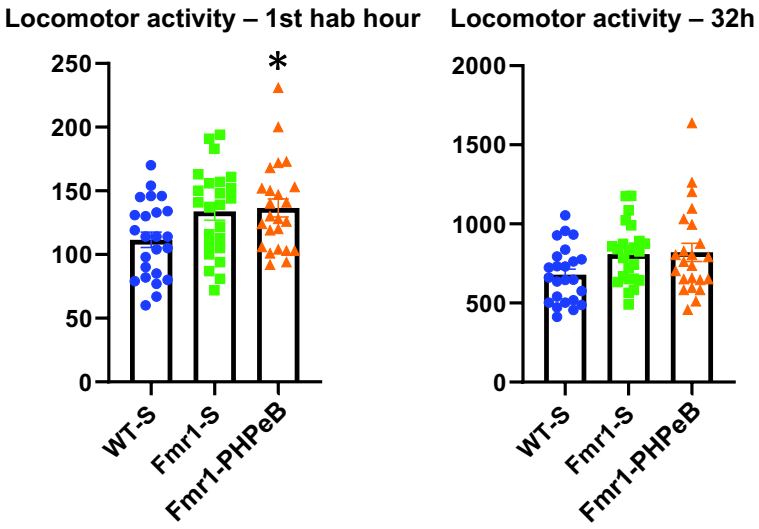
F



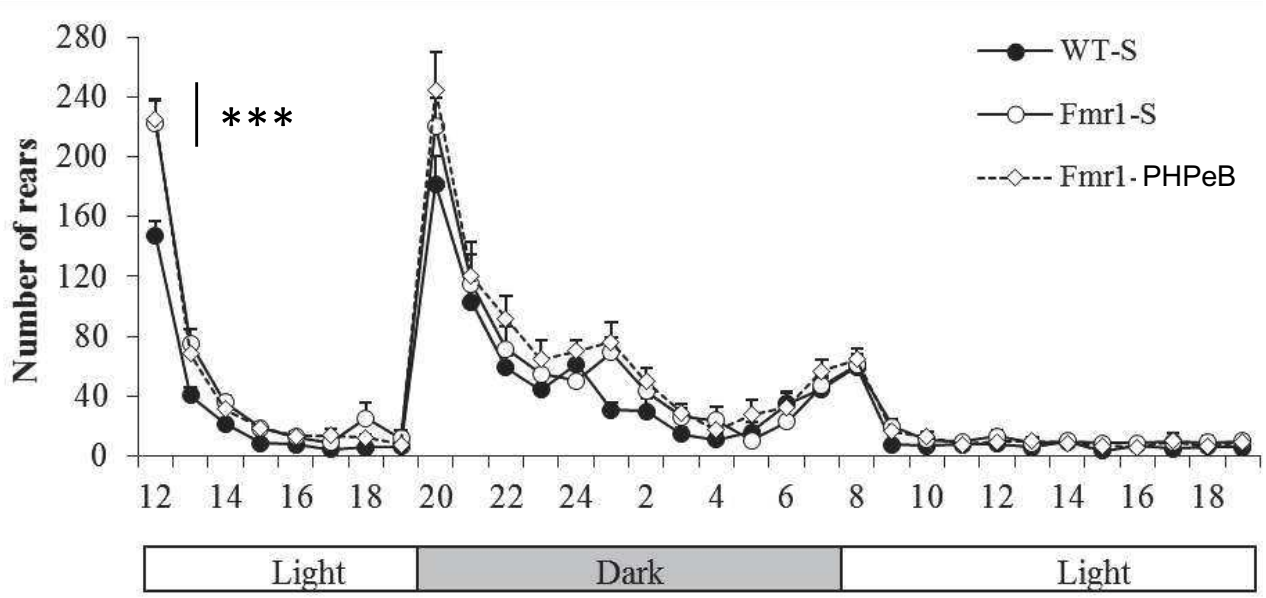
**A**

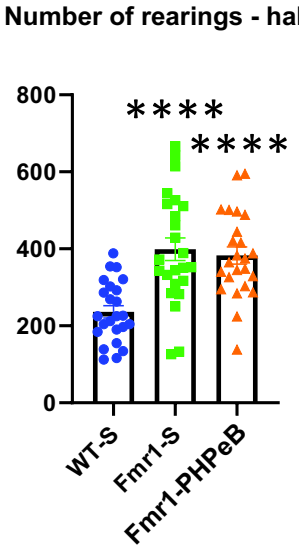

Locomotor activity
160
120
80
40
0
12 14 16 18 20 22 24 2 4 6 8 10 12 14 16 18
WT-S
Fmr1-S
Fmr1- PHPeB
Light
Dark
Light

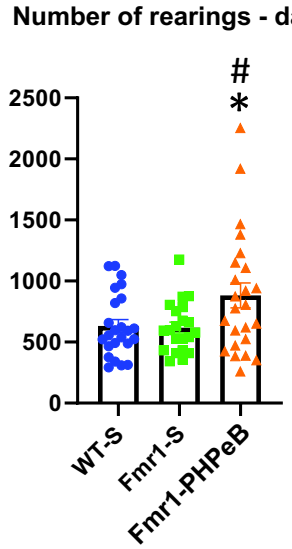

Locomotor activity - Hab
600
400
200
0
**
*
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB
Locomotor activity - dark
1500
1000
500
0
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB
Locomotor activity - light
300
200
100
0
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB

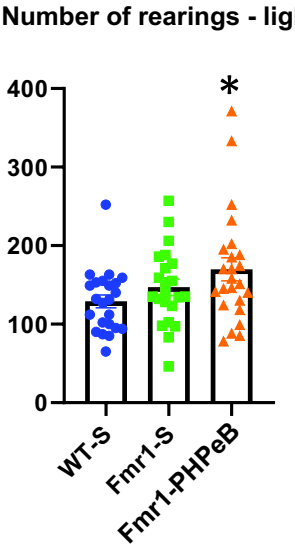

Locomotor activity – 1st hab hour
250
200
150
100
50
0
*
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB
Locomotor activity – 32h
2000
1500
1000
500
0
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB

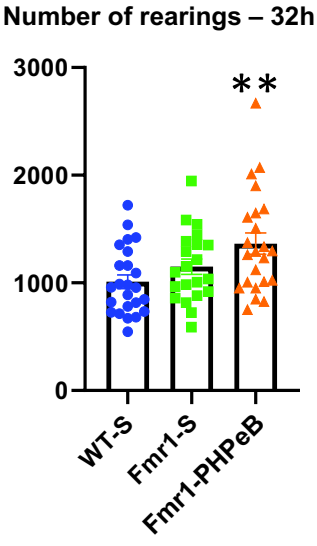
**B**

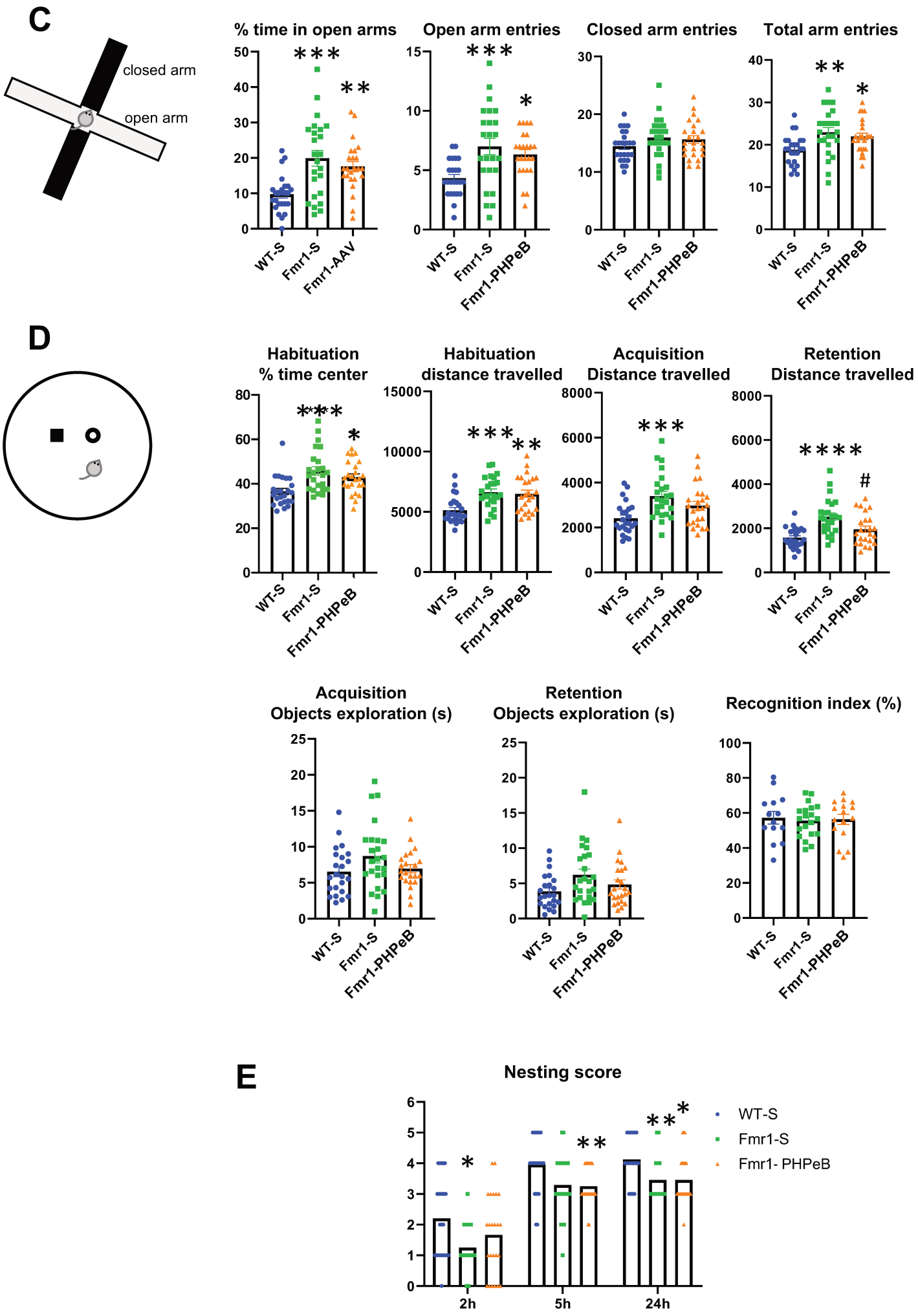

Number of rears
280
240
200
160
120
80
40
0
***
WT-S
Fmr1-S
Fmr1- PHPeB
12 14 16 18 20 22 24 2 4 6 8 10 12 14 16 18
Light
Dark
Light


Number of rearings - habituation
800
600
400
200
0
****
****
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB

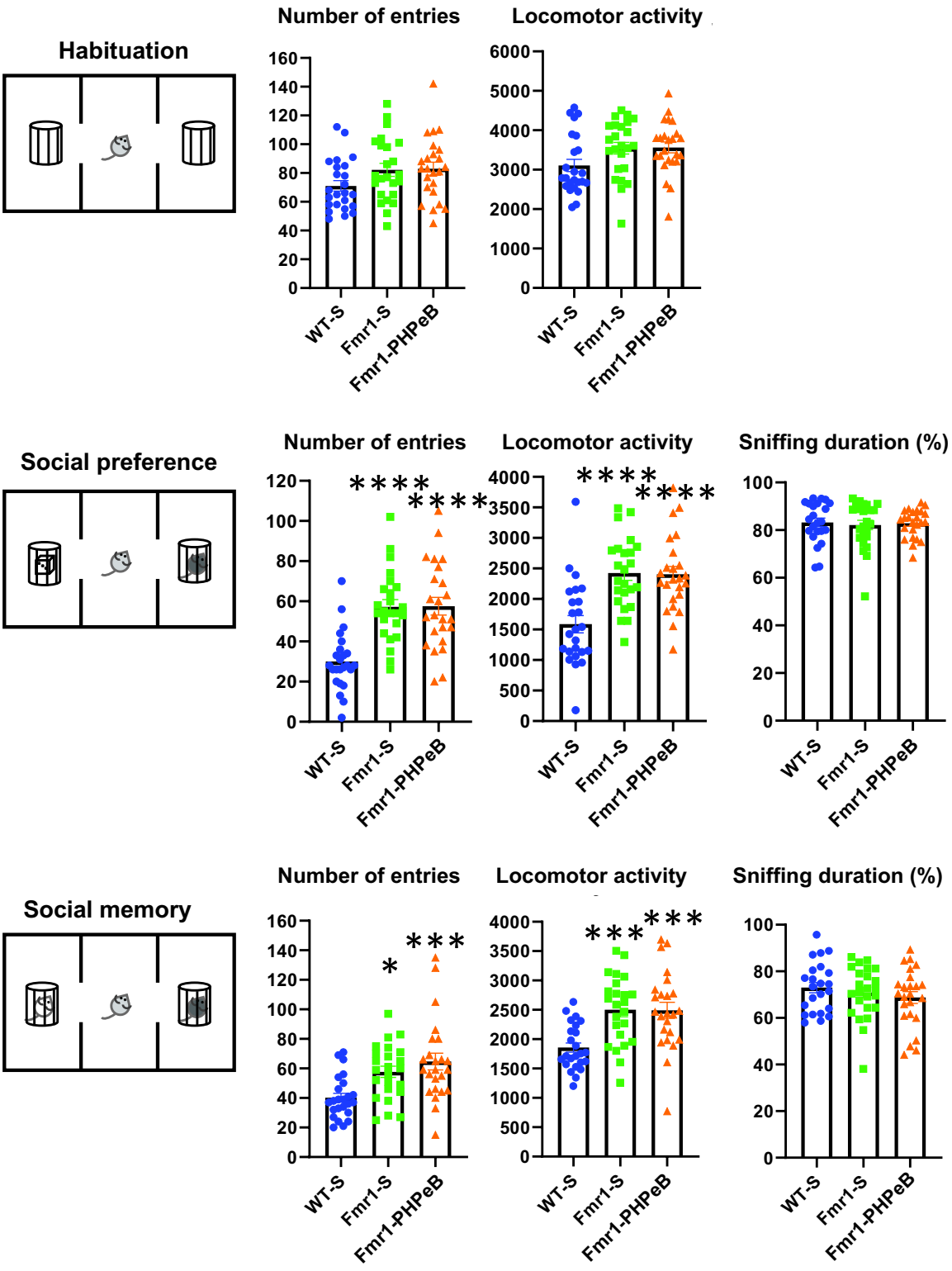

Number of rearings - dark
2500
2000
1500
1000
500
0
#
*
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB

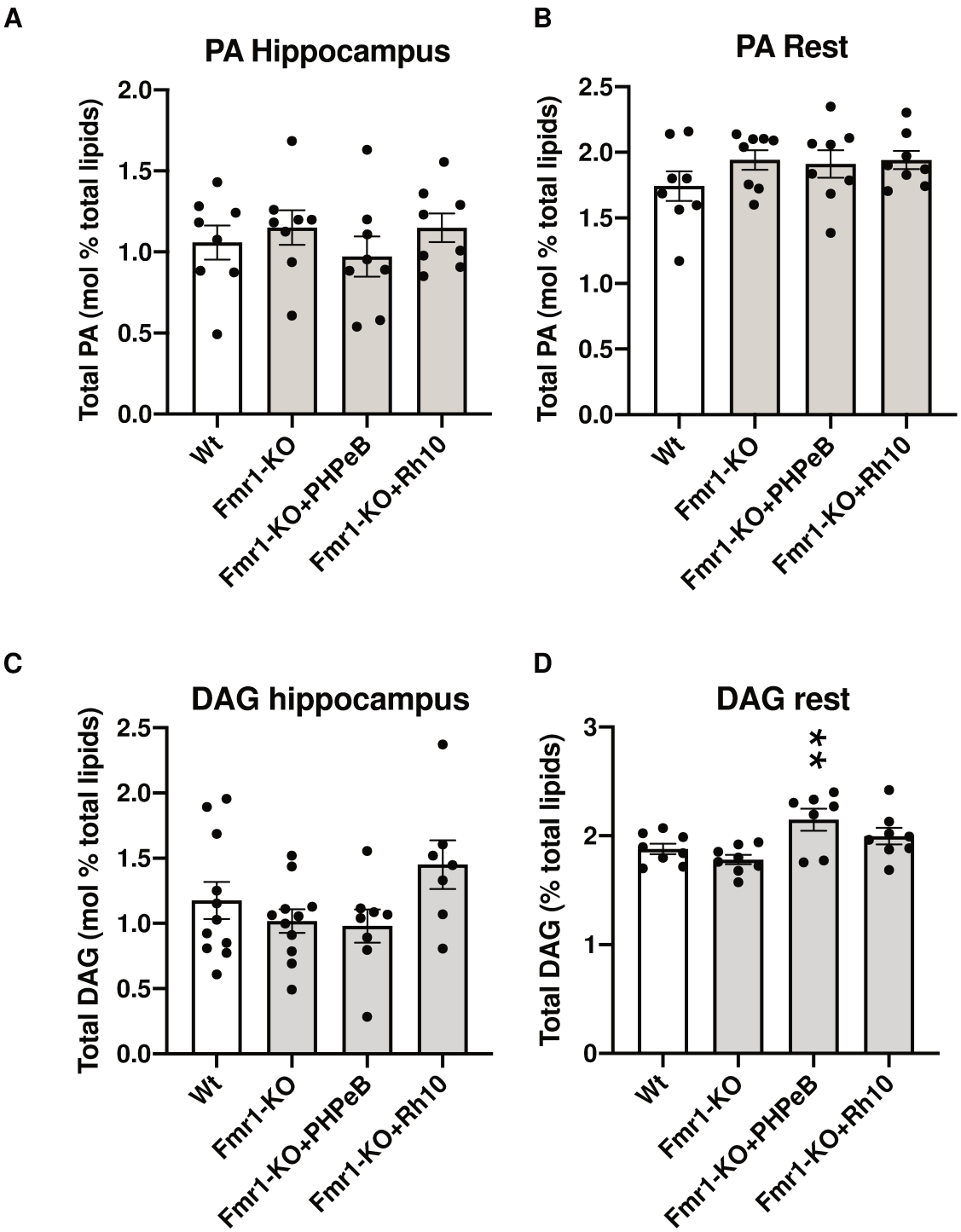

Number of rearings - light
400
300
200
100
0
*
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB


Number of rearings – 32h
3000
2000
1000
0
**
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB

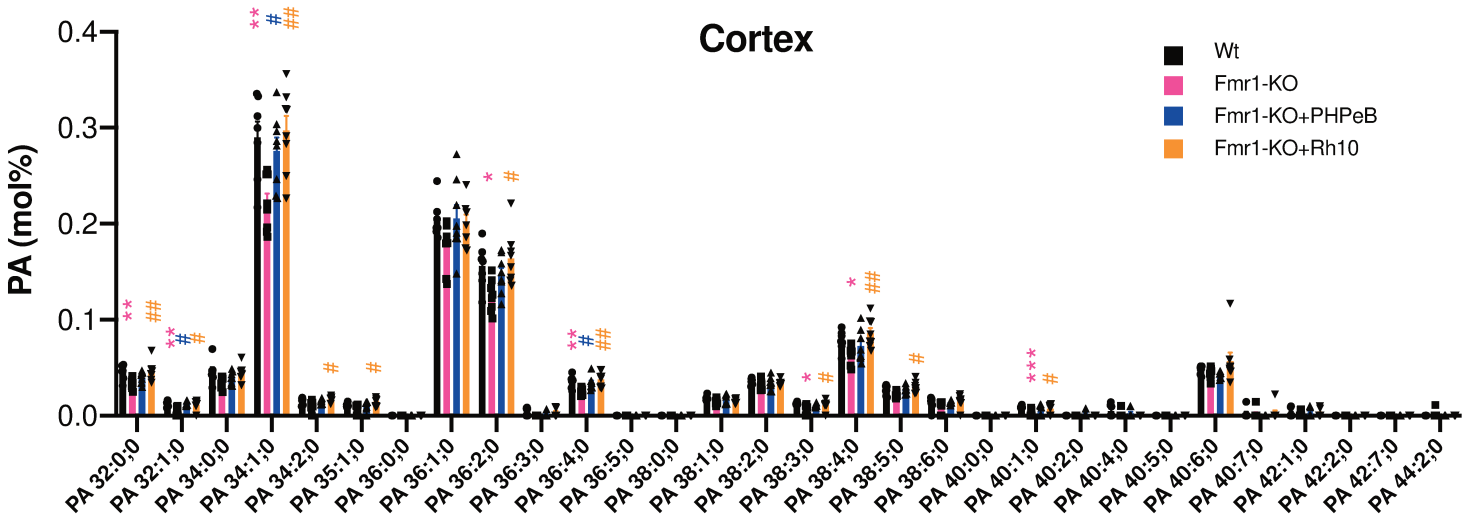

C
closed arm
open arm
% time in open arms
Open arm entries
Closed arm entries
Total arm entries
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-AAV
Fmr1-PHPeB
D
Habituation
% time center
Habituation
distance travelled
Acquisition
Distance travelled
Retention
Distance travelled
Acquisition
Objects exploration (s)
Retention
Objects exploration (s)
Recognition index (%)
E
Nesting score
WT-S
Fmr1-S
Fmr1- PHPeB
2h
5h
24h

# F

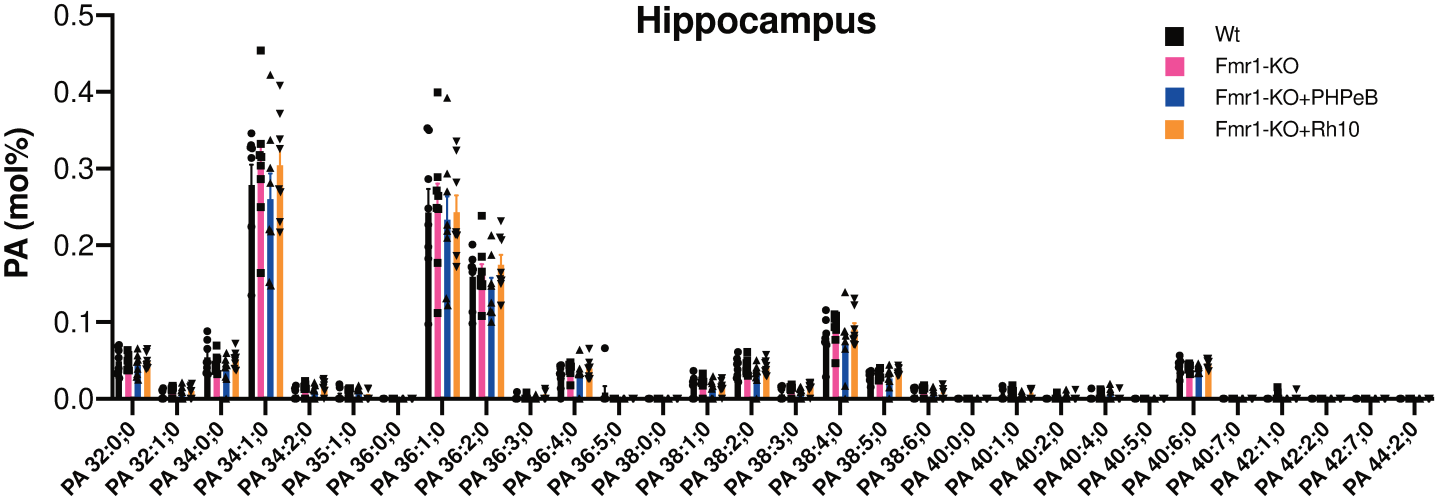

Habituation
Number of entries
Locomotor activity
Social preference
Number of entries
Locomotor activity
Sniffing duration (%)
Social memory
Number of entries
Locomotor activity
Sniffing duration (%)
WT-S
Fmr1-S
Fmr1-PHPeB
****
***
*


A
PA Hippocampus
Total PA (mol % total lipids)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
B
PA Rest
Total PA (mol % total lipids)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
C
DAG hippocampus
Total DAG (mol % total lipids)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
D
DAG rest
Total DAG (% total lipids)
3
2
1
0
**
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10

