

**Université de Limoges**

**ED 652 – Biologie, Chimie, Santé (BCS)**

**UR 20218 NEURIT – Neuropathies et innovations thérapeutiques**

Thèse pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Limoges  
Spécialité Neurosciences

Présentée et soutenue par  
**Nesrine BENSLIMANE**

Le 12 décembre 2022

**Caractérisation d'un modèle *in vitro* de cellules neuronales issues d'iPSc  
porteuses d'une mutation non-sens sur le gène *GDAP1*  
responsable de la maladie de Charcot-Marie-Tooth  
et tests d'approches thérapeutiques innovantes**

Thèse dirigée par Dr Anne-Sophie LIA et Pr Frédéric FAVREAU

JURY :

Rapporteurs

M. Giovanni Stevanin

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), Paris

M. Patrick Vourc'h

UMR Inserm U 1253 – iBrain, Université de Tours

Examineurs

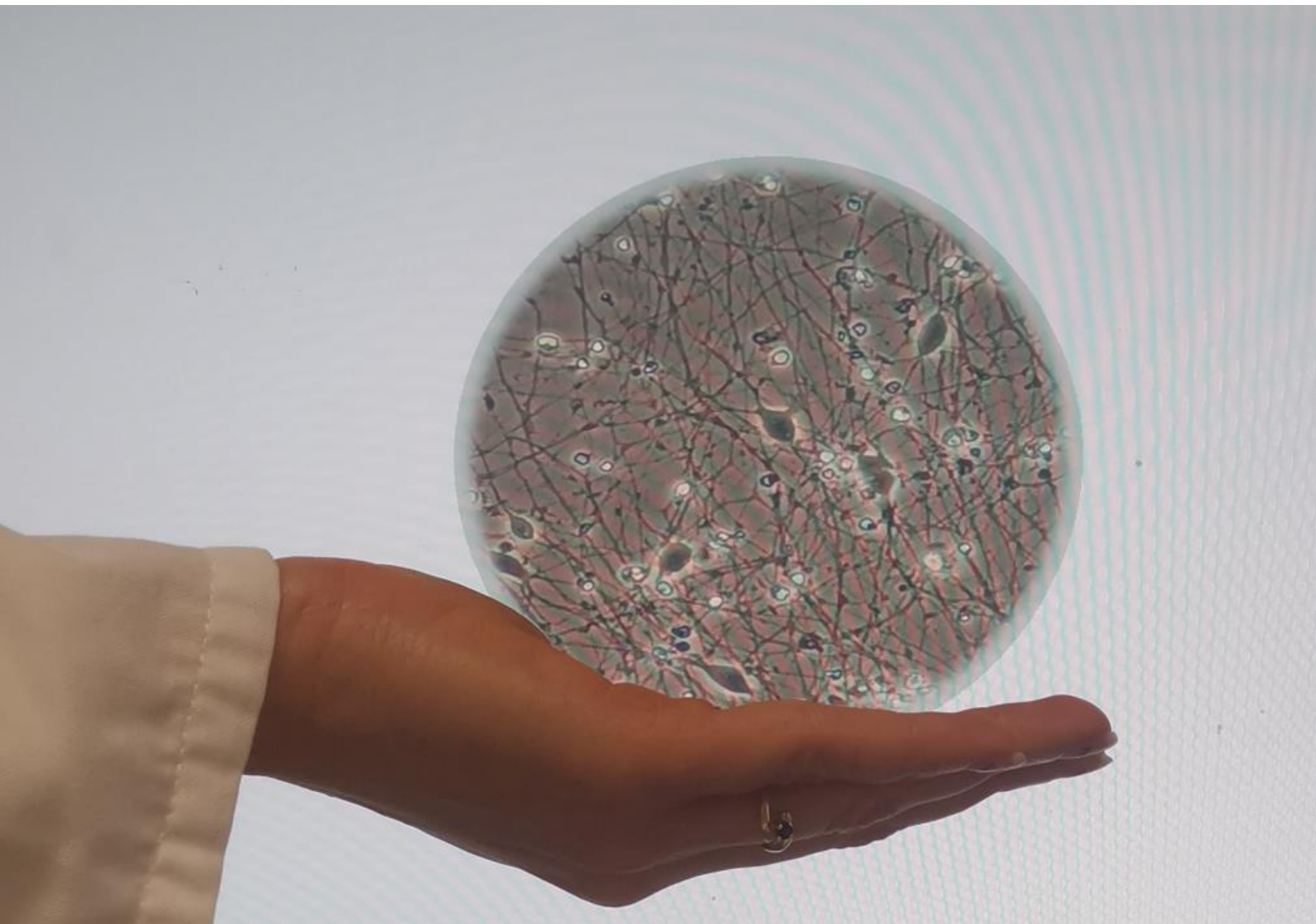
Mme. Béatrice Turcq

INSERM U1312 BRIC, Université de Bordeaux

M. Fabrice Lejeune

UMR9020 CNRS -U1277 Inserm, Institut de Biologie Lille





**Caractérisation d'un modèle *in vitro* de cellules neuronales issues d'iPSc  
porteuses d'une mutation non-sens sur le gène *GDAP1*  
responsable de la maladie de Charcot-Marie-Tooth  
et tests d'approches thérapeutiques innovantes**

*Je dédie cette thèse à la mémoire de ma défunte grand-mère, une femme exceptionnelle, qui avait le don de toujours donner les bons conseils, ses mots encourageants m'ont permis de persévérer, grâce à elle j'ai réussi à trouver ma voie, et c'est elle qui m'a appris à être forte afin de poursuivre mes rêves jusqu'au bout.*

*Je suis de ce qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant de phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.*

**Marie Curie**



### *Au terme de ce travail je remercie*

J'adresse tout d'abord mes remerciements les plus sincères au **Professeur Franck Sturtz**, de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Je le remercie, pour sa bienveillance, ses conseils enrichissants, qui ont été bénéfique pour ma thèse.

J'adresse tous mes remerciements au **Professeur Patrick Vourc'h** et **docteur Giovanni Stevanin**, de l'honneur qu'ils m'ont réservé en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

J'adresse également mes remerciements aux **Docteur Beatrice Turcq**, et **Docteur Fabrice Lejeune**, pour leur participation afin de parfaire ce travail de recherche en tant qu'examineurs de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement **le Docteur Fabrice Lejeune**, pour son accueil dans son laboratoire durant ma semaine de stage à Lille, très reconnaissante pour cette formation enrichissante où j'ai appris la transfection des lignées ainsi que le traitement avec les molécules de translecture. Je profite également pour le remercier de m'avoir offert gracieusement les molécules de translecture et les constructions plasmidiques qui m'ont permis d'entamer mes travaux de recherche.

Mes remerciements les plus sincères aux institutions qui ont soutenu financièrement ces travaux de thèse : la Région de la nouvelle aquitaine, et l'ANR (Agence National de la Recherche).

Mes remerciements les plus sincères et les plus distingués vont à mes co-directeurs de thèse : **Docteur Anne-Sophie LIA** et **professeur Frédéric Favreau**. Je les remercie par ailleurs d'avoir accepté de diriger ma thèse, et de m'avoir proposé un sujet de recherche qui m'a passionné et motivé tout au long de ma thèse malgré les difficultés.

Ma profonde gratitude va au **docteur Anne-Sophie LIA**, qui a été ma marraine dès mon arrivée à Limoges et qui m'a immédiatement accordé sa confiance et m'a constamment encouragé, conseillé, guidé avec sa gentillesse et sa disponibilité.

Ma plus sincère reconnaissance au **Professeur Frédéric Favreau**, pour ses précieux conseils et son esprit positif qui m'ont permis de progresser.

**Federica**, une personne très gentille, formidable, merci d'être là, de m'avoir transmis les bonnes pratiques de la culture des iPSc (en feeder), sur la différenciation neuronale, et surtout d'avoir pris le temps jusqu'à que j'arrive à voir ces minuscules rosettes (les vrais pas le poisson). Merci pour ta participation à la correction de ma thèse. En me regardant dans les yeux tu me comprenais vite si j'étais bien ou pas, merci d'être présente dans les moments difficiles. Qui donc mieux que toi pour comprendre ce que cela signifie : la joie d'un bon résultat, la frustration d'un mauvais résultat, et les weekends au labo.

**Aurore**, merci d'avoir supporté ma phrase à chaque fois que je rentais dans l'open space (Hi Aurore), une personne extraordinaire, merci pour l'aide que tu m'as apporté pour finaliser cette thèse, merci pour ta bonne humeur, et ta joie de vivre.

**Amandine B**, nous avons commencé cette thèse ensemble et nous la finissons ensemble (décalage d'un mois et 2 jours), tu es une superbe fille, merci pour ton amitié, ton soutien, tes conseils, et ta gentillesse. Je te souhaite bon courage pour la suite « Dr. Amandine ».

**Ioanna**, c'est ta dernière année de thèse, tu vas y arriver, je crois en toi, une amie formidable, j'ai beaucoup d'estime pour toi, merci pour nos moments de manip et nos discussions sous la même hotte. 그것은 당신의 논문의 마지막 해에, 당신은 거기에 도착할 것입니다. 나는 당신을 믿습니다. 좋은 친구, 나는 당신을 많이 존경합니다. 우리의 처리 순간과 같은 후드 아래에서 토론해 주셔서 감사합니다. Je parle bien coréen lol.

**Fede**, **Ioannnnnnnaaaa**, **AmandineB**, merci pour les bons moments passés ensemble à Bordeaux, Montpellier, Paris, Rennes, et en fin Miami. Je garde de très bons souvenirs.

**Angélique**, merci pour toutes les commandes de produits que tu as pu passer en urgence, ainsi que pour tes remarquables qualités humaines et sociales que j'ai apprécié pendant ces années de thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance à **Laurence**, pour tout le temps consacré afin d'analyser chaque lame, et l'expertise en microscopie électronique, merci pour tes encouragements à chaque expérience foirée, tu as su trouver les beaux mots pour me reconforter et me remonter le morale, me soutenir, par tes précieux conseils, j'ai de la chance de t'avoir connue je ne t'oublierai jamais,

**Fanny**, toujours prête à m'accueillir avec le sourire, Ravie de t'avoir connue, je t'apprécie vraiment

**Hichem**, après ton départ, j'ai senti un grand vide dans l'open space, merci d'être présent pendant ma première année de thèse.

**Simon**, mon médecin traitant, merci pour tes consultations bénéfiques, et tes conseils concernant ma santé. Merci pour le Coca Cola qui me remonter le morale.

**Camille L** « Madame CRISPR », merci pour ton aide, ton soutien, et tes compétences en Anglais qui m'ont beaucoup aidé. Bon courage ma collègue du weekend.

**Camille S**, bienvenue dans l'équipe, je compte sur toi pour finaliser le projet de recherche.

**MoMo**, merci pour la sauce mayonnaise du Crous, bon courage pour la suite de ton parcours doctoral.

**Paco**, je te remercie pour tes compétences informatiques, et pour ta gentillesse.

**PAF**, ravie de t'avoir connue dans l'équipe iPSc, merci pour tes conseils dans ce domaine.

**Flavien**, Merci pour ta gentillesse, et tes encouragements

**Michele**, grâce à toi, j'avais les bonnes conditions pour rédiger cette thèse, un endroit propre et bien rangé, merci de t'être occupée de ma plante Géraldine tous les jours.

**Amandine R**, merci pour ton expertise en MEA, tes conseils sur la différenciation, merci pour ta gentillesse, et ton aide.

Sans oublier **rosette** et **bessy** (mes deux poissons), merci d'avoir passé un court séjour dans l'open space.

Mes remerciements sont également pour tous les membres de l'équipe **NeurIT**.

Mes pensées vont aussi à tous mes amis de France et d'Algérie qui m'ont toujours motivé et encouragé.

**À mes très chers parents**, merci d'avoir cru en moi, soutenir mes choix, grâce à vous j'ai réalisé mon rêve d'enfant. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot, et chaque lettre, vous exprime la reconnaissance, le respect, et le merci d'être mes parents, bientôt avec vous en Algérie. Je vous aime.

**Manel**, Tu es une sœur formidable, très très très généreuse, merci pour ton soutien et ton aide depuis mon arrivé en France. Merci pour tous les aller-retours « Tours-Limoges\_Limoges-Tours », juste pour me ramener les bons plats ainsi que les courses

étant occupée par mes expériences au labo. Merci de m'avoir accompagné au Maroc ou on a passé des moments inoubliables « sortie sur bateaux, la promenade sur dos de chameaux, et nos moments de fous rires,... ».

**Ninou** et **Touta**, neveu et nièce adorés, vous êtes ma joie de vivre, vos blagues ont été un grand réconfort dans les moments de stress.

**Naima**, une tante idéale, qui m'a toujours soutenu, cru en moi, un grand merci pour ta confection de la soutane de thèse, bientôt ensemble.

**Djilali**, je ne te remercie jamais assez pour ce que tu as fait pour moi, malgré cette distance tu as su m'aider à ta façon pour pouvoir finir cette année.

Un grand merci également à toute la famille **PAPIN**, qui dès le début m'ont accueillie très chaleureusement et tout particulièrement à **Colette**, qui me considère comme sa propre fille, en étant loin de chez moi. Merci du fond du cœur à **Angélique**, d'être là dans les bons et les mauvais moments, Je t'aime beaucoup, et je souhaite que du bonheur. A **Kevin**, merci de m'avoir encouragé à postuler pour une thèse après mon master, pour ton soutien et tes encouragements, merci de m'avoir supporté surtout pour faire la tournée des magasins pour choisir des chaussures.

Pour cette thèse, qui m'a permis d'être fière de moi, en fin j'ai exaucé mon rêve d'être docteur dans le domaine de la recherche scientifique, cette thèse m'a appris l'acharnement et le courage jusqu'à l'obtention de mes premiers motoneurones.

Le meilleur pour la fin « **Amyas** » et son copain « **Felix** de Tours »

Mon petit chat adoré, qui a été le compagnon idéal tout au long de cette thèse, et merci Félix de t'être occupé de lui et le supporter durant son séjour à Tours.

Enfin, ces remerciements sont adressés à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé ou soutenu tout le temps qu'avait duré la réalisation de cette thèse.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

<b>Introduction</b> .....	16
<b>Partie I. Neuropathies Périphériques &amp; la maladie de Charcot-Marie-Tooth</b> .....	17
I.1. Les Neuropathies Périphériques .....	18
I.1.1. Généralités sur les neuropathies périphériques .....	18
I.1.2. Les neuropathies périphériques d'origine génétique .....	18
I.1.3. Architecture du système nerveux périphérique .....	19
I.1.3.1. Le neurone .....	20
I.1.3.2. Classification des neurones .....	22
I.1.3.2.1. Classification morphologique .....	22
I.1.3.2.2. Classification fonctionnelle .....	23
I.1.3.3. La cellule de Schwann .....	24
I.2. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) .....	25
I.2.1. Physiopathologie et clinique de la CMT .....	25
I.2.2. Classification de la CMT .....	26
I.2.2.1. Classification basée sur l'aspect électrophysiologique .....	27
I.2.2.2. Classification basée sur le mode de transmission génétique .....	28
I.2.2.2.1. CMT à transmission autosomique dominante .....	28
I.2.2.2.2. CMT à transmission autosomique récessive .....	28
I.2.2.2.3. CMT lié au chromosome X .....	29
I.2.2.3. Classification basée sur le gène en cause .....	29
I.2.3. Mécanismes moléculaires et génétiques de la CMT .....	30
I.2.3.1. Défaut d'assemblage de la myéline .....	31
I.2.3.2. Cytosquelette et transport axonal .....	32
I.2.3.3. Dysfonctionnement mitochondrial .....	33
I.2.3.4. Processus de l'ARNm .....	34
I.2.3.5. Transport endosome et signalisation .....	34
I.2.3.6. Protéasome et agrégation de protéines .....	34
I.2.3.7. Les canaux .....	35
<b>Partie II. La mitochondrie</b> .....	36
II.1. L'origine de la mitochondrie .....	37
II.2. La structure de la mitochondrie .....	37
II.3. Le génome mitochondrial .....	39
II.4. Les fonctions de la mitochondrie .....	39
II.4.1. La production d'énergie .....	39
II.4.2. L'homéostasie calcique .....	40
II.4.3. Le stress oxydant .....	42
II.4.4. Dynamique mitochondriale .....	47
II.4.4.1. Fusion/Fission mitochondriale .....	48
II.4.5. Transport mitochondrial .....	50
II.4.6. La mitophagie .....	51
<b>Partie III. Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1)</b> .....	53
III.1. Du gène à la protéine .....	54
III.1.1. Le gène <i>GDAP1</i> .....	54
III.1.2. La protéine GDAP1 .....	54
III.1.2.1. Expression de la protéine GDAP1 .....	54

III.1.2.2. La structure de la protéine GDAP1 .....	55
III.1.2.3. Dimérisation de GDAP1 .....	56
III.1.3. GDAP1L1 (GDAP1like1).....	57
III.2. Rôle de <i>GDAP1</i> .....	57
III.2.1. GDAP1 et mitochondrie .....	58
III.2.1.1. GDAP1 et dynamique mitochondriale.....	58
III.2.1.2. GDAP1 et transport mitochondrial.....	59
III.2.1.3. GDAP1 et le stress oxydatif .....	60
III.2.1.4. GDAP1 et l'activité bioénergétique.....	62
III.2.1.5. GDAP1 et le potentiel membranaire de la mitochondrie .....	62
III.2.1.6. GDAP1 et l'homéostasie calcique .....	63
III.2.2. GDAP1 et autres organistes .....	65
III.2.2.1. 3.2.1. GDAP1 et Golgi.....	65
III.2.2.2. <i>GDAP1</i> et peroxysomes.....	65
III.2.2.3. GDAP1 et lysosome.....	65
III.2.2.4. GDAP1 et l'autophagie.....	66
III.3. <i>GDAP1</i> impliqué dans le CMT .....	66
III.3.1. Les mutations de <i>GDAP1</i> .....	66
III.3.2. Transmission de <i>GDAP1</i> .....	67
III.3.2.1. Mutations <i>GDAP1</i> à transmission autosomique récessive.....	67
III.3.2.2. Mutations <i>GDAP1</i> à transmission autosomique dominante .....	68
III.3.3. Corrélation génotype- phénotype.....	69
III.3.4. Le modèle animal et cellulaire de <i>GDAP1</i> .....	70
III.3.5. Modèles animaux <i>GDAP1</i> .....	70
III.3.5.1. Modèle de souris.....	70
III.3.5.2. Modèle de drosophiles .....	71
III.3.5.3. Modèle de zebrafish.....	71
III.3.5.4. Modèle de levure.....	71
III.3.5.5. Modèles cellulaires.....	72
III.3.5.5.1. Culture de cellules primaires.....	72
III.3.5.5.2. Culture de lignée cellulaire.....	73
III.3.5.5.3. Culture cellulaire à base de cellules souches pluripotentes induites ou iPSC.....	73
Partie IV. Strategies thérapeutiques .....	75
IV.1. Stratégies thérapeutiques appliquées aux neuropathies périphériques .....	76
IV.1.1. Thérapie basée sur la thérapie génique .....	77
IV.1.1.1. Les vecteurs .....	77
IV.1.1.2. Administration de Nanomédicaments.....	77
IV.1.1.2.1. Oligonucléotides antisens (ASO) .....	78
IV.1.1.2.2. ARN interférents.....	79
IV.1.1.3. CRISPR cas9 .....	80
IV.1.1.4. Les limites de la thérapie génique appliquées aux CMT .....	81
IV.1.2. Thérapie basée sur l'utilisation de molécules pharmacologiques .....	81
IV.1.2.1. Acide ascorbique ou vitamine C.....	81
IV.1.2.2. PXT3003 .....	82
IV.1.2.3. Curcumine .....	82
IV.1.2.4. Mélatonine .....	83
IV.1.2.5. Des antagonistes de progestérone .....	83

IV.1.2.6. Neuregulin-1 type III (NRG1) .....	84
IV.2. Stratégies appliquées aux mutations non-sens.....	84
IV.2.1. Stratégie par des approches basées sur l'acide nucléique .....	86
IV.2.1.1. Les ARNt supprimeurs .....	86
IV.2.1.2. Oligonucléotides .....	87
IV.2.1.3. Edition de l'ARNt par les enzymes ADA « Adenosine deaminase acting on RNA » .....	88
IV.2.1.4. La technologie de CRISPR .....	88
IV.2.2. Stratégie par des approches basées sur des molécules de translecture (Revue) .....	89
<b>Objectifs</b> .....	90
<b>Résultats</b> .....	93
Article 1 (revue): Read-through activator and NMD inhibitors molecules in neurodegenerative diseases .....	94
Article 2: GDAP1 Involvement in Mitochondrial Function and Oxidative Stress, Investigated in a Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived Motor Neurons .....	130
Efficacité des molécules de translecture et inhibiteurs du NMD sur des progéniteurs neuronaux porteurs de la mutation c.581C>G (p.Ser194*), à l'état homozygote sur le gène GDAP1 .....	153
Article 3: Amlexanox: A double property of Read-through and Nonsense Mediated Decay Inhibition in Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived neuronal cells harboring a nonsense mutation in the GDAP1 gene.....	164
Article 4: From Negative to Positive Diagnosis: Structural Variation Could Be the Second Mutation You Are Looking for in a Recessive Autosomal Gene .....	186
<b>Discussion et perspectives</b> .....	197
Partie I. Les iPSc : une technologie extrêmement utile à l'étude des neuropathies périphériques d'origine génétique.....	198
Partie II. Différenciation des iPSc en cellules neuronales :un modèle essentiel pour comprendre les voies physiopathologiques et développer de nouveaux modèles cellulaires innovants adaptés aux neuropathies périphériques d'origine génétique. ....	200
Partie III. Analyses fonctionnelles de GDAP1: caractérisation de son rôle dans le stress oxydant et les fonctions mitochondriales.....	203
Partie IV. Efficacité des Molécules de translecture et inhibiteurs du NMD sur les cellules neuronales porteuses de la mutation non-sens c.581C>G dans le gène GDAP1. ....	205
Partie V. Autres molécules thérapeutiques : tests préliminaires.....	209
Partie VI. Autres gènes CMT et autres modèles .....	211
<b>Conclusion</b> .....	212
<b>Références bibliographiques</b> .....	214

## Table des illustrations

---

Figure 1 : Structure d'un nerf périphérique .....	20
Figure 2 : Structure d'un neurone .....	21
Figure 3 : Différents types de neurones selon la classification morphologique .....	23
Figure 4 : Les docteurs Charcot, Marie et Tooth : premiers à décrire la maladie de CMT ....	25
Figure 5 : Présentation clinique résumée de la CMT .....	26
Figure 6 : Différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth selon la valeur de la vitesse de conduction nerveuse (VCN).....	27
Figure 7 : Patho-mécanismes de gènes impliqués dans le CMT. ....	31
Figure 8 : Structure de la mitochondrie.....	38
Figure 9 : Représentation schématique sur la production d'ATP .....	40
Figure 10 : Représentation schématique sur l'homéostasie calcique.....	41
Figure 11 : Représentation schématique sur la biogénèse de glutathion. ....	46
Figure 12 : Le mécanisme moléculaire glutathion dépendant destiné à l'élimination du peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	47
Figure 13 : Représentation schématique sur le processus de fusion mitochondriale .....	49
Figure 14 : Représentation schématique sur le processus de fission mitochondriale.....	50
Figure 15 : Représentation schématique sur le transport mitochondrial.....	51
Figure 16 : : Les mécanismes moléculaires de la mitophagie. ....	52
Figure 17 : Du gène à la protéine GDAP1. ....	55
Figure 18 : Modèle de conformation moléculaire de GDAP1. ....	56
Figure 19 : Rôles de GDAP1 .....	58
Figure 20 : GDAP1 et le mécanisme de fission mitochondriale.....	59
Figure 21 : GDAP1 et le transport mitochondrial.....	60
Figure 22 : Rôle de GDAP1 dans la protection contre le stress oxydant. ....	62
Figure 23 : GDAP1 et l'homéostasie du calcium.....	64
Figure 24 Aperçu des principales approches du traitement de la CMT. ....	77
Figure 25 : Les différentes approches pour limiter l'impact des mutations non-sens.....	86
Figure 26 : Représentation schématique des objectifs de la thèse .....	90
Figure 27: Résultats des tests des molécules de translecture dans des PN transfectés par pFlucUGA.....	154
Figure 28 :Résultats obtenus par le séquençage Sanger confirmant la présence de la mutation c.581C>G, p.Ser194* à l'état homozygote de l'exon 5 de GDAP1 dans les MN issus de patient comparé aux MN contrôle. ....	155