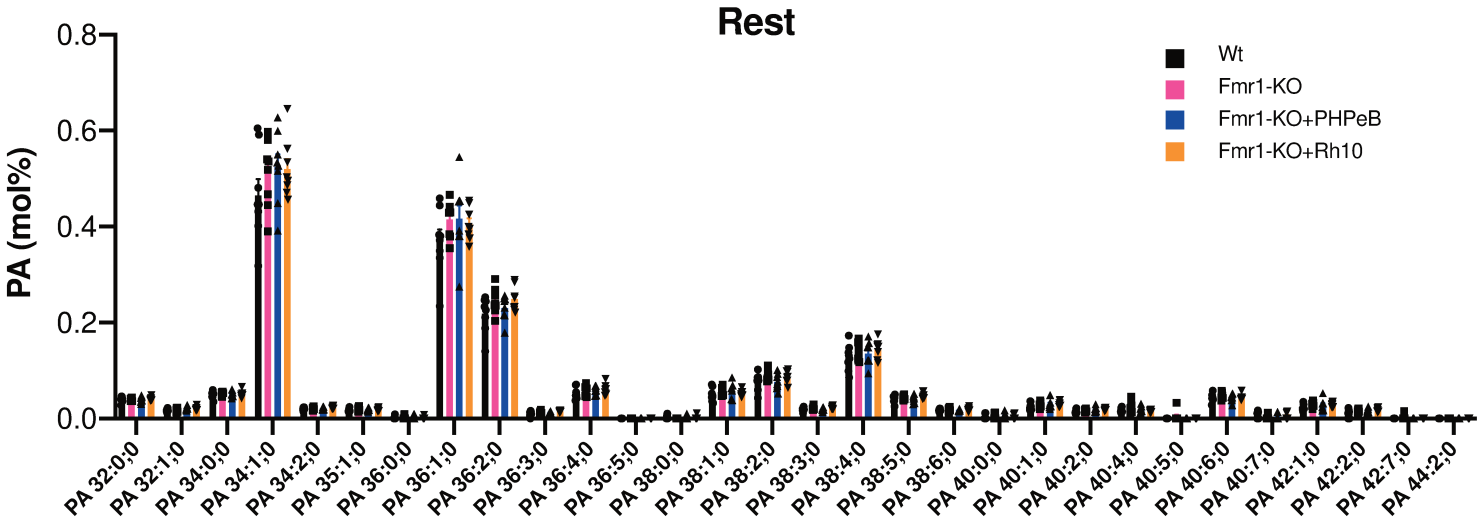
E

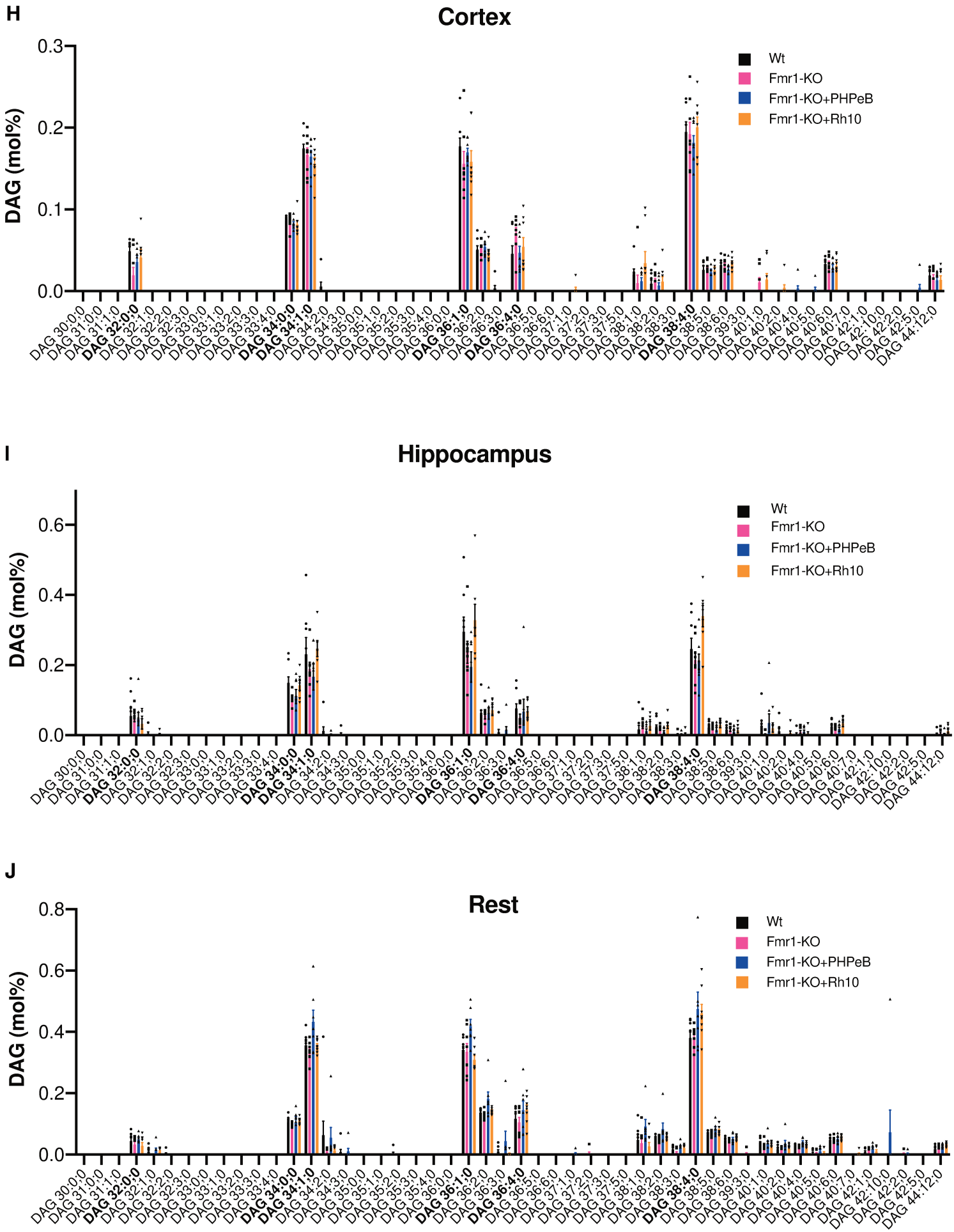

Cortex
PA (mol%)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
PA 32:0;0
PA 32:1;0
PA 34:0;0
PA 34:1;0
PA 34:2;0
PA 35:1;0
PA 36:0;0
PA 36:1;0
PA 36:2;0
PA 36:3;0
PA 36:4;0
PA 36:5;0
PA 38:0;0
PA 38:1;0
PA 38:2;0
PA 38:3;0
PA 38:4;0
PA 38:5;0
PA 38:6;0
PA 40:0;0
PA 40:1;0
PA 40:2;0
PA 40:4;0
PA 40:5;0
PA 40:6;0
PA 40:7;0
PA 42:1;0
PA 42:2;0
PA 42:7;0
PA 44:2;0

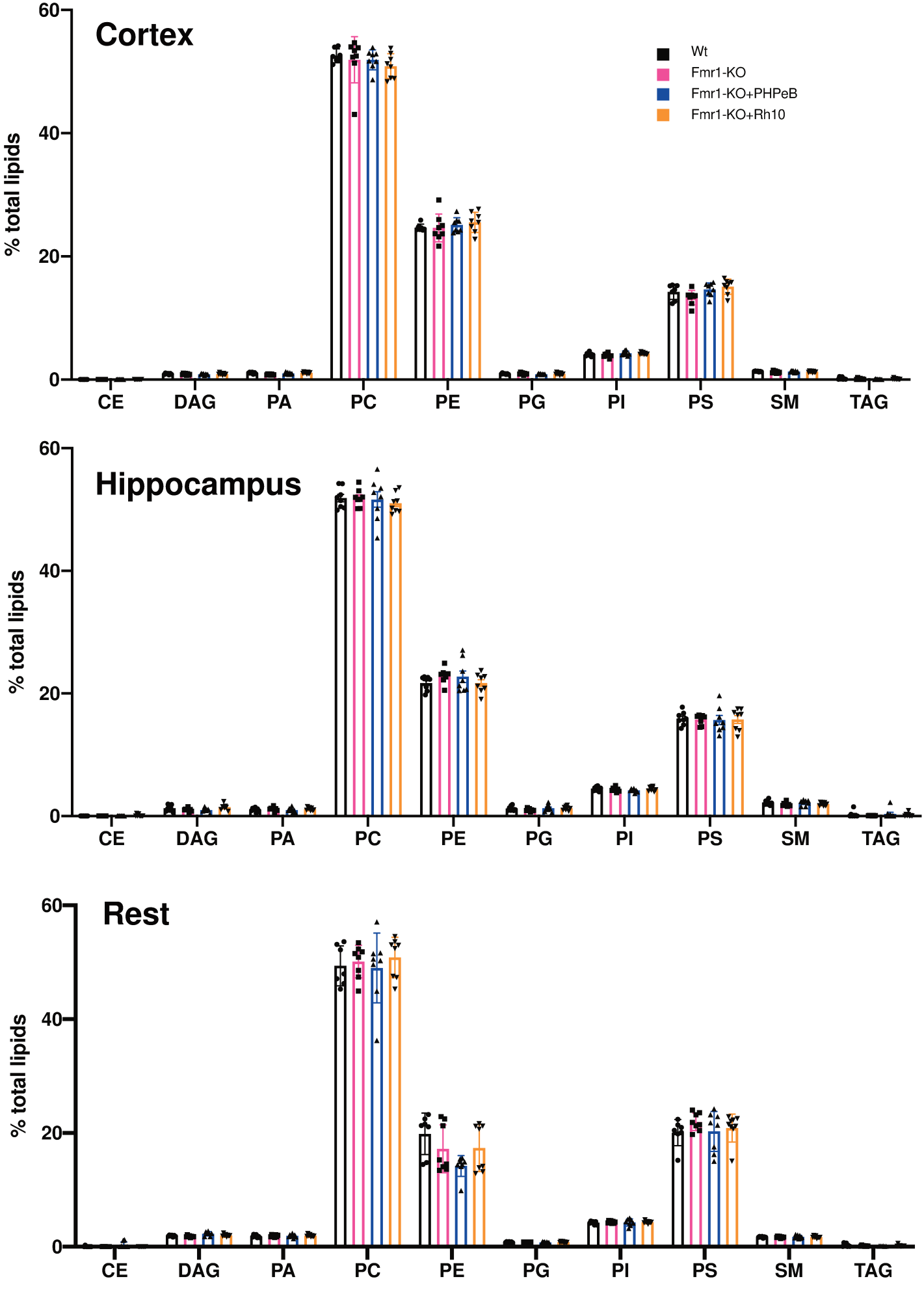
F

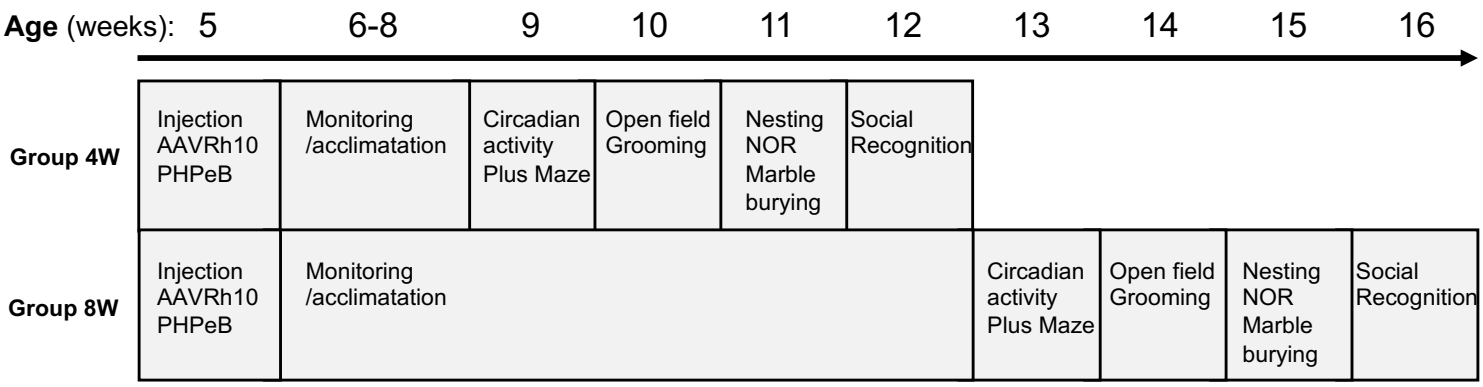

Hippocampus
PA (mol%)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
PA 32:0;0
PA 32:1;0
PA 34:0;0
PA 34:1;0
PA 34:2;0
PA 35:1;0
PA 36:0;0
PA 36:1;0
PA 36:2;0
PA 36:3;0
PA 36:4;0
PA 36:5;0
PA 38:0;0
PA 38:1;0
PA 38:2;0
PA 38:3;0
PA 38:4;0
PA 38:5;0
PA 38:6;0
PA 40:0;0
PA 40:1;0
PA 40:2;0
PA 40:4;0
PA 40:5;0
PA 40:6;0
PA 40:7;0
PA 42:1;0
PA 42:2;0
PA 42:7;0
PA 44:2;0

G


Rest
PA (mol%)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
PA 32:0;0
PA 32:1;0
PA 34:0;0
PA 34:1;0
PA 34:2;0
PA 35:1;0
PA 36:0;0
PA 36:1;0
PA 36:2;0
PA 36:3;0
PA 36:4;0
PA 36:5;0
PA 38:0;0
PA 38:1;0
PA 38:2;0
PA 38:3;0
PA 38:4;0
PA 38:5;0
PA 38:6;0
PA 40:0;0
PA 40:1;0
PA 40:2;0
PA 40:4;0
PA 40:5;0
PA 40:6;0
PA 40:7;0
PA 42:1;0
PA 42:2;0
PA 42:7;0
PA 44:2;0


H
Cortex
DAG (mol%)
0.3
0.2
0.1
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
DAG 30:0;0
DAG 31:0;0
DAG 31:1;0
DAG 32:0;0
DAG 32:1;0
DAG 32:2;0
DAG 32:3;0
DAG 33:0;0
DAG 33:1;0
DAG 33:2;0
DAG 33:3;0
DAG 33:4;0
DAG 34:0;0
DAG 34:1;0
DAG 34:2;0
DAG 34:3;0
DAG 35:0;0
DAG 35:1;0
DAG 35:2;0
DAG 35:3;0
DAG 35:4;0
DAG 36:0;0
DAG 36:1;0
DAG 36:2;0
DAG 36:3;0
DAG 36:4;0
DAG 36:5;0
DAG 36:6;0
DAG 37:1;0
DAG 37:2;0
DAG 37:3;0
DAG 37:5;0
DAG 38:1;0
DAG 38:2;0
DAG 38:3;0
DAG 38:4;0
DAG 38:5;0
DAG 38:6;0
DAG 39:3;0
DAG 40:1;0
DAG 40:2;0
DAG 40:4;0
DAG 40:5;0
DAG 40:6;0
DAG 40:7;0
DAG 42:1;0
DAG 42:10;0
DAG 42:2;0
DAG 42:5;0
DAG 44:12;0
I
Hippocampus
DAG (mol%)
0.6
0.4
0.2
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
DAG 30:0;0
DAG 31:0;0
DAG 31:1;0
DAG 32:0;0
DAG 32:1;0
DAG 32:2;0
DAG 32:3;0
DAG 33:0;0
DAG 33:1;0
DAG 33:2;0
DAG 33:3;0
DAG 33:4;0
DAG 34:0;0
DAG 34:1;0
DAG 34:2;0
DAG 34:3;0
DAG 35:0;0
DAG 35:1;0
DAG 35:2;0
DAG 35:3;0
DAG 35:4;0
DAG 36:0;0
DAG 36:1;0
DAG 36:2;0
DAG 36:3;0
DAG 36:4;0
DAG 36:5;0
DAG 36:6;0
DAG 37:1;0
DAG 37:2;0
DAG 37:3;0
DAG 37:5;0
DAG 38:1;0
DAG 38:2;0
DAG 38:3;0
DAG 38:4;0
DAG 38:5;0
DAG 38:6;0
DAG 39:3;0
DAG 40:1;0
DAG 40:2;0
DAG 40:4;0
DAG 40:5;0
DAG 40:6;0
DAG 40:7;0
DAG 42:1;0
DAG 42:10;0
DAG 42:2;0
DAG 42:5;0
DAG 44:12;0
J
Rest
DAG (mol%)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
DAG 30:0;0
DAG 31:0;0
DAG 31:1;0
DAG 32:0;0
DAG 32:1;0
DAG 32:2;0
DAG 32:3;0
DAG 33:0;0
DAG 33:1;0
DAG 33:2;0
DAG 33:3;0
DAG 33:4;0
DAG 34:0;0
DAG 34:1;0
DAG 34:2;0
DAG 34:3;0
DAG 35:0;0
DAG 35:1;0
DAG 35:2;0
DAG 35:3;0
DAG 35:4;0
DAG 36:0;0
DAG 36:1;0
DAG 36:2;0
DAG 36:3;0
DAG 36:4;0
DAG 36:5;0
DAG 36:6;0
DAG 37:1;0
DAG 37:2;0
DAG 37:3;0
DAG 37:5;0
DAG 38:1;0
DAG 38:2;0
DAG 38:3;0
DAG 38:4;0
DAG 38:5;0
DAG 38:6;0
DAG 39:3;0
DAG 40:1;0
DAG 40:2;0
DAG 40:4;0
DAG 40:5;0
DAG 40:6;0
DAG 40:7;0
DAG 42:1;0
DAG 42:10;0
DAG 42:2;0
DAG 42:5;0
DAG 44:12;0


Cortex
Hippocampus
Rest
Wt
Fmr1-KO
Fmr1-KO+PHPeB
Fmr1-KO+Rh10
% total lipids
0
20
40
60
CE
DAG
PA
PC
PE
PG
PI
PS
SM
TAG


Age (weeks): 5 6-8 9 10 11 12 13 14 15 16
Group 4W
Injection AAVRh10 PHPeB
Monitoring /acclimatation
Circadian activity Plus Maze
Open field Grooming
Nesting NOR Marble burying
Social Recognition
Group 8W
Injection AAVRh10 PHPeB
Monitoring /acclimatation
Circadian activity Plus Maze
Open field Grooming
Nesting NOR Marble burying
Social Recognition

## Résultats supplémentaires : injections néonatales d'AAVrh10-ΔN-DGKκ

L'absence de FMRP à l'origine des anomalies moléculaires causant le syndrome de l'X Fragile arrive très tôt au cours du développement : les méthylations conduisant à l'extinction de la transcription de *FMR1* prennent place entre la 10ème et 13èmesemaine de gestation (Sutherland et al., 1991 ; Devys et al., 1992 ; Sutcliffe et al., 1992 ; Suzumori et al.,1993 ; Castellví-Bel et al., 1995 ; Willemsen et al., 2002 ; Shaked et Eiges, 2018). Les enfants atteints du FXS sont en moyenne diagnostiqués entre 2 et 3 ans, le retard de langage étant le premier symptôme alarmant présent chez la plupart des enfants porteurs de la mutation complète (Bailey et al., 2009 ; Hagerman et al., 2017). D'un point de vue thérapeutique, il apparait plus « simple » dans une maladie neurodéveloppementale d'éviter l'apparition de symptômes que de les corriger une fois présents, en effet les processus neurologiques fondamentaux (multiplication des synapses, mise en place des connexions synaptiques, communication cérébrale intra-structurale) à l'origine de nos capacités cognitives prennent naissance au cours du développement de l'enfant (West et Greenberg, 2011). C'est pourquoi, en parallèle de l'étude réalisée chez l'animal jeune adulte nous avons également testé l'expression de ΔN-DGKκ chez la souris au stade post-natal (P0). Pour ces expériences, nous avons respecté un timing maximum de 6h après la naissance, car l'expression de certains sérotypes viraux (AAV2 / 8 et 2/9) présente une biodistribution sensible au temps de l'injection. En effet, l'injection à P0 montre une transduction principalement neuronale, tandis que l'administration virale dans des périodes ultérieures de développement (24 à 84 heures après la naissance) montre une transduction non neuronale plus importante (Chakrabarty et al., 2013). Nous avons choisi les injections intra-cérébro-ventriculaires afin de pouvoir atteindre la totalité du SNC par la communication ventriculaire (Chakrabarty et al., 2013 ; Kim et al., 2013). Le vecteur AAVRh10-ΔN- DGKκ a été administré à des jeunes souris *Fmr1*-KO âgés de quelques heures (pups) à une dose de $4.10^{10}$ VG / ventricule. On observe dans les trois structures analysées, cortex, hippocampe et reste du cerveau, 16 semaines après l'injection (au lieu des 4 semaines normalement prévues en raison du confinement COVID-19) un faible titre viral (±1 VG/cell) et une faible expression protéique du transgène (**Fig. 1ABCD**). Seize semaines après les injections, une batterie de tests comportementaux a été réalisée sur les souris injectées AAV-Rh10-ΔN- DGKκ *Fmr1*-KO (noté *Fmr1*-AAV) et des souris contrôles de la portée WT ou *Fmr1*-KO injectés vehicule (Nacl 0,9% noté WT-S et *Fmr1*-S).

Les souris *Fmr1*-S ont montré une augmentation de près de deux fois du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe surélevé en croix (Elevated Plus Maze EPM) par rapport aux souris WT-S, suggérant une diminution de l'anxiété induite par le phénotype. Les souris *Fmr1*-AAV montrent quant à elles une diminution de cette anxiété encore plus marquée, indiquant une absence d'effet du traitement (**Fig.2A**). Les souris *Fmr1*-S ou Rh10-ΔN- DGKκ ont montré une activité locomotrice accrue par rapport aux souris WT-S, et on n'observe malheureusement pas d'effet du traitement sur ce phénotype d'hyperactivité non plus. Ce phénotype a été observé dans le test EPM (**Fig.2A**) nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés).

Concernant les tests de reconnaissance d'objet (NOR) (**Fig.2B**) et le test de reconnaissance sociale à trois chambres (**Fig. 2C**), on n'observe pas de phénotype dans les différentes phases des tests entre les souris WT-S et *Fmr1*-S ni entre les souris *Fmr1*-S et *Fmr1*-AAV. Aucune différence d'indice de reconnaissance n'a été observée dans le test NOR (**Fig. 2B**). Aucune conclusion ne peut donc être tirée de ces tests.

Les trois groupes de souris ne montrent aucune différence de phénotype concernant le test d'enfouissement des billes (test qui évalue un phénotype d'hyperactivité et / ou de stéréotypies) (**Fig.2D**), la forte variabilité de ces phénotypes entre les souris a empêché de tirer une conclusion. Concernant le test de nesting (capacité à faire un nid), les souris *Fmr1*-S montrent une capacité réduite à construire un nid après 5 et 24h. Les souris *Fmr1*-AAV n'ont pas montré de correction de ce phénotype (**Fig. 2E**). En ce qui concerne le macro-orchidisme ainsi que le poids des animaux, aucune différence n'a été observé dans les différents groupes (**Fig.3AB**).

Pour conclure, l'objectif premier de cette expérience était d'administrer ΔN-DGKκ par AAV directement à la naissance des animaux afin de tester la capacité du traitement à éviter que les symptômes ne se développent. Malheureusement, en raison de la difficulté à observer le phénotype initial entre souris WT-S et KO-S il est difficile de conclure sur un effet du traitement. Il est bien connu que le phénotype de la souris *Fmr1*-KO est assez variable et parfois très subtil. Cette expérience en est le reflet. Pour autant, même s'il serait intéressant de répéter cette expérience sur un plus grands nombre d'animaux, l'absence d'effet du traitement dans le test EPM suggère que la dose utilisée ici n'est pas suffisante pour avoir une correction suffisante. En effet les niveaux d'expression atteints avec les injections P0 sont comparables à celles obtenue avec l'AAV PHPe.B. L'utilisation d'une dose plus élevée de virus pourrait permettre de déterminer si l'administration de ΔN-DGKκ permet d'éviter l'apparition des symptômes FXS.