Figure 29: Représentation schématique du gène GDAP1 avec la position de la mutation c.581C>G, montrant la possible action du système NMD sur cet ARNm muté. ....	156
Figure 30: Représentation schématique du protocole de différenciation d'iPSc en MN.....	158
Figure 31: Caractérisation des motoneurones obtenus par le nouveau protocole de différenciation optimisé.....	161
Figure 32: Expression de l'ARNm de GDAP1 dans les MN issus d'iPSc du chez des patient porteur de la mutation c.581C>G dans le gène GDAP1 et le du contrôle dans les PN. ....	162
Figure 33: Analyse par western blot de l'expression protéique de GDAP1 chez les cellules issues du contrôle et du patient et le patient porteur de la mutation d'intérêt dans les PN (A), et les MN (B). ....	163
Figure 34: Expression de Tom20 (marquage mitochondriale) chez les PN de du patients porteur de la mutation c.581C>G dans le gène GDAP1 et de du contrôle après traitement par des molécules de translecture et/ou inhibiteur du NMD. ....	183
Figure 35: Expression de l'ARNm de GDAP1 chez des MN porteurs de la mutation c.581C>G dans le gène GDAP1 après traitement par l'amlexanox (Aml). ....	184
Figure 36: Expression de la protéine GDAP1 dans des MN porteurs de la mutation c.581C>G dans le gène GDAP1 après traitement par l'amlexanox et G418. ....	185
Figure 37:Activité électrique des MN. ....	201
Figure 38: Résultats des premiers tests des molécules des extraits lichéniques et produits purs dérivés de translecture, dans la lignée U2OS-UGA. ....	210

## Liste des abréviations

---

**2D** : deux Dimensions

**3D** : trois Dimensions

**AA** : Acide Ascorbique

**AAV** : virus adéno-associés

**AD** : Autosomique Dominant

**ADN**: Acide DesoxyriboNucleique

**ADNmt**: ADN mitochondrial

**AR** : Autosomique Récessive

**ARNg** : ARN guide

**ARNm** : Acide RiboNucléique messenger

**ARNt** : ARN de transfert

**ASO** : Oligonucléotides AntiSens

**ATP**: Adénosine Triphosphate

**BDNF** : Brain Derived Neurotrophic Factor

**Ca<sup>2+</sup>**: ion Calcium

**CMT**: Charcot-Marie-Tooth

**DAPI**: 4', 6-DiAmidino-2-PhenylIndole

**DMSO**: DiMéthyl SulfOxyde

**EB** : Corps Embryonnaire

**EOR** : Espèces Oxygénées Réactives

**G418**: Geneticine

**GDAP1**: Ganglioside-induced Differentiation-Associated Protein-1

**GDAP1-L1**: Ganglioside-induced Differentiation-Associated Protein-1 Like1

**GDF**: Growth Differentiation Factors

**GDNFs:** Glial-Derived Neurotrophic Factors

**GSH:** Glutathione

**GST:** Glutathione-S-Transferase

**H2O2:** peroxyde d'hydrogène

**iPSc:** induced Pluripotent Stem cells

**MAM:** Mitochondrial-Associated endoplasmic reticulum Membrane

**MEA:** MultiElectrodes Array

**MEF:** Mouse Embryonic Fibroblasts

**MNs:** Motoneurones

**miARN:** micro-ARN

**NGS:** le séquençage de nouvelle génération

**NMD:** Nonsense-Mediated mRNA Decay

**NT-3:** Neurotrophin-3

**PNs:** progéniteurs neuronaux

**PTC :** codon de terminaison prématuré

**RE :** Réticulum Endoplasmique

**RT-qPCR :** Reverse Transcriptase –quantitative Polymerase Chain Reaction

**sh-RNA:** Short Hairpin Acide RiboNucléique

**si-RNA:** Small Interfering Acide RiboNucléique

**SNC :** Système Nerveux Central

**SNP :** Système Nerveux Périphérique

**TOM:** Translocase of the Outer Membrane

## *Introduction*

---



*Partie I. Neuropathies Périphériques  
& la maladie de Charcot-Marie-Tooth*

---



## I.1. Les Neuropathies Périphériques

### I.1.1. Généralités sur les neuropathies périphériques

Les neuropathies périphériques sont un groupe hétérogène de pathologies qui désigne une atteinte de l'architecture du système nerveux périphérique incluant les neurones moteurs et / ou sensitifs, les racines, les plexus et les troncs nerveux périphériques jusqu'à leurs ramifications terminales intramusculaires, incluant également le système nerveux autonome (Siao and Kaku, 2019). Les neuropathies peuvent être acquises, résultant de facteurs environnementaux ou d'autres facteurs (altération métabolique ou vasculaire, maladies auto-immunes, infection bactérienne ou virale, médicaments et toxines...), ou d'origine génétique. Ceci complexifie le diagnostic des neuropathies périphériques.

### I.1.2. Les neuropathies périphériques d'origine génétique

Les neuropathies périphériques héréditaires peuvent être classées en : purement sensitives, purement motrices ou sensitivo-motrices (Mathis et al., 2015).

Les neuropathies héréditaires purement motrices (HMN) : une forme de dégénérescence lente et progressive, dépendante de la longueur des motoneurones inférieurs de manière symétrique et distale, d'où le nom amyotrophie spinale distale (dSMA) (Bansagi et al., 2017). Ce type de neuropathie provoque des troubles d'équilibre, et de mouvement, l'amyotrophie et une faiblesse musculaire.

Les neuropathies héréditaires purement sensitives (HSN) : une forme de déficience de fibres sensorielles et des troubles autonomes, elle se caractérise principalement par la sensation de la chaleur, brûlure, fourmillement ou par la perte de ces sensations (Rotthier et al., 2012).

Les neuropathies héréditaires motrices et sensitives (HMSN) : connue aussi sous le nom de CMT pour Charcot-Marie-Tooth. La CMT est la neuropathie héréditaire la plus fréquente avec une prévalence de 1/2,500. Plus de détails sur la maladie sont rapportés dans la partie CMT.

Les neuropathies périphériques peuvent se présenter selon d'autres critères, telles que la topologie, la structure de l'atteinte ou le type de fibres lésées.

La topographie de l'atteinte : mononeuropathies, lorsqu'un seul nerf est touché, mononeuropathies multiples ou multinévrites, lorsque plusieurs nerfs sont touchés de manière asymétrique ; et polyneuropathies, lorsqu'il s'agit d'une atteinte du tronc de manière diffuse et symétrique (Magy and Vallat, 2009).

La structure de l'atteinte : axonopathies, dans le cas où les axones sont touchés, myélinopathies dans le cas où la gaine de myéline est touchée, et neuronopathies si le corps cellulaire du neurone est touché (Barohn and Amato, 2013).

Le type de fibres lésées : une atteinte des petites fibres myélinisées et/ou des fibres amyéliniques ; une atteinte de grosses fibres myélinisées et neuropathies autonomiques (Levine, 2018).

### **I.1.3. Architecture du système nerveux périphérique**

D'un point de vue anatomique, le système nerveux périphérique est constitué de fibres nerveuses qui acheminent l'information électrique du Système Nerveux Central (SNC) au Système Nerveux Périphérique (SNP) et inversement. Chaque fibre correspond à un axone associé à une cellule de Schwann délimité par l'endonèvre. L'ensemble de fibres nerveuses est regroupé en fascicules eux-mêmes entourés du périnèvre. L'ensemble des fascicules s'associe grâce à l'épinèvre (figure 1).

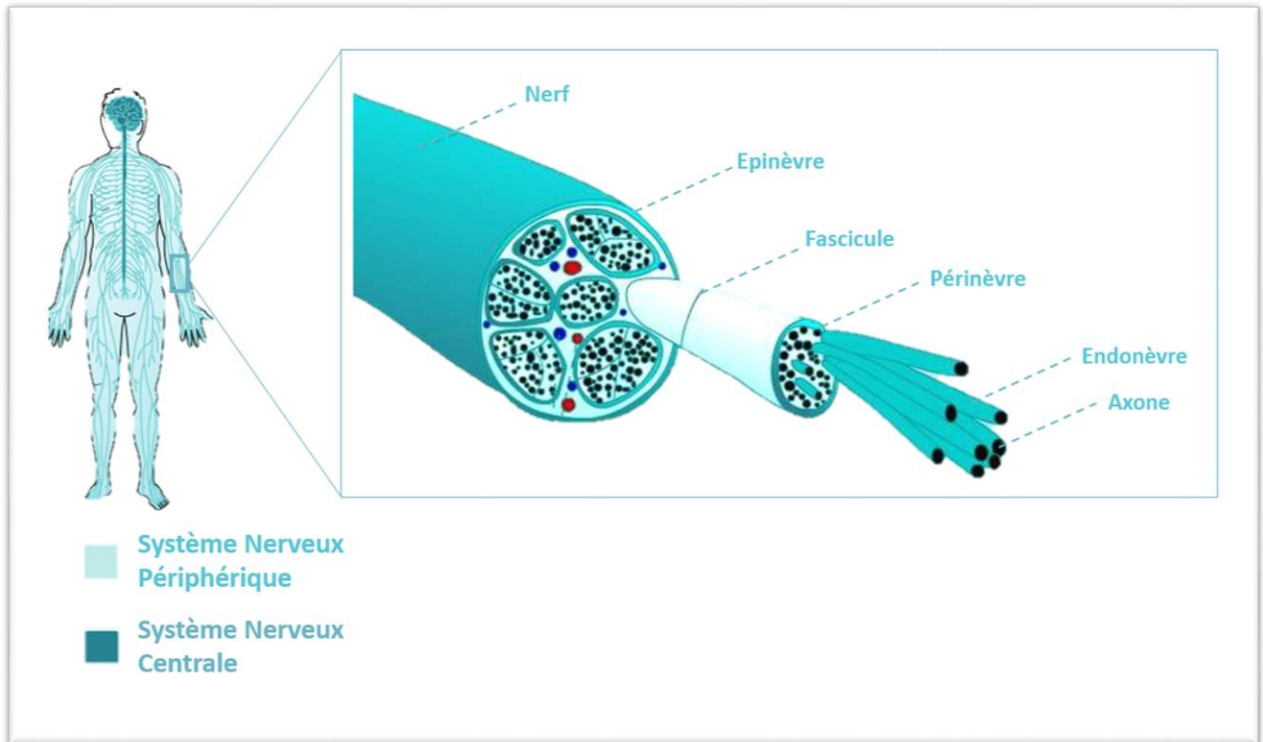
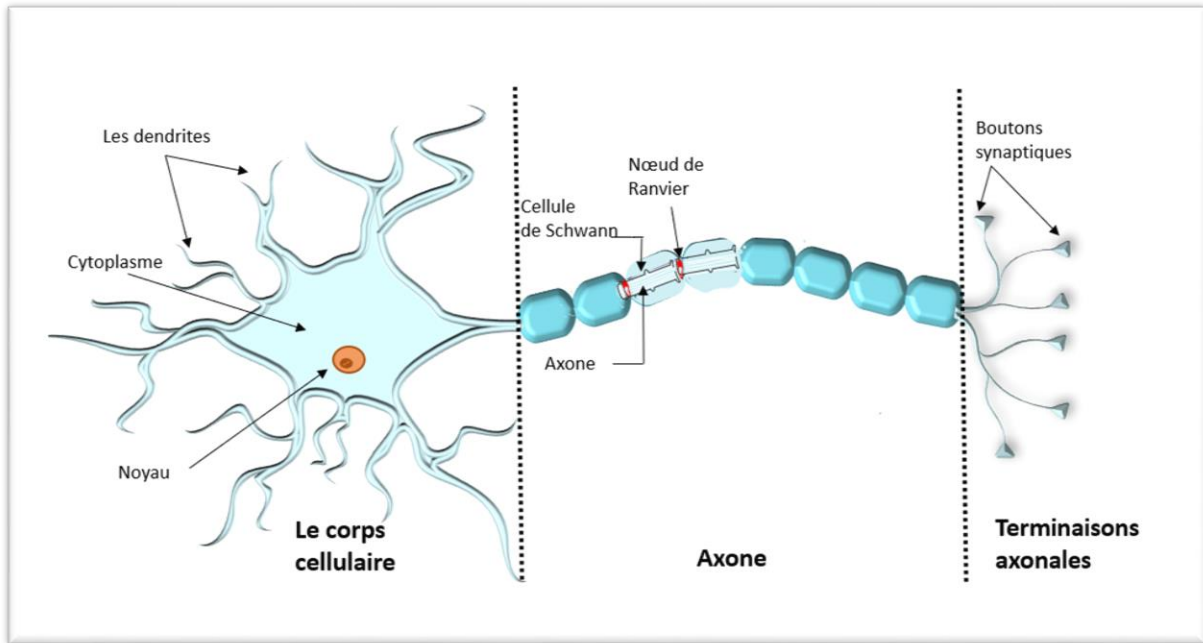


Figure 1 : Structure d'un nerf périphérique

### I.1.3.1. Le neurone

L'unité structurale et fonctionnelle du système nerveux, d'un point de vue ultra-structurale, est le neurone. Il est composé d'un corps cellulaire d'où partent un axone et les dendrites qui constituent ce qu'on appelle les neurites, qui vont assurer la connexion entre les neurones (figure 2).





*Figure 2 : Structure d'un neurone*

Le corps cellulaire : appelé aussi le soma, il est le site de biosynthèse dans lequel tous les éléments du neurone sont produits. Il contient tous les organites habituels (le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries, etc ...).

Les dendrites : Des prolongements courts très ramifiés émergent du corps cellulaire pour former un arbre dendritique. La structure ramifiée de ces dendrites permet la réception de signaux nerveux libérés par des neurotransmetteurs lorsque ces derniers se retrouvent en contact avec d'autres neurones (synapses). L'influx sera par la suite transmis aux corps cellulaires. Le nombre de dendrites varie d'une cellule à une autre.

L'axone : est un prolongement plasmique, unique, d'une longueur qui varie d'une cellule à une autre et pouvant mesurer plus d'un mètre. Ses extrémités ramifiées assurent la transmission d'influx nerveux du cône axonique jusqu'aux boutons synaptiques. Les boutons synaptiques se trouvent aux terminaisons de l'axone qui communiquent avec d'autres neurones ou d'autres types cellulaires via les synapses. Elles possèdent des vésicules présynaptiques qui elles-mêmes contiennent des neurotransmetteurs permettant la connexion inter-neuronale, neuromusculaire ou neuroglandulaire.

Contrairement aux dendrites, l'axone se caractérise par son aspect lisse avec un diamètre uniforme. L'axone et les dendrites englobent une surface importante du cytoplasme dans lequel on retrouve des protéines qui confèrent une certaine dynamique et une polarité à la cellule (les microfilaments d'actine, les microtubules et les neurofilaments).

### **I.1.3.2. Classification des neurones**

Les neurones sont classés selon leurs morphologies et leurs fonctions :

#### **I.1.3.2.1. Classification morphologique**

Cette classification dépend du nombre et de la disposition du prolongement émergeant du corps cellulaire (dendrites et axone) (figure 3) :

Neurone unipolaire : se caractérise par la présence d'un seul prolongement unique qui se divise à courte distance du corps cellulaire pour donner lieu à des prolongements dendritiques et axoniques.

Neurone bipolaire : se caractérise par la présence de deux prolongements, un seul axone avec une seule dendrite. Ce sont les neurones qu'on retrouve rarement dans le système nerveux. Et souvent dans l'épithélium olfactif et dans la rétine, dans le ganglion vestibulaire de l'oreille interne, et enfin dans le ganglion spiral du système auditif.

Neurone multipolaire : se caractérise par la présence d'un axone et de plusieurs dendrites, c'est le type de neurone le plus abondant dans le système nerveux.

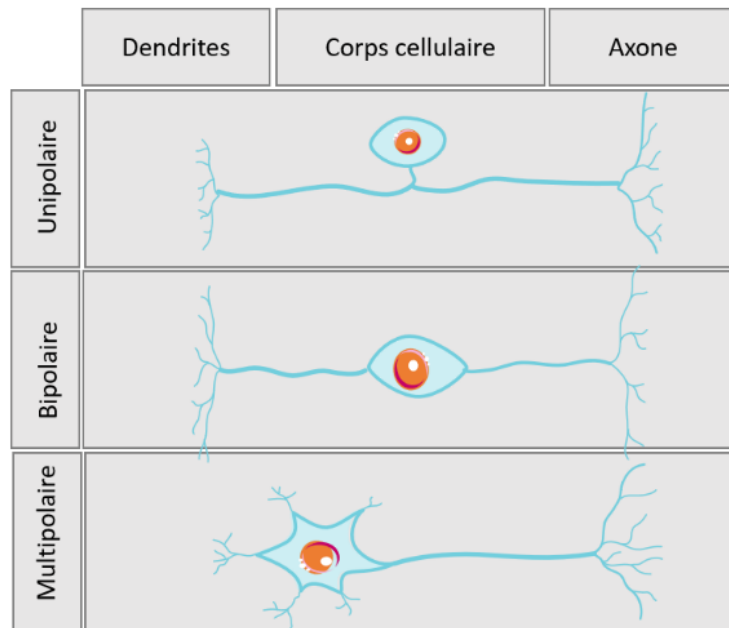


Figure 3 : Différents types de neurones selon la classification morphologique

#### I.1.3.2.2. Classification fonctionnelle

Cette classification dépend du sens de propagation de l'influx nerveux, on distingue trois types de neurones :

Neurones moteurs ou Motoneurones (MN) : ce sont les fibres nerveuses efférentes, qui véhiculent l'information qui provient du SNC vers les organes périphériques. Cela permet la motricité des muscles squelettiques lors d'un mouvement par exemple. Ce sont des neurones multipolaires, dont le corps cellulaire se situe dans le système nerveux (voir détail ci-dessous) et les boutons synaptiques au niveau des muscles.

Selon la localisation du corps cellulaire et le type de neurotransmetteurs, on distingue: les neurones moteurs situés dans le cortex cérébral (dans le cerveau), qui utilisent le glutamate comme neurotransmetteur, et les motoneurones situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière, et ils utilisent l'acétylcholine comme neurotransmetteur (Stifani, 2014).

Dès la réception de l'ordre d'exécution du mouvement, le MN supérieur transmet l'information du cortex moteur tout au long du tronc cérébral et la moelle épinière. Cette information sera par la suite guidée par le MN inférieur par formation d'une synapse. Ces MN sont directement

connectées au muscle à innover. En fonction du muscle à innover, on différencie trois classes de MN inférieurs : branchiaux, viscéraux et somatiques (Stifani, 2014).

Les MN branchiaux : se trouvent dans le tronc cérébral, des MN spécialisés dans l'innervation des muscles du visage et du cou.

Les MN viscéraux : l'innervation de chaque organe viscéral fait intervenir les deux types de motoneurones du système nerveux autonome : sympathique et parasympathique.

Les MN somatiques : ces MN se situent dans le tronc cérébral et la moelle épinière, impliqués dans l'innervation de muscles de mouvement.

Neurones sensitifs : ce sont les fibres nerveuses afférentes qui conduisent l'information de la périphérie vers le SNC (moelle spinale et cerveau). Ce sont des neurones unipolaires, dont les dendrites se situent au niveau du récepteur sensoriel (par exemple la peau), le corps cellulaire de ces neurones se situe dans le ganglion rachidien de la moelle épinière, les terminaisons synaptiques ainsi que les boutons au niveau du système nerveux (moelle épinière et cerveau).

Interneurones : se situent entre les neurones pré-synaptiques (en amont) et post synaptiques (en aval). Ces neurones sont les plus abondants dans le système nerveux puisqu'ils représentent 99% des neurones. Ils jouent un rôle clé dans la conduite des informations entre les neurones sensoriels et les neurones moteurs.

### **I.1.3.3. La cellule de Schwann**

Dans le système nerveux périphérique, certaines cellules, nommées cellules de Schwann, envoient plusieurs prolongements qui s'enroulent autour de certains axones. Ceux-ci se retrouvent entourés avec un grand nombre de couches, qu'on appelle une gaine de myéline. Les cellules de Schwann sont des cellules gliales à la fois nourricières et protectrices du milieu extérieur. Elles jouent un rôle fondamental dans la propagation du potentiel d'action grâce aux nœuds de Ranvier, présents tout au long de l'axone, et permettant d'accélérer la vitesse d'influx nerveux (Salzer, 2015).

La myéline est composée de 70 % de lipides et 30 % de protéines. Cette gaine de myéline peut être compacte et riche en protéines P0 (Protein Zero), PMP22 (Peripheral Myelin Protein 2), MBP (Myelin Basic Protein) et PLP (Proteolipid protein) ou non compacte et alors riche en protéines : MAG (Myelin Associated Glycoprotein), GJB1 (connexine 32) et la E-Cadhérine (Jerath and Shy, 2015; Sibley et al., 2007).

## I.2. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

### I.2.1. Physiopathologie et clinique de la CMT

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est la maladie neurologique héréditaire la plus fréquente avec une prévalence d'un cas sur 2500. Décrite comme une neuropathie sensitivo-motrice, elle affecte aussi bien le nerf moteur que le nerf sensitif.

La maladie a été décrite pour la première fois en 1886 à Paris par Dr Charcot et Dr Marie, et dans la même année, à Londres, par Dr Tooth d'où le nom « Charcot-Marie-Tooth » (Barreto et al., 2016) (figure 4). Dans la majorité des cas, les signes de la maladie débutent dans l'enfance ou l'adolescence, mais peuvent également se manifester à un âge tardif, avec un tableau clinique classique associant généralement une atrophie longueur dépendante et une faiblesse musculaire distale lentement progressive et/ou une perturbation sensorielle.