**Fig1.**

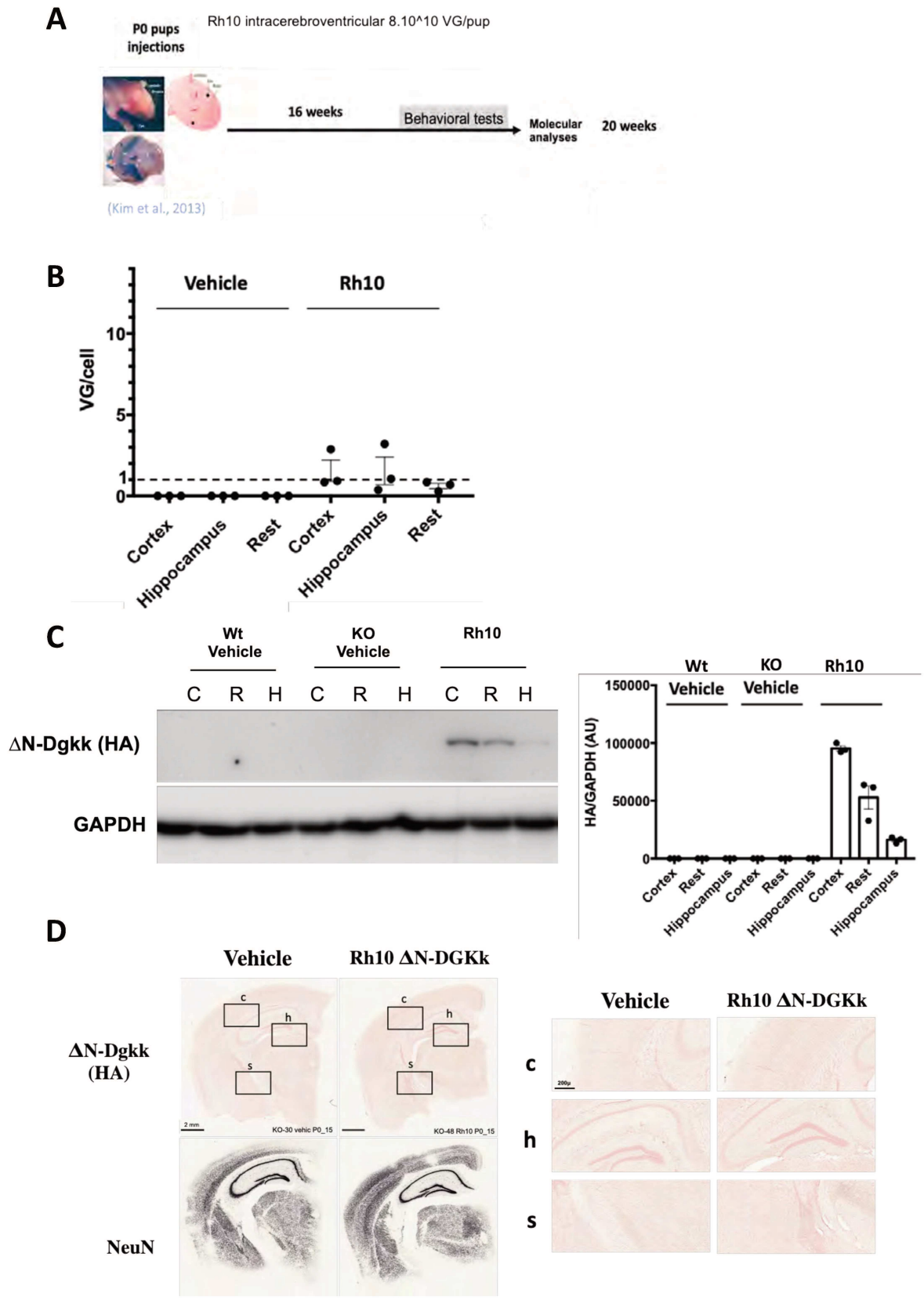
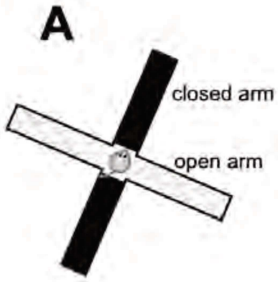
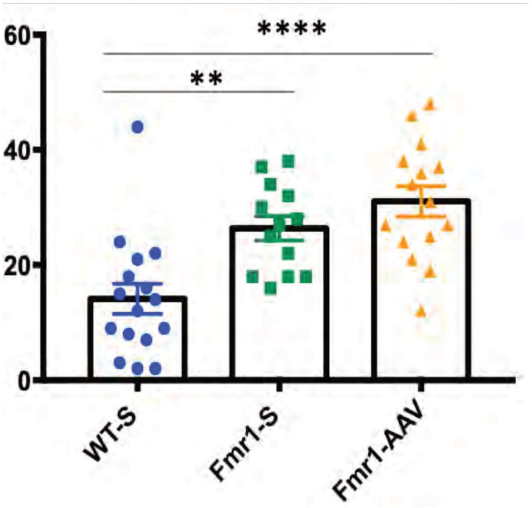

A
P0 pups injections
Rh10 intracerebroventricular 8.10^10 VG/pup
16 weeks
Behavioral tests
Molecular analyses
20 weeks
(Kim et al., 2013)
B
Vehicle
Rh10
VG/cell
10
5
1
0
Cortex
Hippocampus
Rest
Cortex
Hippocampus
Rest
C
Wt Vehicle
KO Vehicle
Rh10
C R H C R H C R H
ΔN-Dgkk (HA)
GAPDH
Wt
KO
Rh10
Vehicle
Vehicle
HA/GAPDH (AU)
150000
100000
50000
0
Cortex
Rest
Hippocampus
Cortex
Rest
Hippocampus
Cortex
Rest
Hippocampus
D
Vehicle
Rh10 ΔN-DGKk
ΔN-Dgkk (HA)
NeuN
c
h
s
KO-30 vehic P0_15
KO-48 Rh10 P0_15
Vehicle
Rh10 ΔN-DGKk
c
h
s

**Fig. 1 : ΔN-DGKk expression in vivo with AVV vectors.** **A)** Scheme of timeline analyses performed. **B)** Viral titers (viral genome copy VG per cell) determined by qPCR in cortical, hippocampal and rest of brain areas of Fmr1-KO mice treated with saline solution (Vehicle) or AAV-Rh10-ΔN-DGKk (Rh10) 16 weeks after injections. Data are mean ± SEM. Each dot represents an individual mouse. **C)** Immunoblots and quantification of ΔN-DGKk protein in lysates from brain areas of mice treated as in B. GAPDH was used as a loading control. Densitogram of ΔN-DGKk expression is presented as change relative to vehicle conditions. Data are mean ± SEM ($n$ = 5). **D)** Representative coronal brain sections processed for detection of ΔN-DGKk using immunohistochemistry on Fmr1-KO mice treated with indicated treatment, 16 weeks post-injections, counter stained with eosin hematoxylin. Adjacent sections were immunolabelled with NeuN. 3 mice per genotype were processed. The sections shown are between Bregma levels –1.50 mm and –1.80 mm. Scale bar is 2 mm. Magnifications of regions of cortex (c), hippocampus (h), and striatum (s) are shown in side panels, scale bar 200 µm.

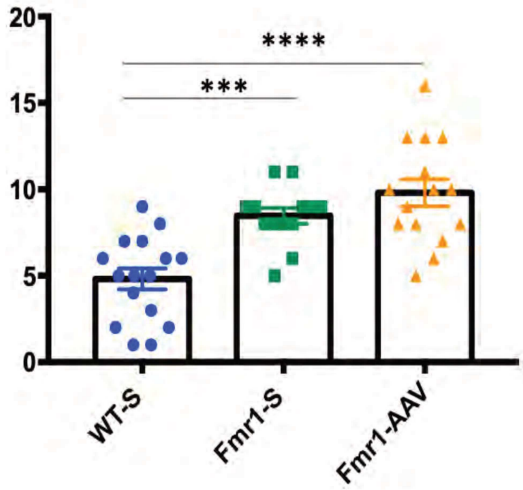
**Fig2.**



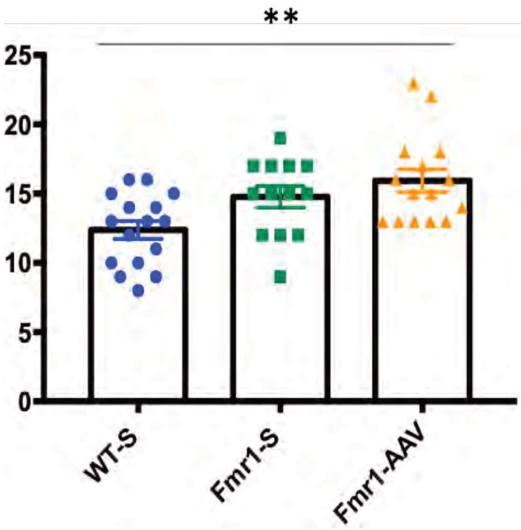

% Time in open arms




Open arm entries




Closed arm entries




Total arm entries

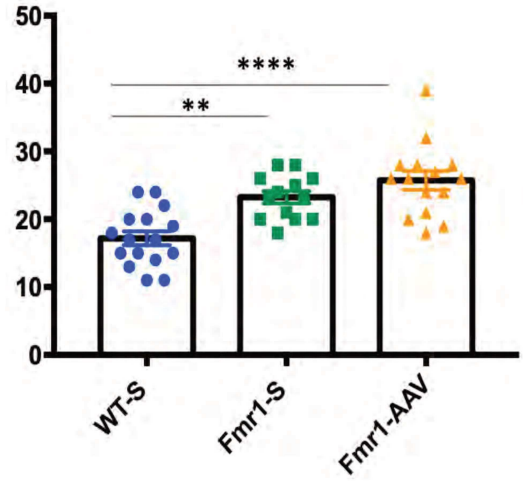
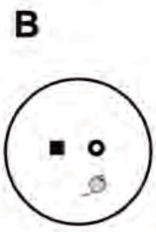
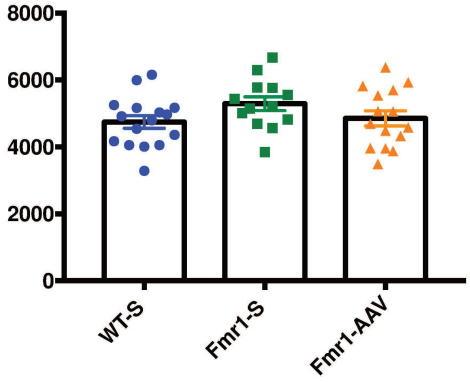


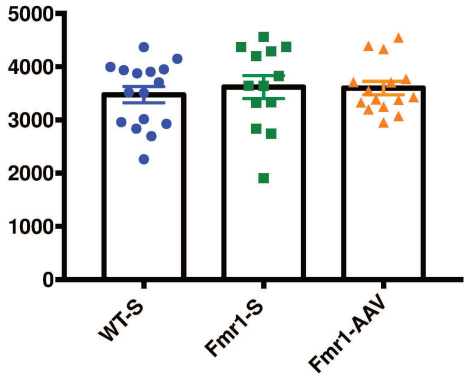
**Fig2.**



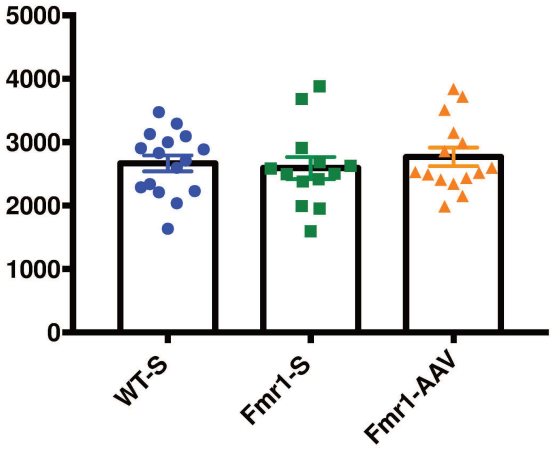

Habituation-Distance traveled



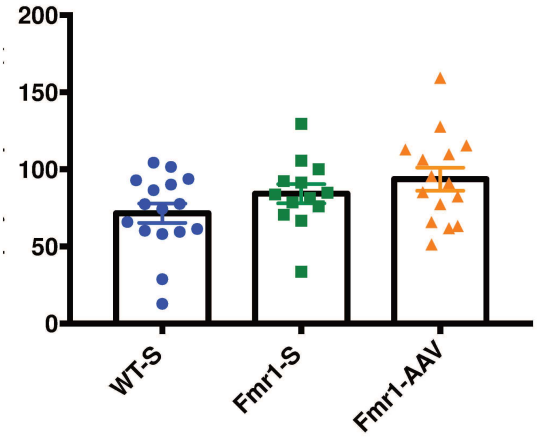

Acquisition-Distance traveled



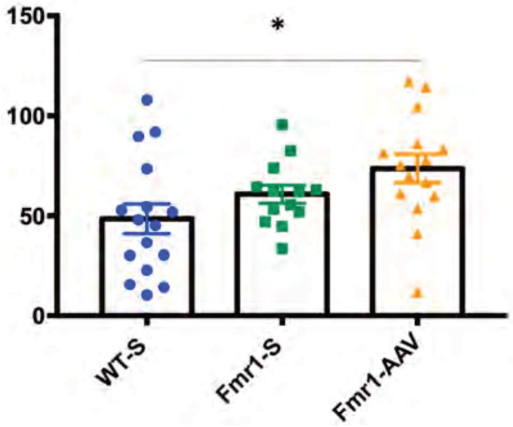

Retention-Distance traveled




Acq-Objects exploration




Ret-Objects exploration




Recognition index %

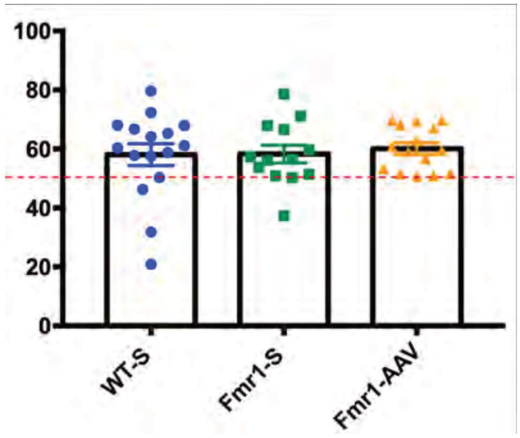
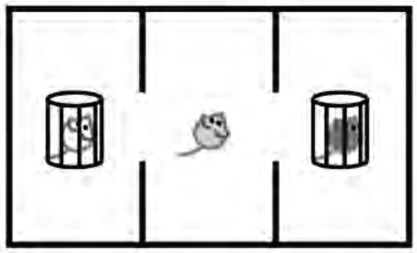
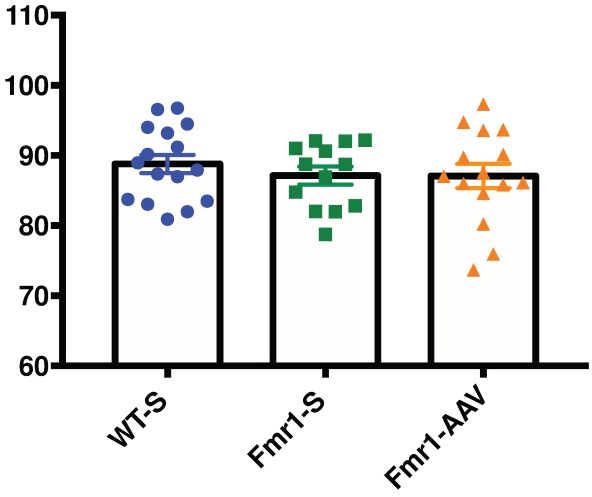


**Fig2.**

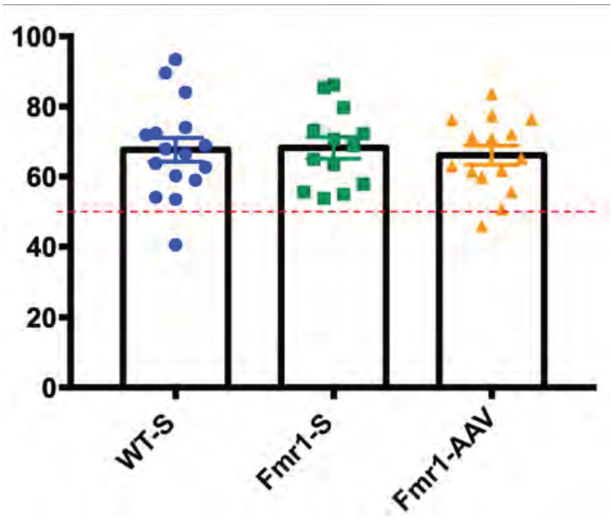
**C**



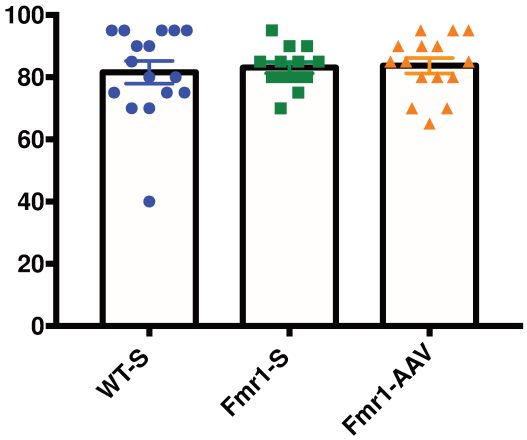
Social preference- sniffing duration %




Social memory- sniffing duration %




**D** % Buried marbles




**E** Nesting score

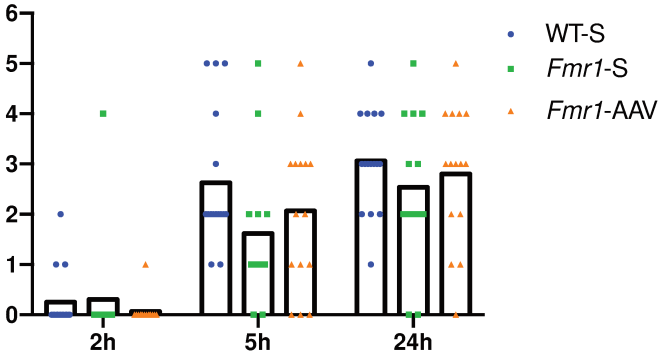
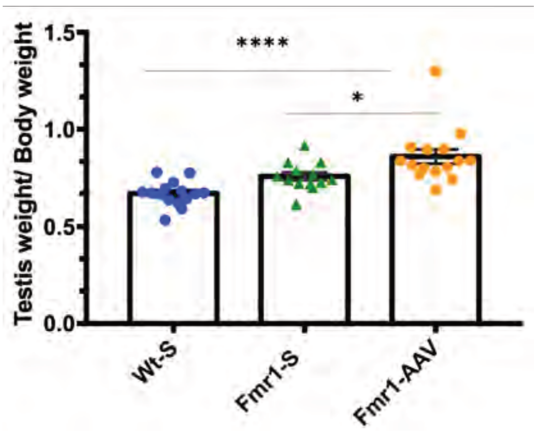


**Fig. 2 : Behavior analysis of *Fmr1*-KO mouse 16 weeks after injections. A)** Elevated Plus Maze. Percentage of time spent in open arms and number of entries in open, closed and total (open+closed) arms. **B)** Novel object recognition. Locomotor activity (distance) in the whole arena. Locomotor activity during the acquisition and retention trials. Object exploration during the acquisition and retention trials.Recognition index. **C)** Social recognition. Social preference (percentage of exploration of a congener vs an object) (center) and social memory (percentage of exploration of a novel vs familiar congener) (right). Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test and one group t-test. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs WT-S; # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 vs *Fmr1*-S; @ p<0.05, @@ p<0.01, @@@@ p<0.0001 vs chance (50%). **D)** Marble burying. **E)** Nest building. Scoring of nests at 2, 5 and 24h. 0-5 scale as described by Gaskill et al (2013): 0 = undisturbed nesting material; 1 = disturbed nesting material but no nest site; 2 = a flat nest without walls; 3 = a cup nest with a wall less than ½ the height of a dome that would cover a mouse; 4 = an incomplete dome with a wall ½ the height of a dome; 5 = a complete dome with walls taller than ½ the height of a dome, which may or may not fully enclose the nest. Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. * p<0.05 vs WT-S; # p<0.05 vs *Fmr1*-S; one group t-test. *p<0.05 vs WT-S, @@@ p<0.001, @@@@ p<0.0001 vs chance (50%); and $\chi 2$ test. *p<0.05 vs WT-S.

**Fig 3.**

**A**




**B**

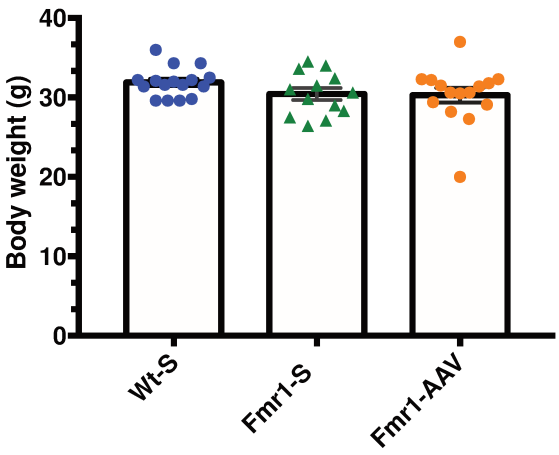



**Fig. 3 : A)** Macroorchidism of *Fmr1*-KO mouse 16 weeks after AAV-Rh10-ΔN-DGKk injections (testis weight/body weight). **B)** Body weight of *Fmr1*-KO mouse 16 weeks after AAV-Rh10-ΔN-DGKk injections**.** Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. * $p<0.05$ , ****$p<0.0001$.

## Discussion article 2

Une majorité des stratégies thérapeutiques tentées pour le FXS a ciblé le déséquilibre de la balance excitatrice / inhibitrice de la maladie principalement via les antagonistes de mGluR5 (mavoglurant ; basimglurant) ou les agonistes des GABA (agoniste de l'arbaclofen-$GABA_B$ ; agoniste de la ganaxolone-$GABA_A$). Malheureusement, jusqu'à présent aucun essai clinique n'a montré de succès probant et le FXS reste à ce jour une maladie sans traitement. La correction des phénotypes FXS observés chez la souris *Fmr1*-KO avec l'administration des AAV5- FMRP et AAV9- FMRP a fourni la première preuve de concept préclinique de l'approche de thérapie génique pour le FXS (Gholizadeh et al., 2014 ; Hampson et al., 2019). Cette étude a toutefois montré qu'un niveau d'expression inapproprié de FMRP pouvait aggraver les phénotypes FXS, peut-être dû au fait que FMRP, comme la plupart des protéines de liaison à l'ARN, entraîne un stress cellulaire lorsqu'elle est surexprimée (Mazroui et al., 2002). Par ailleurs dans ces études l'administration de FMRP par les AAV a été réalisée au stade néonatal et il demeurait inconnu si une telle administration pouvait être envisageable à un stade ultérieur, notamment une fois le développement achevé. Dans notre étude, nous avons montré que l'expression de l'enzyme DGKκ modifiée (ΔN- DGKκ) à l'aide d'une administration par le vecteur viral AAV-Rh10 à un stade post-adolescent (5 semaines) permet une correction des principaux déficits comportementaux dans le modèle de souris *Fmr1*-KO du FXS et avec un effet à long terme (plus de 8 semaines après injections). La délétion N-terminal de la protéine ΔN-DGKκ a préservé la capacité de l'enzyme à moduler la signalisation cellulaire tout en la rendant indépendante de FMRP, elle a également conservé la capacité à corriger les altérations comportementales de la souris *Fmr1*-KO adulte. Ces résultats mettent en évidence le rôle important joué par DGKk dans le mécanisme physiopathologique du FXS et suggèrent son utilisation possible en approche de thérapie génique. Avant un développement plus important de cette stratégie, plusieurs points peuvent être discutés.

### 1. Absence de toxicité des AAV-ΔN- DGKκ *in vitro*

Nos analyses de toxicités in vitro ont mis en évidence une absence de toxicité aiguë dans les cultures de neurones transduits avec les AAVrh10-ΔN-DGKκ et AAVrh10-ΔN-FMRP. En effet, on a observé qu'il n'y a pas de cellules apoptotiques à l'aide du marquage Caspase 3/7 contrairement au traitement à la staurosporine qui est agent proapoptotique. On n'a également observé aucun effet sur le relargage de la lactate déshydrogénase qui est un marqueur de

destruction membranaire et de mort cellulaire. Cependant, lorsque l'on analyse le pourcentage de cellules NeuN+ (neurones) et GFAP+ (cellules gliales), une légère baisse cellulaire peut être vue lorsque l'on traite à une concentration élevée pour les deux AAV. Nous pouvons tout de même préciser que cette potentielle toxicité semble être capside dépendante et non pas protéine dépendante car nous avons observé le même effet avec l'AAVrh10-FMRP. D'autre part, nous n'observons pas de diminution du nombre de noyaux, ce qui suggère qu'il n'y a pas de perte cellulaire, cela pourrait être expliqué par le seuil d'intensité de fluorescence fixé qui est trop élevé et qui ne permet pas de quantifier toutes les cellules NeuN. Cette hypothèse reste à confirmer en répétant ces expériences et en modifiant certains paramètres expérimentaux (modification du seuil d'intensité de fluorescence en imagerie, utilisation d'autre capside comme l'AAV9 …). Dans les mêmes conditions nous n'avons pas observé de toxicité dans les autres tests à cette dose ce qui suggère que les cellules entrent en apoptose mais ne meurent pas dans ce délai (une semaine après transduction). Une toxicité possible aux doses utilisées n'est donc pas à écarter. Il faut toutefois garder à l'esprit que la concentration utilisée *in vitro* de $1.10^{10}$ VG/puit de plaque 24 puits est extrêmement haute comparativement aux doses utilisées in vivo ($1.10^{11}$ à $5.10^{11}$ VG/souris)

## 2. Effet correcteur de l'AAVrh10-ΔN-DGKκ in vivo

Bien qu'aucune toxicité aiguë des virus n'ait été observée avec une expression élevée de ΔN-DGKκ dans les cultures de neurones et qu'aucune perte neuronale n'ait été observée après plusieurs semaines d'expression *in vivo*, une concentration suffisante de la protéine semble cependant nécessaire pour obtenir un effet. En effet, une faible efficacité de transduction cérébrale, comme celle obtenue avec le vecteur PHPe.B n'a pas été en mesure de fournir une correction visible malgré une expression cérébrale plus homogène qu'avec le Rh10 mais avec un titre viral (VG) 10 à 100 fois inférieur (selon les régions du cerveau) inférieur. Après vérification par qPCR du titre viral dans le foie des souris injectées PHPe.B, on observe le même titre viral que ce qui est présent dans le cerveau, cela prouve qu'il y a une perte du virus dans la circulation et pourrait expliquer cette diminution du titre viral par rapport au Rh10 et cette absence d'effet correcteur sur les phénotypes. Il serait donc intéressant de connaitre le niveau de protéine DGKκ nécessaire et suffisant pour un effet correcteur observable. Il serait également intéressant de connaitre à quelle valeur se situe le taux de protéine ΔN- DGKκ atteint par notre approche se situe par rapport au niveau de protéine endogène. Cette question demeure pour l'instant sans réponse car nous ne disposons pas de bon anticorps contre la protéine DGKκ

endogène chez la souris, et les anticorps anti-protéine humaine ne reconnaissent pas la protéine souris. D'après les observations faites chez l'homme (**Art 2. Fig. 1A**) le niveau de DGK est très faible. L'évaluation du niveau d'ARNm de DGKκ endogène dans le cerveau des souris *Fmr1*-WT et KO ainsi que le niveau d'ARN du transgène ΔN- DGKκ dans les souris *Fmr1*-KO traitées AAV, pourrait nous donner un ordre de grandeur du ratio entre endogène et transgène au niveau ARN mais ne reflètera sans doute pas les niveaux de protéine dont les niveaux d'expression varient fortement (en cellule Cos-1 on a observé une augmentation d'environ 100X entre DGKκ et ΔN- DGKκ avec un même niveau d'ARN). Cette analyse aura cependant l'intérêt d'établir un point de repère.

L'effet correcteur que nous avons observé sur le long-terme sans observer de toxicité apparente lorsqu'on cible le circuit cortex-hippocampe-striatum (à l'origine de la majeure partie des fonctions cognitives altérées dans le FXS) quand bien même la distribution de ΔN- DGKκ n'est pas homogène dans toutes les structures visées (et aussi dans une certaine mesure entre les animaux), semble indiquer une certaine tolérance vis-à-vis de la dose nécessaire et de la plasticité de la signalisation neuronale pour rétablir une homéostasie normale.

En ce qui concerne les injections néonatales, nous n'avons pas pu récapituler l'effet du traitement voulu (similaire à l'AAVrh10 chez l'adulte) sur les phénotypes d'hyperactivité et d'anxiété, le protocole reste à ajuster afin d'obtenir les conditions optimales (concentration du virus, protocole de phénotypage impacté par le confinement, à répéter). On ne peut pas exclure un effet au niveau moléculaire comme pour le PHPeB sur le déséquilibre lipidique, il serait donc intéressant d'effectuer ces analyses sur les cerveaux de souris injectées à P0. La complexité de cette étude réside dans le fait que nous avons une absence d'effet du génotype pour la plupart des tests comportementaux qui ne nous permet donc pas d'évaluer l'effet du traitement.

## 3. Conséquence sur les niveaux de lipides cérébraux (homéostasie DAG/PA)

Nos analyses des lipides cérébraux ont révélé une baisse du niveau de PA total dans le cortex des souris *Fmr1*-KO, en adéquation avec ce qui avait été montré dans les cultures de neurones activés (Tabet et al., 2016a), mais pas dans les autres régions du cerveau et pas de changement du DAG total. On aurait aimé voir une augmentation du DAG comme dans les cultures de neurones ou l'étude pioglitazone (Art 1 Fig. 4), cependant la variabilité observée ici

pour les différentes espèces de DAG et entre les animaux ne nous a pas permis de conclure. On a toutefois pu observer plusieurs sous-espèces DAG altérées (32:0:0 et 36:4:0 dans le cortex). De manière remarquable, le virus Rh10 ΔN-DGKκ corrige les principales altérations observées. Les plus remarquables sont celles de toutes les espèces majeures de PA corticaux, très touchées et toutes corrigées. L'absence d'effet sur les PA mineurs suggère un problème de sensibilité plutôt qu'une absence d'effet. De manière intéressante on a observé dans une certaine mesure une correction aussi avec le PHPe.B, ce qui suggère que le virus a dans une certaine mesure eu un effet compensatoire au niveau lipidique. De manière intéressante, aucune modification significative des niveaux de PA n'a été observée dans l'hippocampe. Ce qui suggérerait que la fonction de DGKκ s'exerce surtout dans le cortex et le reste du cerveau. Cependant, étonnamment, plusieurs espèces de DAG sont diminuées dans l'hippocampe des souris *Fmr1*-KO comparativement aux souris WT et le virus Rh10-ΔN- DGKκ est correcteur. Une seule espèce de DAG (36:4:0) a été trouvée augmentée dans le cortex et corrigée par le virus Rh10-ΔN- DGKκ. Ces données indiquent que l'homéostasie DAG/PA est altérée dans le cerveau des souris *Fmr1*-KO et ΔN- DGKκ a la capacité de rétablir cette homéostasie.

Des analyses électro-physiologiques (en cours, en collaboration avec le Dr. Manzoni, INMED, Marseille) et des voies de signalisations moléculaires (qui seront réalisées par moi-même après ma soutenance) retardées à cause du confinement compléteront cette étude.

## 4. Vers une thérapie génique pour les patients FXS ?

Avant d'envisager une application de thérapie génique chez des patients FXS, de nombreuses étapes sont encore nécessaires. D'autres études précliniques sur des modèles murins et d'autres modèles mammifères de grande taille seront sans doute indispensables. D'après Cheever et al., de bons modèles doivent être utilisés pour la preuve de concept et l'effet thérapeutique observés sur eux doit être robuste car la transposition de la thérapie génique chez l'homme donnera des résultats probablement moins efficaces en raison de la réponse immunitaire, de l'hétérogénéité de la population mais aussi de la distribution du virus. De plus, l'utilisation de grands mammifères sera indispensable pour confirmer le choix de la voie d'administration, l'accès chirurgical nécessaire et analyser la réaction immunitaire (Cheever et al., 2015). Suivant notre preuve de concept de thérapie génique avec l'AAV-ΔN-DGKκ, l'étape suivante serait l'étude de la toxicité *in vivo*. Cette étude serait réalisée avec une protéine humaine en excluant le tag HA et en utilisant deux doses de virus, une similaire à celle utilisée

dans nos essais chez la souris et une autre 10X supérieure. Les injections seraient effectuées chez d'autres mammifères avec des analyses histologiques des différents organes et de la biodistribution du vecteur.

De nombreuses questions subsistent pour l'utilisation d'une approche de thérapie génique chez des patients FXS :

- **Dose du vecteur** : à la dose utilisée dans notre étude ($1.10^{11}$ VG/souris équivalent à $3{,}3.10^{12}$ VG/kg), l'AAVrh10-ΔN-DGKκ transduit apparemment suffisamment de neurones dans les structures ciblées pour une correction des phénotypes (le pourcentage exact de neurones transduits reste à déterminer par un comptage HA+/NeuN). La question majeure qui se pose est de savoir si un tel taux de transduction peut être atteint chez les mammifères de grandes tailles ? Quelle dose sera nécessaire et suffisante chez les patients FXS afin d'observer un effet bénéfique du traitement ?
- **Voie d'administration optimale du vecteur** : les injections hippocampes-striatum sont celles qui nous ont fournies les meilleurs résultats dans notre étude, cependant ce type d'injection est-il envisageable chez l'homme ? La chirurgie qui en découle n'est-elle pas trop invasive ? Chez les primates, les injections IV sont validées comme étant efficaces dans de nombreuses régions du système nerveux. Chez l'homme les injections intraparenchymales en intra-cérébro-ventriculaire sont validées également comme étant efficaces (voies d'administration que nous avions testées dans notre étude pilote mais qui a été exclue car peu efficace pour atteindre les structures internes) (Janson et al., 2002)
- **Réponse immunitaire potentielle** : dans notre étude, nous montrons que les doses utilisées ne provoquent pas de toxicité, cependant les souris ne sont pas les animaux idéaux pour une étude de toxicité. Il serait important d'évaluer la séropositivité des patients avant traitement et prévoir une utilisation d'immunosuppresseurs dès le départ afin d'éviter une réaction immunitaire contre la capside et/ou le transgène.
- **Critères de sélection des patients pour la thérapie génique** : lors du développement d'un essai clinique, plusieurs critères d'inclusion et d'exclusion seront définis. Quels patients pourront bénéficier de ce traitement pour avoir un potentiel effet ? Quel devrait être l'âge des patients ainsi que le stade de développement de la maladie ? Serait-il possible d'évaluer l'effet thérapeutique sur des enfants ? Nous savons que la prévalence peut varier dans différents endroits du monde en raison des effets fondateurs ou des différences raciales ou ethniques dans les haplotypes qui pourraient prédisposer à l'expansion des CGG (des taux de prévalence plus

élevés ont été observés chez certains groupes ethniques, tels que les hommes afro-américains (1 sur 2500) et les juifs tunisiens, en Europe, la prévalence globale de cette maladie rare est estimée à 32,5 pour 100 000 habitants) (Vegter et al., 2010 ; Hagerman et al., 2017 ; www.orpha.net). Quelle population serait la plus représentative en termes d'hétérogénéité génétiques et cliniques, d'autant plus qu'il n'existe actuellement aucun biomarqueur sanguin validé pour évaluer la gravité de la maladie ou pour surveiller l'efficacité des traitements dans le FXS ?

- **Coûts et investissements pour les thérapies géniques** : Actuellement, les nombreux succès de thérapies géniques ont soulevé plusieurs questions concernant le coût de ces approches qui apparait comme un facteur limitant. En effet, à titre d'exemple, la première thérapie génique sur le marché pour soigner le déficit en lipoprotéine lipase, appelé GLYBERA coûtait 1 million d'euros et celle pour soigner l'ADA-SCID plus de 700.000 euros. Ces montants sont justifiés en partie par les coûts de la recherche en amont, des études cliniques ainsi que de la production des vecteurs, cependant ces thérapies sont uniques contrairement aux thérapies pharmacologiques qui elles ont un coût étendu tout au long de la vie du patient. Rappelons que le coût annuel médian par patient aux États-Unis varie de 2 222 $ à 9 702 $ (selon le type d'assurance et la fréquence d'hospitalisation). Dans l'UE, le coût annuel total moyen par patient FXS était de 28 441 €. En France, les estimations de la charge économique atteignent un coût total annuel par patient de 25 800 €. Les visites médicales représentaient près de la moitié (43%) des dépenses, tandis que les hospitalisations représentaient 34% et les médicaments, tests médicaux, dispositifs médicaux et transports les 23% restants (Chevreul et al., 2015 ; Sacco et al., 2013 ; Bailey et al., 2012 ; Musci et al., 2005).

Dans l'ensemble, la correction des phénotypes de la souris *Fmr1*-KO avec l'expression de ΔN-DGKκ dans les neurones renforce l'idée que le déséquilibre DAG / PA dans les neurones cérébraux est un facteur critique de la maladie et que ce déséquilibre peut être corrigé, y compris à un stade avancé du développement. Bien que l'utilisation de la thérapie génique pour une maladie comme le FXS apparaisse encore incertaine, ΔN-DGKκ pourrait cependant offrir un potentiel intéressant pour une telle approche, représentant une cible très spécifique et importante dans le mécanisme physiopathologique complexe de la maladie. La fonction précise de DGKκ dans la régulation des niveaux subtils de DAG et PA à travers les différentes régions du cerveau demeure clairement incomprise à ce jour et représentera un vrai défi pour les années à venir.

# Conclusions générales

A l'heure actuelle, aucun traitement n'existe pour soigner les patients atteints du syndrome de l'X Fragile, pour autant de nombreuses études ont permis de grandes avancées dans la compréhension du mécanisme physiopathologique de la maladie. Un grand nombre de traitements a déjà été envisagé incluant des molécules aussi diverses que des antagonistes NMDA (Acamprosate), des agonistes CB1/2 (Cannabidiol), des inhibiteurs de la voie Ras-ERK (AMO-01), des modulateurs GABA (SAGE-17) ou encore des activateurs de la voie PKC (Bryostation-1). Cette absence de traitement associé à la question du mécanisme physiopathologique sous-jacent à la maladie que partiellement compris, nous a conduit à tester deux nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre de mon projet de thèse. Ces stratégies ont été suggérées par la découverte par notre équipe de DGKκ comme une cible proposée majeure de FMRP et l'hypothèse que la dérégulation de cette enzyme constitue une cible physiopathologique importante dans le syndrome de l'X Fragile. Ces deux stratégies (pharmacologique avec la pioglitazone et thérapie génique avec un AAVs exprimant une forme modifiée de DGKκ, ΔN-DGKκ) appliquées dans le modèle murin *Fmr1*-KO, nous ont toutes deux donné des résultats très encourageants. La correction des altérations cellulaires et comportementales majeures dans ce modèle ouvre des perspectives importantes pour aboutir enfin à la compréhension complète des mécanismes moléculaires du FXS et avancer vers un traitement attendu depuis si longtemps. (Améliorer les conditions de vie des patients et pourquoi pas obtenir une guérison seraient de très beaux objectifs et des défis passionnants pour les communautés scientifiques et médicales.)

# Bibliographie


Abekhoukh, S. & Bardoni, B. CYFIP family proteins between autism and intellectual disability: Links with fragile X syndrome. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–9 (2014).

Abekhoukh, S. et al. New insights into the regulatory function of CYFIP1 in the context of WAVE- and FMRP-containing complexes. DMM Dis. Model. Mech. **10**, 463–474 (2017).

Abitbol, M. *et al*. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat. Genet*., **4**, 147-153 (1993).

Ackermann, M. & Matus, A. Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat. Neurosci.* **6**, 1194–1200 (2003).

Adachi, N. *et al.* Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase β and γ in the developing rat brain. *Mol. Brain Res.* **139**, 288–299 (2005).

Agbandje-McKenna & Kleinschmidt.*AAV Capsid Structure and Cell Interactions*. *Methods in Molecular Biology* .**807**, (2011).

Agulhon, C. et al. "Expression of *FMR1*, FXR1 and FXR2 genes in human prenatal tissues." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **58**: 867-880 (1999).

Ahmad, M., Xu, D. & Wang, W. Type IA topoisomerases can be “magicians” for both DNA and RNA in all domains of life. RNA Biol. **14**, 854–864 (2017).

Akins, M. R. *et al.* Axonal ribosomes and mRNAs associate with fragile X granules in adult rodent and human brains. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 192–209 (2017).

Akins, M. R., Leblanc, H. F., Stackpole, E. E., Chyung, E. & Fallon, J. R. Systematic mapping of fragile X granules in the mouse brain reveals a potential role for presynaptic FMRP in sensorimotor functions. *J. Comp. Neurol.* **520**, 3687–3706 (2012).

Alanay, Y. *et al.* A multidisciplinary approach to the management of individuals with fragile X syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* **51**, 151–161 (2007).

Albers C. A. & Grieve, A. J. Test Review: Bayley, N. (2006). Bayley Scales of Infant and Toddler Development– Third Edition. San Antonio, TX: Harcourt Assessment. *J. Psychoeduc. Assess.* **25**, 180–190 (2007).

Alberti, S., Gladfelter, A. & Mittag, T. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* **176**, 419–434 (2019).

Almasi-Nasrabadi, M. *et al.* Involvement of NMDA receptors in the beneficial effects of pioglitazone on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Behav. Brain Res.* **231**, 138–145 (2012).

Almasi-Nasrabadi, M. *et al.* Involvement of NMDA receptors in the beneficial effects of pioglitazone on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Behav. Brain Res.* 231, 138–145 (2012).

Almena, M. & Mérida, I. Shaping up the membrane: Diacylglycerol coordinates spatial orientation of signaling. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 593–603 (2011).

Alpatov, R. *et al.* A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell* **157**, 869–881 (2014).

Altman-Hamamdzic, S. *et al.* Expression of β-galactosidase in mouse brain: Utilization of a novel nonreplicative Sindbis virus vector as a neuronal gene delivery system. *Gene Ther.* **4**, 815–822 (1997).

Alvarez-Mora, M. I. *et al.* Impaired Mitochondrial Function and Dynamics in the Pathogenesis of FXTAS. *Mol. Neurobiol.* **54**, 6896– 1. 6902 (2017).
Anastasiadou, E *et al.* Non-coding RNA networks in cancer.*Nat.Rev.Cancer.* **176**, 139–148(2019).

Anderson, B. R., Chopra, P., Suhl, J. A., Warren, S. T. & Bassell, G. J. Identification of consensus binding sites clarifies FMRP binding determinants. *Nucleic Acids Res.* **44**, 6649–6659 (2016).

Anderson, P. & Kedersha, N. Visibly stressed: The role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* **7**, 213–221 (2002).

Annessa, I. D., Cicconardi, F. & Di, D. Handling FMRP and its molecular partners: Structural insights into Fragile X Syndrome. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* (2018).

Antar, L. N., Afroz, R., Dictenberg, J. B., Carroll, R. C. & Bassell, G. J. Metabotropic Glutamate Receptor Activation Regulates Fragile X Mental Retardation Protein and *Fmr1* mRNA Localization Differentially in Dendrites and at Synapses. *J. Neurosci.* **24**, 2648–2655 (2004).

Antar, L. N., Dictenberg, J. B., Plociniak, M., Afroz, R. & Bassell, G. J. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes, Brain Behav.* **4**, 350–359 (2005).

Antar, L. N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R. C. & Bassell, G. J. Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* **32**, 37–48 (2006).

Apartis, E. *et al.* New insights and the need for revised diagnostic criteria. *Neurology* **79**, 1898–1907 (2012).

Arsenault, J. *et al.* FMRP Expression Levels in Mouse Central Nervous System Neurons Determine Behavioral Phenotype. *Hum. Gene Ther.* **27**, 982–996 (2016).

Asamitsu, S., Takeuchi, M., Ikenoshita, S. & Imai, Y. Perspectives for Applying G-Quadruplex Structures in Neurobiology and Neuropharmacology. 1–15 (2019).

Ascano, M. *et al*. *FMR1* targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature*.492(7429): 382–386 (2012).

Ashley, C. T. et al. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. Nat. Genet. **4**, (1993a).

Ashley, C. T., Wilkinson, K. D., Reines, D. & Warren, S. T. *FMR1* protein: Conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science (80).* **262**, 563–566 (1993b).

Ashwood, P. et al. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome.*Brain Behav. Immun*.**25**, 40–45 (2012).

Ashwood, P. et al. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome.*Brain Behav. Immun*.25, 40–45 (2012).

Asiminas, A. *et al.* Sustained correction of associative learning deficits after brief, early treatment in a rat model of Fragile X Syndrome. *Sci. Transl. Med.* **11**, 1–11 (2019).

Asokan, A., Schaffer, D. V. & Samulski, R. J. The AAV vector toolkit: Poised at the clinical crossroads. *Mol. Ther.* **20**, 699–708 (2012).

Athar, Y. M. & Joseph, S. RNA-Binding Specificity of the Human Fragile X Mental Retardation Protein. *J. Mol. Biol.* **432**, 3851–3868 (2020).

Ayloo, S., Guedes-Dias, P., Ghiretti, A. E. & Holzbaur, E. L. F. Dynein efficiently navigates the dendritic cytoskeleton to drive the retrograde trafficking of BDNF/TrkB signaling endosomes. *Mol. Biol. Cell* **28**, 2543–2554 (2017).

Bagni, C. & Zukin, R. S. Review A Synaptic Perspective of Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. *Neuron* **101**, 1070–1088 (2019).

Bailey, D. B. *et al.* Health and economic consequences of fragile X syndrome for caregivers. *J. Dev. Behav. Pediatr.* **33**, 705–712 (2012).

Bakker, C. E. et al. Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. Exp. Cell Res. **258**, 162–170 (2000).

Banko, J. L., Hou, L., Poulin, F., Sonenberg, N. & Klann, E. Regulation of eukaryotic initiation factor 4E by converging signaling pathways during metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci.* **26**, 2167–2173 (2006).

Bardoni, B. et al. 82-FIP, a novel FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) interacting protein, shows a cell cycle-dependent intracellular localization. Hum. Mol. Genet. **12**, 1689–1698 (2003b).

Bardoni, B. et al. NUFIP1 (Nuclear FMRP Interacting Protein 1) is a nucleocytoplasmic shuttling protein associated with active synaptoneurosomes. Exp. Cell Res. **289**, 95–107 (2003a).

Bardoni, B. *et al.*Assignment of NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) gene to chromosome 13q14 and assignment of a pseudogene to chromosome 6q12 ( 2000).

Bardoni, B., Schenck, A. & Mandel, J. L. A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (*FMR1*) protein. Hum. Mol. Genet. **8**, 2557–2566 (1999).

Bardoni, B., Schenck, A. & Mandel, J. L. The Fragile X mental retardation protein. Brain Res. Bull. **56**, 375–382 (2001).

Bardoni, B., Sittler, A., Shen, Y. & Mandel, J. L. Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein. Neurobiol. Dis. **4**, 329–336 (1997).

Bartlett, J. S., Samulski, R. J. & McCown, T. J. Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1181–1186 (1998).

Bartley, C. M. *et al.* Mammalian FMRP S499 is phosphorylated by CK2 and promotes secondary phosphorylation of FMRP. *eNeuro* **3**, 1–16 (2016).

Bartley, C. M., O'Keefe, R. A. & Bordey, A. FMRP S499 is phosphorylated independent of mTORC1-S6K1 activity. *PLoS One* **9**, (2014).

Bassell, G.J. *et al.* Fragile X Syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function. *Neuron*. 60(2): 201–214 (2008).

Baum, A. E. *et al.* A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **13**, 197–207 (2008).

Bayley, N. (2006). Bayley Scales of Infant and Toddler Development– Third Edition. San Antonio, TX: Harcourt Assessment. *J. Psychoeduc. Assess.* **25**, 180–190 (2007).

Bear, M. F. & Malenka, R. C. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 389–399 (1994).

Bear, M. F., Huber, K. M. & Warren, S. T. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* **27**, 370–377 (2004).

Bechara, E. G. et al. A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. PLoS Biol. **7**, (2009).

Beggs, J. E. et al. The MAP kinase-interacting kinases regulate cell migration, vimentin expression and eIF4E/CYFIP1 binding. Biochem. J. **467**, 63–76 (2015).

Belur, L. R. *et al.* Intravenous delivery for treatment of mucopolysaccharidosis type I: A comparison of AAV serotypes 9 and rh10. *Mol. Genet. Metab. Reports* **24**, 100604 (2020).

Bernardet, M. & Crusio, W. E. *Fmr1* KO mice as a possible model of autistic features. *ScientificWorldJournal.* **6**, 1164–1176 (2006).

Bernardet, M. & Crusio, W. E. *Fmr1* KO mice as a possible model of autistic features. *ScientificWorldJournal.* **6**, 1164–1176 (2006).

Berzhanskaya, J. *et al.* Disrupted Cortical State Regulation in a Rat Model of Fragile X Syndrome. *Cereb. Cortex* **27**, 1386–1400 (2016).

Bessis, N., GarciaCozar, F. J. & Boissier, M. C. Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* **11**, S10–S17 (2004).

Bey, K. *et al.* Intra-CSF AAV9 and AAVrh10 Administration in Nonhuman Primates: Promising Routes and Vectors for Which Neurological Diseases? *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **17**, 771–784 (2020).

Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I. & Filipowicz, W. Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress. *Cell* **125**, 1111–1124 (2006).

Biferi, M. G. *et al.* A New AAV10-U7-Mediated Gene Therapy Prolongs Survival and Restores Function in an ALS Mouse Model. *Mol. Ther.* **25**, 2038–2052 (2017).