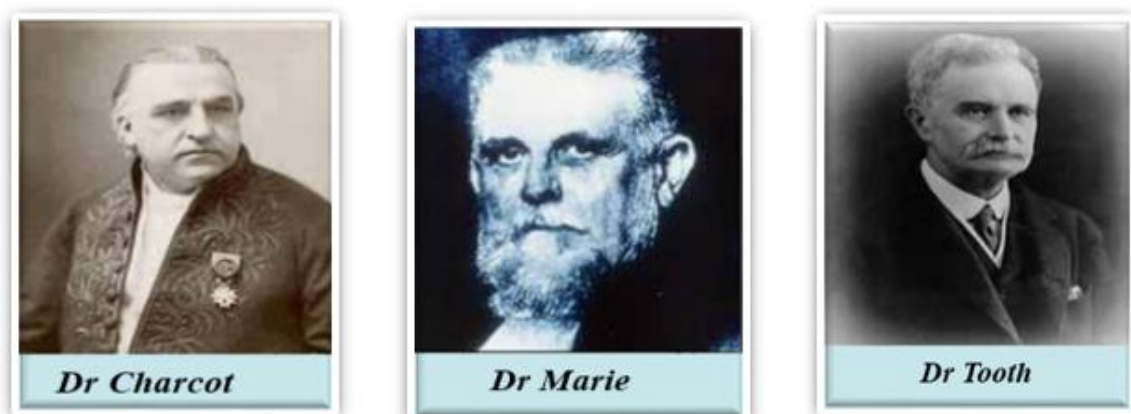
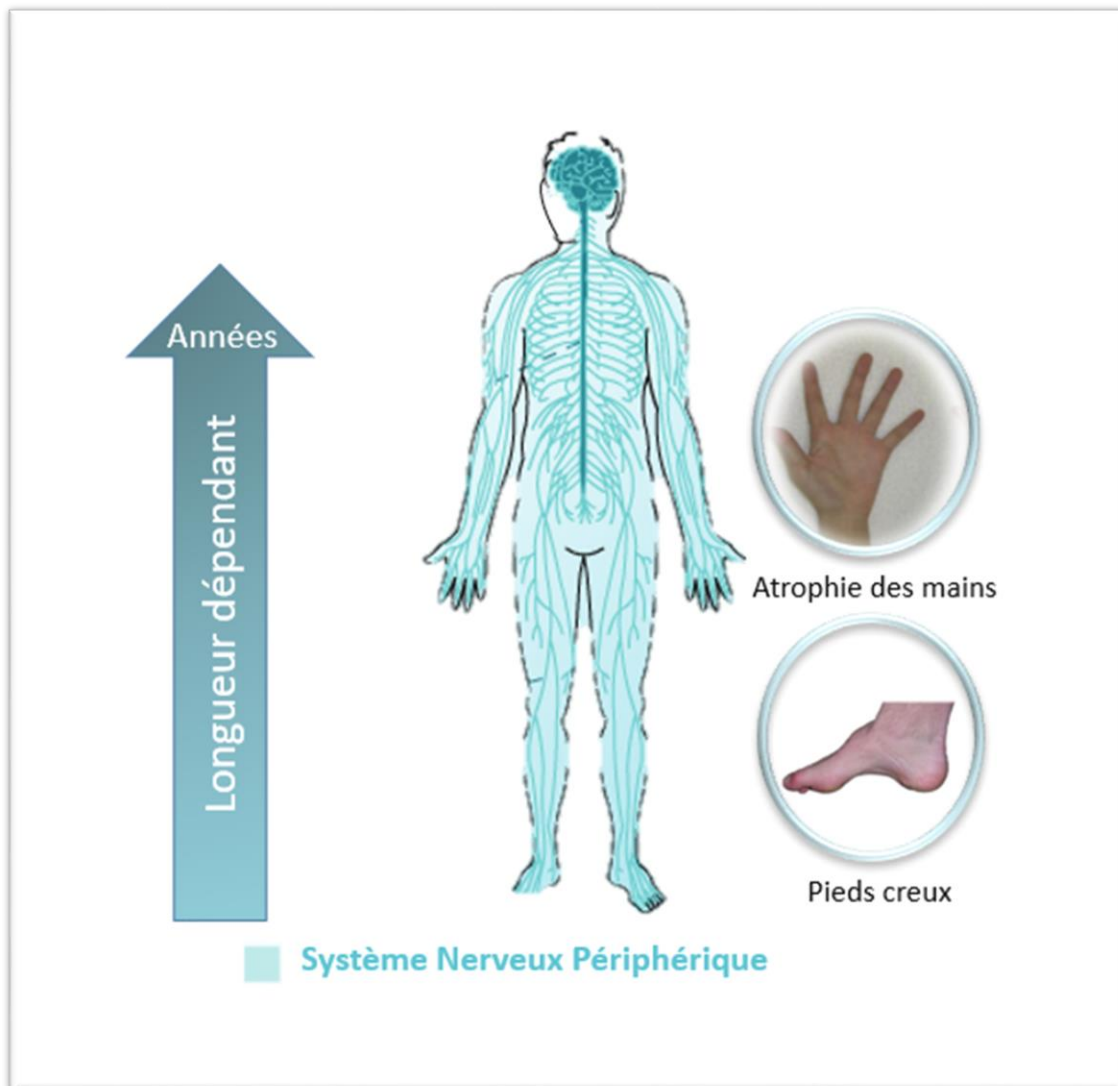


Figure 4 : Les docteurs Charcot, Marie et Tooth : premiers à décrire la maladie de CMT

Dans un premier temps, les patients présentent une déformation osseuse des membres inférieurs, souvent associée à l'apparition de pieds creux provoquant des difficultés à la marche

et des chutes répétitives, puis, une faiblesse des muscles au niveau des mains qui survient quelques années plus tard (Rudnik-Schöneborn et al., 2020) (figure 5). Des symptômes supplémentaires tels une perte auditive et une scoliose sont présents chez certains patients.



*Figure 5 : Présentation clinique résumée de la CMT*

L'approche diagnostique de la CMT repose sur un examen clinique, les données électrophysiologiques et familiales, et parfois une biopsie nerveuse (Duchesne et al., 2018).

### **I.2.2. Classification de la CMT**

La maladie de CMT se définit comme hétérogène en termes clinique, neuropathologique mais aussi génétique, ce qui a rendu sa classification plus complexe au cours des dernières années (Mathis et al., 2015). En s'appuyant sur trois critères, les différents types de CMT sont classés

selon les caractéristiques d'électrophysiologie (forme démyélinisante, forme axonale et forme intermédiaire), le mode de transmission (autosomique dominant, autosomique récessive, et liée à l'X) et le gène en cause. Dix pour cent des cas de CMT (CMT1A) proviennent d'une mutation *de novo* (cas sporadique) (Blair et al., 1996).

### I.2.2.1. Classification basée sur l'aspect électrophysiologique

En 1968, une première classification a été décrite par Peter Dyck et Edward Lambert basée sur la vitesse de conduction nerveuse ou VCN. Ainsi, les CMT ont été classés en forme **démyélinisante** caractérisée par une réduction de la VCN (inférieure à 30 m/s) et **axonale** avec une VCN normale (supérieure ou égale à 40 m/s). Chez certains patients, qui présentent les caractéristiques des deux formes (axonal et démyélinisante), on parle de forme intermédiaire dont la VCN est comprise entre 25 et 45 m/s (figure 6).

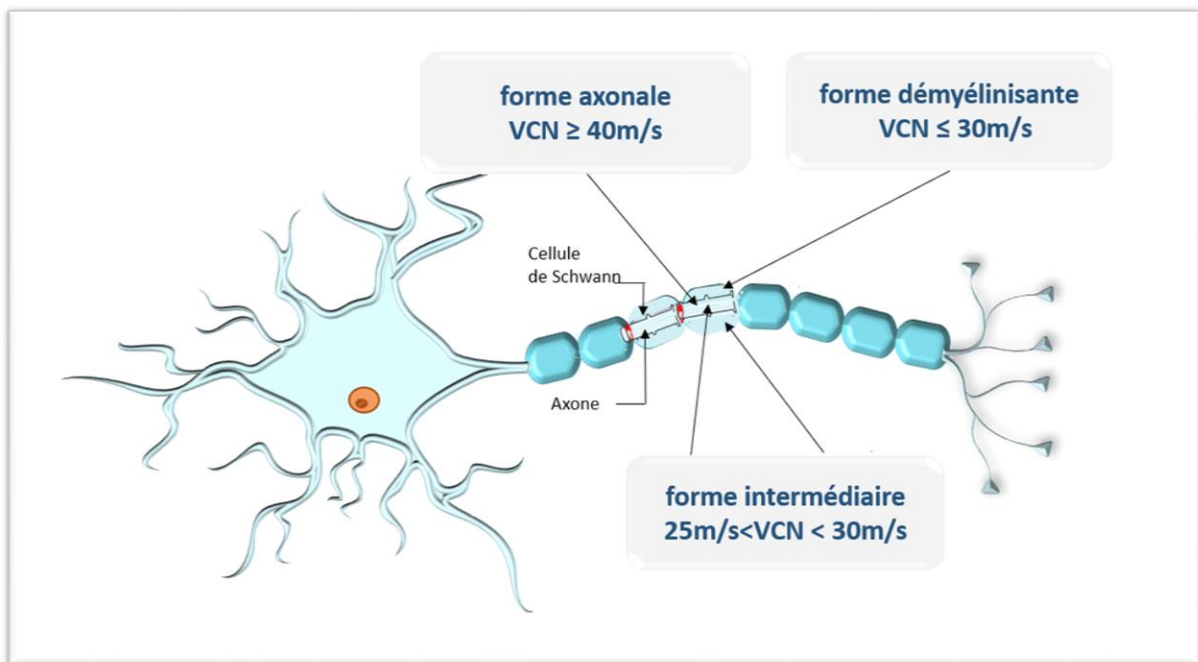


Figure 6 : Différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth selon la valeur de la vitesse de conduction nerveuse (VCN).

### I.2.2.2. Classification basée sur le mode de transmission génétique

En ce qui concerne la classification basée sur la génétique, les CMT peuvent être transmises selon les trois modes classiques de transmissions génétiques décrites dans la littérature : soit un mode autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l’X.

#### I.2.2.2.1. CMT à transmission autosomique dominante

Dans le cas de CMT à transmission **autosomique dominante (AD)**, un des deux parents est porteur de l’anomalie (mère ou père) et présente 50 % de risque de transmettre la maladie à ses enfants.

En termes de fréquence, les CMT autosomiques dominantes sont les plus répandues, elles peuvent être classées comme démyélinisantes **CMT1** ou axonales **CMT2**.

#### I.2.2.2.2. CMT à transmission autosomique récessive

Dans le cas de CMT à transmission autosomique récessive (AR), les deux parents doivent transmettre des variations pathogènes sur le même gène pour que la maladie soit présente chez l’enfant.

Elles sont subdivisées en CMT4A ou AR-CMTde pour la forme démyélinisante, et AR-CMTax pour les lésions axonales. Ben Othmane et al, ont défini la CMT4A comme une CMT de type 2 autosomique récessive laquelle correspond au premier locus AR qui a été identifié dans le gène *GDAP1* (Ben Othmane et al., 1993).

La CMT autosomique récessive était considérée comme plutôt rare dans la population mutés caucasienne, en 2014, avec, par exemple, un faible pourcentage de patients (0.9 %) pour le gène *GDAP1* et (0.2 %) le gène *SH3TC2*, parmi 17.000 patients CMT testés (DiVincenzo et al., 2014). Dans certaines régions du bassin méditerranéen, la forme autosomique récessive est plus fréquente que la forme dominante. En effet, il y a un taux élevé de patients CMT particulièrement pour les gènes *GDAP1* et *SH3TC2* en comparaison avec certains autres pays.



En Algérie par exemple, la forme AR représente 50 % parmi les autres formes de CMT en lien avec le pourcentage de consanguinité qui est très élevé (Vallat et al., 2005).

#### I.2.2.2.3. CMT lié au chromosome X

La transmission liée à l’X se fait à travers le chromosome sexuel X. Une femme atteinte de CMTX présente 1 risque sur 2 de transmettre la pathologie à ses enfants, tandis qu’un homme atteint de CMTX ne le transmettra à aucun fils, par contre le transmettra à toutes ses filles. On distingue une forme de CMTX transmises de manière dominante liée à des mutations du gène *GJB1*, *beta-1 de la jonction (gap)* qui est associé au CMTX1 (Bergoffen et al., 1993), et une forme de CMTX transmises de manière récessive liée à des mutations du gène *AIFM1* pour *apoptosis inducing factor mitochondrion associated-1* aboutissant au CMTX4 (Hu et al., 2017).

#### I.2.2.3. Classification basée sur le gène en cause

Avec l’avancée des techniques de séquençage à haut débit, plus particulièrement de la technique NGS permettant d’évaluer un grand panel de gènes, la classification de la CMT s’est révélée de plus en plus complexe.

Certains gènes peuvent être impliqués soit dans une forme dominante, soit dans une forme récessive, par exemple le gène *GDAP1* (voir chapitre *GDAP1*). Face au nombre croissant de gènes impliqués dans la CMT, Mathis et al ont proposé une nouvelle classification plus simple, qui d’ailleurs a été approuvée par un groupe d’experts internationaux dans le domaine. Le principe de cette classification est de citer en premier le mode de transmission donc soit « AD ou AR », puis préciser le type de la maladie « De » pour démyélinisante, et « Ax » pour axonale ou intermédiaire « In », et en dernier le nom du gène impliqué au lieu de la lettre. Prenant par exemple le CMT1A qui portera le nom AD-CMTde-PMP22 (Magy et al., 2018; Mathis et al., 2015).

Grâce aux séquençages de l'exome entier (WES) et/ou un séquençage du génome entier (WGS), des études ont montré de nouveaux variants ou de nouveaux gènes associés à ces neuropathies, tels que : ARHGEF28, KBTBD13, AGRN et GNE (Previtali et al., 2019).

### **I.2.3. Mécanismes moléculaires et génétiques de la CMT**

L'avancée des approches de séquençage de nouvelle génération (NGS), et en particulier le séquençage d'exomes, a permis de mettre en évidence un grand nombre de gènes contribuant au développement clinique de la CMT (Morena et al., 2019). A ce jour, plusieurs mutations affectant plus de 100 gènes ont été identifiées. Ces différents gènes codent pour différentes protéines impliquées dans divers mécanismes moléculaires y compris le dysfonctionnement mitochondrial, le transport intracellulaire (transport axonal, et dysfonctionnement cytosquelettique), les anomalies d'assemblage de la myéline, les dysfonctionnements de l'endosome, et des gènes impliqués dans le processus de traduction et le traitement post-traductionnel (Rossor et al., 2013).

Dans cette section de ce chapitre, je mentionnerai quelques principaux mécanismes pathologiques causant la CMT en référence à leurs gènes responsables (figure 7).

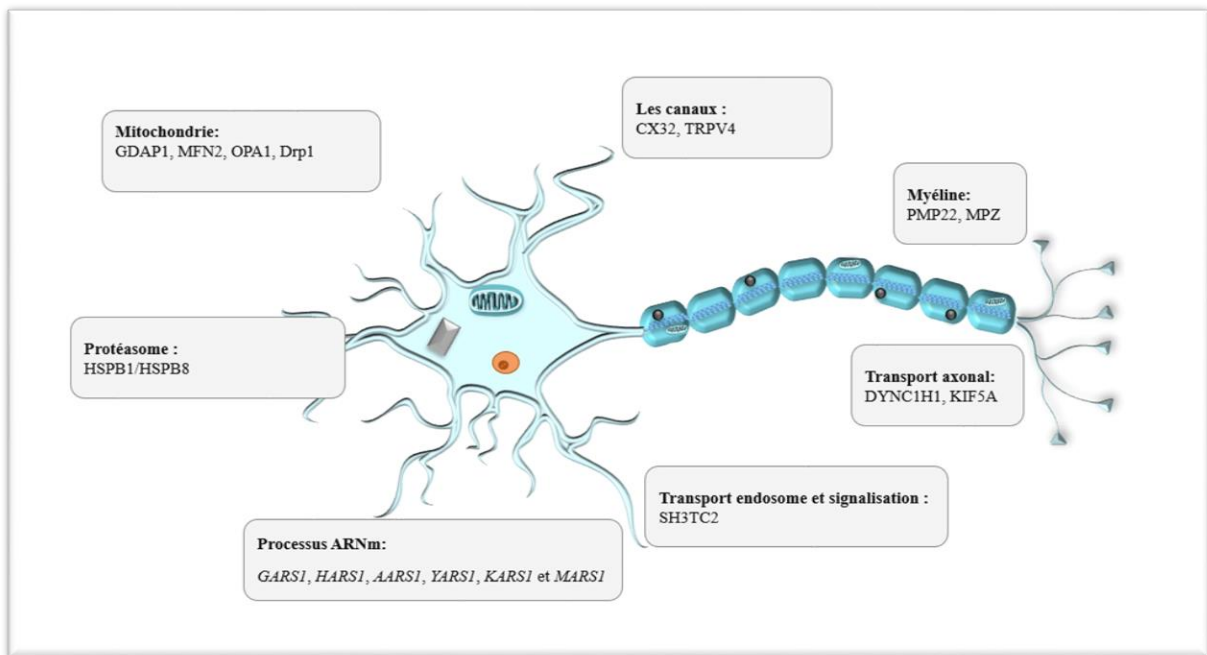


Figure 7 : Patho-mécanismes de gènes impliqués dans le CMT.

### I.2.3.1. Défaut d'assemblage de la myéline

La neuroprotection de l'axone est assurée par les cellules de Schwann, par l'enroulement d'une gaine de myéline autour d'un axone qui fait plus de 1  $\mu\text{m}$ . En l'isolant, cette myéline permet la propagation du signal électrique tout au long de l'axone où les impulsions nerveuses sautent entre les nœuds de Ranvier (Mensch et al., 2015). Au niveau structural, on distingue deux types de myéline, celle qui est dite « myéline compacte » et comprends deux principales protéines de structure PMP22, et MPZ, et celle qui est dite « myéline non compacte » qui contient une protéine principale Cx32 (Jerath, 2015). Des mutations qui se trouvent au niveau des gènes codant pour des protéines constituant la myéline compacte sont responsables de la majorité des formes démyélinisantes de neuropathies héréditaires.

**PMP22** : L'une de ces mutations conduit à la forme la plus courante de CMT : CMT1A. Il s'agit d'une duplication d'une taille de 1,5 mégabases située dans la région 17p11.2 et contenant la totalité du gène *PMP22*. Cela conduit à une accumulation de la protéine PMP22 avec la formation d'agrégats causant la neuropathie démyélinisante (Magyar et al., 1996). L'adressage de PMP22 à la membrane cellulaire serait perturbé, déstabilisant ainsi la gaine de myéline.

CMT1E correspond à des mutations ponctuelles de *PMP22*, ce qui conduit à un mauvais repliement de la protéine PMP22 provoquant ainsi son accumulation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, plutôt que dans le cytoplasme de la cellule de Schwann (Hanemann et al., 2000).

*MPZ*: Ce gène code une protéine transmembranaire P0, exprimée principalement dans les cellules de Schwann et qui a une fonction importante dans la compaction de la myéline. Des mutations de ce gène donne la deuxième forme démyélinisante CMT1B. Une étude a montré que des mutations de décalage du cadre de lecture provoque la forme sévère de la maladie, qui entraîne la formation de protéines aberrantes mal repliées et qui restent retenue dans le réticulum endoplasmique favorisant la mort cellulaire (Khajavi et al., 2005). Des mutations ponctuelles de *MPZ* ont également été rapportées. Ces dernières seraient responsables de l'altération d'un domaine cytoplasmique de P0, ayant un rôle important dans la régulation de l'adhésion de la protéine et entraînant ainsi une forme de neuropathie démyélinisante plus ou moins sévère pour le patient (Xu et al., 2001).

### **I.2.3.2. Cytosquelette et transport axonal**

Il existe des protéines motrices (kinésines, dynéines) qui sont régulées pour maintenir la survie cellulaire, l'homéostasie, et l'établissement de la polarité au sein de la cellule nerveuse. Ces protéines sont fabriquées majoritairement dans le corps cellulaire neuronal, et sont acheminées le long de l'axone dans un sens bidirectionnel (antérograde/rétrograde). Ce transport axonal nécessite l'installation d'une architecture cytosquelettique composée de différents types de fibres : les microtubules, les neurofilaments, et les microfilaments. Le transport antérograde (du corps cellulaire aux extrémités de l'axone) est assuré par la superfamille de kinésines. Les kinésines semblent être les plus importantes, et se chargent du transport de divers cargos (ARN, mitochondries, neurofilaments) le long des microtubules dans les neurones. Des mutations de *KIF5A*, la sous-unité de la chaîne lourde de certaines de ces kinésines, semblent être la cause

de plusieurs pathologies dégénératives y compris la CMT, avec une réduction du transport antérograde des mitochondries. En utilisant l'analyse des données NGS pour rechercher de petits variants nucléotidiques (SNV ou indels courts) couplée à l'investigation des grands CNV (Copy Number Variation) avec un outil d'analyse très performant CovCopCan (Derouault et al., 2020) développé dans notre équipe, nous avons mis en évidence deux grands variants structuraux différents dans *KIF5A* (CMT2) (Pyromali et al., 2021).

La chaîne lourde de la dynéine est codée par *DYNC1H1* (*Dynein, cytoplasmic 1 heavy chain 1*), des mutations au niveau de ce gène sont responsable de CMT20 (Weedon et al., 2011).

### **1.2.3.3. Dysfonctionnement mitochondrial**

La mitochondrie assure plusieurs rôles biologiques pour le maintien et le bon fonctionnement des cellules neuronales (voir le chapitre mitochondrie). Cela nécessite l'intervention de certains gènes impliqués dans la dynamique et la fonction mitochondriale. Lorsque ces gènes sont mutés, cela provoque un dysfonctionnement de la mitochondrie et peut entraîner la CMT (Pareyson et al., 2015). Le processus de fusion et fission mitochondrial est fondamental, il permet de réguler de façon équilibrée la forme, la taille et le nombre des mitochondries par la participation de certains médiateurs clés comme les : Mitofusins (Mfn1/2), l'optic atrophy 1 (OPA1), la dynamin-related protein 1 (Drp1), et GDAP1.

MFN2 : indispensable pour la fusion mitochondriale, localisée dans la membrane externe mitochondriale, participe également au rapprochement entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE). Les mutations du gène *MFN2* représentent environ 20 % des cas de CMT2 et provoque en particulier la CMT2A. Ces mutations sont associées non seulement aux défauts de fusion mitochondriale mais aussi à une perturbation du transport axonal (Chandhok et al., 2018).

GDAP1 : exprimé dans la membrane externe mitochondriale des nerfs périphériques. Plusieurs fonctions ont été proposées pour GDAP1, y compris dans la fission mitochondriale. Des études

*in vitro* et *in vivo* ont montré que la déplétion en GDAP1 provoque une fragmentation du réseau mitochondrial, et empêche le transport axonal. Plus de détail sur GDAP1 dans le chapitre 3.

#### **I.2.3.4. Processus de l'ARNm**

La synthèse des protéines nécessite des synthétases Aminoacyl-tRNA chargée d'associer l'acide aminé à son ARNt. Lorsque certaines de ces synthétases AA-tRNA sont mutées (comme *GARS1*, *HARS1*, *AARS1*, *YARS1*, *KARS1* et *MARS1*), cela peut engendrer l'apparition de CMT. Par exemple, des mutations au niveau du gène *GARS* conduisent à la forme CMT2D (Antonellis et al., 2003; Jerath and Shy, 2015).

#### **I.2.3.5. Transport endosome et signalisation**

La communication intracellulaire entre organelle est extrêmement importante dans la cellule eucaryote, et se fait en partie par un mécanisme appelé le transport par endosome, qui permet un échange de composants à travers les membranes. Les altérations du transport intracellulaire ont été liées à plusieurs mutations génétiques causant la CMT (Bucci et al., 2012). En effet parmi ces gènes, *SH3TC2* est responsable de la CMT4C, classe considérée comme la plus fréquente de la forme autosomique récessive de la CMT démyélinisante. La protéine SH3TC2 est principalement exprimée dans les cellules de Schwann, avec un rôle dans la myélinisation. Cette dernière est exprimée dans les endosomes de façon précoce ce qui explique sa participation dans le transport par endosome.

#### **I.2.3.6. Protéasome et agrégation de protéines**

Dans la cellule eucaryote, les protéines ont besoin d'être dégradées efficacement par des unités tels que le protéasome ou les lysosomes. Une dégradation réduite de ces protéines entraîne des agrégats et est connue pour provoquer des neuropathies héréditaires (Jerath and Shy, 2015; Tai and Schuman, 2008). Certains gènes codant pour des protéines ont un rôle de contrôle de l'architecture du cytosquelette. Elles sont appelées des protéines de choc thermique

HSPB1/HSPB8 (Heat shock protein beta 1/8). Les HSPB mutants pourraient perturber les structures du cytosquelette, favorisant des défauts dans le transport axonal (Capponi et al., 2011).

### **I.2.3.7. Les canaux**

La neurotransmission est réalisée grâce à la stimulation de canaux ioniques neuronaux. Ces canaux favorisent l'entrée ou la sortie de certains ions (sodium, calcium, potassium, chlorure). Par exemples, la connexine 32 (Cx32), qui forme une connexon (constitué de six connexines en formant un pore central) a pour rôle de transporter de manière rapide des ions entre deux cellules adjacentes (Jerath and Shy, 2015). Des mutations au niveau de la connexon du gène *GJB1* codant la protéine CX32 sont associées au CMT1X (Jerath and Shy, 2015; Kleopa et al., 2012). Des mutations du gène *Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4)* provoquent des modifications dans la fonction de ces canaux et conduisent à une forme de CMT2C (Jerath and Shy, 2015; Velilla et al., 2019).