Bishop, D. V. M. Which neurodevelopmental disorders get researched and why? *PLoS One* **5**, (2010).

Björklund, T. Chapter 3 Expression of Multiple Functional RNAs. **1382**, 41–56 (2016).

Blackwell, E., Zhang, X. & Ceman, S. Arginines of the RGG box regulate FMRP association with polyribosomes and mRNA. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1314–1323 (2010).

Bledsoe, A. W., Jackson, C. A., Mcpherson, S. & Morrow, C. D. Cytokine production in motor neurons by poliovirus replicon vector gene delivery. *Nat. Biotechnol.* **18**, 964–969 (2000).

Blonden, L. *et al.* Two members of the Fxr gene family, *Fmr1* and Fxr1, are differentially expressed in Xenopus tropicalis. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 437–442 (2005).

Bockstael, O. *et al.* Rapid transgene expression in multiple precursor cell types of adult rat subventricular zone mediated by adeno-associated type 1 vectors. *Hum. Gene Ther.* **23**, 742–753 (2012).

Boda, B., Nikonenko, I., Alberi, S. & Muller, D. Central nervous system functions of PAK protein family: From spine morphogenesis to mental retardation. *Mol. Neurobiol.* **34**, 67–80 (2006).

Boivin, M., Willemsen, R., Hukema, R. K. & Sellier, C. Potential pathogenic mechanisms underlying Fragile X Tremor Ataxia Syndrome: RAN translation and/or RNA gain-of-function? *Eur. J. Med. Genet.* **61**, 674–679 (2018).

Bokoch, G. M. Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 743–781 (2003).

Bontekoe, C. J. M. Knockout mouse model for Fxr2: a model for mental retardation. Hum. Mol. Genet. **11**, 487–498 (2002).

Boris, M. *et al.* Effect of pioglitazone treatment on behavioral symptoms in autistic children. *J. Neuroinflammation* **4**, 1–7 (2007).

Boris, M. *et al.* Effect of pioglitazone treatment on behavioral symptoms in autistic children. *J. Neuroinflammation* 4, 1–7 (2007).

Boulon, S. et al. The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. J. Cell Biol. **180**, 579–595 (2008).

Boyle, L. & Kaufmann, W. E. The behavioral phenotype of *FMR1* mutations. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* **154**, 469–476 (2010).

Braat, S. & Kooy, R. F. Fragile X syndrome neurobiology translates into rational therapy. *Drug Discov. Today* **19**, 510–519 (2014).

Braat, S. & Kooy, R. F. The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* **86**, 1119–1130 (2015).

Brackett, D. M. *et al. Fmr1* Transcript Isoforms: Association with Polyribosomes; Regional and Developmental Expression in Mouse Brain. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).

Bradbury, A. M. *et al.* AAVrh10 Gene Therapy Ameliorates Central and Peripheral Nervous System Disease in Canine Globoid Cell Leukodystrophy (Krabbe Disease). *Hum. Gene Ther.* **29**, 785–801 (2018).

Brami, B. A., Leli, U. & Hauser, G. Elevated Phosphatidyl-CMP Is Not the Source of Diacylglycerol Accumulation Induced by Lithium in NG108-15 Cells. *J. Neurochem.* **60**, 1137–1142 (1993).

Brengues, M., Teixeira, D. & Parker, R. Cell biology: Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science (80).* **310**, 486–489 (2005).

Brouwer, JR. *et al.* Elevated *Fmr1* mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. *Experimental Cell Research* **313**:244-253 (2007).

Brown, V. *et al.* Microarray Identification of FMRP-Associated Brain mRNAs and Altered mRNA Translational Profiles in Fragile X Syndrome Howard Hughes Medical Institute Department of Human Genetics FMRP is largely cytoplasmic, incorporated into large messenger-ribonucleopr. *Cell* **107**, 477–487 (2001).

Bruno, J. L. *et al.* Altered Brain Network Segregation in Fragile X Syndrome Revealed by Structural Connectomics. *Cereb. Cortex* **27**, 2249–2259 (2017).

Buchan, J. R. & Stansfield, I. Halting a cellular production line: responses to ribosomal pausing during translation. *Biol. Cell* **99**, 475–487 (2007).

Buffington, S.A. *et al*. Translational Control in Synaptic Plasticity and Cognitive Dysfunction. *Annu Rev Neurosci* .37: 17–38 (2014).

Buijsen, R. A. M. *et al.* FMRpolyG-positive inclusions in CNS and non-CNS organs of a fragile X premutation carrier with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 1–5 (2014).

Bunting, M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. & Prescott, S. M. Molecular cloning of a novel human diacylglycerol kinase highly selective for arachidonate-containing substrates. *J. Biol. Chem.* **271**, 10237–10241 (1996).

Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K. & Neidle, S. Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure. Nucleic Acids Res. **34**, 5402–5415 (2006).

Burger, C. *et al.* Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol. Ther.* **10**, 302–317 (2004).

Busquets-Garcia, A. *et al.* Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nat. Med.* **19**, 603–607 (2013).

Buxbaum, A.R. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat Rev Mol Cell Biol*.16(2): 95–10 (2015).

Caberlotto, L. *et al.* Differential expression of NPY and its receptors in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 1564–1569 (2001).

Cai, J., Abramovici, H., Gee, S. H. & Topham, M. K. Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 942–948 (2009).

Cajigas, I. J. *et al.* The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. *Neuron* **74**, 453–466 (2012).

Calabrese, B. & Halpain, S. Essential role for the PKC target MARCKS in maintaining dendritic spine morphology. *Neuron* **48**, 77–90 (2005).

Calcedo, R. *et al.* Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 1586–1588 (2011).

Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J. M. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J. Infect. Dis.* **199**, 381–390 (2009).

Capano, L. *et al.* A pilot dose finding study of pioglitazone in autistic children. *Mol. Autism* **9**, 1–14 (2018).

Capano, L. *et al.* A pilot dose finding study of pioglitazone in autistic children. *Mol. Autism*.9, 1–14 (2018).

Caroni, P., Donato, F. & Muller, D. Structural plasticity upon learning: Regulation and functions. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 478–490 (2012).

Carrel, T. L. et al. Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. J. Neurosci. **26**, 11014–11022 (2006).

Cartier, N. *et al.* Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science (80).* **326**, 818–823 (2009).

Castellví-Bel, S. *et al.* Prenatal diagnosis of fragile x syndrome: (cgg)n expansion and methylation of chorionic villus samples. *Prenat. Diagn.* **15**, 801–807 (1995).

Castle, J. C. et al. Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. Nat. Genet. **40**, 1416–1425 (2008).

Castle, M.J. *et al*. Controlling AAV Tropism in the Nervous System with Natural and Engineered Capsids Michael. *Methods Mol Biol.* 1382: 133–149 (2016).

Caudy, A. A., Myers, M., Hannon, G. J. & Hammond, S. M. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* **16**, 2491–2496 (2002).

Cavallaro, S. et al. Genes and pathways differentially expressed in the brains of Fxr2 knockout mice. Neurobiol. Dis. **32**, 510–520 (2008).

Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science (80).* **288**, 669–672 (2000).

Cearley, C. N. & Wolfe, J. H. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* **13**, 528–537 (2006).

Ceman, S. *et al.* Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 3295–3305 (2003).

Ceman, S., Brown, V. & Warren, S. T. Isolation of an FMRP-Associated Messenger Ribonucleoprotein Particle and Identification of Nucleolin and the Fragile X-Related Proteins as Components of the Complex. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7925–7932 (1999).

Chakrabarty, P. *et al.* Capsid Serotype and Timing of Injection Determines AAV Transduction in the Neonatal Mice Brain. *PLoS One* **8**, 0–8 (2013).

Chamberlin, N. L., Du, B., De Lacalle, S. & Saper, C. B. Recombinant adeno-associated virus vector: Use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res.* **793**, 169–175 (1998).

Chan, K. Y. *et al.* Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. *Nat. Neurosci.* **20**, 1172–1179 (2017).

Chang, S. *et al.* Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in Drosophila. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 256–263 (2008).
Chaturvedi, R. K. & Beal, M. F. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic. Biol. Med.* **63**, 1–29 (2013).

Chaytow, H., Huang, Y. T., Gillingwater, T. H. & Faller, K. M. E. The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 3877–3894 (2018).

Cheever, T. R. *et al.* Perspectives on Best Practices for Gene Therapy Programs. *Hum. Gene Ther.* **26**, 127–133 (2015).

Chen, L., Yun, S. W., Seto, J., Liu, W. & Toth, M. The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing u rich target sequences. *Neuroscience* **120**, 1005–1017 (2003).

Chen, S.*et al.* Maternal autoimmune diseases and the risk of autism spectrum disorders in offspring: A systematic review and meta-analysis. *Behav. Brain Res.* **296**, 61–69 (2016).

Chevreul, K., Berg Brigham, K., Durand-Zaleski, I. & Hernández-Quevedo, C. Health Systems in Transition (17/3). World Health Organization, on behalf of the European Observatory on Health Systems and Policies. *Heal. Syst. Rev.* 1–218 (2018).

Chianese, R. *et al.* Impact of Dietary Fats on Brain Functions. *Curr. Neuropharmacol.* **16**, 1059–1085 (2017).

Chiurazzi, P. & Pirozzi, F. Advances in understanding - genetic basis of intellectual disability. *F1000Research* **5**, 1–16 (2016).

Choudhury, S. R. *et al.* Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology*.01; 120: 63–80 (2017).

Christie, S. B., Akins, M. R., Schwob, J. E. & Fallon, J. R. The FXG: A presynaptic Fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. *J. Neurosci.* **29**, 1514–1524 (2009).

Chu, J. F., Majumder, P., Chatterjee, B., Huang, S. L. & Shen, C. K. J. TDP-43 Regulates Coupled Dendritic mRNA Transport-Translation Processes in Co-operation with FMRP and Staufen1. *Cell Rep.* **29**, 3118-3133.e6 (2019).

Chuang, S. C. *et al.* Prolonged epileptiform discharges induced by altered group I metabotropic glutamate receptor-mediated synaptic responses in hippocampal slices of a fragile X mouse model. *J. Neurosci.* **25**, 8048–8055 (2005).

Chyung, E., Leblanc, H. F., Fallon, J. R. & Akins, M. R. cargos. **526**, 96–108 (2019).

Ciaccio, C. *et al.* Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. *Ital. J. Pediatr.* **43**, 1–12 (2017).

Cloutier, P. & Coulombe, B. New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? Biochem. Cell Biol. **88**, 211–221 (2010).

Coffee, B., Zhang, F., Ceman, S., Warren, S. T. & Reines, D. Histone Modifications Depict an Aberrantly Heterochromatinized *FMR1*. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 923–932 (2002).
Coffee, B., Zhang, F., Warren, S. T. & Reines, D. Acetylated histones are associated with *FMR1* in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat. Genet.* **22**, 98–101 (1999).

Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G. & Wang, Y. T. Long-term depression in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 459–473 (2010).

Collins, S. C. *et al.* Large-scale neuroanatomical study uncovers 198 gene associations in mouse brain morphogenesis. *Nat. Commun.* **10**, 1–12 (2019).

Colón-González, F. & Kazanietz, M. G. C1 domains exposed: From diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 827–837 (2006).

Colón-González, F. & Kazanietz, M. G. C1 domains exposed: From diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 827–837 (2006).

Conn, P. J. & Pin, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205–237 (1997).

Cordelier, P. & Strayer, D. S. Conditional expression of α1-antitrypsin delivered by recombinant SV40 vectors protects lymphocytes against HIV. *Gene Ther.* **10**, 2153–2156 (2003).

Cory, G. O. C. & Ridley, A. J. Braking WAVEs. Nature **418**, 732–733 (2002).

Cotticelli, M. *et al.* Ferroptosis as a novel therapeutic target for Friedreich's ataxia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **369**, 47–54 (2019).

Cougot, N. *et al.* Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J. Neurosci.* **28**, 13793–13804 (2008).

Cowley, B., Kirjanen, S., Partanen, J. & Castrén, M. L. Epileptic Electroencephalography Profile Associates with Attention Problems in Children with Fragile X Syndrome: Review and Case Series. *Front. Hum. Neurosci.* **10**, 1–8 (2016).

Curia, G., Papouin, T., Séguéla, P. & Avoli, M. Downregulation of tonic GABAergic inhibition in a mouse model of fragile X syndrome. *Cereb. Cortex* **19**, 1515–1520 (2009).

D'Annessa, I., Cicconardi, F. & Di Marino, D. Handling FMRP and its molecular partners: Structural insights into Fragile X Syndrome. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **141**, 3–14 (2019).

D'Hulst, C. & Kooy, R. F. The GABAA receptor: a novel target for treatment of fragile X? *Trends Neurosci.* **30**, 425–431 (2007).

D'Souza,H.,&Karmiloff Smith,ANeurodevelopmentaldisorders. *Wiley Interdisciplinar Reviews: Cognitive Science*, *8*(1-2) (2017).
Dahlhaus, R. Of men and mice: modeling the fragile X syndrome. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–38 (2018).

Dankner, R. & Roth, J. More recent, better designed studies have weakened links between antidiabetes medications and cancer risk. *Diabet. Med.* **37**, 194–202 (2020).

Darnell, J. C. Defects in translational regulation contributing to human cognitive and behavioral disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 465–473 (2011).

Darnell, J. C. *et al.* FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. **146**, 247–261 (2011).

Darnell, J. C. *et al.* FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. **146**, 247–261 (2011).

Darnell, J. C. *et al.* Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **107**, 489–499 (2001).

Darnell, J. C. et al. Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. Genes Dev. **19**, 903–918 (2005).

Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O. & Darnell, R. B. Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3164–3177 (2009).

Davidovic, L. *et al.* The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 3047–3058 (2007).

Davidovic, L. et al. The nuclear MicroSpherule protein 58 is a novel RNA-binding protein that interacts with fragile X mental retardation protein in polyribosomal mRNPs from neurons. Hum. Mol. Genet. **15**, 1525–1538 (2006).

Davidovic, L., Huot, M. E. & Khandjian, E. W. Lost once, the Fragile X Mental Retardation protein is now back onto brain polyribosomes. RNA Biol. **2**, 1–3 (2005).

Davis, J. K. & Broadie, K. Multifarious Functions of the Fragile X Mental Retardation Protein Overview of Expanding FMRP Functions. **33**, 703–714 (2018).

Dawson, G. Measuring Brain Lipids HHS Public Access. *Biochim Biophys Acta* **1851**, 1026–1039 (2015).

Daya, S. & Berns, K. I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 583–593 (2008).

De Boulle, K. *et al.* A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat. Genet.* **3**, 31–35 (1993).

de Vrij, F. M. S. *et al.* Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in *Fmr1* KO mice. *Neurobiol. Dis.* **31**, 127–132 (2008).

Delerue, T. *et al.* A yeast-based screening assay identifies repurposed drugs that suppress mitochondrial fusion and mtDNA maintenance defects. *DMM Dis. Model. Mech.* **12**, 1–9 (2019).

den Broeder, M. J. *et al.* Generation and characterization of *Fmr1* knockout zebrafish. *PLoS One* **4**, 2–7 (2009).

Deng, J. & Dunaevsky, A. Delayed Development of Dendritic Spines in Fxr2 Knockout Mouse. *Open Neurosci. J.* **3**, 148–153 (2009).

Denman, R. B. Volume 7, (2002) pp 877 – 883. **7**, 877–883 (2002).

Denman, R. B., Dolzhanskaya, N. & Sung, Y. J. Regulating a translational regulator: Mechanisms cells use to control the activity of the fragile X mental retardation protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1714–1728 (2004).

Derivery, E., Lombard, B., Loew, D. & Gautreau, A. The wave complex is intrinsically inactive. Cell Motil. Cytoskeleton **66**, 777–790 (2009).

DeRubeis, S. *et al.* CYFIP1 coordinates mRNA translation and cytoskeleton remodeling to ensure proper dendritic Spine formation. *Neuron* **79**, 1169–1182 (2013).

Deverman, B. E. *et al.* Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat. Biotechnol.* **34**, 204–209 (2016).

Devys, D. *et al.* Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development. *Am. J. Med. Genet.* **43**, 208–216 (1992).
Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P. & Mandel, J. L. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat. Genet.* **4**, 335–340 (1993).

Di Marino, D. *et al.* MD and Docking Studies Reveal That the Functional Switch of CYFIP1 is Mediated by a Butterfly-like Motion. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3401–3410 (2015).

Di Marino, D., D'Annessa, I., Tancredi, H., Bagni, C. & Gallicchio, E. A unique binding mode of the eukaryotic translation initiation factor 4E for guiding the design of novel peptide inhibitors. *Protein Sci.* **24**, 1370–1382 (2015).

Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657 (2006).

Dictenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H. & Bassell, G. J. A Direct Role for FMRP in Activity-Dependent Dendritic mRNA Transport Links Filopodial-Spine Morphogenesis to Fragile X Syndrome. *Dev. Cell* **14**, 926–939 (2008).

Didiot, M-C. *et al.* Cells lacking the Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly. *Mol. Biol. Cell* **19**, 428–437 (2009).

Ding, J., Huang, T., Li, L., Fan, Y. & Shen, Y. Alternative splicing of the *FMR1* gene in human fetal tissues. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. **19**, 241–246 (1997).

Dockendorff, T. C. *et al.* Drosophila lacking d*Fmr1* activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. *Neuron* **34**, 973–984 (2002).

Dölen, G. *et al.* Correction of Fragile X Syndrome in Mice. *Neuron* **56**, 955–962 (2007).

Dolzhanskaya, N., Merz, G. & Denman, R. B. Alternative splicing modulates protein arginine methyltransferase-dependent methylation of fragile X syndrome mental retardation protein. *Biochemistry* **45**, 10385–10393 (2006b).

Dolzhanskaya, N., Merz, G. & Denman, R. B. Oxidative stress reveals heterogeneity of FMRP granules in PC12 cell neurites. *Brain Res.* **1112**, 56–64 (2006a).

Dolzhanskaya, N., Merz, G., Aletta, J. M. & Denman, R. B. Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. *J. Cell Sci.* **119**, 1933–1946 (2006c).

Drozd, M., Bardoni, B. & Capovilla, M. Modeling fragile X syndrome in drosophila. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–15 (2018).

Duan, S. Z., Usher, M. G. & Mortensen, R. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ-mediated effects in the vasculature. *Circ. Res.* **102**, 283–294 (2008).

Dunbar, C. E. *et al.* Gene therapy comes of age. *Science (80).* **359**, (2018).

Duncan, R. F. & Hershey, J. W. B. Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *J. Cell Biol.* **109**, 1467–1481 (1989).

Dury, A. Y. *et al.* Nuclear Fragile X Mental Retardation Protein Is localized to Cajal Bodies. *PLoS Genet.* **9**, (2013).

Eberhart, D. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1083–1091 (1996).

Edbauer, D. *et al.* Regulation of Synaptic Structure and Function by FMRP-Associated MicroRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* **65**, 373–384 (2010).

Ehrengruber, M. U. *et al.* Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7041–7046 (1999).

Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. **346**, 818–822 (1990).

Elvira, G. *et al.* Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 635–651 (2006).

Engineer, C. T. *et al.* Degraded speech sound processing in a rat model of fragile X syndrome. *Brain Res.* **1564**, 72–84 (2014).

Entezam, A. *et al.* Regional FMRP deficits and large repeat expansions into the full mutation range in a new Fragile X premutation mouse model. *Gene* **395**, 125–134 (2007).

Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 861–874 (2011).

Fahling, M. *et al.* Translational Regulation of the Human Achaete-scute Homologue-1 by Fragile X Mental Retardation Protein.The Journal of Biol.Chemistry. **284**, 4255–4266 (2009).

Fan, H. *et al.* Mosaicism for an *FMR1* gene deletion in a fragile X female. *Am. J. Med. Genet.* **136 A**, 214–217 (2005).

Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. & Chen, J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science (80).* **294**, 1942–1945 (2001).

Farshbaf, M. & Ghaedi, K. Huntington's Disease and Mitochondria. *Neurotox. Res.* **32**, 518–529 (2017).
Farshbaf, M. J., Ghaedi, K., Shirani, M. & Nasr-Esfahani, M. H. Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARγ) as a therapeutic target for improvement of cognitive performance in Fragile-X. *Med. Hypotheses* **82**, 291–294 (2014).

Faust, S. M. *et al.* CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection Find the latest version: CpG-depleted adeno-associated virus vectors evade immune detection. *J. Clin. Invest.* **123**, 2994–3001 (2013).

Fealko, C. & Soares, N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Transl. Pediatr.* **9**, S55–S65 (2020).

Feng, Y. *et al.* FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol. Cell* **1**, 109–118 (1997a).

Feng, Y. et al. Fragile X mental retardation protein: Nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. J. Neurosci. **17**, 1539–1547 (1997).

Feng, Y., Zhang, F., Lokey, LK., Chastain, JL., Lakkis, L., Eberhart, D., Warren, ST. Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at *FMR1*. *Science* **268** (5211):731-734 (1995).

Ferrara, A. *et al.* Cohort study of pioglitazone and cancer incidence in patients with diabetes. *Diabetes Care* **34**, 923–929 (2011).

Ferro, D. *et al.* Dynamic duo - FMRP and TDP-43: regulating common targets, causing different diseases. *Brain Res*.1693(Pt A): 37–42**1693**, 37–42 (2018).

Ferron, L., Nieto-Rostro, M., Cassidy, J. S. & Dolphin, A. C. Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density. *Nat. Commun.* **5**, (2014).

Finelli, P. F., Pueschel, S. M., Padre-Mendoza, T. & O'Brien, M. M. Neurological findings in patients with the fragile-X syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **48**, 150–153 (1985).

Fischer, A., Hacein-Bey, S., Le Deist, F., De Saint Basile, G. & Cavazzana-Calvo, M. Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies. *Isr. Med. Assoc. J.* **4**, 51–54 (2002).

Fombonne & Elsabbagh, M. *et al.* Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Res.* **5**, 160–179 (2012).

Foster, D. A. Phosphatidic acid and lipid-sensing by mTOR. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 272–278 (2013).

Foster, D. A. Phosphatidic acid signaling to mTOR: Signals for the survival of human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 949–955 (2009).

Foster, D. A. Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res.* **67**, 1–4 (2007).

Friedmann, T. & Roblin, R. Gene therapy for human genetic disease? *Science (80).* **178**, 648–649 (1972).

Friocourt, G. From genes to human diseases in cortical development. *BioEssays* **29**, 706–709 (2007).

Fu, X. et al. Alternatively, spliced products lacking exon 12 dominate the expression of fragile X mental retardation 1 gene in human tissues. Mol. Med. Rep. **12**, 1957–1962 (2015).

Fu, Y.-H. *et al. Variation of the CGG Repeat at the Fragile X Site Results in Genetic Instability: Resolution of the Sherman Paradox*. *Cell* **67**, (1991).

Gagnon, J. A. & Mowry, K. L. Molecular motors: Directing traffic during RNA localization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 229–239 (2011).

Gallagher, S. M., Daly, C. A., Bear, M. F. & Huber, K. M. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* **24**, 4859–4864 (2004).

Galvez, R., Smith, R. L. & Greenough, W. T. Olfactory bulb mitral cell dendritic pruning abnormalities in a mouse model of the Fragile-X mental retardation syndrome: Further support for FMRP's involvement in dendritic development. *Dev. Brain Res.* **157**, 214–216 (2005).

Gantois, I. *et al.* Metformin ameliorates core deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat. Med.* **23**, 674–677 (2017).

Gao, G.-P. *et al.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. SCi.* **99**, 11854–11859 (2002).

Garber, K. B., Visootsak, J. & Warren, S. T. Fragile X syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**, 666–672 (2008).

Gareau, C. *et al.* Characterization of Fragile X Mental Retardation Protein Recruitment and Dynamics in Drosophila Stress Granules. *PLoS One* **8**, (2013).

Gasman, S. & Vitale, N. Lipid remodelling in neuroendocrine secretion. *Biol. Cell* **109**, 381–390 (2017).

Ghaleiha, A. *et al.* A pilot double-blind placebo-controlled trial of pioglitazone as adjunctive treatment to risperidone: Effects on aberrant behavior in children with autism. *Psychiatry Res.* **229**, 181–187 (2015).

Ghaleiha, A. *et al.* A pilot double-blind placebo-controlled trial of pioglitazone as adjunctive treatment to risperidone: Effects on aberrant behavior in children with autism. *Psychiatry Res.* 229, 181–187 (2015).

Gholizadeh, S., Arsenault, J., Xuan, I. C. on. Y., Pacey, L. K. & Hampson, D. R. Reduced phenotypic severity following adeno-associated virus-mediated *Fmr1* gene delivery in fragile X mice. *Neuropsychopharmacology* **39**, 3100–3111 (2014).