## *Partie II. La mitochondrie*

---



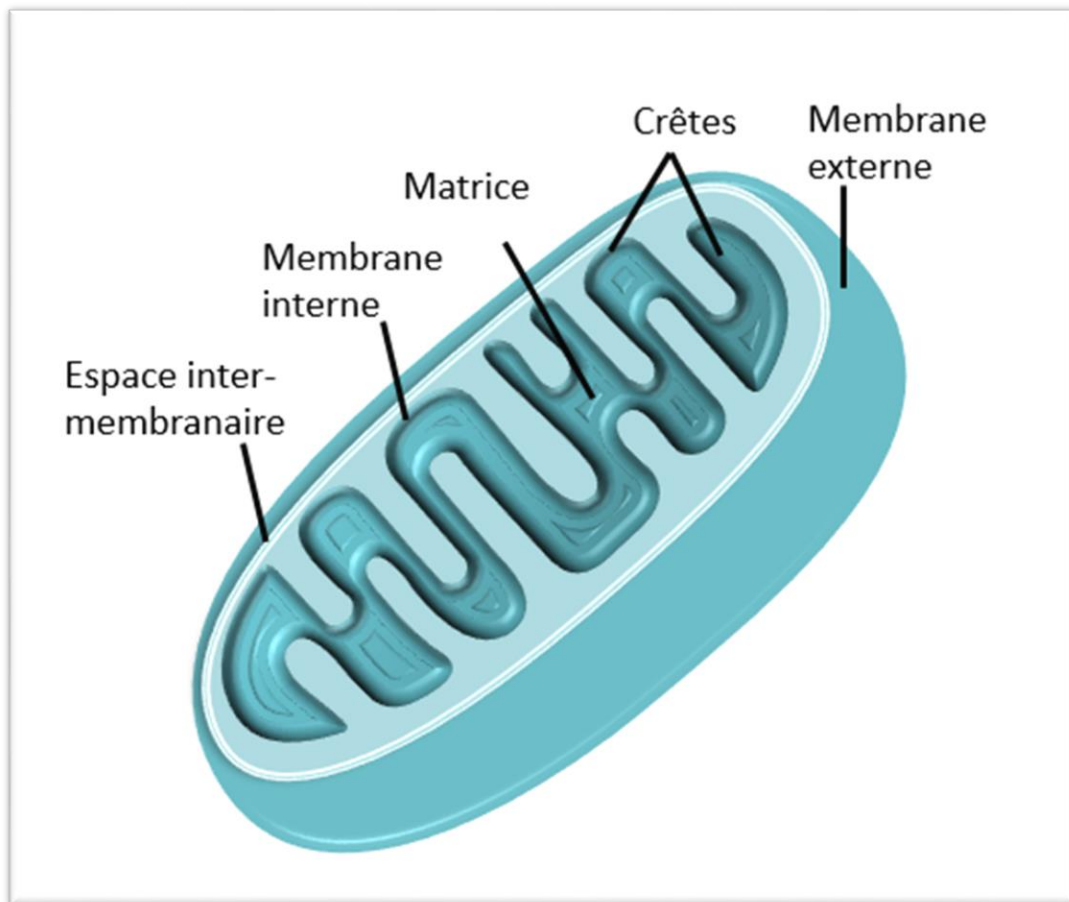


## II.1. L'origine de la mitochondrie

La mitochondrie, « mitos » et « chondros » en grec ancien, signifie « fil », et « granule ». D'après la théorie endosymbiotique, il y a environ deux milliards d'années, les mitochondries se sont développées à partir de certaines formes bactériennes. Elles proviendraient plus particulièrement d'un phylum  $\alpha$ -protéobactéries, qui a été phagocyté dans une cellule hôte. En 1966, cette théorie a été proposée par Lynn Margulis (Margulis, 1966), mais il a fallu attendre jusqu'à 1980 pour que l'idée de l'origine bactérienne soit acceptée complètement par la communauté scientifique, suite à la découverte de l'ADN mitochondrial. L'association symbiotique entre la bactérie et l'eucaryote a conduit à un mécanisme fondamental nouveau de production d'énergie. Au moment de l'intégration de ces bactéries dans les cellules eucaryotes, le génome bactérien a subi plusieurs évolutions, qui ont provoqué la perte d'un grand nombre de gènes alors que certains ont migré vers le noyau. Ces gènes sont donc devenus nucléaires mais les protéines codées seront destinées à la mitochondrie (Roger et al., 2017).

## II.2. La structure de la mitochondrie

La mitochondrie, un organite intracellulaire d'une taille de 0.5 à 1  $\mu\text{m}$ , est essentielle pour la survie des cellules des mammifères, puisqu'elle est considérée comme la principale source d'énergie métabolique (Kühlbrandt, 2015; Osellame et al., 2012). Au niveau structural, la mitochondrie est composée d'une double membrane phospholipidique. La membrane externe qui est en contact direct avec le cytoplasme, et la membrane interne qui est différente de la membrane externe par la présence d'invaginations appelées crêtes. Les crêtes mitochondriales se prolongent dans la matrice, ce qui induit un espace inter-membranaire entre ces deux membranes (figure 8).



*Figure 8 : Structure de la mitochondrie*

La membrane externe : La plupart des protéines de cette membrane permettent une grande perméabilité passive de la majorité des molécules, en particulier une protéine transmembranaire appelée porine ou VDAC pour Voltage-Dependent Anion Channel, qui permet le passage de molécules de taille inférieure à 10 kDa. Le transport de grosses protéines vers l'espace intermembranaire est assuré par un système d'import spécifique formé par des translocases TOM (Translocase of the Outer Membrane) (Kühlbrandt, 2015).

La membrane interne : Contrairement à la membrane externe, la membrane interne n'est perméable qu'aux petites molécules. Elle contient une grande proportion de protéines et est riche en un phospholipide particulier appelé cardiolipine. Le passage sélectif de molécules est assuré par un système de translocases inséré dans la membrane interne ou TIM (Translocase of the Inner Membrane) (Kühlbrandt, 2015).

La présence de crêtes au niveau de cette membrane permet d'augmenter de façon importante la surface d'échange avec l'espace intermembranaire. C'est au niveau de cette membrane interne que se trouvent les complexes de la chaîne respiratoire. Ces protéines très particulières permettent un enchaînement de réactions complexes, aboutissant à la production d'ATP (Colina-Tenorio et al., 2020).

### **II.3. Le génome mitochondrial**

Chaque cellule humaine contient en moyenne une centaine de mitochondries, variable selon le type cellulaire. Chaque mitochondrie possède son propre génome : ADNmt, qui est indépendant du génome nucléaire. Ce génome est compacté sous une forme circulaire dans une structure nucléoprotéique de 100 nm appelée nucléoïde qui se retrouve proche des crêtes dans la matrice mitochondriale (Kukat et al., 2011). La molécule d'ADNmt contient 37 gènes qui codent pour 13 protéines associées à la phosphorylation oxydative (OXPHOS), 2 ARN ribosomiques, et 22 ARNt (Lee and J., 2017; Taanman, 1999).

### **II.4. Les fonctions de la mitochondrie**

La mitochondrie est considérée comme un organe multifonctionnel. En plus des fonctions bioénergétiques dédiées à la synthèse des molécules d'ATP (Adénosine Triphosphate), la mitochondrie est aussi impliquée dans l'homéostasie du calcium, sans oublier la synthèse d'espèces oxygénées réactives (EOR) souvent considérées comme délétères.

#### **II.4.1. La production d'énergie**

C'est le catabolisme des substrats énergétiques d'origine endogène ou exogène qui permettent la production d'ATP. Une fois dans le cytosol, le glucose se transforme en pyruvate et au niveau mitochondrial, les acides gras en Acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA) (Evans and Heather, 2016). Le métabolisme énergétique suit alors le cycle de Krebs alimenté par d'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) issu du pyruvate (glycolyse), et la  $\beta$ -oxydation des acides gras suivi

par la phosphorylation oxydative aboutissant à la synthèse d'ATP, grâce à ces transporteurs d'électrons issus des voies métaboliques précédemment citées (NADH, H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>) (figure 9).

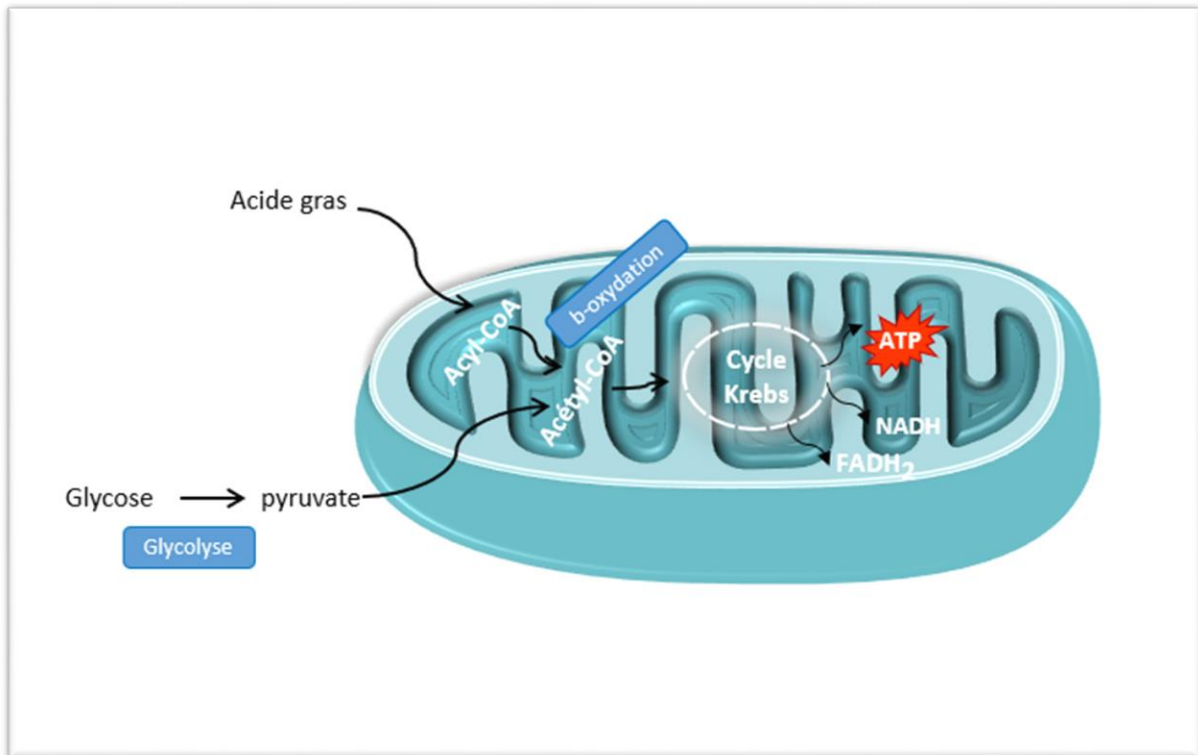


Figure 9 : Représentation schématique sur la production d'ATP

La mitochondrie est la principale source d'énergie cellulaire. La production d'ATP est issue de la  $\beta$ -oxydation des acides gras produisant de l'acétyl-CoA et dont le pyruvate est un dérivé qui aboutit également à la synthèse d'acétyl-CoA. Le dernier sera pris en charge par le cycle de Krebs formant des transporteurs d'électrons NADH, H<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>. Les électrons seront transportés au niveau des complexes de la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP au niveau de l'ATP synthase. On parle alors de phosphorylation oxydative.

## II.4.2. L'homéostasie calcique

Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est indispensable pour le bon fonctionnement des neurones, permettant la libération des neurotransmetteurs dans les synapses (Brini et al., 2014). Le  $\text{Ca}^{2+}$  passe dans le milieu intracellulaire via des canaux ioniques voltage-dépendants et des récepteurs présents dans la membrane plasmique. Une fois à l'intérieur de la cellule, le  $\text{Ca}^{2+}$  est stocké dans le RE. Il sera par la suite soit relargué du RE à l'aide des récepteurs RyaR et IP3R localisés au niveau de la membrane du RE (Ginzburg et al., 2004), soit dirigé vers l'intérieur du RE grâce à la pompe SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) (Misquitta et al., 1999) lors d'une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique des neurones. L'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique fait également intervenir les mitochondries qui régulent l'homéostasie calcique grâce à deux protéines DVAC (voltage dependant anion channel) et UP (uniporter) (Brini et al., 2014) (figure 10).

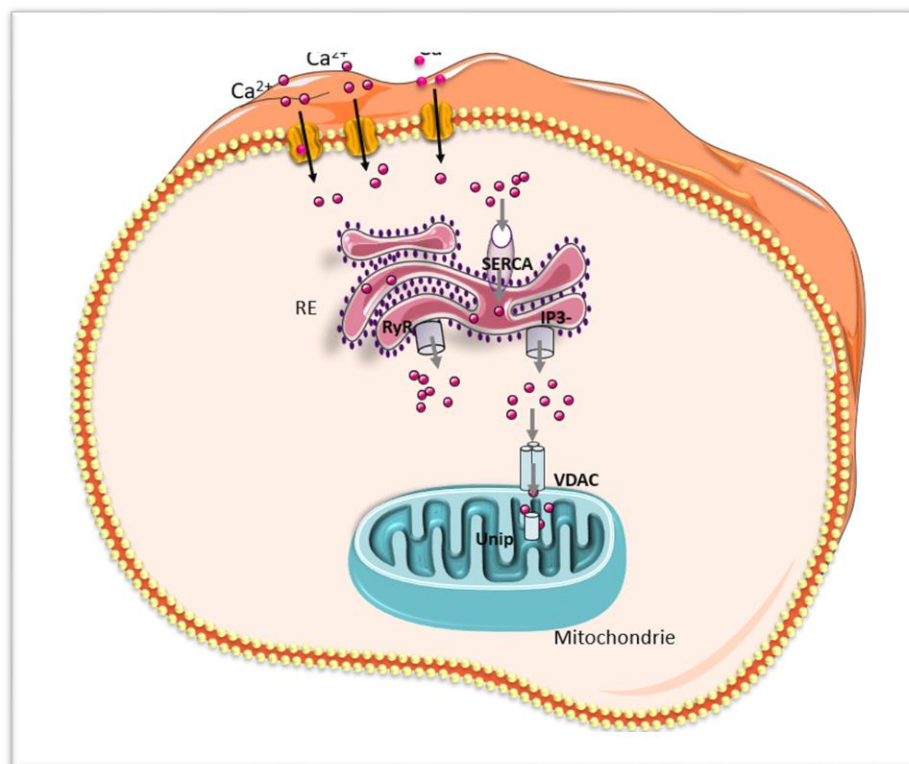
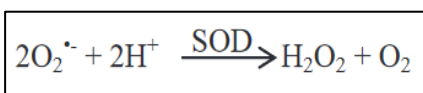


Figure 10 : Représentation schématique sur l'homéostasie calcique

### II.4.3. Le stress oxydant

La mitochondrie est aussi considérée comme le siège majeur de la production d'espèces oxygénées réactives qui sont des radicaux libres de l'oxygène. Ces EOR sont formés principalement à partir d'électrons qui s'échappent de la chaîne respiratoire. Environ 0.2% à 2.0% de l'oxygène consommé sera partiellement réduit au niveau mitochondrial et à l'origine de la production d'un anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  (Li et al., 2013). Ce dernier pourra ensuite être catalysé en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  par une métalloenzyme, la superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale (Li et al., 2013).



La production d' $H_2O_2$  pourra aboutir à la synthèse d'un autre EOR, connu pour sa forte réactivité, le radical Hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), lors d'une réaction appelée réaction de Fenton (Circu and Aw, 2010).

Par ailleurs, la cellule possède des systèmes antioxydants permettant de contrôler la production et l'élimination des EOR. Dans des conditions physiologiques, il existe un équilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants. Un déséquilibre de cette balance vers les espèces prooxydantes comme une surproduction d'EOR, génère un stress oxydant.

Rôle physiopathologique : On parle de stress oxydant lorsqu'il ya un déséquilibre de la balance entre le taux de production des EOR et l'activité anti-oxydante. En effet la production excessive d'EOR induit des altérations au niveau moléculaire de l'ensemble des grandes classes de molécules biologiques (ADN génomique et mitochondrial), protéines, lipides avec des altérations qui peuvent être irréversibles (Grimm and Eckert, 2017).

Cependant une génération accrue d'ERO est souvent délétère par les grandes classes de molécules biologiques.

Rôle physiologique : Les EOR sont également connus pour avoir un rôle physiologique dans la cellule. Ils sont impliqués dans divers processus, notamment dans la prolifération cellulaire, la

réponse immunitaire, la défense contre les microorganismes et la plasticité synaptique (Grimm and Eckert, 2017).

- Altération génomique

ADN et ARN sont une cible des radicaux libres. Par exemple, l'interaction de la guanine avec le radical Hydroxyle  $\text{OH}^{\bullet}$  sine qui s'apparie à l'adénine à la place de la cytosine entraîne des mutations au niveau de l'ADN lors des réplifications (Rhoads et al., 2006; Srinivas et al., 2019).

- Altération protéique :

Les EOR peuvent aussi réagir soit directement avec les protéines ou bien avec les acides aminés, eux-mêmes. Les plus sensibles au stress oxydant sont notamment la lysine, l'arginine, la cystéine, la méthionine, l'histidine et la phénylalanine (Rhoads et al., 2006). Par exemple, la méthionine, peut ainsi être transformée en méthionine sulfone. Ce résidu oxydé conduit alors à un changement conformationnel des protéines qui le contiennent, ce qui peut avoir pour conséquence de participer à certaines pathologies neurodégénératives telles que l'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Moskovitz, 2005).

- Altération lipidique :

Les EOR ciblent aussi les lipides en particulier ceux présents dans la membrane cellulaire. Elles touchent notamment les acides gras polyinsaturés (AGPI). L'oxydation de ces derniers génère des peroxydes lipidiques tels que les hydroperoxydes de lipide (LOOH), mais également des produits de dégradation comme les aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal 4(4-HNE) qui peuvent d'ailleurs être utilisés comme des marqueurs du stress oxydant. Ces altérations qui touchent les acides gras polyinsaturés membranaires vont générer un dysfonctionnement de la mitochondrie et vont contribuer au développement de plusieurs pathologies telles que les maladies neurodégénératives, cancer, maladie cardiovasculaire, mais également le vieillissement (Brieger et al., 2012).

Pour contrer ces états prooxydants, la cellule a de multiples moyens de défense antioxydants :

- Les antioxydants :

Pour rééquilibrer la production de EOR, l'organisme dispose d'un système de défense basé sur deux catégories d'antioxydants endogènes : (i) les systèmes enzymatiques incluant la superoxydes dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase, et (ii) les systèmes non-enzymatiques, principalement constitués par des vitamines ou des dérivés antioxydants.

- Les systèmes antioxydants enzymatiques

Plusieurs composés possèdent la capacité d'antioxydant tels que : la Superoxide dismutase, la catalase et la Glutathion peroxydase.

La superoxide dismutase (SOD) est la première ligne de défense contre les EOR. Elle transforme l' $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ . Chez l'homme, 3 formes de SOD ont été identifiées qui se trouvent dans différents compartiments de la cellule et dont le but est d'agir rapidement contre la production d'anion superoxyde et de diminuer le stress oxydant (Brieger et al., 2012; Kabel, 2014). Ces isoformes sont différentes selon le type de métal associé à la protéine. Par exemple, SOD1 utilise le cuivre et le zinc comme cofacteurs. C'est la plus abondante dans le cytoplasme et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Il a été montré que des mutations au niveau de la SOD1 étaient responsables de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Jafari-Schluep et al., 2004).

La SOD2 utilise comme cofacteur le manganèse et est localisée dans la matrice mitochondriale. Une altération de la SOD2 est impliquée dans l'augmentation de la production de l'ion superoxyde qui va à son tour altérer les complexes I et II de la chaîne respiratoire impliqués dans le transport des électrons jusqu'au complexe IV menant à la synthèse d'ATP via la production d'un gradient de proton entre la matrice mitochondriale et l'espace intra-membranaire.

La SOD3 comme la SOD1, utilise le cuivre et le zinc, mais se trouve en abondance au niveau extracellulaire.



La catalase (CAT) est localisée principalement dans le peroxyosome et est en charge de convertir  $H_2O_2$  en molécule d'eau et en  $O_2$  non réactifs (Kobayashi et al., 2005).

La Glutathion peroxydase (GPx) réduit  $H_2O_2$  en molécule d'eau en utilisant le GSH réduit comme donneur d'électrons (Fundu et al., 2019).

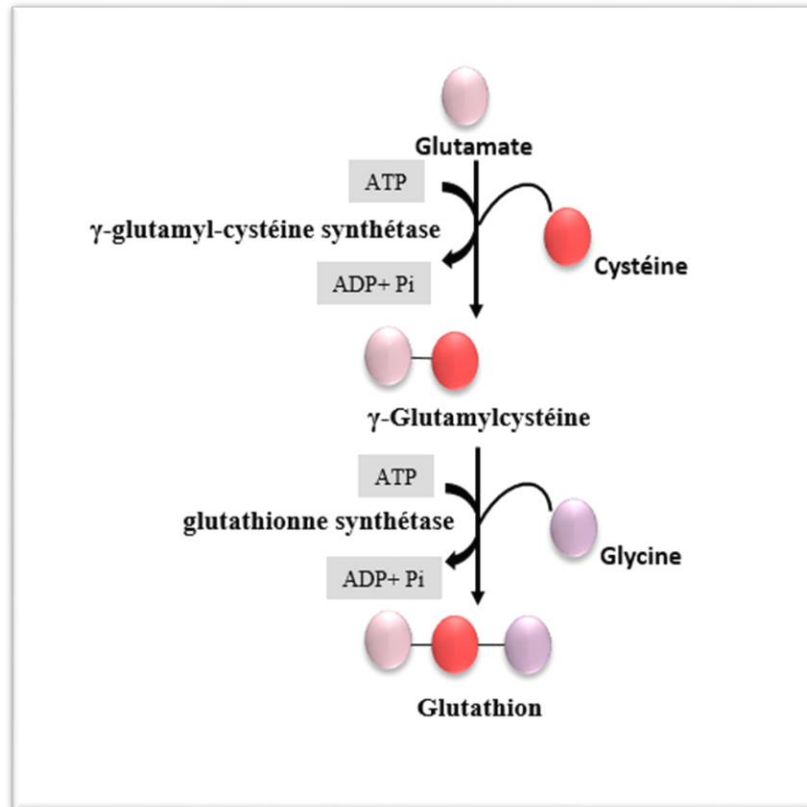
- Les antioxydants non enzymatiques :

Les antioxydants non enzymatiques sont en partie apportés par les produits alimentaires, plusieurs exemples peuvent être cités dont : **la vitamine C, E,**

- La vitamine C ou acide ascorbique : il s'agit d'une molécule organique hydrosoluble présente dans le cytoplasme et dans les fluides extracellulaires. Elle réduit les dérivés oxydés par le stress oxydant en devenant de l'acide déhydroascorbique.
- La vitamine E : contrairement à la vitamine C, la vitamine E est une molécule organique liposoluble qui lui permet donc de piéger les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique.

Le glutathion réduit ou GSH : Il est considéré comme l'un des antioxydants majeurs chez les mammifères. C'est un tripeptide constitué de 3 acides aminés : le glutamate, la glycine et la cystéine.

Dans la cellule, le glutathion se trouve majoritairement sous forme réduite (GSH) et en faible proportion sous forme oxydée (GSSG). Le GSH est produit en deux étapes successives d'ATP-dépendantes : la première étape fait intervenir une  $\gamma$ -glutamyl-cystéine synthétase qui conjugue la cystéine à la molécule de glutamate pour produire un premier composé le  $\gamma$ -glutamylcystéine. Une deuxième enzyme glutathion synthétase rajoute la glycine au produit de la première réaction qui donne le GSH (Sreekumar et al., 2021) (figure 11).



*Figure 11 : Représentation schématique sur la biogénèse de glutathion.*

Le GSH joue un rôle crucial dans la détoxification des EOR tel que le peroxyde d'oxygène où il est utilisé comme cofacteur par les enzymes telles que les glutathion peroxydases (Gpx). Le GSH est alors recyclé par la glutathion réductase (GR) dépendante du NADPH, H<sup>+</sup> (Sreekumar et al., 2021).

Le GSH est également un composé pris en charge par les glutathions transférases qui ont comme substrat des composés électrophiles formant des conjugués et participant à leur élimination (Sreekumar et al., 2021) (figure 12).