Gholizadeh, S., Halder, S. K. & Hampson, D. R. Expression of fragile X mental retardation protein in neurons and glia of the developing and adult mouse brain. *Brain Res.* **1596**, 22–30 (2015).

Ghosh, S. *et al.* The thiazolidinedione pioglitazone alters mitochondrial function in human neuron-like cells. *Mol. Pharmacol.* **71**, 1695–1702 (2007).

Ghosh, S. *et al.* The thiazolidinedione pioglitazone alters mitochondrial function in human neuron-like cells. *Mol. Pharmacol.* 71, 1695–1702 (2007).

Gibson, J. R., Bartley, A. F., Hays, S. A. & Huber, K. M. Imbalance of neocortical excitation and inhibition and altered UP states reflect network hyperexcitability in the mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurophysiol.* **100**, 2615–2626 (2008).

Gibson, T. J., Rice, P. M., Thompson, J. D. & Heringa, J. KH domains within the *FMR1* sequence suggest that fragile X syndrome stems from a defect in RNA metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 331–333 (1993).

Gkogkas, C. G. *et al.* Pharmacogenetic Inhibition of eIF4E-Dependent Mmp9 mRNA Translation Reverses Fragile X Syndrome-like Phenotypes. *Cell Rep.* **9**, 1742–1755 (2014).

Glade, M. J. & Smith, K. Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition* **31**, 781–786 (2015).

Glock, C., Heumüller, M. & Schuman, E. M. mRNA transport & local translation in neurons This review comes from a themed issue on Molecular neuroscience. *Curr. Opin. Neurobiol.* **45**, 169–177 (2017).

Goering, R. *et al.* FMRP promotes RNA localization to neuronal projections through interactions between its RGG domain and G-quadruplex RNA sequences. *Elife* **9**, 1–31 (2020).

Gomes, E. & Shorter, J. The molecular language of membraneless organelles. *J. Biol. Chem.* **294**, 7115–7127 (2019).

Gonzalez-Alegre, P. Recent advances in molecular therapies for neurological disease: Triplet repeat disorders. *Hum. Mol. Genet.* **28**, R80–R87 (2019).

Goo, R. S. R Egulation of P Hosphoinositide -S Pecific. *Annu. Rev. Biochem* **70**, 281–312 (2001).

Gothelf, D. *et al.* Neuroanatomy of fragile X syndrome is associated with aberrant behavior and the fragile X mental retardation protein (FMRP). *Ann. Neurol.* **63**, 40–51 (2008).

Goto, K. & Kondo, H. Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons (cloning/in situ hybridization). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7598–7602 (1993).

Goulet, I., Boisvenue, S., Mokas, S., Mazroui, R. & Côté, J. TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. Hum. Mol. Genet. **17**, 3055–3074 (2008).

Greco, C. M. Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain* **125**, 1760–1771 (2002).

Greig, J. A. *et al.* Characterization of adeno-associated viral vector-mediated human factor VIII gene therapy in hemophilia. *Hum. Gene Ther.* **28**, 392–402 (2017).

Grieger, J. C. & Samulski, R. J. *Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications*. *Methods in Enzymology* **507**, (Elsevier Inc., 2012).

Grieger, J. C. & Samulski, R. J. *Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications*. *Methods in Enzymology* **507**, (Elsevier Inc., 2012).

Grieger, J. C., Choi, V. W. & Samulski, R. J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat. Protoc.* **1**, 1412–1428 (2006).

Grieger, J. C., Choi, V. W. & Samulski, R. J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat. Protoc.* **1**, 1412–1428 (2006).

Grieger, J. C., Johnson, J. S., Gurda-Whitaker, B., Agbandje-McKenna, M. & Samulski, R. J. Surface-Exposed Adeno-Associated Virus Vp1-NLS Capsid Fusion Protein Rescues Infectivity of Noninfectious Wild-Type Vp2/Vp3 and Vp3-Only Capsids but Not That of Fivefold Pore Mutant Virions. *J. Virol.* **81**, 7833–7843 (2007).

Grimm, D. & Büning, H. Small But Increasingly Mighty: Latest Advances in AAV Vector Research, Design, and Evolution. *Hum. Gene Ther.* **28**, 1075–1086 (2017).

Grommes, C., Karlo, J. C., Dechant, A. & Landreth, G. E. The PPAR c agonist pioglitazone crosses the blood – brain barrier and reduces tumor growth in a human xenograft model. 929–936 (2013).

Guo, L. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel human kinase gene, PDIK1L. *J. Genet.* **82**, 27–32 (2003).

Guo, X. *et al.* VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease. *Nat. Commun.* **7**, (2016).

Gurda, B. L. *et al.* Evaluation of AAV-mediated gene therapy for central nervous system disease in Canine Mucopolysaccharidosis VII. *Mol. Ther.* **24**, 206–216 (2016).

Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1 Find the latest version: Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* **118**, 3132–3142 (2008).

Hagerman, R. J. & Hagerman, P. J. Fragile x syndrome: A model of gene-brain-behavior relationships. *Mol. Genet. Metab.* **74**, 89–97 (2001).

Hagerman, R. J. *et al.* Advances in the treatment of fragile x Syndrome. *Pediatrics* **123**, 378–390 (2009).
Hagerman, R. J. *et al.* Fragile X syndrome. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17065 (2017).
Hall, D. A. & O'keefe, J. A. Fragile x-associated tremor ataxia syndrome: the expanding clinical picture, pathophysiology, epidemiology, and update on treatment. *Tremor Other Hyperkinet. Mov. (N. Y).* **2**, 1–11 (2012).

Halstead, J. M. *et al.* An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science (80).* **347**, 1367–1370 (2015).

Hammond, L. S., Macias, M. M., Tarleton, J. C. & Pai, G. S. Fragile X syndrome and deletions in *FMR1*: New case and review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* **72**, 430–434 (1997).

Hampson, D. R., Hooper, A. W. M. & Niibori, Y. brain sciences The Application of Adeno-Associated Viral Vector Gene Therapy to the Treatment of Fragile X Syndrome. 1–15 (2019).

Hatton, D. D., Buckley, E., Lachiewicz, A. & Roberts, J. Ocular status of boys with fragile X syndrome: A prospective study. *J. AAPOS* **2**, 298–302 (1998).
Hazlett, H. C. *et al.* Teasing apart the heterogeneity of autism: Same behavior, different brains in toddlers with fragile X syndrome and autism. *J. Neurodev. Disord.* **1**, 81–90 (2009).

Hazlett, H. C. *et al.* Trajectories of Early Brain Volume Development in Fragile X and Autism RH: Trajectory of Brain Volume in Fragile X. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **51**, 921–933 (2012).

He, C. X. & Portera-Cailliau, C. The trouble with spines in fragile X syndrome: Density, maturity and plasticity. *Neuroscience* **251**, 120–128 (2013)

Hecht,F., Sutherland, GR. Detection of fragile sites on human chromosomes. *Clinical Genetics* 28:95-96 (1985).

Helmrich, A., Ballarino, M. & Tora, L. Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Mol. Cell* **44**, 966–977 (2011).

Herbert, A. L. *et al.* Dynein/dynactin is necessary for anterograde transport of Mbp mRNA in oligodendrocytes and for myelination in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E9153–E9162 (2017).

Herman, A. B. *et al.* Regulation of stress granule formation by inflammation, vascular injury, and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 2014–2027 (2019).

Hernández, G. On the origin of the cap-dependent initiation of translation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 166–175 (2009).

Hernández, G. On the origin of the cap-dependent initiation of translation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 166–175 (2009).

Heulens, I. *et al.* Craniofacial characteristics of fragile X syndrome in mouse and man. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 816–823 (2013).

Hinds, H. L. et al. Tissue specific expression of FMR–1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. Nat. Genet. **3**, 36–43 (1993).

Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K. & Rudelli, R. D. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **41**, 289–294 (1991).

Hirokawa, N. & Tanaka, Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases. *Exp. Cell Res.* **334**, 16–25 (2015).

Hlushchenko, I., Koskinen, M. & Hotulainen, P. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. *Cytoskeleton* **73**, 435–441 (2016).
Hocquemiller, M. *et al.* AAVrh10 Vector Corrects Disease Pathology in MPS IIIA Mice and Achieves Widespread Distribution of SGSH in Large Animal Brains. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **17**, 174–187 (2020).
Hodges, H.,

Hoeffer, C. *et al.* in subjects with Fragile X syndrome. **11**, 332–341 (2013).

Hoeft, F. *et al.* Morphometric spatial patterns differentiating boys with fragile X syndrome, typically developing boys, and developmentally delayed boys aged 1 to 3 years. *Arch. Gen. Psychiatry* **65**, 1087–1097 (2008).
Hoffman, H. J. *et al.* Panel I: Epidemiology, natural history, and risk factors. *Otolaryngol. - Head Neck Surg. (United States)* **148**, (2013).

Hordeaux, J. *et al.* Efficient central nervous system AAVrh10-mediated intrathecal gene transfer in adult and neonate rats. *Gene Ther.* **22**, 316–324 (2015).

Hoshino, Y. *et al.* The adeno-associated virus rh10 vector is an effective gene transfer system for chronic spinal cord injury. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).

Hotulainen, P. & Hoogenraad, C. C. Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* **189**, 619–629 (2010).

Hou, L. & Klann, E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci.* **24**, 6352–6361 (2004).

Houssa, B. *et al.* Cloning of a novel human diacylglycerol kinase (DGKθ) containing three cysteine-rich domains, a proline-rich region, and a pleckstrin homology domain with an overlapping Ras-associating domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 10422–10428 (1997).

Howard, D. B., Powers, K., Wang, Y. & Harvey, B. K. Tropism and toxicity of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 6, 7, 8, and 9 in rat neurons and glia in vitro. *Virology* **372**, 24–34 (2008).

Hozumi, Y. *et al.* Diacylglycerol kinase β accumulates on the perisynaptic site of medium spiny neurons in the striatum. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 2409–2422 (2008).

Hozyasz, K. K., Mostowska, A., Kowal, A., Mydlak, D. & Tsibulski, A. PEDIATRIC UROLOGY Further Evidence of the Association of the Diacylglycerol Kinase Kappa (. 272–276 (2017).

Hsu, P. J. *et al.* The RNA-binding protein FMRP facilitates the nuclear export of N6-methyladenosine–containing mRNAs. *J. Biol. Chem.* **294**, 19889–19895 (2019).

Hu, C., Busuttil, R. W. & Lipshutz, G. S. RH10 provides superior transgene expression in mice when compared with natural AAV serotypes for neonatal gene therapy. *J. Gene Med.* **12**, 766–778 (2010).

Hu, Y. et al. The amino-terminal structure of human fragile X mental retardation protein obtained using precipitant-immobilized imprinted polymers. Nat. Commun. **6**, (2015).

Huang, G., Zhu, H., Wu, S., Cui, M. & Xu, T. Long noncoding RNA can be a probable mechanism and a novel target for diagnosis and therapy in fragile X syndrome. *Front. Genet.* **10**, (2019).

Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T. & Bear, M. F. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7746–7750 (2002).

Huber, K. M., Kayser, M. S. & Bear, M. F. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR- dependent long-term depression. *Science (80).* **288**, 1254–1256 (2000).

Hubstenberger, A. *et al.* P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Mol. Cell* **68**, 144-157.e5 (2017).

Hudry, E. & Vandenberghe, L. H. Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. *Neuron* **101**, 839–862 (2019).

Hussain, G. *et al.* Lipids as biomarkers of brain disorders. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**, 351–374 (2020).

Hussain, G. *et al.* Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis.* **18**, 1–12 (2019).

Hutton, J. Does rubella cause autism: A 2015 reappraisal? *Front. Hum. Neurosci.* **10**, 1–15 (2016).

Ifrim, M. F., Williams, K. R. & Bassell, G. J. Single-molecule imaging of PSD-95 mRNA translation in dendrites and its dysregulation in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **35**, 7116–7130 (2015).

Imai, S. I., Kai, M., Yasuda, S., Kanoh, H. & Sakane, F. Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGKϰ. *J. Biol. Chem.* **280**, 39870–39881 (2005).

Inoue, S. B. *et al.* A role for the Drosophila fragile X-related gene in circadian output. *Curr. Biol.* **12**, 1331–1335 (2002).

Irwin, S. A. Dendritic Spine Structural Anomalies in Fragile-X Mental Retardation Syndrome. *Cereb. Cortex* **10**, 1038–1044 (2000).

Irwin, S. A. *et al.* Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: A quantitative examination. *Am. J. Med. Genet.* **98**, 161–167 (2001).
Irwin, S. A. *et al.* Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *Am. J. Med. Genet.* **111**, 140–146 (2002).

Ishizuka, A., Siomi, M. C. & Siomi, H. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* **16**, 2497–2508 (2002).

Islam, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* **39**, 73–82 (2017).

Ismail, F. Y. & Shapiro, B. K. What are neurodevelopmental disorders? *Curr. Opin. Neurol.* **32**, 611–616 (2019).

Jackson, C. A., Cobbs, C., Peduzzi, J. D., Novak, M. & Morrow, C. D. Repetitive intrathecal injections of poliovirus replicons result in gene expression in neurons of the central nervous system without pathogenesis. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1827–1841 (2001).

Jacquemont, S. *et al.* Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: Molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 869–878 (2003).

Janson, C. *et al.* Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1391–1412 (2002).

Jin, P. et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein 3nd the microRNA pathway. Nat. Neurosci. **7**, 113–117 (2004).

Job, C. & Eberwine, J. Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 889–898 (2001).

Johnson, J. M. et al. Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays. **302**, 2141–2145 (2003).

Johnson, S., Moore, T. & Marlow, N. Using the Bayley-III to assess neurodevelopmental delay: Which cut-off should be used? *Pediatr. Res.* **75**, 670–674 (2014).

Johnson, S., Moore, T. & Marlow, N. Using the Bayley-III to assess neurodevelopmental delay: Which cut-off should be used? *Pediatr. Res.* **75**, 670–674 (2014).

Jovičić, A. & Gitler, A. D. TDP-43 in ALS: Stay on Target...Almost There. *Neuron* **81**, 463–465 (2014).

Jung, K. M. *et al.* Uncoupling of the endocannabinoid signalling complex in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat. Commun.* **3**, (2012).

Kakefuda, K. *et al.* Diacylglycerol kinase β knockout mice exhibit lithiumsensitive behavioral abnormalities. *PLoS One* **5**, 1–10 (2010).

Kalra, S. & Shukla, R. Pioglitazone: Indian perspective. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **15**, 294 (2011).

Kanai, Y., Dohmae, N. & Hirokawa, N. Kinesin Transports RNA. *Neuron* **43**, 513–525 (2004).

Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science (80- ).* **294**, 1030–1038 (2001).

Kates, W. R., Abrams, M. T., Kaufmann, W. E., Breiter, S. N. & Reiss, A. L. Reliability and validity of MRI measurement of the amygdala and hippocampus in children with fragile X syndrome. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* **75**, 31–48 (1997).
Kaufmann, W. E., Abrams, M. T., Chen, W. & Reiss, A. L. Genotype, molecular phenotype, and cognitive phenotype: Correlations in fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **83**, 286–295 (1999).

Kaufmann, W. E., Cohen, S., Sun, H. T. & Ho, G. Molecular phenotype of fragile X syndrome: FMRP, FXRPs, and protein targets. Microsc. Res. Tech. **57**, 135–144 (2002).

Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).

Kazdoba, T. M., Leach, P. T., Silverman, J. L. & Crawley, J. N. Modeling fragile X syndrome in the *Fmr1* knockout mouse. *Intractable Rare Dis. Res.* **3**, 118–133 (2014).

Kedersha, N. *et al.* Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **151**, 1257–1268 (2000).

Kedersha, N. *et al.* Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**, 871–884 (2005).

Kelley, D. J. *et al.* The cyclic AMP cascade is altered in the fragile X nervous system. *PLoS One* **2**, 1–6 (2007).

Kelley, D.J. *et al*. The Cyclic AMP Phenotype of Fragile X and Autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 32(8): 1533–1543 (2008).

Kenkel, W. M. *et al.* Functional magnetic resonance imaging in awake transgenic fragile x rats: Evidence of dysregulation in reward processing in the mesolimbic/habenular neural circuit. *Transl. Psychiatry* **6**, (2016).

Kenny, P. & Ceman, S. RNA secondary structure modulates FMRP's bi-functional role in the microRNA pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–13 (2016).

Khalil, A. M., Faghihi, M. A., Modarresi, F., Brothers, S. P. & Wahlestedt, C. A novel RNA transcript with antiapoptotic function is silenced in fragile X syndrome. *PLoS One* **3**, (2008).

Khandjian, E. Novel isoforms of the fragile X related protein FXR1P are expressed during myogenesis. Hum. Mol. Genet. **7**, 2121–2128 (1998).

Khandjian, E. W. et al. A heterogeneous set of *Fmr1* proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. Hum. Mol. Genet. **4**, 783–789 (1995).

Khandjian, E. W. *et al.* Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13357–13362 (2004).

Khlghatyan, J. & Beaulieu, J.-M. Are FXR Family Proteins Integrators of Dopamine Signaling and Glutamatergic Neurotransmission in Mental Illnesses? *Front. Synaptic Neurosci.* **10**, 1–8 (2018).

Kim, H. K., Dong, W. K., Weiler, I. J. & Greenough, W. T. Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode insertion. *J. Neurosci.* **26**, 2413–2418 (2006).

Kim, H., Gibboni, R., Kirkhart, C. & Bao, S. Impaired critical period plasticity in primary auditory cortex of fragile x model mice. *J. Neurosci.* **33**, 15686–15692 (2013).

Kim, K. *et al.* Synaptic removal of diacylglycerol by DGKζ and PSD-95 regulates dendritic spine maintenance. *EMBO J.* **28**, 1170–1179 (2009b).

Kim, L. *et al.* Anxiety, hyperactivity and stereotypy in a zebrafish model of fragile X syndrome and autism spectrum disorder. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **55**, 40–49 (2014).

Kim, M., Bellini, M. & Ceman, S. Fragile X Mental Retardation Protein FMRP Binds mRNAs in the Nucleus. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 214–228 (2009).

Kim, N. The Interplay between G-quadruplex and Transcription. 2898–2917 (2019).

Kim, T. H. *et al.* Phospho-dependent phase separation of FMRP and CAPRIN1 recapitulates regulation of translation and deadenylation. *Science (80).* **365**, 825–829 (2019).

Klauck, T. M., Xu, X., Mousseau, B. & Jaken, S. Cloning and characterization of a glucocorticoid-induced diacylglycerol kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 19781–19788 (1996).

Klusek, J., Martin, G., Losh, M. Consistency Between Research and Clinical Diagnoses of Autism Among Boys and Girls with Fragile X Syndrome Jessica. *J Intellect Disabil Res*. **58**,940–952 (2014).
Kooy, R. F. *et al.* Transgenic Mouse Model for the Fragile X Syndrome. **245**, 241–245 (1996).

Koss, H., Bunney, T. D., Behjati, S. & Katan, M. Dysfunction of phospholipase Cγ in immune disorders and cancer. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 603–611 (2014).

Krahn, M. & Lévy, N. Perspectives thérapeutiques pour les maladies génétiques. *Univ. Médicale Virtuelle Francoph.* (2012).

Krawczun, M. S., Jenkins, E. C. & Brown, W. T. Analysis of the fragile-X chromosome: localization and detection of the fragile site in high resolution preparations. *Hum. Genet.* **69**, 209–211 (1985).

Kremer, E. J. *et al.* Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science (80).* **252**, 1711–1714 (1991).

Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. Neuronal RNA granules: A link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**, 683–696 (2001).

Kulkarni, M., Ozgur, S. & Stoecklin, G. On track with P-bodies. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 242–251 (2010).

Kumar, S. R., Markusic, D. M., Biswas, M., High, K. A. & Herzog, R. W. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **3**, 16034 (2016).

Kumari, D. & Usdin, K. The distribution of repressive histone modifications on silenced *FMR1* alleles provides clues to the mechanism of gene silencing in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4634–4642 (2010).
Kvarnung, M. & Nordgren, A. Intellectual disability & rare disorders: A diagnostic challenge. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1031**, 39–54 (2017).

Kye, M. J. eon. et al. SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. Hum. Mol. Genet. **23**, 6318–6331 (2014).

Lai, A., Valdez-Sinon, A. N. & Bassell, G. J. Regulation of RNA granules by FMRP and implications for neurological diseases. *Traffic* (2020). doi:10.1111/tra.12733

Landreth, G., Jiang, Q., Mandrekar, S. & Heneka, M. PPARγ Agonists as Therapeutics for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* **5**, 481–489 (2008).

Lannoy, N. & Hermans, C. Thérapie génique en 2017 : état des lieux et perspectives. (2017).

Larsson, C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell. Signal.* **18**, 276–284 (2006).

Leach, N. T. *et al.* Disruption of diacylglycerol kinase delta (DGKD) associated with seizures in humans and mice. *Am. J. Hum. Genet.* **80**, 792–799 (2007).

Lee, A. *et al.* Control of dendritic development by the Drosophila fragile X-related gene involves the small GTPase Rac1. *Development* **130**, 5543–5552 (2003).

Lee, F. C. Y. & Ule, J. Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Mol. Cell* **69**, 354–369 (2018).

Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).

Lemay, J. F., Herbert, A. R., Dewey, D. M. & Innes, A. M. A rational approach to the child with mental retardation for the paediatrician. *Paediatr. Child Health (Oxford).* **8**, 345–356 (2003).

Lentz, T. B., Gray, S. J. & Samulski, R. J. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol. Dis.* **48**, 179–188 (2012).

Leone, P. *et al.* Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Sci. Transl. Med.* **4**, 1–14 (2012).

Levenga, J. et al. Ultrastructural analysis of the functional domains in FMRP using primary hippocampal mouse neurons. Neurobiol. Dis. **35**, 241–250 (2009).

Lewis, J. D. *et al.* Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* **34**, 916–922 (2011).

Li, D. K., Tisdale, S., Lotti, F. & Pellizzoni, L. SMN control of RNP assembly: From post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. Semin. Cell Dev. Biol. **32**, 22–29 (2014).

Li, L. *et al.* Production and Characterization of Novel Recombinant Adeno-Associated Virus Replicative-Form Genomes: A Eukaryotic Source of DNA for Gene Transfer. *PLoS One* **8**, (2013).

Li, M. *et al.* Identification of *FMR1*-regulated molecular networks in human neurodevelopment. *Genome Res.* **30**, 361–374 (2020).

Lim, A., Rechtsteiner, A. & Saxton, W. M. Two kinesins drive anterograde neuropeptide transport. *Mol. Biol. Cell* **28**, 3542–3553 (2017).

Lin, C. & Miles, W. O. Survey and summary beyond ClIP: Advances and opportunities to measure RBP-RNA and RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **47**, 5490–5501 (2019).

Linder, B. et al. Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. Hum. Mol. Genet. **17**, 3236–3246 (2008).

Ling, C., Zhong, L. & Srivastava, A. Adeno-associated Viral Vectors in Gene Therapy. *eLS* 1–8 (2018).

Lipton, S. A., Gu, Z. & Nakamura, T. Inflammatory Mediators Leading to Protein Misfolding and Uncompetitive/Fast Off-Rate Drug Therapy for Neurodegenerative Disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* **82**, 1–27 (2007).

Liu, G., Martins, I. H., Chiorini, J. A. & Davidson, B. L. Adeno-associated virus type 4 (AAV4) targets ependyma and astrocytes in the subventricular zone and RMS. *Gene Ther.* **12**, 1503–1508 (2005).

Loomis, E. W., Sanz, L. A., Chédin, F. & Hagerman, P. J. Transcription-Associated R-Loop Formation across the Human *FMR1* CGG-Repeat Region. *PLoS Genet.* **10**, (2014).

Los, A. P., Van Baal, J., De Widt, J., Divecha, N. & Van Blitterswijk, W. J. Structure-activity relationship of diacylglycerol kinase θ. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1636**, 169–174 (2004).

Louboutin, J. P., Chekmasova, A. A., Marusich, E., Chowdhury, J. R. & Strayer, D. S. Efficient CNS gene delivery by intravenous injection. *Nat. Methods* **7**, 905–907 (2010).

Lozano, R., Azarang, A., Wilaisakditipakorn, T. & Hagerman, R. J. Fragile X syndrome: A review of clinical management. *Intractable Rare Dis. Res.* **5**, 145–157 (2016).

Lozano, R., Hare, E. B. & Hagerman, R. J. Modulation of the GABAergic pathway for the treatment of fragile X syndrome. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **10**, 1769–1779 (2014).

Lubs, H. A. A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **21**, 231–244 (1969).
Ludwig, A. L. *et al.* CNS expression of murine fragile X protein (FMRP) as a function of CGG-repeat size. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3228–3238 (2014).

Lykken, E. A., Shyng, C., Edwards, R. J., Rozenberg, A. & Gray, S. J. Recent progress and considerations for AAV gene therapies targeting the central nervous system. *J. Neurodev. Disord.* **10**, 1–10 (2018).

Majumder, M. & Palanisamy, V. RNA binding protein FXR1-miR301a-3p axis contributes to p21WAF1 degradation in oral cancer. PLoS Genet. **16**, 1–25 (2020).

Majumder, M. & Palanisamy, V. RNA binding protein FXR1-miR301a-3p axis contributes to p21WAF1 degradation in oral cancer. *PLoS Genet.* **16**, 1–25 (2020).

Markmiller, S. *et al.* Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell* **172**, 590-604.e13 (2018).

Martin, J. P. & Bell, J. a Pedigree of Mental Defect Showing Sex-Linkage. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **6**, 154–157 (1943).

Martínez-Cerdeño, V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Dev. Neurobiol.* **77**, 393–404 (2017).

Martínez-Cerdeño, V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Dev. Neurobiol.* **77**, 393–404 (2017).

Mary, B., Maurya, S., Arumugam, S., Kumar, V. & Jayandharan, G. R. Post-translational modifications in capsid proteins of recombinant adeno-associated virus (AAV) 1-rh10 serotypes. *FEBS J.* **286**, 4964–4981 (2019).

Masciopinto, F. *et al.* Effects of long-term treatment with pioglitazone on cognition and glucose metabolism of PS1-KI, 3xTg-AD, and wild-type mice. *Cell Death Dis.* **3**, e448-10 (2012).

Matsuo, K., Clay, O., Takahashi, T., Silke, J. & Schaffner, W. Evidence for erosion of mouse CpG islands during mammalian evolution. *Somat. Cell Mol. Genet.* **19**, 543–555 (1993).
Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.* **15 Spec No 1**, 17–29 (2006).

Maurin, T. *et al.* HITS-CLIP in various brain areas reveals new targets and new modalities of RNA binding by fragile X mental. 1–12 (2018).

Maurin, T., Zongaro, S. & Bardoni, B. Fragile X Syndrome: From molecular pathology to therapy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **46**, 242–255 (2014).

Mays, L.E. *et al.* Identification of the murine AAVrh32.33 capsid-specific CD8+ T cell epitopes. *J. Gene Med.* **14**, 11: 1095–1102 (2009).

Mazin, P. et al. Widespread splicing changes in human brain development and aging. Mol. Syst. Biol. **9**, 1–14 (2013).

Maziuk, B., Ballance, H. I. & Wolozin, B. Dysregulation of RNA binding protein aggregation in neurodegenerative disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 1–9 (2017).

Mazroui, R. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3007–3017 (2002).

McBride, S. M. J. *et al.* Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a Drosophila model of Fragile X syndrome. *Neuron* **45**, 753–764 (2005).

McCarty, D. M., Young, S. M. & Samulski, R. J. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 819–845 (2004).

McClure, J.J. et al. Muscle-specific FXR1 isoforms in squamous cell cancer. Trends in cancer. **176**, 139–148 (2019).

McCown, T. J., Xiao, X., Li, J., Breese, G. R. & Samulski, R. J. Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus (AAV) vector. *Brain Res.* **713**, 99–107 (1996).

McIvor, E. I., Polak, U. & Napierala, M. New insights into repeat instability: Role of RNA•DNA hybrids. *RNA Biol.* **7**, 551–558 (2010).
Mckinney, B. C., Grossman, A. W., Elisseou, N. M. & Greenough, W. T. Dendritic spine abnormalities in the occipital cortex of C57BL / 6*Fmr1* knockout mice (2005).
Mefford & Hoffman, E. P. & Ph, D. Genomics, Intellectual Disability, and Autism. 733–743 (2012)

Meintjes, E. J. *et al.* Fxr1 knockout mice show a striated muscle phenotype: Implications for Fxr1p function in vivo. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1291–1302 (2004).

Merenstein, S. A. *et al.* Molecular-clinical correlations in males with an expanded *FMR1* mutation. *Am. J. Med. Genet.* **64**, 388–394 (1996).

Mérida, I., Arranz-Nicolás, J., Rodríguez-Rodríguez, C. & Ávila-Flores, A. Diacylglycerol kinase control of protein kinase C. *Biochem. J.* **476**, 1205–1219 (2019).

Merienne, N. & Déglon, N. Gene silencing approaches for the treatment of Huntington's disease | Approches de gene silencing pour le traitement de la maladie de Huntington. *Medecine/Sciences* **31**, (2015).

Mientjes, E. J. *et al.* The generation of a conditional *Fmr1* knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. *Neurobiol. Dis.* **21**, 549–555 (2006).

Mili, S. & Steitz, J. A. Evidence for reassociation of RNA-binding proteins after cell lysis: Implications for the interpretation of immunoprecipitation analyses. 1692–1694 (2004).

Mingroni-Netto, R. C., Haddad, L. A. & Vianna-Morgante, A. M. The number of CGG repeats of the *FMR1* locus in premutated and fully mutated heterozygotes and their offspring: Implications for the origin of mosaicism. *Am. J. Med. Genet.* **64**, 270–273 (1996).

Miyashiro, K. Y. *et al.* RNA Cargoes Associating with FMRP Reveal Deficits in Cellular Functioning in *Fmr1* Null Mice. **37**, 417–431 (2003).

Mohamed, F. *et al.* Assessment of Hair Aluminum, Lead, and Mercury in a Sample of Autistic Egyptian Children: Environmental Risk Factors of Heavy Metals in Autism. *Behav. Neurol.* **2015**, (2015).

Moine, H. & Vitale, N. Of local translation control and lipid signaling in neurons. *Adv. Biol. Regul.* **71**, 194–205 (2019).

Moine, H. & Vitale, N. Phosphatidic acid: From pleiotropic functions to neuronal pathology. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 1–8 (2019).

Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C. & Benveniste, O. Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors. *Hum. Gene Ther.* **712**, 704–712 (2010).

Morales, J. *et al.* Drosophila fragile X protein DFXR regulates neuronal morphology and function in the brain. *Neuron* **34**, 961–972 (2002).

Mouslech, Z. & Valla, V. Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice. *Neuroendocrinol. Lett.* **30**, 153–179 (2009).

Moya, P. R., Murphy, D. L., McMahon, F. J. & Wendland, J. R. Increased gene expression of diacylglycerol kinase eta in bipolar disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **13**, 1127–1128 (2010).

Muddashetty, R. S. *et al.* Reversible Inhibition of PSD-95 mRNA Translation by miR-125a, FMRP Phosphorylation, and mGluR Signaling. *Mol. Cell* **42**, 673–688 (2011).

Muddashetty, R. S., Kelić, S., Gross, C., Xu, M. & Bassell, G. J. Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **27**, 5338–5348 (2007).

Musci, T. J., Caughey, A. B., Smith, W., Schwartz, M. & Sampson, J. Cost-effectiveness analysis of prenatal population-based fragile X carrier screening. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **192**, 1905–1912 (2005).

Myrick, L. K. *et al.* Independent role for presynaptic FMRP revealed by an *FMR1* missense mutation associated with intellectual disability and seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 949–956 (2015).

Myrick, L. K., Hashimoto, H., Cheng, X. & Warren, S. T. Human FMRP contains an integral tandem Agenet (Tudor) and KH motif in the amino terminal domain. Hum. Mol. Genet. **24**, 1733–1740 (2015a).

Na, S. D. & Burns, T. G. Wechsler Intelligence Scale for Children-V: Test Review. *Appl. Neuropsychol. Child* **5**, 156–160 (2015).

Nakagawa, T., Engler, J. A. & Sheng, M. The dynamic turnover and functional roles of α-actinin in dendritic spines. *Neuropharmacology* **47**, 734–745 (2004).

Nakagawara. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org on March 29, 2011. For personal use only. No other uses without permission. *N. Engl. J. Med.* **329**, 977–986 (1991).

Nalavadi, V. C., Muddashetty, R. S., Gross, C. & Bassell, G. J. Dephosphorylation-induced ubiquitination and degradation of FMRP in dendrites: A role in immediate early mGluR-stimulated translation. *J. Neurosci.* **32**, 2582–2587 (2012).

Naldini, L. A comeback for gene therapy. *Science (80).* **326**, 805–806 (2009).

Nanjan, M. J., Mohammed, M., Prashantha Kumar, B. R. & Chandrasekar, M. J. N. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorg. Chem.* **77**, 548–567 (2018).

Napoli, I. et al. The Fragile X Syndrome Protein Represses Activity-Dependent Translation through CYFIP1, a New 4E-BP. Cell **134**, 1042–1054 (2008).

Narayanan, U. *et al.* FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *J. Neurosci.* **27**, 14349–14357 (2007).

Narayanan, U. *et al.* S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **283**, 18478–18482 (2008).

Naso, M. F., Tomkowicz, B., Iii, W. L. P. & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**, (2017).

Negrotto, L., Farez, M. F. & Correale, J. Immunologic effects of metformin and pioglitazone treatment on metabolic syndrome and multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* **73**, 520–528 (2016).

Negrotto, L., Farez, M. F. & Correale, J. Immunologic effects of metformin and pioglitazone treatment on metabolic syndrome and multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 73, 520–528 (2016).

Neufeld, E. F., Sweeley, C. C., Rogers, S., Friedmann, T. & Roblin, R. Gene therapy for human genetic disease? *Science (80-. ).* **178**, 648–649 (1972).

Neuhofer, D. *et al.* Functional and structural deficits at accumbens synapses in a mouse model of Fragile X. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–15 (2015).
Ng, M. C., Yang, Y. L. & Lu, K. T. Behavioral and Synaptic Circuit Features in a Zebrafish Model of Fragile X Syndrome. *PLoS One* **8**, 1–8 (2013).
Nimchinsky, E. A., Oberlander, A. M. & Svoboda, K. Abnormal development of dendritic spines in *FMR1* knock-out mice. *J. Neurosci.* **21**, 5139–5146 (2001).
Niu, M. *et al.* Autism Symptoms in Fragile X Syndrome. *J. Child Neurol.* **32**, 903–909 (2017).
Nolin, S. L., Glicksman, A., Houck, G. E., Brown, W. T. & Dobkin, C. S. Mosaicism in fragile X affected males. *Am. J. Med. Genet.* **51**, 509–512 (1994).

Nomura, T., Xu, J. & Contractor, A. The developmental switch in GABA polarity is delayed in fragile X mice. *J. Neurosci.* **34**, 446–450 (2014).

O'Connor, D. M. & Boulis, N. M. Gene therapy for neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* **21**, 504–512 (2015).

Oberle, I. *et al.* New polymorphism and a new chromosome breakpoint establish the physical and genetic mapping of DXS369 in the DXS98-FRAXA interval. *Am. J. Med. Genet.* **38**, 336–342 (1991).

Oguro-Ando, A. et al. Increased CYFIP1 dosage alters cellular and dendritic morphology and dysregulates mTOR. Mol. Psychiatry **20**, 1069–1078 (2015).

Oliphant, A. R., Brandl, C. J. & Struhl, K. Defining the Sequence Specificity of DNA-Binding Proteins by Selecting Binding Sites from Random-Sequence Oligonucleotides: Analysis of Yeast GCN4 Protein. **9**, 2944–2949 (1989).

Olmos-Serrano, J. L., Corbin, J. G. & Burns, M. P. The GABA A receptor agonist THIP ameliorates specific behavioral deficits in the mouse model of fragile X syndrome. *Dev. Neurosci.* **33**, 395–403 (2011).

Pan, F., Aldridge, G. M., Greenough, W. T. & Gan, W. B. Dendritic spine instability and insensitivity to modulation by sensory experience in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17768–17773 (2010).

Panja, D. *et al.* Two-Stage Translational Control of Dentate Gyrus LTP Consolidation Is Mediated by Sustained BDNF-TrkB Signaling to MNK. *Cell Rep.* **9**, 1430–1445 (2014).

Pannetier et Juhel. Différences et variabilités en psychologie, livre (2009).

Paradee, W., Melikian, H. E., Rasmussen, D. L., Kenneson, A. & Conn, P. J. Fragile x mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. **94**, 185–192 (1999).

Pasciuto, E. & Bagni, C. SnapShot: FMRP interacting proteins. Cell **159**, 218-218.e1 (2014).

Passini,Deborah J. Watson, Charles H. Vite, Daniel J. Landsburg, Alyson L. Feigenbaum, and John H. Wolfe*. *Society* **77**, 7034–7040 (2003).

Pastori, C. *et al.* Comprehensive analysis of the transcriptional landscape of the human *FMR1* gene reveals two new long noncoding RNAs differentially expressed in Fragile X syndrome and Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Hum. Genet.* **133**, 59–67 (2014).

Pathania, M. et al. The autism and schizophrenia associated gene CYFIP1 is critical for the maintenance of dendritic complexity and the stabilization of mature spines. Transl. Psychiatry **4**, 1–11 (2014).

Patzlaff, N. E., Shen, M. & Zhao, X. Regulation of Adult Neurogenesis by the Fragile X Family of RNA Binding Proteins. *Brain Plast.* **3**, 205–223 (2018).

Paulson, H. & Arbor, A. *Repeat Expansion Diseases*. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* (2006). doi:10.1007/3-540-29623-9_8503

Peier, A. M. *et al.* (Over) correction of *FMR1* deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features. **9**, 1145–1160 (2000).

Pek, J. W., Anand, A. & Kai, T. Tudor domain proteins in development. Dev. **139**, 2255–2266 (2012).

Penaud-Budloo, M., François, A., Clément, N. & Ayuso, E. Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **8**, 166–180 (2018).

Pfeiffer, B. E. & Huber, K. M. The state of Synapses. *Neuroscientist* **15**, 549–567 (2009).

Piazzon, N. et al. In vitro and in Cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. J. Biol. Chem. **283**, 5598–5610 (2008).

Piccinni, C., Motola, D., Marchesini, G. & Poluzzi, E. Assessing the association of pioglitazone use and bladder cancer through drug adverse event reporting. *Diabetes Care* **34**, 1369–1371 (2011).

Piguet, F., Alves, S. & Cartier, N. Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Hum. Gene Ther.* **28**, 988–1003 (2017).

Pilaz, L. J. & Silver, D. L. Moving messages in the developing brain—emerging roles for mRNA transport and local translation in neural stem cells. *FEBS Lett.* **591**, 1526–1539 (2017).

Pirozzi, F., Tabolacci, E. & Neri, G. The FRAXopathies: Definition, overview, and update. *Am. J. Med. Genet. Part A* **155**, 1803–1816 (2011).

Plante, I. *et al.* Dicer-derived microRNAs are utilized by the fragile X mental retardation protein for assembly on target RNAs. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 1–12 (2006).

Polak, P. & Hall, M. N. mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 209–218 (2009).

Pop, A. S., Gomez-Mancilla, B., Neri, G., Willemsen, R. & Gasparini, F. Fragile X syndrome: A preclinical review on metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antagonists and drug development. *Psychopharmacology (Berl).* **231**, 1217–1226 (2014).

Pretto, D. *et al.* Clinical and molecular implications of mosaicism in *FMR1* full mutations. *Front. Genet.* **5**, 1–11 (2014).
Primerano, B. *et al.* Reduced *FMR1* mRNA translation efficiency in fragile X patients with premutations. *Rna* **8**, 1482–1488 (2002).

Protic, D., Salcedo-Arellano, M. J., Dy, J. B., Potter, L. A. & Hagerman, R. J. New Targeted Treatments for Fragile X Syndrome. *Curr. Pediatr. Rev.* **15**, 251–258 (2019).

Protter, D. S. W. & Parker, R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.* **26**, 668–679 (2016).

Purugganan, O. Intellectual disabilities. *Pediatr. Rev.* **39**, 299–309 (2018).

Qin, M., Kang, J., Burlin, T. V., Jiang, C. & Smith, C. B. Postadolescent changes in regional cerebral protein synthesis: An in vivo study in the *Fmr1* null mouse. *J. Neurosci.* **25**, 5087–5095 (2005).

Quan, Q., Qian, Y., Li, X. & Li, M. Pioglitazone Reduces β Amyloid Levels via Inhibition of PPARγ Phosphorylation in a Neuronal Model of Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 1–12 (2019).

Quartier, A. *et al.* Intragenic *FMR1* disease-causing variants: a significant mutational mechanism leading to Fragile-X syndrome. 1–9 (2017). doi:10.1038/ejhg.2016.204

Rabinowitz, J. E. *et al.* Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity. *J. Virol.* **76**, 791–801 (2002).

Rabinowitz, J., Chan, Y. K. & Samulski, R. J. Adeno-associated Virus (AAV) versus immune response. *Viruses* **11**, 1–11 (2019).

Ramos, A. et al. The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: A platform for protein-protein interaction. Structure **14**, 21–31 (2006).

Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. & Wang, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**, 621–629 (2005).

Raper, S. E. *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* **80**, 148–158 (2003).

Reimann, J. *et al.* The Oral Antidiabetic Pioglitazone Protects from Neurodegeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis-Like Symptoms in Superoxide Dismutase-G93A Transgenic Mice. **25**, 7805–7812 (2005).

Reiss, A. L. & Dant, C. C. *The behavioral neurogenetics of fragile X syndrome: Analyzing gene-brain-behavior relationships in child developmental psychopathologies*. *Development and Psychopathology* **15**, (2003).
Reiss, A. L., Lee, J. & Freund, L. Neuroanatomy of fragile X syndrome: The temporal lobe. *Neurology* **44**, 1317–1324 (1994).
Reiss, A. L., Patel, S., Kumar, A. J. & Freund, L. Preliminary communication: Neuroanatomical variations of the posterior fossa in men with the fragile X (Martin-Bell) syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **31**, 407–414 (1988).

Rezaul, K. *et al.* Engineered Tug-of-War Between Kinesin and Dynein Controls Direction of Microtubule Based Transport In Vivo. *Traffic* **17**, 475–486 (2016).

Rhee, G. S. Regulation of Phosphoinositide -Specific. *Annu. Rev. Biochem* **70**, 281–312 (2001).

Richards, B. W., Sylvester, P. E. & Brooker, C. Fragile X-Linked Mental Retardation: the Martin-Bell Syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* **25**, 253–265 (1981).

Richter, J.D. *et al*. Dysregulation and restoration of translational homeostasis in fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci*.16(10): 595–605 (2015).

Rochefort, N. L. & Konnerth, A. Dendritic spines: From structure to in vivo function. *EMBO Rep.* **13**, 699–708 (2012).

Rochette, C. F., Gilbert, N. & Simard, L. R. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. Hum. Genet. **108**, 255–266 (2001).

Rodriguez De Turco, E. B. *et al.* Diacylglycerol kinase ε regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoylinositol lipid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4740–4745 (2001).

Rogers, R. C., Stevenson, R. E., Simensen, R. J., Holden, K. R. & Schwartz, C. E. Finding new etiologies of mental retardation and hypotonia: X marks the spot. *Dev. Med. Child Neurol.* **50**, 104–111 (2008).

Ronesi, J.A. *et al*. Disrupted mGluR5-Homer scaffolds mediate abnormal mGluR5 signaling, circuit function and behavior in a mouse model of Fragile X Syndrome. *Nat Neurosci*.15(3): 431–S1 (2012).

Ropers, H. H. Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**, 161–187 (2010).
Rosario, R. *et al.* FMRP associates with cytoplasmic granules at the onset of meiosis in the human oocyte. *PLoS One* **11**, 1–14 (2016).

Rossignol, D. A. & Frye, R. E. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* **17**, 290–314 (2012).

Rossignol, D. A. & Frye, R. E. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* 17, 290–314 (2012).

Rossoll, W. Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? Hum. Mol. Genet. **11**, 93–105 (2002).

Rostaing, P. *et al.* Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 3463–3474 (2006).

Roxo, C., Kotkowiak, W. & Pasternak, A. G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives. (2019).

Royo, N. C. *et al.* Specific AAV serotypes stably transduce primary hippocampal and cortical cultures with high efficiency and low toxicity. *Brain Res.* **1190**, 15–22 (2008).

Rudelli, R. D. *et al.* Adult fragile X syndrome - Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol.* **67**, 289–295 (1985).
Sabaratnam, M., Vroegop, P. G. & Gangadharan, S. K. Epilepsy and EEG findings in 18 males with fragile X syndrome. *Seizure* **10**, 60–63 (2001).

Sacco, P., Capkun-Niggli, G., Zhang, X. & Jose, R. The economic burden of fragile X syndrome: Healthcare resource utilization in the United States. *Am. Heal. Drug Benefits* **6**, 73–83 (2013).

Sakai, H. & Sakane, F. Recent progress on type II diacylglycerol kinases: The physiological functions of diacylglycerol kinase δ, η and κ and their involvement in disease. *J. Biochem.* **152**, 397–406 (2012).

Sakane, F., Mizuno, S. & Komenoi, S. Diacylglycerol Kinases as Emerging Potential Drug Targets for a Variety of Diseases: An Update. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 1–8 (2016).

Sakane, F., Mizuno, S., Takahashi, D. & Sakai, H. Where do substrates of diacylglycerol kinases come from? Diacylglycerol kinases utilize diacylglycerol species supplied from phosphatidylinositol turnover-independent pathways. *Adv. Biol. Regul.* **67**, 101–108 (2018).

Salvador-Carulla, L. & Bertelli, M. 'Mental retardation' or 'intellectual disability': Time for a conceptual change. *Psychopathology* **41**, 10–16 (2007).

Samulski, R. J. *et al.* Central and peripheral nervous systems. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 445–451 (2017).

Sanchez, G. et al. A novel function for the survival motoneuron protein as a translational regulator. Hum. Mol. Genet. **22**, 668–684 (2013).

Sandoval, G. M. *et al.* Neuroanatomical abnormalities in fragile X syndrome during the adolescent and young adult years. *J. Psychiatr. Res.* **107**, 138–144 (2018).

Santoro, M. R., Bray, S. M. & Warren, S. T. Molecular Mechanisms of Fragile X Syndrome: A Twenty-Year Perspective. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**, 219–245 (2012).

Saré, R.M. et al. Comparative Behavioral Phenotypes of *Fmr1* KO, Fxr2 Het, and *Fmr1* KO/Fxr2 Het mice. Brain sciences. **1–14** (2019).

Sawicka, K. *et al.* FMRP has a cell-type-specific role in CA1 pyramidal neurons to regulate autism-related transcripts and circadian memory. *Elife* **8**, 1–36 (2019).

Sawicka, K., Pyronneau, A., Chao, M., Bennett, M. V. L. & Zukin, R. S. Elevated erk/p90 ribosomal S6 kinase activity underlies audiogenic seizure susceptibility in Fragile X mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E6290–E6297 (2016).

Saxena, K. *et al.* Experiential contributions to social dominance in a rat model of fragile-X syndrome. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **285**, (2018).
Schaefer GB, Mendelsohn NJ. Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. Genet Med.10:4-12 (2008).

Schaeffer, C. *et al.* The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J.* **20**, 4803–4813 (2001).

Schenck, A. *et al.* CYFIP/Sra-1 Controls Neuronal Connectivity in Drosophila and Links the Rac1 GTPase Pathway to the Fragile X Protein. *Neuron* **38**, 887–898 (2003).

Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C. & Mandel, J. L. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **98**, 8844–8849 (2001).

Schmitt, S., Cantuti Castelvetri, L. & Simons, M. Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 999–1005 (2015).

Schneider, A., Hagerman, R. J. & Hessl, D. Fragile X syndrome - From genes to cognition. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **15**, 333–342 (2009).

Schütz, B. *et al.* The Oral Antidiabetic Pioglitazone Protects from Neurodegeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis-Like Symptoms in Superoxide Dismutase-G93A Transgenic Mice. **25**, 7805–7812 (2005).

Schütz, B. *et al.* The Oral Antidiabetic Pioglitazone Protects from Neurodegeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis-Like Symptoms in Superoxide Dismutase-G93A Transgenic Mice. 25, 7805–7812 (2005).

Schütz, *et al.* The Oral Antidiabetic Pioglitazone Protects from Neurodegeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis-Like Symptoms in Superoxide Dismutase-G93A Transgenic Mice. **25**, 7805–7812 (2005).

Sealey, L. A. *et al.* Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environ. Int.* **88**, 288–298 (2016).

Searcy, J. L. *et al.* Long-term pioglitazone treatment improves learning and attenuates pathological markers in a mouse model of alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **30**, 943–961 (2012).

Sellier, C. *et al.* Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *EMBO J.* **29**, 1248–1261 (2010).