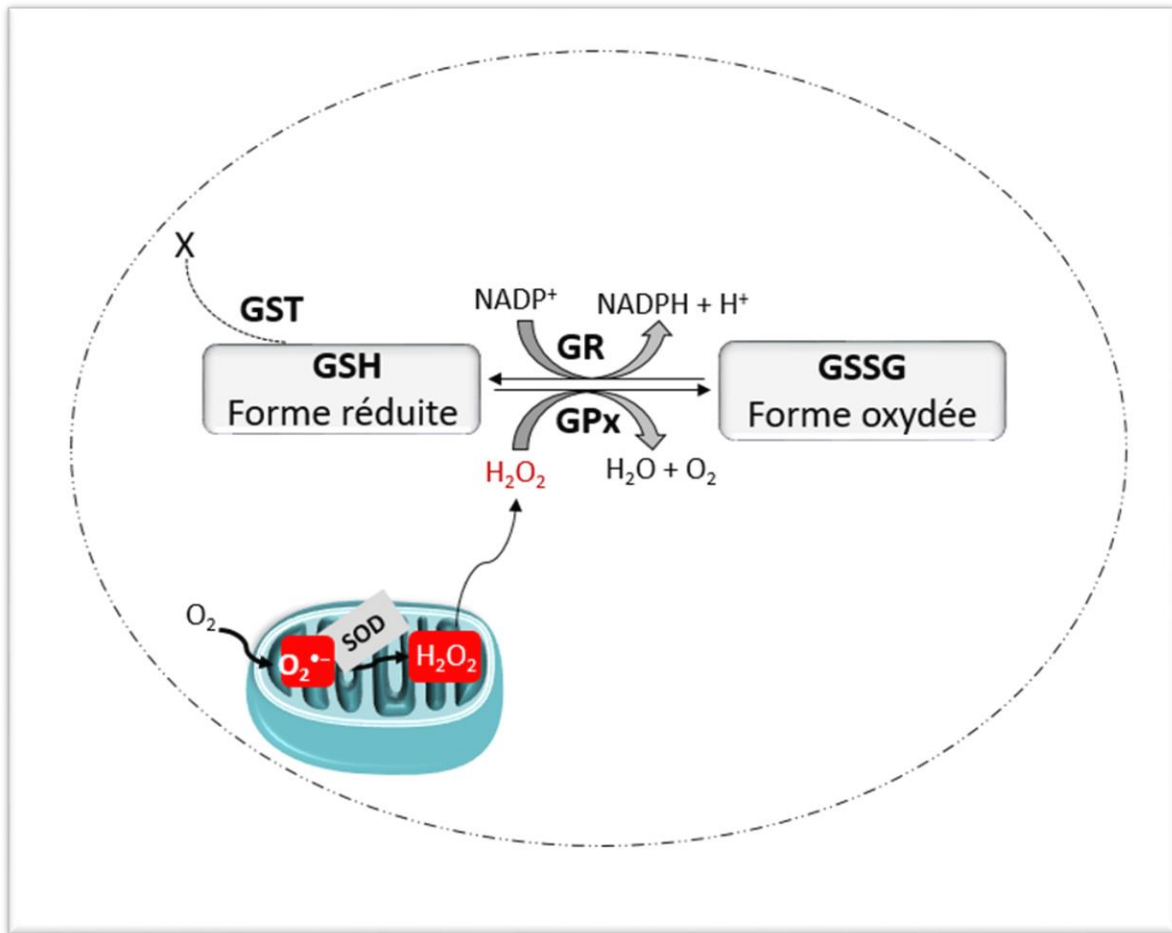


Figure 12 : Le mécanisme moléculaire glutathion dépendant destiné à l'élimination du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réduit en molécule d'eau et O<sub>2</sub> lors d'une réaction catalysée par les peroxydases (GPx), et au cours d'une réaction nécessitant du NADPH, H<sup>+</sup>. Le recyclage du GSH (forme réduite) à partir du GSSG (forme oxydée) se fait par glutathion réductase (GR)

Comme définit précédemment, Les mitochondries sont essentielles de part leur rôle dans la production d'ATP. L'un des plus grands consommateurs d'énergie est le neurone puisqu'il nécessite donc une distribution mitochondriale le long des axones. Cette répartition est possible grâce à l'intervention du processus de fusion et fission mitochondriale (Brillo et al., 2021).

#### II.4.4. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont en constante dynamique et changent de morphologie en continu. Ce processus fondamental est crucial pour assurer plusieurs évènements : le transport mitochondrial, l'interaction avec d'autres organelles dans la cellule (réticulum endoplasmique

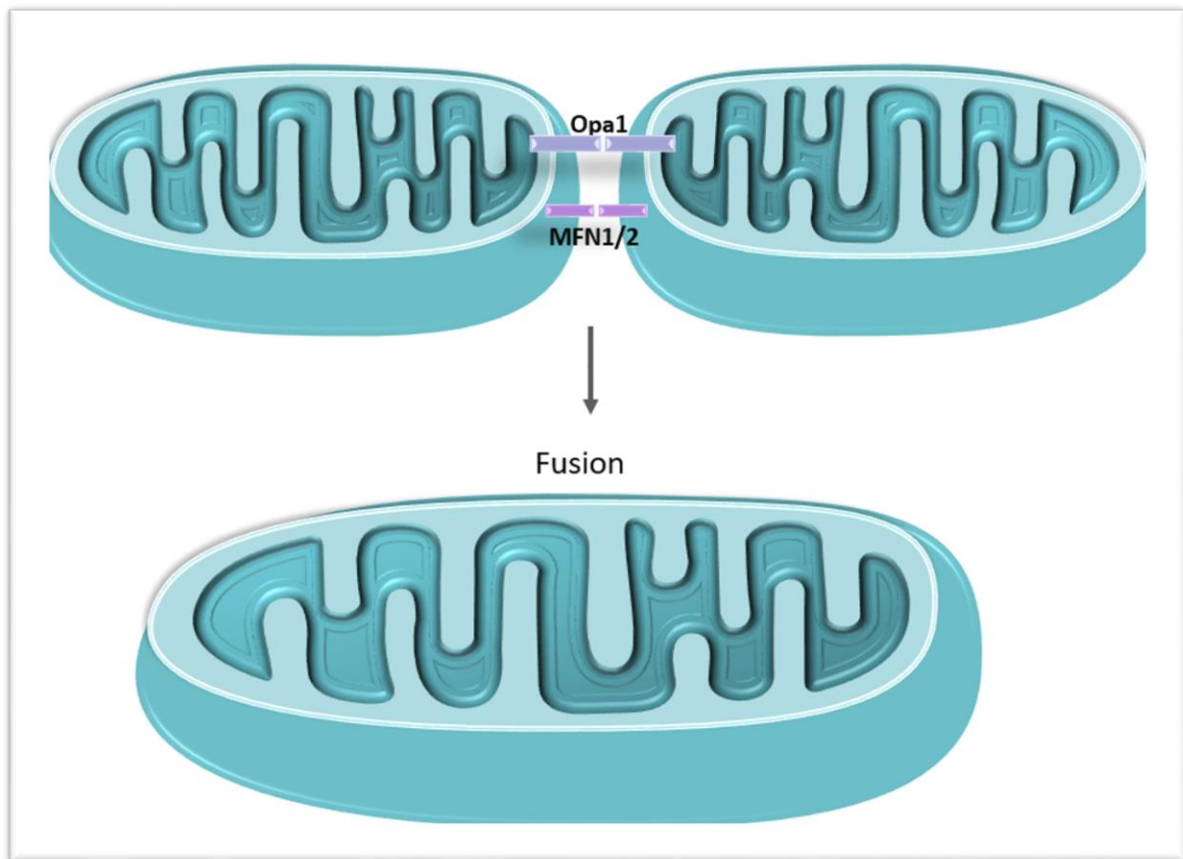
(RE), cytosquelette et lysosome), la mitophagie, et la fusion/fission mitochondriale (Brillo et al., 2021).

#### II.4.4.1. Fusion/Fission mitochondriale

La première observation de la mitochondrie en microscopie à fluorescence a montré que cette dernière ressemble en réalité à un réseau tubulaire plus au moins long et connecté (Bakeeva et al., 1978). Ceci est expliqué par les mouvements permanents induits entre le processus de fusion et de fission mitochondriales (Karbowski and Youle, 2003).

On parle de processus de fusion lorsque deux mitochondries adjacentes se rejoignent, et de processus de fission lorsqu'une mitochondrie se sépare en deux mitochondries filles. L'équilibre entre ces deux événements forme un réseau mitochondrial connecté. L'inactivation de l'un entraîne une activation de l'autre. Le mécanisme moléculaire de fusion et de fission est dépendant de protéines conservées de type dynamin-like GTPase (Ramachandran, 2018).

**La Fusion :** Dans les cellules eucaryotes, la fusion mitochondriale se fait en deux étapes : d'abord, la fusion de la membrane externe est régulée par deux protéines très conservées chez l'homme nommées Mitofusine 1 et 2 (MFN1 et MFN2). Ces protéines rapprochent les membranes externes de deux mitochondries en formant des homo et hétéro-dimères, puis, dans un second temps, la fusion des deux membranes internes se déroule via l'intervention de la protéine OPA1 qui interagit avec MFN1 (Sebastián et al., 2016) (figure 13).



*Figure 13 : Représentation schématique sur le processus de fusion mitochondriale*

Des études ont montré que des mutations de MFN2 étaient impliquées dans le développement de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) (Züchner et al., 2004). De façon intéressante, dans un modèle transgénique murin CMT2A, la mutation de MFN2 empêchait la dégénérescence axonale seulement lorsque le niveau de MNF1 était élevé. En revanche, lorsque le niveau d'expression de MNF1 était faible, les mutants MNF2 présentaient un effet dominant négatif sur la fusion mitochondriale (Zhou et al., 2019). Ainsi, la déficience de MFN2 pourrait être compensée par le MNF1 via la formation d'un complexe entre MFN1 et MFN2, ce qui préserverait la fusion mitochondriale (Detmer and Chan, 2007). Dans ce contexte, une surexpression de MNF1 dans le système nerveux périphérique pourrait être proposée comme une approche thérapeutique intéressante pour les patients CMT2A (Detmer and Chan, 2007; Zhou et al., 2019).

**La Fission** : Le processus de fission débute par un contact entre le RE et la membrane externe mitochondriale (Friedman et al., 2011). Cette interaction permet le recrutement d'une protéine cytosolique Drp1 (dynamamin related protein 1) à la membrane externe mitochondriale grâce à des récepteurs localisés à la surface mitochondriale Fis1 (*mitochondrial fission 1 protein*), Mff (*mitochondrial fission factor*), MiD49 et MiD51. La liaison de Drp1 au niveau de la surface mitochondriale s'assemble en oligomères en formant des anneaux induisant la fragmentation de la mitochondrie grâce à l'intervention de l'énergie acquise lors de l'hydrolyse du GTP (Michalska et al., 2016) (figure 14).

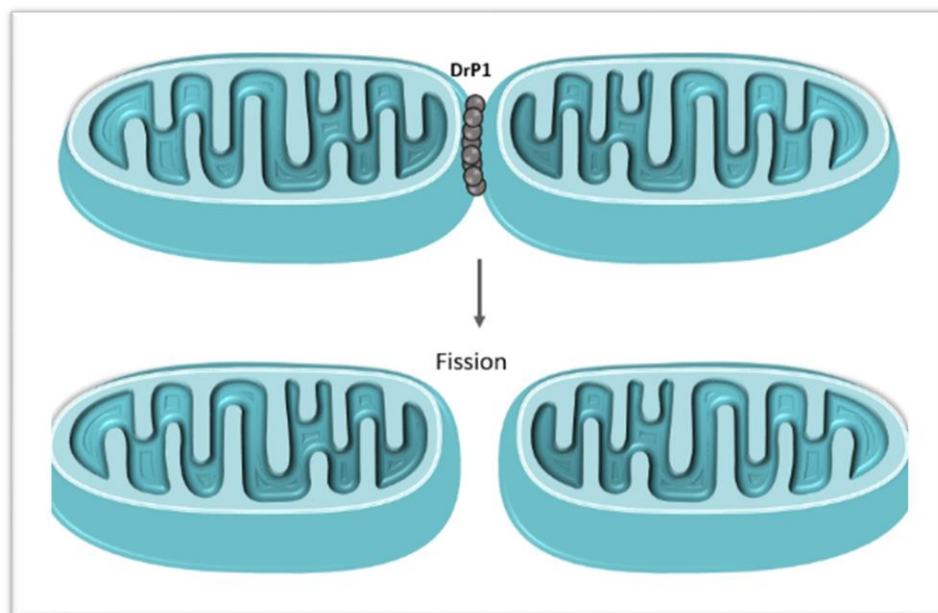


Figure 14 : Représentation schématique sur le processus de fission mitochondriale

#### II.4.5. Transport mitochondrial

Chez les neurones, un système de transport mitochondrial bidirectionnel, a été mis en évidence (Correia et al., 2016; Lovas and Wang, 2013). Un transport antérograde s'effectue du corps cellulaire vers les jonctions synaptiques et le transport rétrograde lorsqu'il s'effectue dans le sens opposé. Le déplacement des mitochondries est assuré par l'intervention de protéines motrices dépendante de l'ATP telles que les kinésines et les dynéines qui glissent sur le cytosquelette notamment au niveau des microtubules (Pareyson et al., 2015).

Le transport antérograde fait intervenir la kinésine, et en particulier la kinésine 1, codées par KIF5A, KIF5B et KIF5C, alors que le transport rétrograde implique plutôt des protéines dynéines codées par DYNC1H1 et qui forment des complexes protéiques avec les dynactines (Nahacka et al., 2021; Pareyson et al., 2015). Le déplacement des mitochondries le long des microtubules est également assuré par les protéines adaptatrices Miro/Milton, localisées dans la membrane externe mitochondriale (figure 15).

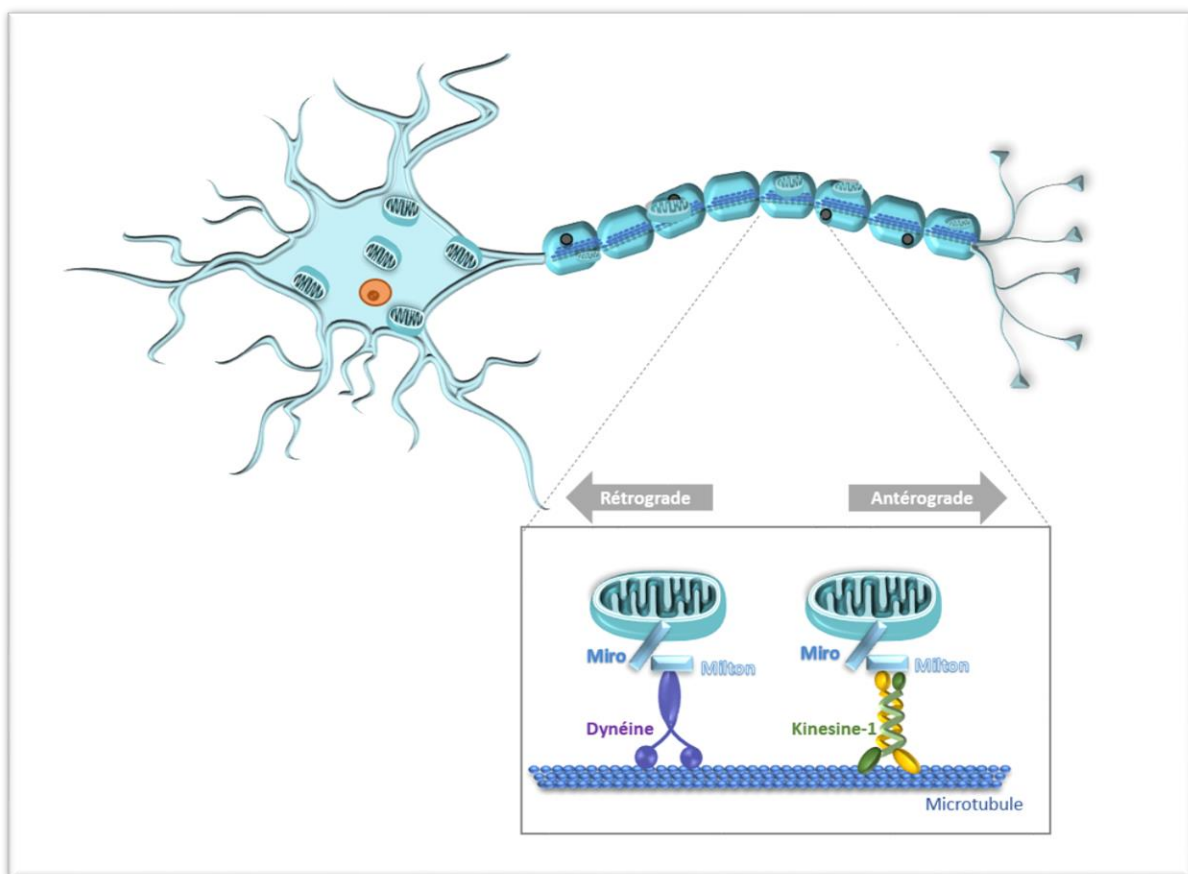


Figure 15 : Représentation schématique sur le transport mitochondrial

#### II.4.6. La mitophagie

La mitophagie désigne la dégradation spécifique des mitochondries lorsque ces dernières sont endommagées ou non fonctionnelles. Dans les cellules de mammifères, la mitophagie est un processus de contrôle qualité déterminant pour la survie de la cellule. Le mécanisme

moléculaire de ce processus peut être déclenché par ubiquitinylation de manière dépendante ou indépendante (Palikaras et al., 2018).

La mitophagie peut s'effectuer de façon dépendante par la voie PINK1/Parkin (figure 16A). Parkin est une E3 ubiquitine ligase. Une fois phosphorylée par PINK1, Parkin ubiquitinye plusieurs protéines mitochondriales externes dites réceptrices : P62, NBR1, OPTN, NDP52, et TAX1BP1 qui s'associent avec la protéine LC3. L'interaction avec LC3 conduit au recrutement de phagophore puis à la séquestration des mitochondries au sein des autophagosomes (Kubli and Gustafsson, 2012), qui seront par la suite dégradés par les lysosomes (Glick et al., 2010). La mitophagie peut s'effectuer de manière indépendante (figure 16B) par l'intervention de protéines mitochondriales externes dites réceptrices NIX, BNIP3, FUNDC1, BCL2L13, qui seront reconnues par la protéine LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) localisée dans la membrane de phagophore (figure 16).

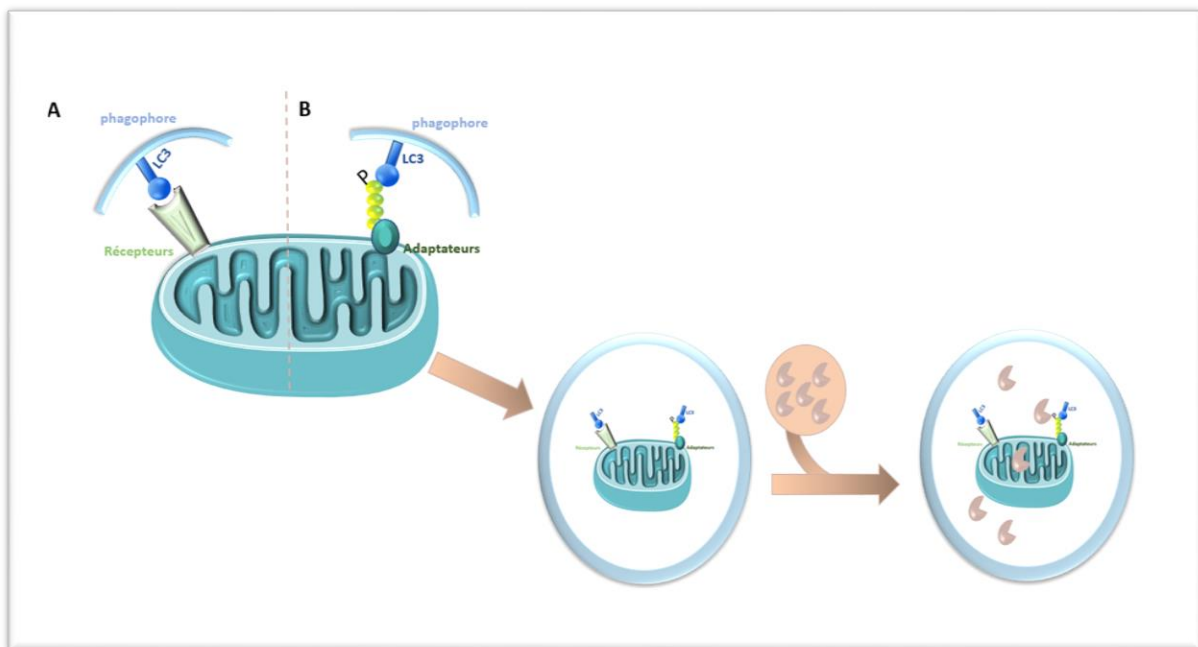
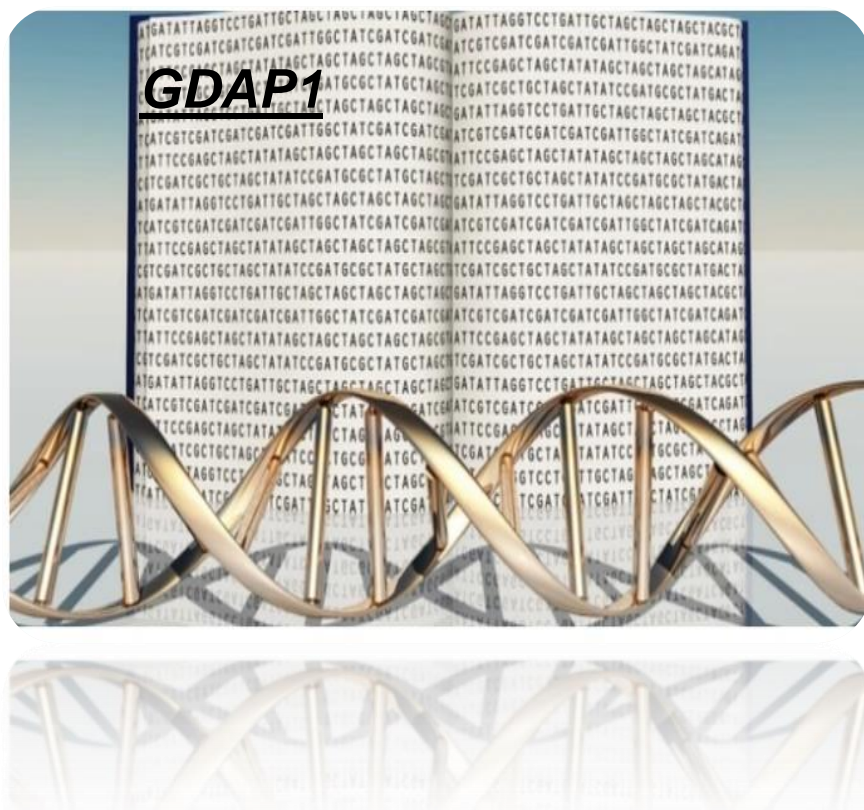


Figure 16 : : Les mécanismes moléculaires de la mitophagie. **A.** Mécanisme Indépendant de PINK/PARKIN et dépendant de protéines réceptrices localisées dans la membrane externe mitochondriale. **B.** Mécanisme Indépendant de PINK/PARKIN



## *Partie III. Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1)*

---



## III.1. Du gène à la protéine

### III.1.1. Le gène *GDAP1*

*GDAP1* a été rapporté pour la première fois comme l'un des 10 ADNc (GDAP1-GDAP10) fortement exprimés lors de la différenciation cholinergique d'une lignée cellulaire de neuroblastome de souris Neuro2a induite par le ganglioside d'où le nom *Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1* (Liu et al., 1999).

Chez l'Homme, en utilisant la cartographie des gènes candidats pour la CMT, le locus a été identifié pour la première fois comme étant responsable de la CMT4A. Ce locus est localisé sur le chromosome 8q13-q21 (Ben Othmane et al., 1993). Le gène correspondant a été associé à plusieurs formes de CMT (Baxter et al., 2002; Cuesta et al., 2002). Le gène *GDAP1* contient 6 exons et 5 introns (Cuesta et al., 2002), Il code pour deux différents transcrits résultant de l'épissage alternatif. Le premier transcrit plus long, constitue l'isoforme « a » de 358 acides aminés, et le deuxième transcrit constitue l'isoforme « b » de 290 acides aminés raccourci dans sa partie N-terminale (Cassereau et al., 2011; Cuesta et al., 2002). Il a été rapporté que la protéine de 358 acides aminés codée par le transcrit « a » présente une homologie de 94 % à la protéine Gdap1 de souris.

### III.1.2. La protéine GDAP1

#### III.1.2.1. Expression de la protéine GDAP1

Il s'agit d'une protéine localisée dans la membrane externe de la mitochondrie (Niemann et al., 2005; Pedrola et al., 2005). L'équipe de Pedrola a montré que *GDAP1* est principalement exprimé dans les neurones périphériques incluant les neurones moteurs et sensitifs (Pedrola et al., 2005), alors que dans la même année l'équipe de Niemann a retrouvé une expression de *GDAP1* non seulement dans les neurones moteurs et sensitifs mais aussi dans les cellules myéliniques de Schwann (Niemann et al., 2005).