Seo, J. *et al.* Regulation of hippocampal long-term potentiation and long-term depression by diacylglycerol kinaseζ. *Hippocampus* **22**, 1018–1026 (2012).

Shaked, H. & Eiges, R. Reevaluation of *FMR1* Hypermethylation Timing in Fragile X Syndrome. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–7 (2018).

Sharma, A. *et al.* Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **30**, 694–702 (2010).

Sherman, S. L. *et al.* Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* **69**, 289–299 (1985).

Sheth, U. & Parker, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science (80).* **300**, 805–808 (2003).

Shirai, Y. & Saito, N. Diacylglycerol kinase as a possible therapeutic target for neuronal diseases. *J. Biomed. Sci.* **21**, 1–8 (2014).

Shirai, Y. *et al.* Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGKβ in neurite spine formation, contributing to cognitive function. *PLoS One* **5**, (2010).

Shiraishi-Yamaguchi, Y. & Furuichi, T. The Homer family proteins. *Genome Biol.* **8**, 1–12 (2007).

Shitik, E. M., Velmiskina, A. A., Dolskiy, A. A. & Yudkin, D. V. Reactivation of *FMR1* gene expression is a promising strategy for fragile X syndrome therapy. *Gene Ther.* **27**, 247–253 (2020).

Siddiqui, M. F., Elwell, C. & Johnson, M. H. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders.*Autism Open Access*. **6**, (2016).

Sidorov, M. S., Auerbach, B. D. & Bear, M. F. Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. *Mol. Brain* **6**, 1 (2013).

Sim, E. U., Ma, X., Chan, S. L., Lee, C. & Narayanan, K. Predicted interaction of human Ribosomal Protein S15 with Fragile X Mental Retardation Protein. J. Appl. Biol. Biotechnol. **4**, 40206 (2016).

Siomi, M. C., Higashijima, K., Ishizuka, A. & Siomi, H. Casein Kinase II Phosphorylates the Fragile X Mental Retardation Protein and Modulates Its Biological Properties. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8438–8447 (2002).

Siomi, M. C., Zhang, Y., Siomi, H. & Dreyfuss, G. Specific sequences in the fragile X syndrome protein *FMR1* and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. Mol. Cell. Biol. **16**, 3825–3832 (1996).

Sittler, A., Devys, D., Weber, C. & Mandel, J. L. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of *Fmr1* protein isoforms. Hum. Mol. Genet. **5**, 95–102 (1996).

Sitzmann, A.F. *et al.* Rare *FMR1* gene mutations causing fragile X syndrome: A review. *Am J Med Genet A*.176(1): 11–18 (2018).

So, B. R. et al. A U1 snRNP-specific assembly pathway reveals the SMN complex as a versatile hub for RNP exchange. Nat. Struct. Mol. Biol. **23**, 225–230 (2016).

Sommer, W. *et al.* Differential expression of NPY and its receptors in alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 1564–1569 (2001).

Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **136**, 731–745 (2009).

Sontheimer, E. J. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 127–138 (2005).

Soong, H. K., Dong, W. K., Weiler, I. J. & Greenough, W. T. Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode insertion. *J. Neurosci.* **26**, 2413–2418 (2006).

Sophie Mokas, J. R. M. *et al.* Uncoupling Stress Granule Assembly and Translation Initiation Inhibition. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2673–2683 (2009).

Sossin, W. S. & Desgroseillers, L. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* **7**, 1581–1589 (2006).

Spencer, C. M. et al. Exaggerated behavioral phenotypes in *Fmr1*/Fxr2 double knockout mice reveal a functional genetic interaction between Fragile X-related proteins. Hum. Mol. Genet. **15**, 1984–1994 (2006).

Sreeram, N., Wren, C., Bhate, M., Robertson, P. & Hunter, S. Cardiac abnormalities in the fragile X syndrome. *Br. Heart J.* **61**, 289–291 (1989).

Stefani, G., Fraser, C. E., Darnell, J. C. & Darnell, R. B. Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *J. Neurosci.* **24**, 7272–7276 (2004).

Stephenson, J. in Risk of Bladder Cancer. **306**, 2015 (2011).

Stetler, A. et al. Identification and characterization of the methyl arginines in the fragile X mental retardation protein Fmrp. Hum. Mol. Genet. **15**, 87–96 (2006).

Stevenson, R. E., Schwartz, C. E., Arena, J. F. & Lubs, H. A. X-linked mental retardation: the early era from 1943 to 1969. *Am. J. Med. Genet.* **51**, 538–541 (1994).

Steward, O., Bakker, C. E., Willems, P. J. & Oostra, B. A. No evidence for disruption of normal patterns of mRNA localization in dendrites or dendritic transport of recently synthesized mRNA in *FMR1* knockout mice, a model for human fragile-X mental retardation syndrome. *Neuroreport* **9**, 477–481 (1998).

Stoll, G. et al. Europe PMC Funders Group Deletion of TOP3 β , a component of FMRP-containing mRNPs , contributes to neurodevelopmental disorders. **16**, (2014).

Stone, D., David, A., Bolognani, F., Lowenstein, P. R. & Castro, M. G. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J. Endocrinol.* **164**, 103–118 (2000).

Strum, J. C. *et al.* Rosiglitazone induces mitochondrial biogenesis in mouse brain. *J. Alzheimer's Dis.* **11**, 45–51 (2007).

Subramanian, M. *et al.* G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep.* **12**, 697–704 (2011).

Sudhakar, V. & Richardson, R. M. Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Neurotherapeutics* **16**, 166–175 (2019).

Sudhakaran, I. P. *et al.* FMRP and Ataxin-2 function together in long-term olfactory habituation and neuronal translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, (2014).

Suhl, J. A., Chopra, P., Anderson, B. R., Bassell, G. J. & Warren, S. T. Analysis of FMRP mRNA target datasets reveals highly associated mRNAs mediated by G-quadruplex structures formed via clustered WGGA sequences. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 5479–5491 (2014).

Sutcliffe, J. S. *et al.* DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile x syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 397–400 (1992).

Sutherland, G.R. *et al.* Prenatal diagnosis of fragile x syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* **329**, 977–986 (1991).

Sutherland,G. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. Science 197:265-266 (1977).

Suzumori, K., Yamauchi, M., Seki, N., Kondo, I. & Hori, T. A. Prenatal 1. Samulski, R. J. & Asokan, A. Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. **7**, 1–9 (2014).

Tabet, R. *et al.* Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E3619–E3628 (2016).

Tabet, R., Vitale, N. & Moine, H. Fragile X syndrome : Are signaling lipids the missing culprits? *Biochimie* **130**, 188–194 (2016b).

Taha, M. S. *et al.* Novel FMRP interaction networks linked to cellular stress. *FEBS J.* 1–24 (2020).

Tamanini, F. et al. Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. Hum. Mol. Genet. **8**, 863–869 (1999).

Tamanini, F. et al. Differential expression of *FMR1*, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. Hum. Mol. Genet. **6**, 1315–1322 (1997).

Tamanini, F. *et al.* FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 809–813 (1996).

Tamanini, F. The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins. Hum. Mol. Genet. **9**, 1487–1493 (2000).

Tanguy, Y. *et al.* Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 1–10 (2015).

Tassone, F. & Hagerman, R. Modeling Fragile X Syndrome. *Results Probl. Cell Differ.* **54**, 337–57 (2012).
Tecott, L. H. The genes and brains of mice and men. *Am. J. Psychiatry* **160**, 646–656 (2003).
Ted Brown, W. Genetics of autism. *Autism Oxidative Stress. Inflammation, Immune Abnorm.* 61–72 (2009).

Tenenbaum, L. *et al.* Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J. Gene Med.* **6**, 212–222 (2004).

The Dutch-Belgian Fragile X Consorthium *et al. Fmr1* knockout mice: A model to study fragile X mental retardation. *Cell* **78**, 23–33 (1994).

Thelen, M. P. & Kye, M. J. The Role of RNA Binding Proteins for Local mRNA Translation: Implications in Neurological Disorders. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 1–13 (2020).

Thomson, S. R. *et al.* Cell-Type-Specific Translation Profiling Reveals a Novel Strategy for Treating Fragile X Syndrome. *Neuron* **95**, 550-563.e5 (2017).
Tian, Y. *et al.* Loss of FMRP impaired hippocampal long-term plasticity and spatial learning in rats. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 1–14 (2017).
Till, S. M. *et al.* Conserved hippocampal cellular pathophysiology but distinct behavioural deficits in a new rat model of FXS. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5977–5984 (2015).

Todd, A. G., Shaw, D. J., Morse, R., Stebbings, H. & Young, P. J. SMN and the Gemin proteins form sub-complexes that localise to both stationary and dynamic neurite granules. Biochem. Biophys. Res. Commun. **394**, 211–216 (2010).

Todd, P. K. *et al.* CGG Repeat-Associated Translation Mediates Neurodegeneration in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron* 78:440-455 **78**, (2014).

Tranfaglia, M.R. Fragile X syndrome : A psychiatric perspective. *Modeling Fragile X Syndrome*. *Results and problems in cell differentiation* **54**, (2012).

Triller, A. & Sheng, M. Synaptic structure and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 363–365 (2012).

Tuccori, M. *et al.* Pioglitazone use and risk of bladder cancer: Population based cohort study. *BMJ* **352**, 1–8 (2016).

Tucker, B., Richards, R. I. & Lardelli, M. Contribution of mGluR and *Fmr1* functional pathways to neurite morphogenesis, craniofacial development and fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 3446–3458 (2006).

Tuerk, C., Gold,L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to BacteriophageT4 DNA Polymerase. *American Association for the Advancement of Science* (1990).

Turturro, F., Oliver, R., Friday, E., Nissim, I. & Welbourne, T. Troglitazone and pioglitazone interactions via PPAR-γ-independent and -dependent pathways in regulating physiological responses in renal tubule-derived cell lines. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **292**, 1137–1146 (2007).

Tyzio, R. *et al.* Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science (80).* **343**, 675–679 (2014).

Urabe, M., Ding, C. & Kotin, R. M. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1935–1943 (2002).

Utari, A. *et al.* Aging in fragile X syndrome. *J. Neurodev. Disord.* **2**, 70–76 (2010).

Valdez-Sinon, A. N. *et al.* Cdh1-APC Regulates Protein Synthesis and Stress Granules in Neurons through an FMRP-Dependent Mechanism. *iScience* **23**, 101132 (2020).

Valverde, R., Edwards, L. & Regan, L. Structure and function of KH domains. FEBS J. **275**, 2712–2726 (2008).

Valverde, R., Pozdnyakova, I., Kajander, T., Venkatraman, J. & Regan, L. Fragile X Mental Retardation Syndrome: Structure of the KH1-KH2 Domains of Fragile X Mental Retardation Protein. Structure **15**, 1090–1098 (2007).

Van Dam, D. *et al.* Spatial learning, contextual fear conditioning and conditioned emotional response in *Fmr1* knockout mice. *Behav. Brain Res.* **117**, 127–136 (2000).

Van't Padje, S. et al. Reduction in fragile X related 1 protein causes cardiomyopathy and muscular dystrophy in zebrafish. J. Exp. Biol. **212**, 2564–2570 (2009).

Vasilyev, N. et al. Crystal structure reveals specific recognition of a G-quadruplex RNA by a β-turn in the RGG motif of FMRP. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **112**, E5391–E5400 (2015).

Vegter, S., Rozenbaum, M. H., Postema, R., Tolley, K. & Postma, M. J. Review of regulatory recommendations for orphan drug submissions in the netherlands and scotland: Focus on the underlying pharmacoeconomic evaluations. *Clin. Ther.* **32**, 1651–1661 (2010).

Verkerk, A. J. M. h. *et al.* Alternative splicing in the fragile X gene *FMR1*. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 399–404 (1993).

Verkerk, A. J. M. H. *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**, 905–914 (1991).

Verma, I. M. & Weitzman, M. D. GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 711–738 (2005).

Verrier, E. *et al.* PPARγ agonists ameliorate endothelial cell activation via inhibition of diacylglycerol-protein kinase C signaling pathway: Role of diacylglycerol kinase. *Circ. Res.* **94**, 1515–1522 (2004).

Veverka, V. *et al.* Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: Compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* **27**, 585–595 (2008).

Vissers, L. E. L. M., Gilissen, C. & Veltman, J. A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 9–18 (2016).

vom Dorp, K. *et al*. Chapter 6 Distinguishing Phosphatidic Acid Pools from De Novo. **1009**, 261–271 (2013).

Wan, L., Dockendorff, T. C., Jongens, T. A. & Dreyfuss, G. Characterization of d*FMR1*, a Drosophila melanogaster Homolog of the Fragile X Mental Retardation Protein. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8536–8547 (2000).

Wan, R. P. *et al.* Involvement of FMRP in Primary MicroRNA Processing via Enhancing Drosha Translation. *Mol. Neurobiol.* **54**, 2585–2594 (2017).

Wang, B. et al. FMRP-Mediated Axonal Delivery of miR-181d Regulates Axon Elongation by Locally Targeting Map1b and Calm1. Cell Rep. **13**, 2794–2807 (2015).

Wang, E. T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature **456**, 470–476 (2008).

Wang, E. T. *et al.* Dysregulation of mRNA localization and translation in genetic disease. *J. Neurosci.* **36**, 11418–11426 (2016).

Waterson,Consortium, M. G. S. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520–562 (2002).

Waterston *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520–562 (2002).

Waung, M. W. & Huber, K. M. Protein translation in synaptic plasticity: mGluR-LTD, Fragile X Rapid postsynaptic translation is required for mGluR-dependent LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 319–326 (2009).

Weiler, I. J. *et al.* Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17504–17509 (2004).

Weiler, I. J. *et al.* Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5395–5400 (1997).

West, A. E. & Greenberg, M. E. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–21 (2011).

Wijetunge, L. S., Chattarji, S., Wyllie, D. J. A. & Kind, P. C. Fragile X syndrome: From targets to treatments. *Neuropharmacology* **68**, 83–96 (2013).

Willard, S. S. & Koochekpour, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int. J. Biol. Sci.* **9**, 948–959 (2013).

Willemsen, R. *et al.* Association of FMRP with Ribosomal Precursor Particles in the Nucleolus mental retardation, macroorchidism and facial abnormalities as the main characteristics in of a CGG repeat in the first exon of the *FMR1* gene 2-4.This expansion in patients results. **33**, 27–33 (1996).

Willemsen, R., Bontekoe, C. J. M., Severijnen, L. A. & Oostra, B. A. Timing of the absence of *FMR1* expression in full mutation chorionic villi. *Hum. Genet.* **110**, 601–605 (2002).

Wilson, J. M. Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Get. to Good Res. Integr. Biomed. Sci.* **96**, 490–497 (2018).

Winner, L. K. *et al.* A preclinical study evaluating AAVrh10-based gene therapy for sanfilippo syndrome. *Hum. Gene Ther.* **27**, 363–375 (2016).

Winograd, C. & Ceman, S. Fragile X family members have important and non-overlapping functions. Biomol. Concepts **2**, 343–352 (2011).

Wirth, T., Parker, N. & Ylä-Herttuala, S. History of gene therapy. *Gene* **525**, 162–169 (2013).

Wisniewski, K. E., Segan, S. M., Miezejeski, C. M., Sersen, E. A. & Rudelli, R. D. The fra(X) syndrome: Neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities. *Am. J. Med. Genet.* **38**, 476–480 (1991).

Wood, P. L. *et al.* Targeted Lipidomics of Fontal Cortex and Plasma Diacylglycerols (DAG) in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Validation of DAG Accumulation Early in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **48**, 537–546 (2015).

Wood, P. L. *et al.* Targeted Lipidomics of Fontal Cortex and Plasma Diacylglycerols (DAG) in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Validation of DAG Accumulation Early in the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **48**, 537–546 (2015).

Wood, P. L., Tippireddy, S., Feriante, J. & Woltjer, R. L. Augmented frontal cortex diacylglycerol levels in Parkinson's disease and Lewy Body Disease. *PLoS One* **13**, 1–15 (2018).

Wozniak, J. R., Riley, E. P. & Charness, M. E. Clinical presentation, diagnosis, and management of fetal alcohol spectrum disorder. *Lancet Neurol.* **18**, 760–770 (2019).

Wu, Q. *et al.* The RNase III enzyme DROSHA is essential for MicroRNA production and spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 25173–25190 (2012).

Wu, X.-Y. & Li, A.-X. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 58:389–462, (2006).

Wu, Z. Hong, Zhao, S. Ping, Chu, L. Xiang & Ye, H. Jun. Pioglitazone reduces tumor necrosis factor-α serum concentration and mRNA expression of adipose tissue in hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Cardiol.* **138**, 151–156 (2010).

Wu, Z. Hong, Zhao, S. Ping, Chu, L. Xiang & Ye, H. Jun. Pioglitazone reduces tumor necrosis factor-α serum concentration and mRNA expression of adipose tissue in hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Cardiol.* 138, 151–156 (2010).

Wyant, G.A. et al. NUFIP1 is a ribosome receptor for starvation-induced ribophagy. Science. **360** (6390), 751–758 (2018).

Xiao, Q., Hu, X., Wei, Z. & Tam, K. Y. Cytoskeleton molecular motors: Structures and their functions in neuron. *Int. J. Biol. Sci.* **12**, 1083–1092 (2016).

Xiao, W. *et al.* Gene Therapy Vectors Based on Adeno-Associated Virus Type 1 Gene Therapy Vectors Based on Adeno-Associated Virus Type 1. *J. Virol. Methods* **73**, 3994 (1999).

Xiao, X., Xiao, W., Li, J. & Samulski, R. J. A novel 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adeno-associated virus life cycle. *J. Virol.* **71**, 941–948 (1997).

Xu, D. et al. Top3 β is an RNA topoisomerase that works with Fragile X syndrome protein to promote synapse formation. Nat.Neurosci. **16**(9): 1238-1247 (2013).

Xu, X. L., Li, Y., Wang, F. & Gao, F. B. The steady-state level of the nervous-system-specific microRNA-124a is regulated by d*FMR1* in Drosophila. *J. Neurosci.* **28**, 11883–11889 (2008).

Xu, Z. H. *et al.* Group i mGluR antagonist rescues the deficit of D1-induced LTP in a mouse model of fragile X syndrome. *Mol. Neurodegener.* **7**, 1–14 (2012).
Yan *et al.* Suppression of two major Fragile X Syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology* (2005).

Yang, J. *et al.* DGKl regulates presynaptic release during mGluR-dependent LTD. *EMBO J.* **30**, 165–180 (2011).

Yang, Q. *et al.* Development o f N o v e l Cell Surface Vectors Recombinant Adenoassociated Virus for G e n e Therapy. **1937**, 1929–1937 (1998).

Yang, W., Tu, Z., Sun, Q. & Li, X. J. CRISPR/Cas9: Implications for modeling and therapy of neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 28–31 (2016).

Yki-Jarvinen H. Drug Therapy: Thiazolidinediones. *N Engl J Med* **351**, 1106–1118 (2004).

Yu, S. *et al*. Fragile X Genotype Characterized by an unstable region of DNA.*Case Reports Scienc*e.1179–1181 (1991)

Zabner, J. *et al.* Adeno-Associated Virus Type 5 (AAV5) but Not AAV2 Binds to the Apical Surfaces of Airway Epithelia and Facilitates Gene Transfer. *J. Virol.* **74**, 3852–3858 (2000).

Zaiss, A.K. *et al.* Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *Journal of virology*. **76**, 4580–4590 (2002).

Zang, J. B. *et al.* A mouse model of the human fragile X syndrome I304N mutation. *PLoS Genet.* **5**, (2009).

Zeier,Z. *et al.* Fragile X mental retardation protein replacement restores hippocampal synaptic function in a mouse model of fragile X syndrome. *Gene Ther.* 16(9): 1122–1129 (2009).

Zeng, Y. *et al.* AAVrh-10 transduces outer retinal cells in rodents and rabbits following intravitreal administration. *Gene Ther.* **26**, 386–398 (2019).

Zhang, A., Shen, C. H., Ma, S. Y., Ke, Y. & Idrissi, A. El. Altered expression of Autism-associated genes in the brain of Fragile X mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 920–923 (2009).

Zhang, H. et al. Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. J. Neurosci. **26**, 8622–8632 (2006).

Zhang, H. L. *et al.* Neurotrophin-induced transport of a β-actin mRNP complex increases β-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **31**, 261–275 (2001).

Zhang, J. et al. Expression and Characterization of Human Fragile X Mental Retardation Protein Isoforms and Interacting Proteins in Human Cells. Proteomics Insights **10**, 117864181882526 (2019).

Zhang, L. & Alger, B. E. Enhanced endocannabinoid signaling elevates neuronal excitability in fragile X syndrome. *J. Neurosci.* **30**, 5724–5729 (2010).

Zhang, Y. *et al.* The Fragile X Mental Retardation Syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J.* **14**, 5358–5366 (1995).

Zhang, Y. Q. *et al.* Drosophila fragile x-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell* **107**, 591–603 (2001).

Zhang, Y., Kang, H. R. & Han, K. Differential cell-type-expression of CYFIP1 and CYFIP2 in the adult mouse hippocampus. Animal Cells Syst. (Seoul). **23**, 380–383 (2019).

Zhou, G.-L. *et al.* Akt Phosphorylation of Serine 21 on Pak1 Modulates Nck Binding and Cell Migration. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8058–8069 (2003).

Zhu, J., Huang, X. & Yang, Y. The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adenoassociated virus gene therapy vectors in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2388–2398 (2009).

Zimmer, S.E. *et al*. Splice form-dependent regulation of axonal arbor complexity by FMRP. *Dev Neurobiol.77(6): 738–75* 5 (2017).

Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G. & Rabinowitz, J. E. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* **16**, 1073–1080 (2008).

Zoghbi, H. Y. & Bear, M. F. Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).

Zweier, M. *et al.* Spatially clustering de novo variants in CYFIP2, encoding the cytoplasmic FMRP interacting protein 2, cause intellectual disability and seizures. *Eur. J. Hum. Genet.* **27**, 747–759 (2019).

Karima HABBAS

# La diacylglycérol kinase kappa (Dgkk) comme nouvelle cible thérapeutique dans le modèle murin Fmr1-KO du syndrome de l'X Fragile


## Résumé

Le syndrome de l'X fragile (FXS) est la première cause familiale de déficience intellectuelle et d'autisme. Le FXS est causé par l'absence de la protéine FMRP causée par l'inactivation du gène *FMR1*. Comprendre comment l'absence de FMRP conduit à des altérations synaptiques est important pour définir les bases moléculaires du FXS et identifier un traitement. Dans les neurones corticaux, FMRP contrôle la traduction de la diacylglycérol kinase DgkK, une enzyme contrôlant la signalisation lipidique et dont la dérégulation est suffisante pour récapituler les phénotypes de type FXS. Sur la base de ces données suggérant que la DgkK joue un rôle clé dans le mécanisme pathologique du FXS, nous avons ciblé l'activité DGK par des approches pharmaceutiques et de thérapie génique. Chez la souris *Fmr1*-KO, un agoniste des DGK, la pioglitazone, corrige la signalisation excessive du DAG et les comportements FXS. Les virus adéno-associés (AAV) exprimant un transgène FMRP indépendant de la DgkK corrigent également les phénotypes FXS. Dans l'ensemble, nos données indiquent que la dérégulation de la DgkK contribue au FXS et représente une cible thérapeutique prometteuse.


**Mots clés :** Syndrome de l'X Fragile, *Fmr1*-KO, diacylglycérol kinase kappa, pioglitazone, thérapie génique, AAV, lipides


## Summary

The Fragile X syndrome (FXS) is the first familial cause of intellectual disability and autism. FXS is caused by the absence of the FMRP protein caused by *FMR1* gene silencing. Understanding how the lack of FMRP leads to synaptic alterations is important to define the molecular basis of FXS and identify a treatment. In cortical neurons, FMRP controls the translation of diacylglycerol kinase DgkK, a master regulator controlling lipid signaling and whose deregulation is sufficient to recapitulate FXS-like phenotypes. Based on these data suggesting that DgkK plays a key role in FXS pathomechanism, we targeted DGK activity by pharmaceutical and gene-therapy approaches. In *Fmr1*-KO mouse, DGK agonist, pioglitazone, corrects excessive DAG signaling and FXS behaviors. Adeno-associated viruses (AAV) expressing an FMRP-independent-DgkK transgene also rescue FXS phenotypes. Altogether our data indicate that DgkK deregulation contributes to FXS and represents a promising therapeutic target.


**Keywords:** Fragile X syndrome, *Fmr1*-KO diacylglycerol kinase kappa, pioglitazone, gene therapy, AAV, lipids