### III.1.2.2. La structure de la protéine GDAP1

Des analyses structurales et phylogénétiques ont considéré la protéine GDAP1 comme un nouveau membre de la famille de la glutathion S-transférase (GST) (Marco et al., 2004). Les GST sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires notamment dans la détoxification cellulaire, la régulation des niveaux de glutathion cellulaire (GSH), la biosynthèse hormonale et la signalisation intracellulaire (Hayes et al., 2005). GDAP1 possède deux domaines de GST (GST-N et GST-C). Ces deux domaines sont séparés par deux hélices alpha ( $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 loop), un domaine hydrophobique C ter (HD1), et le domaine transmembranaire C (TMD) permettant son ancrage à la membrane externe mitochondriale (figure 18). La région de l'hélice alpha est absente dans les GST déjà connues, ce qui classe GDAP1 comme un nouveau sous-groupe de GST (Marco et al., 2004).

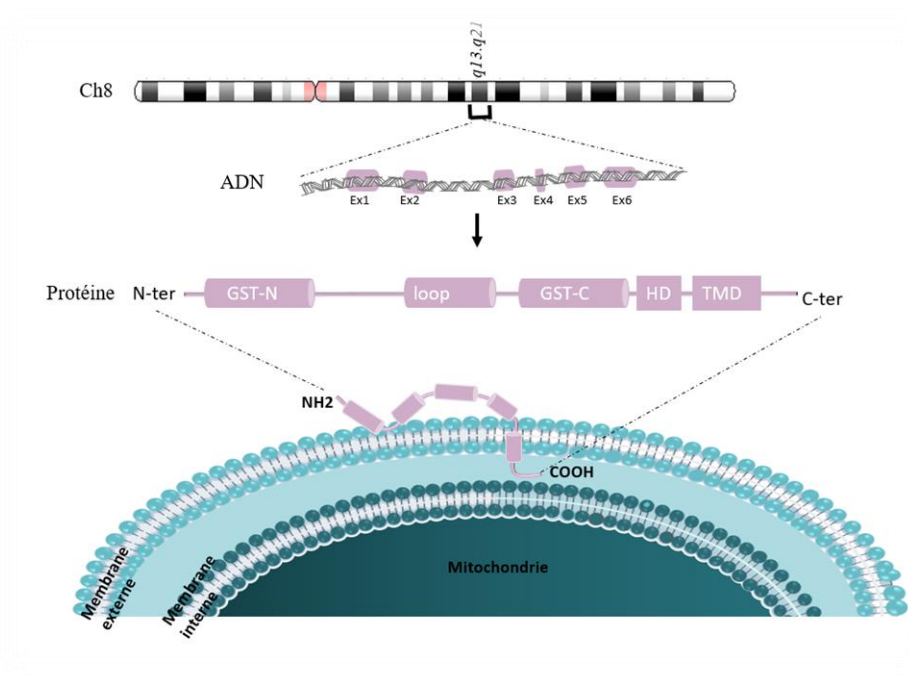


Figure 17 : Du gène à la protéine GDAP1.

A. Le gène codant la protéine GDAP1 est localisé sur le bras court du chromosome 8 dans la région (8q13.q21). B. le gène GDAP1 est constitué de 6 exons et 5 introns. C. La protéine GDAP1 de 358 acides aminés est composée de deux domaines GST (GST-N et GST-C), ( $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 loop), un domaine hydrophobique C ter (HD1), et le domaine transmembranaire C (TMD). D. la protéine GDAP1 est exprimée principalement dans la membrane externe mitochondriale.

Sur le plan fonctionnel, en utilisant une protéine recombinante, il a été démontré que GDAP1 présentait une activité de conjugaison du GSH typique des GST (Huber et al., 2016). Cette activité est gérée par le domaine HD1 de GDAP1 en adoptant deux modèles de conformations moléculaires : une conformation dite « active », où HD1 qui est localisé à l'intérieur du feuillet cytosolique avec son TMD C-terminal dans la membrane externe mitochondriale, ce qui active la fonction enzymatique de GST de GDAP1, et favorise la fission mitochondriale; une conformation dite « inactive », où HD1 est plutôt exposé vers le milieu cytosolique, ce qui inhibe l'activité GST de GDAP1 de façon auto-inhibitrice (Huber et al., 2016) (figure 19).

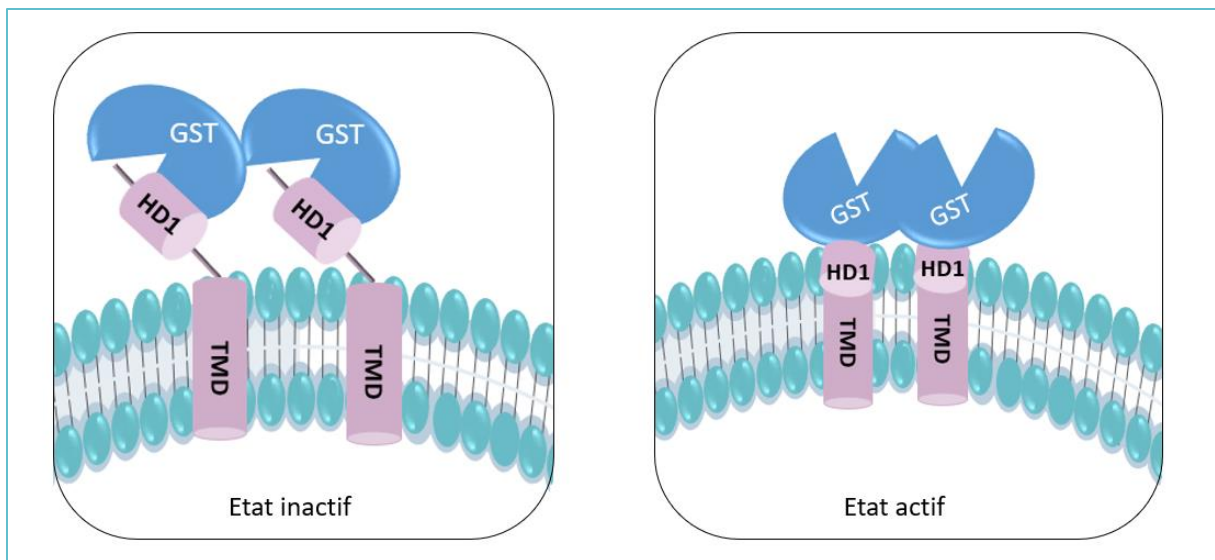


Figure 18 : Modèle de conformation moléculaire de GDAP1.

A. Etat actif de la GST. B. Etat inactif de la GST. (Schéma adapté de l'article Huber et al. 2016).

### III.1.2.3. Dimérisation de GDAP1

Récemment, une étude structurale a montré que la protéine GDAP1 forme des dimères à proximité de la boucle alpha (Googins et al., 2020; Huber et al., 2016). Puisque GDAP1 est capable de former des hétéro-dimères, il est possible que la protéine mutée interfère avec la protéine sauvage, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la fonction de la protéine.

### III.1.3. GDAP1L1 (GDAP1like1)

Le gène *GDAP1* a son paralogue *GDAP1L1* ou *GDAP1-like1* localisé sur le chromosome 20, qui présente les mêmes caractéristiques structurales et qui semble proche des glutathion S-transférases cytosoliques (GST). Ce gène, qui contient six exons et cinq introns code une protéine de 367 acides aminés dont 56 % acides aminés sont identiques avec la protéine GDAP1 (Shield et al., 2006). Contrairement à GDAP1 qui est dans le SNP, GDAP1L1 est exprimé dans le SNC, dans les cellules du cervelet, du cortex, de l'hippocampe et des cellules de Purkinje (Niemann et al., 2014).

GDAP1L1 se retrouve au niveau cytosolique principalement dans le SNC et non dans le SNP (Niemann et al., 2014). D'après une étude *in vitro*, cette dernière pourrait être transloquée dans les mitochondries à la suite d'une condition de stress qui provoque l'augmentation de glutathion oxydé. GDAP1L1 pourrait compenser l'absence de GDAP1 et pourrait être impliqué dans des processus de fission mitochondriale (Niemann et al., 2014). (Cassereau et al., 2020)

## III.2. Rôle de *GDAP1*

Au cours des dernières années, des études sur la structure et les mécanismes d'action de GDAP1 ont considérablement intéressé plusieurs équipes de recherches afin de mieux caractériser son rôle et sa fonction physiologique, mais également d'étudier sa pathogénicité et le mécanisme en cause, puisque des mutations de ce gène conduisent à plusieurs formes de CMT (Partie III.3 du chapitre 3). Le fait de mieux comprendre le(s) rôle(s) de GDAP1 permettrait ainsi de définir des cibles moléculaires et concevoir des approches thérapeutiques.

Certains aspects sur le rôle de GDAP1 restent encore à explorer, alors que d'autres sont contradictoires. Néanmoins, GDAP1 pourrait être impliqué dans plusieurs fonctions telles que : la dynamique et le transport mitochondrial, le stress oxydatif, l'homéostasie du calcium, la production d'énergie, le potentiel membranaire de la mitochondrie, l'organisation du golgi, la maturation des lysosomes, ou encore l'autophagie (figure 19).

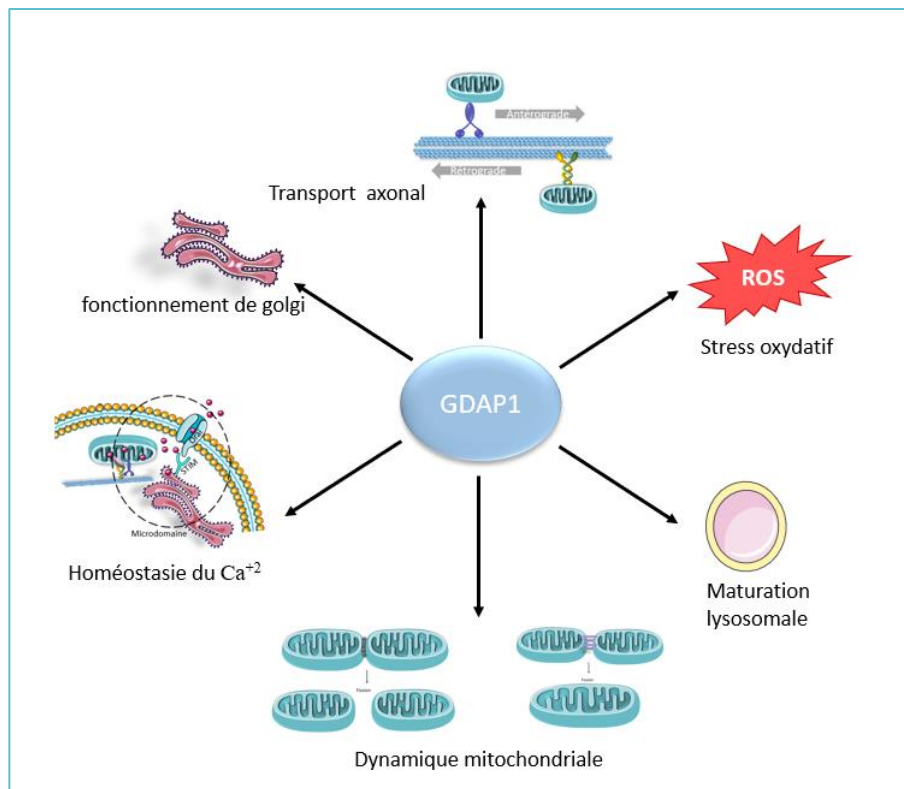


Figure 19 : Rôles de GDAP1

### III.2.1. GDAP1 et mitochondrie

#### III.2.1.1. GDAP1 et dynamique mitochondriale

Des études d'expression, réalisées sur différents modèles cellulaires, semblent suggérer un rôle de GDAP1 dans la dynamique mitochondriale. Il a été suggéré que la surexpression de *GDAP1* dans les cellules COS (lignées cellulaires de type fibroblaste dérivées de tissu rénal de singe) entraînait une fragmentation accrue du réseau mitochondrial sans induire l'apoptose, ce qui suggère ainsi son implication dans le processus de fission (Niemann et al., 2005). De façon complémentaire, l'inhibition de *GDAP1* dans la lignée N1E-115 (cellules de neuroblastome) par ARN interférence montre un réseau mitochondrial tubulaire et filamenteux, appuyant sur le rôle potentiel de GDAP1 dans la fission mitochondriale (Niemann et al., 2005).

L'évènement de fragmentation induit par GDAP1 peut être contrebalancé par l'intervention des protéines connues pour induire la fusion mitochondriale MFN1 et MFN2 et par l'expression d'un mutant négatif Drp1 (Niemann et al., 2005). Lors de la fission, Drp1 est recruté au niveau



de la membrane externe mitochondriale. L'hydrolyse de Drp1 permet la formation d'un anneau de Drp1. Bien que plusieurs études aient montré l'implication de GDAP1 comme facteur de fission, le mécanisme moléculaire exact n'a toujours pas été établi (figure 20).

La protéine GDAP1 est ancrée dans la membrane mitochondriale externe grâce à son domaine transmembranaire C (TMD). Il a été montré que les acides aminés qui entourent ce domaine sont essentiels non seulement pour l'ancrage mais aussi pour la fonction de fission de *GDAP1*. Le domaine hydrophobe HD est aussi nécessaire à la fonction de fission, son altération affecte en effet l'activité de fission (Niemann et al., 2005; Wagner et al., 2009). Un rôle dans la fusion mitochondriale a aussi été suggéré, mais reste à confirmer (Wagner et al., 2009).

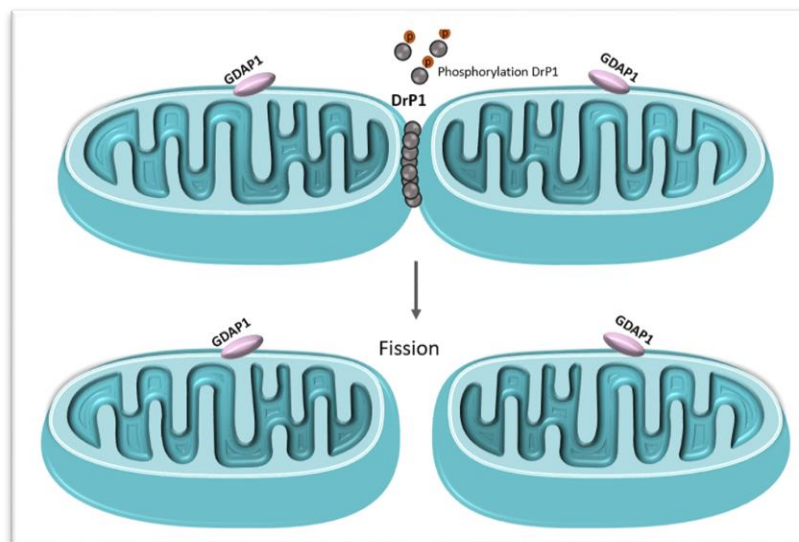


Figure 20 : *GDAP1* et le mécanisme de fission mitochondriale

### III.2.1.2. *GDAP1* et transport mitochondrial

Le transport mitochondrial est nécessaire pour assurer les besoins énergétiques au niveau des neurones. Pla-Martin et al suggèrent que *GDAP1* participe au mouvement antérograde et rétrograde en interagissant avec des protéines impliquées dans le transport axonal comme *RAB6B*, *caytaxin* et *Beta-tubuline* (Estela, 2011; Pla-Martín, 2013) (figure 21). *RAB6B* est impliquée dans le transport rétrograde en interagissant avec la dyeneine (Wanschers et al.,

2008), alors que caytaxin est impliquée dans le transport antérograde en se liant avec la kinesine-1 et les microtubules (Aoyama et al., 2009).

Une étude récente a montré que, au niveau des motoneurones embryonnaires de souris *Gdap1*<sup>-/-</sup>, le déplacement mitochondrial était plus lent dans le transport rétrograde, et plus interrompu (accompagné de pauses), dans le transport antérograde (Civera-Tregón et al., 2021). Le mécanisme de pause dans le transport antérograde est associé à une augmentation de calcium intracytosolique (Civera-Tregón et al., 2021; Saotome et al., 2008). Ces dysfonctions peuvent entraîner des conséquences sur la transmission synaptique puisque le calcium et l'énergie sont très demandés par les synapses distribuées par les mitochondries (Lin and Sheng, 2015).

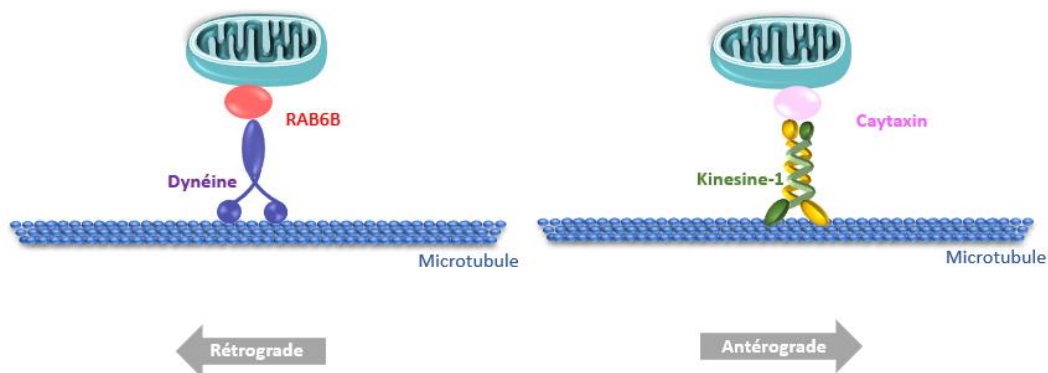


Figure 21 : *GDAP1* et le transport mitochondrial

### III.2.1.3. *GDAP1* et le stress oxydatif

*GDAP1* possède un domaine glutathion S-transférase atypique (GST) localisé à l'extérieur de la membrane mitochondriale externe. La GST est une enzyme impliquée dans le processus de la détoxification des radicaux libres. Dans des conditions physiologiques, le GST de *GDAP1* pourrait être en lien avec la surveillance du niveau métabolique de GSH dans certaines cellules spécifiques. Ce GSH est considéré comme le tampon oxydoréducteur cellulaire permettant de contrôler l'état redox cellulaire (Huber et al., 2016; Noack et al., 2012).



Une perturbation de l'activité de la glutathion-S-transferase réduit la capacité antioxydante cellulaire et sensibilise ces cellules au stress oxydant. La surexpression de *GDAP1* dans les cellules neuronales HT22, exposées à une concentration élevée de glutamate, induit une résistance au glutamate par une augmentation du niveau de GSH, cette augmentation neutralise les ROS et stabilise ainsi le potentiel membranaire mitochondrial  $\Delta\Psi_m$  (Noack, 2012).

En revanche dans les cellules HT22 et motoneurones-like NSC34 avec *GDAP1*<sup>-/-</sup>, les cellules ont été soumises à une toxicité oxydative induite par l'excès de glutamate. Cette concentration élevée de glutamate inhibe la voie de synthèse de GSH. De plus, en absence du domaine GST de *GDAP1*, la cellule se trouve avec un épuisement du niveau de GSH et une augmentation de ROS produite notamment par la mitochondrie de façon continue, ceux-ci conduisant à la mort cellulaire (Noack et al., 2012) (figure 22).

Une étude ultérieure, réalisée dans un modèle animal de souris *Gdap1*<sup>-/-</sup>, a montré que les souris dépourvues de GDAP1 présentaient un stress oxydatif persistant dans leur SNP. Ce résultat confirme donc le rôle de GDAP1 en tant que protecteur contre le ROS. Cependant, Niemann et al suggèrent que l'absence de la fonction GDAP1 pourrait être compensée dans le système nerveux central par l'expression de son paralogue GDAP1L1 (Niemann et al., 2014). De plus un niveau très élevé de ROS a été observé dernièrement dans une étude sur des motoneurones embryonnaires *GDAP1*<sup>-/-</sup> (Fernandez-Lizarbe et al., 2019).

Des preuves sur l'action protectrice de GDAP1 ont été rapportées également sur des fibroblastes de patients CMT4 porteurs de mutations perte de fonction de *GDAP1*. Chez ces patients, le niveau de GSH était faible comparé aux fibroblastes contrôles (Noack et al., 2012).

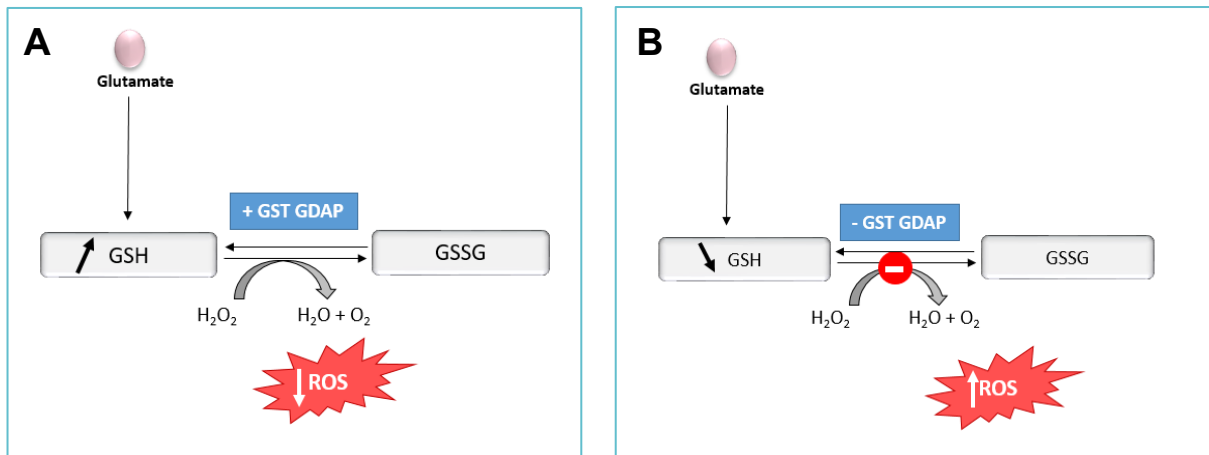


Figure 22 : Rôle de GDAP1 dans la protection contre le stress oxydant. GDAP1 possède un domaine glutathion S-transférase atypique (GST). **A.** la surexpression de GDAP1 réduit le stress oxydant (ROS). **B.** L'absence de GDAP1, induit à l'épuisement de stock de GSH, associé à l'augmentation du stress oxydant.

#### III.2.1.4. GDAP1 et l'activité bioénergétique

Un dysfonctionnement bioénergétique mitochondrial est souvent associé à une réduction du potentiel de membrane mitochondriale et à une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, affectant ainsi la synthèse mitochondriale d'ATP. Ces dysfonctionnements ont été observés dans plusieurs études au niveau de motoneurone *Gdap1*<sup>-/-</sup> (Civera-Tregón et al., 2021), du nerf périphérique de souris *GDAP1*<sup>-/-</sup> (Barneo-Muñoz et al., 2015) et de fibroblastes avec mutation *GDAP1* provenant de plusieurs patients CMT (Cassereau et al., 2011; Noack et al., 2012).

Cassereau et al., ont récemment réalisé une étude sur un modèle de fibroblastes provenant de patients CMT2K porteurs de la mutation p.C240Y, ou la mutation p.R120W, localisées dans les domaines GST de la protéine GDAP1. Il a été observé que les fibroblastes étaient caractérisés par une déficience du complexe mitochondrial I (CI) de la chaîne respiratoire.

#### III.2.1.5. GDAP1 et le potentiel membranaire de la mitochondrie

Niemann a démontré que des mutations dominantes de *GDAP1* sont associées à une fusion mitochondriale, liées à une réduction du potentiel membranaire mitochondrial et à une augmentation des niveaux de ROS (Niemann et al., 2014).

Par la suite, comme détaillé précédemment, Noack et al ont observé que la déplétion de GSH induite par le glutamate dans les cellules HT22-GDAP1 KO, provoque une augmentation de la production de ROS. Cette augmentation du stress oxydant est accompagnée d'une perturbation du potentiel membranaire. En revanche, la surexpression de *GDAP1* permet de mieux contrôler le contenu en GSH dans la cellule, ce qui diminue la production de ROS et stabilise le  $\Delta\Psi_m$  (Noack et al., 2012).

### III.2.1.6. GDAP1 et l'homéostasie calcique

Une étude fonctionnelle a montré que l'inactivation de *GDAP1* dans une lignée cellulaire SH-SY5Y est associée à une diminution de l'interconnexion entre la mitochondrie et le RE, également associé avec une altération de mouvement des mitochondries vers la membrane plasmique. Ce changement de contact est concomitant avec la perturbation de l'homéostasie du calcium qui entraîne une réduction de l'afflux de calcium induit par SOCE (Store-Operated Calcium Entry) (Pla-Martín et al., 2013).

GDAP1 est plus précisément localisé sur la structure nommée « membranes associées à la mitochondrie » (MAMs), qui est un sous-domaine du RE jouant un rôle crucial dans le contact entre le RE et la mitochondrie. Cette région est ainsi fondamentale pour la signalisation calcique.

Par ailleurs, une analyse sur des motoneurones d'embryons de souris knock-out pour *Gdap1* dans des ganglions de la racine dorsale a révélé également un effet sur la réduction de calcium mitochondriale et une diminution de l'activité de SOCE (Barneo-Muñoz et al., 2015). En absence totale de *GDAP1*, la mitochondrie se localise plus loin du micro-domaine de  $Ca^{2+}$ , ce qui réduit le contact entre la mitochondrie et le RE. Le résultat est donc une diminution de la mobilisation des mitochondries vers la membrane plasmique, ce qui limite l'absorption correcte du  $Ca^{2+}$  mitochondriale induite par SOCE.

L'interaction entre GDAP1 et les protéines impliquées dans le transport rétrograde et antérograde dans les cellules neuronales permet le mouvement ainsi qu'une distribution correcte des mitochondries à l'interface du réticulum endoplasmique dans la cellule (Pla-Martín et al., 2013). Il a été montré que des mutations de perte de fonction de GDAP1, localisées au niveau de l'hélice alpha, altèrent l'interaction entre GDAP1 et les protéines de transport (RAB6B et la caytaxine), réduisant ainsi l'activité de SOCE lié à un défaut de localisation de la mitochondrie (Barneo-Muñoz et al., 2015) (figure 23).

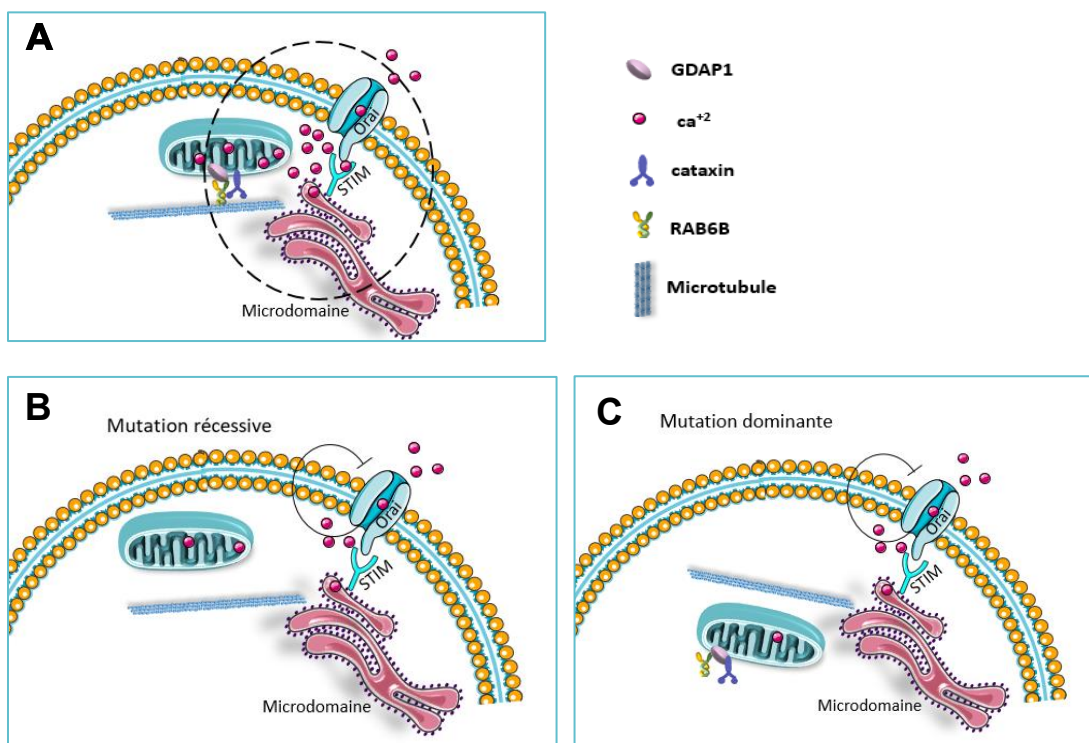


Figure 23 : GDAP1 et l'homéostasie du calcium.

(Schéma adapté aux articles Pla-Martín et al. 2013 ; Barneo-Muñoz et al. 2015).

A. L'interaction entre GDAP1 et des protéines RAB6B et caytaxin impliquées dans le transport rétrograde et antérograde respectivement permet le positionnement correct des mitochondries vers le réticulum endoplasmique dans le microdomaine- $\text{Ca}^{2+}$ .

L'absence de GDAP1 (mutation au niveau de la loop alpha) provoque une mauvaise interaction avec les protéines de transport.

B. GDAP1 garde son interaction avec les protéines de transport mais peut avoir un effet dominant négatif dans le cas de mutation faux sens.

B et C. La mutation de GDAP1 (récessive ou dominante) affecte la localisation de la mitochondrie dans le microdomaine, la mitochondrie se retrouve alors plus loin du micro-domaine- $\text{Ca}^{2+}$ . La mitochondrie perd son contact avec le RE, ce qui perturbe l'homéostasie du calcium induite par l'activité SOCE.

## III.2.2. GDAP1 et autres organistes

### III.2.2.1. GDAP1 et Golgi

En plus de son rôle dans la fonction de la mitochondriale, GDAP1 serait aussi impliquée dans la fonction du Golgi. Une observation par microscopie électronique d'une lignée cellulaire de neuroblastome et d'une lignée Hela mutée avec le gène *GDAP1* a montré une altération de la morphologie du Golgi avec des citernes qui apparaissent d'une forme irrégulière. Ces mutations de *GDAP1* entraînent également un changement de localisation de la protéine de TGN46 (K. Binięda et al., 2021).

### III.2.2.2. GDAP1 et peroxysomes

Le domaine TMD qui permet l'insertion de GDAP1 dans la membrane externe mitochondriale, permet également son ancrage à la membrane peroxysomale en se liant avec une molécule chaperonne et un récepteur d'importation nommé pex19. Il a été démontré que, dans des cellules de neuroblastome de souris N1E-115 transfectées avec des shRNA ciblant *GDAP1*, cette sous-expression de *GDAP1* conduit à un allongement peroxysomal, alors que la réexpression de *GDAP1* favorise la fragmentation des peroxysomes. Il semblerait donc que *GDAP1* joue un rôle dans la fission des peroxysomes (Huber et al., 2013).

### III.2.2.3. GDAP1 et lysosome

Cantaro et al, a de plus, suggéré un rôle de GDAP1 en tant que régulateur au niveau du site de contact membranaire entre la mitochondrie et le lysosome. Il a été caractérisé qu'un dysfonctionnement mitochondrial provoque une morphologie des lysosomes plus large, sans altérer leur capacité hydrolytique. La restauration structurale de ces lysosomes peut être induite par une régulation du niveau cellulaire en GSH. Ainsi, il a été démontré que l'interaction entre GDAP1 et une kinase PYKfyve est nécessaire au maintien à l'état redox et à la maturation des vésicules, et que GDAP1 rapprocherait les deux membranes de la mitochondrie et du lysosome

en interagissant avec un marqueur lysosomal LAMP-1 (Cantarero et al., 2020). (Cantarero et al., 2020).

#### III.2.2.4. GDAP1 et l'autophagie

Une étude récente a proposé deux nouveaux rôles de GDAP1 : dans la participation à un événement précoce de l'autophagie et dans le transport membranaire des vésicules. Ces fonctions seraient liées à une interaction potentielle de GDAP1 avec les protéines STX17, LC3I et LC3II. Elle aurait lieu au niveau des MAMs et permettrait le flux autophagique. Une déficience du gène *GDAP1* dans les motoneurons d'embryons de souris (eMN) *GDAP1*<sup>-/-</sup> de souris semblerait en effet responsable d'un ralentissement du flux autophagique dû à des défauts membranaires dans les vésicules autophagiques précoces (Cantarero et al., 2020).

### III.3. *GDAP1* impliqué dans le CMT

#### III.3.1. Les mutations de *GDAP1*

Depuis la découverte du premier gène, *PMP22*, en 1996, plusieurs gènes codant des protéines avec différentes fonctions biologiques et cellulaires ont été décrits comme étant impliqués dans la CMT, dont le gène *GDAP1*.

En 2002, deux équipes rapportent que des mutations de *GDAP1* peuvent conduire à une forme autosomique récessive de CMT (CMT4A) (Baxter et al., 2002; Cuesta et al., 2002). En 2005, Claramunt et al., publient pour la première fois une mutation de *GDAP1* associée à une transmission autosomique dominante (Claramunt et al., 2005).

À ce jour, plus de 100 mutations associées au gène *GDAP1* responsables de CMT sont répertoriées comme pathogéniques, sur la base de données Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). La plupart de ces mutations correspondent à des mutations faux-sens (56 %), suivies de mutation non-sens (17 %). On retrouve également des petites délétions, insertions (20 %) et mutations d'épissage (7 %) (Cassereau et al., 2011). Ces

mutations affectent principalement l'exon 3 et l'exon 6, où l'on retrouve la boucle  $\alpha$  et le domaine GST-C de la protéine GDAP1 (Cassereau et al., 2011; Pakhrin et al., 2018).

### III.3.2. Transmission de *GDAP1*

*GDAP1* est considéré comme l'un des rares gènes liés à la fois aux formes autosomiques récessives et autosomiques dominantes de la maladie CMT, mais il peut aussi être impliqué dans des formes axonales, des formes démyélinisantes et des formes intermédiaires, ce qui rend sa classification compliquée. La forme récessive axonale est nommée CMT2K ou AR-CMTax-*GDAP1* (Cuesta et al., 2002; Mathis et al., 2015), la récessive démyélinisante est nommée CMT4A ou AR-CMTde-*GDAP1* (Baxter et al., 2002; Mathis et al., 2015). Les formes autosomiques dominantes ont à ce jour uniquement été associées à des formes axonales de la maladie et sont nommées CMT2K ou bien AD-CMTax-*GDAP1* (Mathis et al., 2015). Il existe aussi des formes intermédiaires de transmission autosomique récessive, nommée CMTRIA ou AR-CMTint-*GDAP1* (Mathis et al., 2015).

#### III.3.2.1. Mutations *GDAP1* à transmission autosomique récessive

**Phénotype :** les caractéristiques cliniques des patients porteurs de mutations AR-*GDAP1* sont sévères et se développent à un âge très précoce dans l'enfance. Chez certains patients, une hypotonie est déjà diagnostiquée dans la période néonatale, avec un retard des premiers jalons moteurs, vers la fin de la première décennie. Ces patients commencent à perdre leur autonomie due à des malformations recentrées au niveau des pieds et des mains. Une faiblesse plus au moins importante des membres inférieurs se développe avec la progression de la maladie, conduisant souvent à l'utilisation d'un fauteuil roulant.

**Génotype :** Les mutations de *GDAP1* à transmission récessive sont associées à une perte de fonction de la protéine mutée. Il a été montré que la présence d'un codon stop prématuré (PTC) du gène *GDAP1*, dû à des mutations non-sens ou à des délétions/insertions conduisant à des

décalages du cadre de lecture, perturbe le processus de traduction et conduit à la production d'une protéine tronquée, qui serait mal ancrée à la membrane externe mitochondriale. De plus, les ARNm contenant des codons STOP prématurés sont généralement dégradés par le système nonsense-mediated mRNA decay (NMD), qui est un système de contrôle cellulaire dégradant l'ARNm portant un PTC. Ce système induit ainsi à une diminution de la quantité d'ARNm *GDAP1* et donc de la quantité de protéines GDAP1, ce qui entraîne l'apparition d'une forme sévère de CMT.

Dans le cas de mutations faux-sens, la protéine GDAP1 peut s'ancrer à la membrane externe mitochondriale, mais sa fonction est altérée et peut être responsable de dysfonctionnements mitochondriaux (Niemann et al., 2009; Pedrola et al., 2005). Par exemple, des mutations faux-sens localisées dans la région de  $\alpha$ -Loop de GDAP1 (la région impliquée dans l'interaction protéine-protéine) peuvent provoquer une hyper connexion avec la protéine de transport  $\beta$ -tubuline ce qui perturbe le mécanisme de transport ainsi que le déplacement des mitochondries dans l'axone (Wagner et al., 2009). D'autres mutations de ce domaine  $\alpha$ -loop peuvent également perturber l'interaction entre GDAP1 et des protéines de transport conduisant à une inhibition de l'activité de la SOCE (González-Sánchez et al., 2017). Cette inhibition ne serait pas due à une réduction de l'absorption mitochondriale de  $Ca^{2+}$ , mais plutôt à une réduction des contacts ER-mitochondries, et donc à un épuisement des réserves ER- $Ca^{2+}$  (Pla-Martín et al., 2013).

### III.3.2.2. Mutations *GDAP1* à transmission autosomique dominante

**Phénotype :** le phénotype est moins sévère que dans les formes autosomiques récessives. Ces patients présentent une atteinte principalement distale et une progression lente qui apparaît souvent à l'âge adulte (Sivera et al., 2010). Ces patients présentent un profil électrophysiologique de type axonal.



**Génotype** : les conséquences concernant les mutations *GDAP1* à transmission dominante restent encore mal étudiées, un effet dominant négatif pourrait être proposé comme hypothèse. Cette possibilité peut être reliée au fait que les protéines mutantes interfèrent avec celles de type sauvage, et affectent la fonction globale de *GDAP1*, puisque *GDAP1* peut former des dimères (Huber et al., 2016). Cependant, il a été montré, dans un modèle de cellules COS, que la surexpression de formes mutées de *GDAP1* (R120W et T157P) induit une fragmentation du réseau mitochondriale, similaire à celle associée à la surexpression de la protéine *GDAP1* sauvage. Il reste donc à comprendre si ces mutations du gène *GDAP1* peuvent vraiment altérer le processus normal de fusion des mitochondries (Niemann et al., 2009; Rzepnikowska and Kochański, 2018).

Contrairement aux mutations à transmission récessive, celles à transmission dominante pourraient entraîner une augmentation de la mobilité mitochondriale (González-Sánchez et al., 2017), ce qui conduit à une perturbation de l'activité énergétique. Cassereau et al ont montré que la mutation p.Cys240Tyr altère notamment le complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Cassereau et al., 2009). La surexpression de mutation faux-sens de *GDAP1* a montré une augmentation de l'activité de SOCE (González-Sánchez et al., 2017).

### III.3.3. Corrélation génotype- phénotype

La corrélation étroite entre phénotype et génotype liés aux mutations de *GDAP1* n'a pas encore été établie. Cependant, le mode de transmission génétique de *GDAP1* influence énormément le phénotype. Par exemple, les caractéristiques cliniques présentes chez les patients AR ont une sévérité de la maladie qui est moins fréquente voir absente, chez les patients AD. Sur l'aspect fonctionnel de la cellule, selon le mode de transmission, les mutations de *GDAP1* semblent avoir différents effets sur la fonction mitochondriale. En effet, les mutations AR de *GDAP1* semblent avoir un impact sur la fission tandis que les mutations AD influence plutôt la fusion mitochondriale. Même parmi les patients porteurs de la même mutation, des disparités en terme

d'âge d'apparition de la maladie ou encore de symptômes ont été observées, avec également une variabilité intra familiale notable.(Sivera et al., 2017). Plusieurs études seront donc nécessaires dans les années à venir (Article1), afin d'établir une corrélation génotype-phénotype du gène *GDAP1* en utilisant notamment une approche électrophysiologique, clinique, génétique et physiopathologique pour une grande cohorte de patient CMT, puisque jusqu'à présent les mutations décrites de *GDAP1* étaient limitées à un nombre de patient non apparentés Il serait également intéressant d'élargir nos connaissances sur la corrélation génotype-phénotype dans différentes zones géographiques (Cassereau et al., 2011; Sivera et al., 2017).

### III.3.4. Le modèle animal et cellulaire de *GDAP1*

*GDAP1* est principalement exprimé au niveau des neurones du nerf périphérique, il est donc difficile d'étudier ce gène car, contrairement aux fibroblastes, les neurones des patients CMT ne sont pas prélevables pour les mettre en culture. C'est pourquoi des modèles animaux et cellulaires ont été développés pour reproduire des mutations de *GDAP1* afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de CMT et potentiellement de développer des stratégies thérapeutiques.

### III.3.5. Modèles animaux *GDAP1*

#### III.3.5.1. Modèle de souris

Plusieurs souris transgéniques ont été développées dans le but de recréer le phénotype génétique de patients souffrant de CMT. L'équipe de Niemann et al, ont généré une lignée de souris *GDAP1* knock-out (*Gdap1*<sup>-/-</sup>) utilisant la stratégie de recombinaison Cre-Lox en ciblant l'exon 5 de *Gdap1* (Barneo-Muñoz et al., 2015; Niemann et al., 2014). Dans ce modèle animal, les premiers signes de la pathologie ont commencé tardivement à partir de 19 mois avec une réduction de vitesse de conduction nerveuse et une hypomyélinisation. De plus, chez les souris *Gdap1*<sup>-/-</sup>, il a été montré une structure mitochondriale plus large dans les neurones axonaux,

avec une altération du transport mitochondrial dans les neurones sensitifs (Niemann et al., 2014).

Un deuxième modèle de souris transgénique knock-out *Gdap1* a été généré avec une recombinaison homologue en ciblant l'exon 1 (Barneo-Muñoz et al., 2015). Cette construction a entraîné chez ces souris un développement précoce de la neuropathie avec des déficits comportementaux moteurs dès l'âge de 3 mois. La présence d'une telle différence entre les deux modèles knock-out *GDAP1* pourrait être expliquée par une différence au niveau génétique puisque ce n'est pas le même exon qui a été supprimé (exon1 versus exon 5).

Des études histopathologiques chez les souris *Gdap1*<sup>-/-</sup> ont révélé une perte progressive des motoneurones (MN). Ces MN étaient caractérisés par une réduction du calcium cytosolique associé à des problèmes structuraux des mitochondries (Barneo-Muñoz et al., 2015).

#### **III.3.5.2. Modèle de drosophiles**

Afin de recréer un modèle de sous-expression de *Gdap1* chez la drosophile, son expression a été modulée en utilisant des ARN à interférence. L'étude a montré des changements morphologiques de la mitochondrie lorsque *Gdap1* a été inhibé (López Del Amo et al., 2015). Dans une étude postérieure, l'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique a révélé une altération du métabolisme énergétique dans ce modèle (López Del Amo et al., 2017).

#### **III.3.5.3. Modèle de zebrafish**

Dans le but d'étudier la dynamique mitochondriale dans les neuropathies à petites fibres, un modèle de zebrafish knockin (KI) pour le gène *GDAP1* a été créé en utilisant la stratégie de morpholino. Les chercheurs à l'origine de l'étude ont pu détecter une réduction de la croissance des neurites sensitifs chez le zebrafish KI comparé au contrôle (Eijkenboom et al., 2019).

#### **III.3.5.4. Modèle de levure**

*Saccharomyces cerevisiae*

Afin de mieux comprendre le mécanisme dynamique de la mitochondrie (fission et fusion), une souche de *Saccharomyces cerevisiae*, dont des constructions plasmidiques entraînant des mutations faux sens de *GDAP*, ont été générées par mutagène. Dans les souches mutantes, les protéines GDAP1 se liaient fortement avec la  $\beta$ -tubuline (surtout pour les mutations situées à proximité du domaine alpha-loop) par rapport aux souches WT de *GDAP1* (Estela et al., 2011). Un autre modèle de *S. cerevisiae* a été proposé exprimant plusieurs variantes mutées du gène *GDAP1* dans le but de déterminer leur pathogénicité associée aux CMT. Ce modèle est très adapté pour mieux comprendre la pathogénicité des mutations de *GDAP1* et ainsi confirmer de nouvelles variantes détectées chez des patients CMT (Rzepnikowska et al., 2020). Cependant, le modèle *S. cerevisiae* reste limité par manque d'homologie avec le gène *GDAP1* humain. En effet, les résultats obtenus chez la levure peuvent ne pas refléter ce qui se passe dans les neurones humains.

### III.3.5.5. Modèles cellulaires

Plusieurs modèles cellulaires ont été développés dans le but de mieux comprendre les mécanismes physiologiques et physiopathologiques de GDAP1.

#### III.3.5.5.1. Culture de cellules primaires

Les fibroblastes humains peuvent être obtenus à partir de biopsie de peau provenant de patient. Ces fibroblastes sont considérés comme des cellules faciles à obtenir et à manipuler. Le seul obstacle pour étudier GDAP1 est que ce dernier est peu exprimé dans les fibroblastes comme nous l'avons démontré dans ce travail (Miressi et al., 2021).

Des cultures primaires de fibroblastes humains provenant de deux patient CMT2K portant des mutations *GDAP1* à l'état hétérozygote (p.Cys240Tyr et p.Arg120Trp) ont été obtenues (Cassereau et al., 2009).

À partir de prélèvements au niveau de l'hippocampe et de ganglions de la racine dorsale sur des souris et des rats, des cultures de neurones et des cellules de Schwann ont également pu être obtenues (Huber et al., 2013; Niemann et al., 2005).

#### III.3.5.5.2. Culture de lignée cellulaire

Certaines lignées cellulaires dérivées des neurones expriment naturellement *GDAP1*. La lignée SH-SY5Y correspond à des cellules de neuroblastome humain, et la lignée N1E-115 est originaire d'un neuroblastome de souris. Ces lignées ont été utilisées pour étudier la fonction de GDAP1 en le sur- ou sous-exprimant (K. Binięda et al., 2021).

D'autres lignées n'exprimant pas ou peu *GDAP1*, telles que les cellules Cos-7, HeLa, HEK293T, ont servi à la transfection de construction plasmidique intégrant des mutations de GDAP1.

#### III.3.5.5.3. Culture cellulaire à base de cellules souches pluripotentes induites ou iPSC

Le modèle cellulaire idéal à l'étude de la mutation d'intérêt de *GDAP1* est donc plutôt difficile à obtenir, car il s'agirait idéalement des neurones des patients. Pour contrer cette problématique, la stratégie des cellules souches pluripotentes induites (iPSc) a été proposée (Takahashi and Yamanaka, 2006). En effet, les iPSc, obtenues à partir de cellules somatiques adultes (souvent des fibroblastes) ont la propriété de pouvoir se différencier en tout type cellulaire, y compris en neurones grâce à des cocktails de facteurs trophiques bien définis. Ainsi, au sein de notre laboratoire, nous avons développé un procédé destiné à générer des motoneurones à partir d'iPSc issus de fibroblastes de patients (Faye et al., 2020).

Cette stratégie a été initiée chez l'homme avec la création d'iPSc à partir de cellules dermiques de patients CMT2k et CMT4 porteurs respectivement des mutations, à l'état homozygote, p.Leu193\* et p.Arg341fs sur le gène *GDAP1* (Martí et al., 2017; Saporta et al., 2015). Cette stratégie a également été utilisée chez la souris pour reprogrammer des iPSc murins obtenues à partir de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) dont GDAP1 n'est pas exprimé (*Gdap1*-

4) (Prieto et al., 2016). Il faut souligner qu'aucune de ces iPSc n'a ensuite été différenciée en cellules neuronales à notre connaissance.

## *Partie IV. Strategies thérapeutiques*

---



## IV.1. Stratégies thérapeutiques appliquées aux neuropathies périphériques

À ce jour, peu de traitements curatifs ont été proposés pour les patients souffrant de neuropathies périphériques, particulièrement la CMT. Néanmoins, des tests thérapeutiques basés sur la thérapie génique et l'utilisation de molécules pharmacologiques sont en cours de développement au stade pré-clinique (Stavrou et al., 2021). La thérapie génique repose généralement sur le principe de remplacement d'un gène défectueux par un gène fonctionnel. Mais elle peut également consister en la régulation de l'expression de gènes. Plusieurs gènes ont été identifiés comme responsables de la CMT, et pourraient ainsi être des cibles potentielles pour une thérapie. Une attention majeure a été portée sur les mutations les plus fréquemment retrouvées avec une transmission dominante tel que *PMP22*, *MPZ* et *MFN2*. La compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie a beaucoup aidé au développement de molécules prometteuses. Certaines de ces molécules pharmacologiques ont été développées comme ciblant un mécanisme bien spécifique de chaque type de CMT, alors que d'autres peuvent cibler plusieurs voies communes (Pisciotta et al., 2021; Stavrou et al., 2021; Thenmozhi et al., 2020) (figure 24). Les principaux mécanismes sont détaillés dans la figure 24.



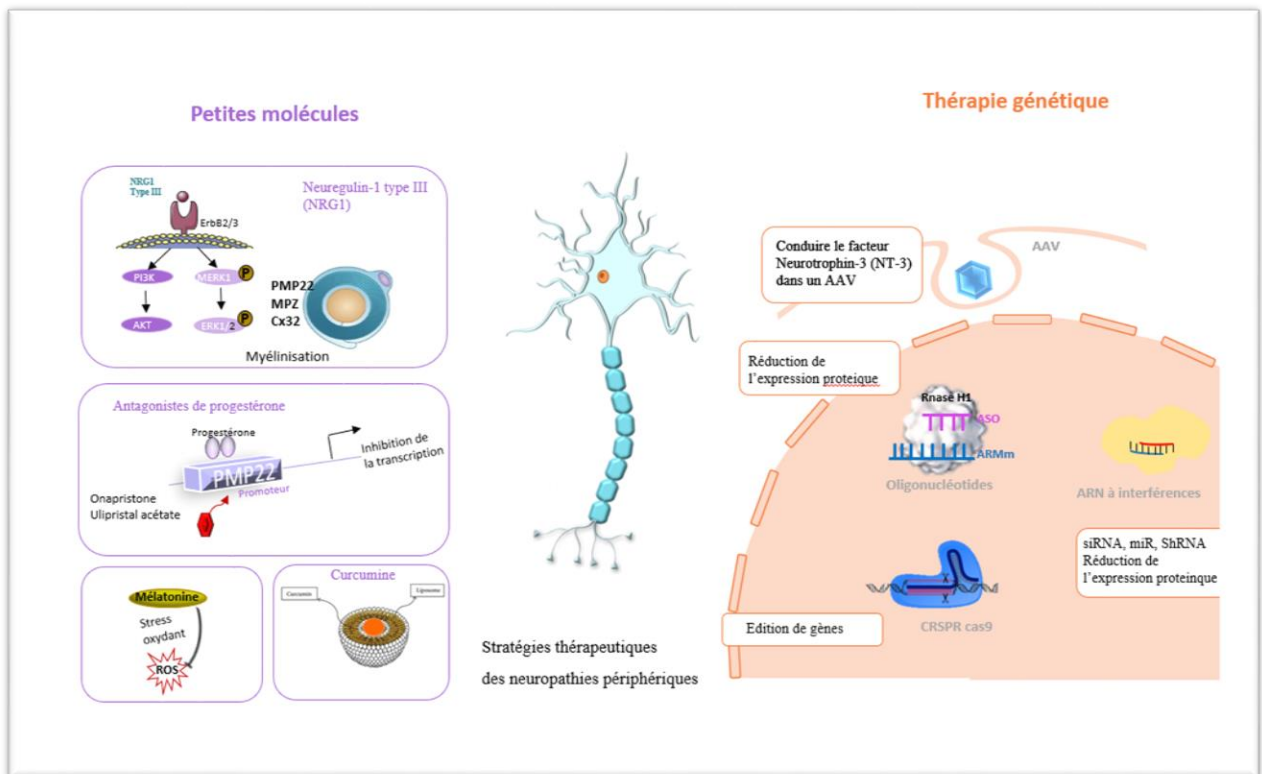


Figure 24 Aperçu des principales approches du traitement de la CMT. Les thérapies développées peuvent être divisées en thérapies géniques, principalement basées sur l'administration de vecteurs et de nano-médicaments (ASO, siRNA, miRNA, et l'édition de gène par la technologie CRISPR) présentant un effet sur la réduction de l'expression de gènes CMT surexprimés. De plus, des traitements pharmacologiques tels que (Neureguline1 type III, des antagonistes de progestérone, Mélatonine, Curcumine) ont été proposés.

#### IV.1.1. Thérapie basée sur la thérapie génique

Le principe de la thérapie génique consiste à introduire du matériel génétique ayant pour but de corriger ou remplacer un gène défectueux dans des cellules affectées. Ce type d'approche est proposé pour le traitement des maladies héréditaires incurables ne répondant pas aux approches pharmacologiques conventionnelles (Piguet et al., 2017). Au cours des dernières décennies, la thérapie génique a été envisagée pour plusieurs classes de CMT en utilisant les diverses stratégies correctives telles que l'utilisation de vecteurs, les oligonucléotides, l'édition génomique (Stavrou et al., 2021).

#### **IV.1.1.1. Les vecteurs**

L'utilisation de vecteurs permet de guider un acide nucléique d'intérêt à visée thérapeutique dans les cellules. En clinique, le virus adéno-associés (ou AAV) est fortement recommandé vu sa stabilité et son absence d'intégration dans le génome hôte (comparé aux lentivirus : Virus à ARN). Cet AAV a été testé pour conduire un facteur neurotrophique Neurotrophin-3 (NT-3). NT3 est un facteur autocrine qui favorise la régénération et la myélinisation des axones, mais qui est aussi important pour la survie et la différenciation des cellules de Schwann (Chan et al., 2001; Woolley et al., 2008). Dans une étude pré-clinique récente concernant le traitement de CMTX1, il a été rapporté que l'administration intramusculaire de NT-3 vectorisé par l'AAV1 chez des souris Gjb1 KO améliore durablement les performances fonctionnelles, en rétablissant l'épaisseur des fibres de myéline (Ozes et al., 2022, p. 1). Cette stratégie a également été testée dans un modèle de souris pour la CMT1A, ce qui a permis une amélioration au niveau de la fonction motrice. NT-3 est actuellement en essai clinique phase I/IIa pour le traitement de patients CMT1A porteurs de la duplication du gène PMP22 (NCT03520751).

#### **IV.1.1.2. Administration de Nanomédicaments**

Un moyen efficace pour réduire la surexpression de certains gènes CMT voire d'abolir l'expression du gène muté, est l'utilisation de nanomédicaments permettant de fournir à la cellule de petits fragments d'acides nucléiques. De nombreuses approches ont été développées dans le but de diminuer les niveaux d'expression de gènes surexprimés tels que : les oligonucléotides antisens (ASO), les ARN à interférences ou encore l'outil CRISPR Cas9.

##### **IV.1.1.2.1. Oligonucléotides antisens (ASO)**

Un oligonucléotide antisens se définit comme une courte séquence (de 13 à 25 nucléotides) simple brin synthétique, qui se lie par complémentarité à des séquences d'ARNm cible. Cela entraîne la dégradation de l'ARNm cible par l'enzyme RNase H1, empêchant ainsi la

production de la protéine d'intérêt (Mustonen et al., 2017). Une injection sous-cutanée journalière d'ASO à 50 mg/kg pendant 2 semaines chez des souris C22 adultes (modèle de neuropathie démyélinisante sévère surexprimant le PMP22 humain) a permis une réduction du niveau de l'ARNm PMP22 jusqu'à 25%, et une amélioration de la myélinisation des axones démyélinisés (Zhao et al., n.d.). Ces résultats ont été confirmés chez le rat CMTA1 surexprimant également le gène *PMP22* avec un phénotype moins sévère que les souris C22, en utilisant un traitement hebdomadaire de 12.5 mg/kg pendant 12 semaines (Zhao et al., n.d.).

#### IV.1.1.2.2. ARN interférents

Les ARN interférents existent sous 3 différents types, qui ciblent la dégradation de l'ARNm. On distingue : les siARN (small interfering RNA), les shARN (short hairpin RNA), et les microARN (miRs).

- Les siARN

Les siRNA, sont des séquences doubles brin d'approximativement 20 nucléotides, un seul brin de siARN va se lier à l'ARNm cible par complémentarité, alors que le deuxième brin se dégrade (Mustonen et al., 2017). Une fois dans le cytoplasme de la cellule, le siARN initie un mécanisme d'interférence d'ARN; l'ARNm cible est pris en charge par une endonucléase Argonaut 2 qui fait partie d'un complexe multiprotéique RISC et va participer à sa dégradation (Mustonen et al., 2017).

Ji-Su Lee *et al*, ont montré que l'injection intrapéritonéale de siARN chez des souris Tr-J portant une mutation naturelle (p.Leu16Pro) du gène *Pmp22* normalise efficacement l'ARNm de *Pmp22* au 6ème jour postnatal, avec une remarquable amélioration de la fonction motrice (Lee et al., 2017). Dans le but d'offrir une amélioration de l'efficacité du traitement, des nanoparticules composées de siARN conjugués à une molécule de squalène ont récemment été appliquées avec succès pour normaliser les niveaux de *Pmp22* dans des modèles de CMT1A (Boutary et al., 2021) : une injection intraveineuse de ces nanoparticules dans deux modèles de

souris transgéniques JP18 (une copie supplémentaire du gène PMP22) et JP18/JY13 (deux copies supplémentaires du gène PMP22) améliore significativement la remyélinisation et la régénération des axones ainsi que l'activité motrice chez ces souris (Boutary et al., 2021).

- Les miARN

Les miARN ou miR se définissent comme des ARN non codants, constitués de petites séquences simples brins, composées de 22 nucléotides, présentes dans les cellules eucaryotes. Ces miARN se lient par une complémentarité de bases avec la région 3'-non traduite (3'UTR) des ARNm ciblés, ce qui induit l'inhibition de la traduction de l'ARNm d'intérêt (Alvarez-Garcia and Miska, 2005). L'utilisation de miR à but thérapeutique pourrait être efficace pour le traitement de neuropathies périphériques. Des miR sont déjà connus pour réguler naturellement l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et la myélinisation des cellules de Schwann. Ji-Su Lee et al, ont constaté que le miR-381 réduit le niveau d'expression de l'ARNm et protéique de PMP22 *in vitro*. De plus, l'administration intra-neurale de miR381 chez des souris C22 (CMTA1) a montré une amélioration phénotypique et électrophysiologique, avec une augmentation de la VCN (J.-S. Lee et al., 2019, p. 22).

#### IV.1.1.3. CRISPR cas9

Après avoir utilisé les miRNA pour réduire l'expression de PMP22, Ji-Su Lee et al, ont testé une nouvelle approche de genome editing « CRISPR Cas 9 ». Cette ingénierie moléculaire intéressante est basée sur l'activité nucléase CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) et Cas9 (associée à CRISPR) qui coupe définitivement le double brin d'ADN et active le système de réparation de l'ADN. Un CRISPR/Cas9 a été conçu pour cibler la boîte TATA du promoteur de *PMP22*. La construction encapsulé avec des liposomes et a été injectée par voie intra-neurale locale chez des souris C22 (Lee et al., 2020), et a permis de réduire significativement l'expression de l'ARNm PMP22.

#### **IV.1.1.4. Les limites de la thérapie génique appliquées aux CMT**

La biodistribution d'agent thérapeutique dans le système nerveux périphérique chez le patient CMT constitue un obstacle majeur pour ces thérapies et limite leur utilisation clinique.

Plusieurs voies d'administration d'agents thérapeutiques ont été proposées, notamment l'injection intraneuronale directe, mais son efficacité semble se limiter uniquement au niveau du site d'injection (Gautier et al., 2021; Lee et al., 2020; Sargiannidou et al., 2015). Malgré l'efficacité biologique prouvée du facteur trophique NT-3 médiée par l'AAV dans l'étude de Burcak et al, il a été souligné qu'une injection par voie intramusculaire ne garantit pas une amélioration axonal globale et notamment pour les CMT avec perte axonale distale (Stavrou et al., 2021).

Un large choix de vecteurs a donc été développé pour améliorer la biodisponibilité nerveuse des molécules d'intérêt à partir d'une administration intraveineuse, une application qui semble prometteuse mais qui pourrait être accompagnée d'effets indésirables ou stimulant l'immunogénicité (Boutary et al., 2021; Stavrou et al., 2021).

Une autre possibilité d'administration pour traiter les patients CMT pouvant fournir une biodistribution adéquate est celle basée sur une injection intrathécale lombaire au niveau de la racine lombaire, et notamment au niveau du nerf sciatique et fémoral de vecteurs viraux exprimant des gènes thérapeutiques (Kagiava et al., 2021, 2019). Cependant, cette injection ne peut être utilisée en routine clinique, en particulier à cause des risques potentiels liés à ce geste invasif.

### **IV.1.2. Thérapie basée sur l'utilisation de molécules pharmacologiques**

#### **IV.1.2.1. Acide ascorbique ou vitamine C**

Il a été montré que l'acide ascorbique (AA) présente une action favorable à la myélinisation *in vitro* dans des cocultures d'axone et de cellules de Schwann (Huff et al., 2021). Ces résultats ont été évalués dans un modèle pré-clinique de souris transgénique surexprimant le gène

*PMP22* humain présentant notamment un phénotype sévère de CMT1A (C22). Le gavage d'acide ascorbique de façon hebdomadaire pendant trois mois a montré une réduction de l'expression de *PMP22* dans le nerf sciatique et une amélioration de la survie des souris (Passage et al., 2004). Il a été émis l'hypothèse que l'AA agirait par inhibition de l'activité enzymatique de l'adénylate cyclase, qui réduit la production de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) (Kaya et al., 2008). L'AA est une solution buvable, facile à fabriquer, et surtout bien tolérée par le patient ce qui a ouvert la voie pour un essai clinique. Malheureusement, aucun effet significatif du traitement d'AA n'a été détecté chez les patients CMT1A lors des essais cliniques (Gess et al., 2015; Pareyson et al., 2011).

#### **IV.1.2.2. PXT3003**

La molécule PXT3003 combine trois composés : le baclofen, naltrexone et le D-sorbitol. Ces 3 molécules possèdent un effet synergique sur la réduction de l'activité de l'adénylate cyclase, induisant une réduction de l'AMPc intracellulaire connu pour réguler positivement l'expression de *PMP22*. PXT3003 améliore le déséquilibre des voies de signalisations (PI3K-Akt) et (Erk-Mek) qui sont importants pour la différenciation et myélinisation de cellules de Schwann (Prukop et al., 2019).

Chumakov et al, ont montré qu'un traitement au PXT3003 chez des rats adultes transgéniques *Pmp22* améliore la vitesse de conduction nerveuse et induit une diminution des niveaux d'expression de l'ARNm de *PMP22* (Chumakov et al., 2014). Un traitement précoce par voie orale avec PTX3003 pendant deux semaines chez de jeunes rats CMTA1 (6-18 jours postnatal) a également réduit l'expression de *PMP22* avec une correction du déficit moteur (Prukop et al., 2019). Cependant, son efficacité n'a été avérée dans un essai de phase II que dans le groupe avec la dose de PTX3003 la plus élevée (Attarian et al., 2016). Très récemment, un nouvel essai clinique de phase III en double aveugle (NCT03023540) a été lancé dans le but de confirmer un potentiel bénéfique de ce traitement.

#### IV.1.2.3. Curcumine

La curcumine est un polyphénol connu pour son activité antioxydante et pour son efficacité bénéfique dans les CMT au sein de mon laboratoire d'accueil (Caillaud et al., 2020)(24).

La curcumine a également montré un résultat bénéfique chez des souris portant une mutation p.Arg98Cys du gène MPZ associé au CMTB1. Une administration hebdomadaire par voie orale de cette molécule a réduit le stress du réticulum endoplasmique conduisant à une amélioration des performances motrices (Patzkó et al., 2012).

Des nanoparticules de curcumin-cyclodextrin/cellulose appelées Nano-Cur ont été développées pour améliorer sa biodisponibilité, prolonger son efficacité et limiter sa toxicité.

Des tests *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'un traitement avec les particules de NanoCur réduisaient les ROS et amélioreraient le potentiel et l'intégrité de la membrane mitochondriale (Caillaud et al., 2020) .

#### IV.1.2.4. Mélatonine

Grâce aux propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes que possède cette hormone, il était envisageable de tester son efficacité dans des modèles de CMT. En effet, un traitement avec une dose de 10mg et 60mg (matin et soir) de mélatonine a été évalué chez trois patients (âgés de 8 à 10 ans) atteints de CMT1A pendant 6 mois. L'analyse des érythrocytes et du plasma des patients a montré un résultat bénéfique sur la réduction du stress oxydant avec une augmentation significative du ratio GSSG/GSH ainsi qu'une normalisation du taux de cytokines plasmatiques pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, and TNF $\alpha$  qui était initialement élevé chez les patients avant traitement (Chahbouni et al., 2017).

#### IV.1.2.5. Des antagonistes de progestérone

Dans le but d'améliorer la myélinisation de la cellule de Schwann, un antagoniste de la progestérone a été évalué. En effet, la progestérone est connue pour stimuler le promoteur du

gène *PMP22* (Désarnaud et al., 1998). L'utilisation d'un antagoniste appelé onapristone, dont le rôle est de bloquer les récepteurs de la progestérone, s'est avéré efficace pour diminuer l'expression de *PMP22* chez le rat CMT1A (Sereda et al., 2003). Bien que l'onapristone améliore le phénotype des rats CMT, il n'a jamais atteint le stade d'essai clinique, notamment à cause de sa toxicité observée dans une étude antérieure chez des patients cancéreux (Lewis et al., 2020). Un autre antagoniste de la progestérone a pu être mené jusqu'à l'essai clinique : l'ulipristal acétate (EllaOne®), capable de réduire les niveaux de *PMP22* et le stress oxydant chez les patients atteints de CMT1A. Malheureusement, ce dernier a été arrêté en raison d'effets indésirables hépatiques majeurs chez les patients (NCT02600286).

#### **IV.1.2.6. Neuregulin-1 type III (NRG1)**

La neuréguline-1 de type III (NRG1-I), est un facteur de croissance paracrine, impliqué dans la survie et la myélinisation de cellules de Schwann (Schulz et al., 2014), via l'activation de la voie de signalisation PI3K–Akt et MAPK/Erk suite à une activation du récepteur ErbB2 par son ligand NRG1-I. Une dérégulation de ces voies est connue pour entraîner des défauts de la myélinisation (Ishii et al., 2021). Fledrich et al ont démontré que le traitement précoce avec NRG1 soluble dans un modèle de rongeurs CMTA1 améliore efficacement le nombre d'axones myélinisés dans les nerfs sciatiques et normalise la cascade de signalisation en aval de ErbB 2, impliquée dans la régulation de la myélinisation des nerfs périphériques. Cependant, un traitement chez les rats CMTA1 adultes ne montre pas d'amélioration phénotypique (Fledrich et al., 2019, 2014).

## **IV.2. Stratégies appliquées aux mutations non-sens**

Des mutations non-sens liées aux neuropathies héréditaires ont été identifiées depuis de nombreuses années. Ces mutations génèrent des PTC (prematuration terminaison codon). Dans la majorité des cas, les ARNm contenant ces PTC sont pris en charge par le système NMD qui les



détruit afin que la cellule ne fabrique pas de protéines tronquées. Cependant, dans certains cas (PTC présent dans le dernier exon du gène par exemple), les ARNm porteurs de PTC peuvent échapper au système NMD. C'est notamment le cas des mutations PTC récemment décrites dans les gènes *SOX10* et *MPZ* (responsables de CMT) qui conduisent à la production de protéines tronquées avec effet dominant négatif sur la protéine native (Inoue et al., 2007, 2004; Warner et al., 1996).

À l'heure actuelle, aucun traitement curatif adapté aux mutations non-sens impliquées dans les neuropathies périphériques n'est utilisé en clinique humaine. Néanmoins, il existe de nouvelles thérapies prometteuses, préalablement développées pour d'autres maladies génétiques, qui permettent de « cacher » les PTC afin de synthétiser partiellement, voir même complètement, une protéine pouvant alors être fonctionnelle.

On peut classer ces différentes thérapies de la façon suivante :

- Stratégies par des approches basées sur l'acide nucléique :
  - Oligoribonucléotides anti-sens,
  - Les ARNt suppresseurs,
  - Edition de l'ARN par les enzymes ADA « Adenosine deaminase acting on RNA »,
  - La technologie CRISPR.
- Stratégies par des approches basées sur des molécules de translecture (Revue)

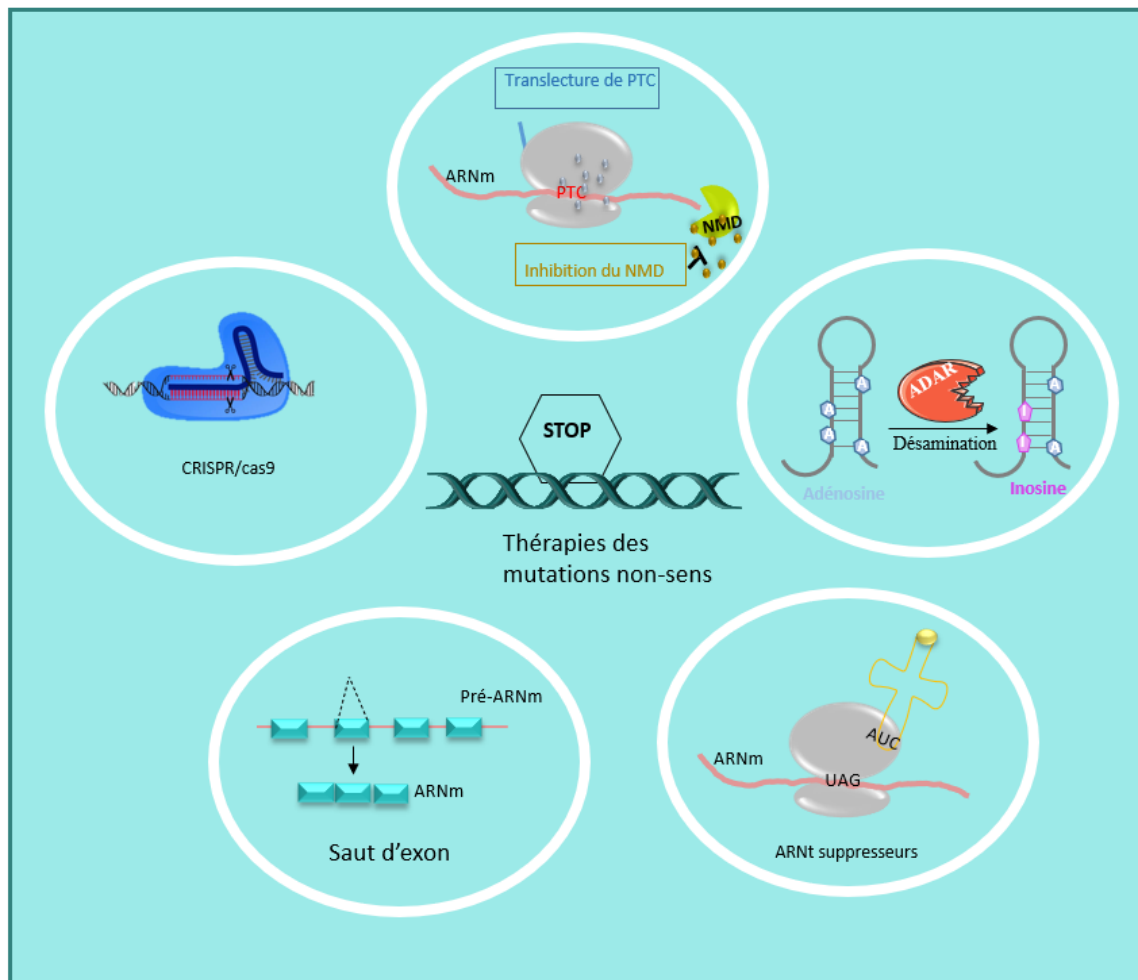


Figure 25 : Les différentes approches pour limiter l'impact des mutations non-sens. Certaines sont basées sur l'utilisation d'acides nucléiques (les oligoribonucléotides anti-sens, les ARNt suppresseurs, l'édition de l'ARN par les enzymes ADA « Adenosine deaminase acting on RNA », et la technologie CRISPR), tandis que d'autres sont basées sur l'utilisation de molécules pharmacologiques qui peuvent inhiber le NMD et/ou activer la translecture.

#### IV.2.1. Stratégie par des approches basées sur l'acide nucléique

De nombreuses approches thérapeutiques basées sur les acides nucléiques ont été proposées dans le but de corriger les effets de l'apparition d'un PTC. Ci-dessous, nous discuterons certaines d'entre elles.

##### IV.2.1.1. Les ARNt suppresseurs

Une des approches pour induire la translecture et glisser sur le PTC est l'utilisation d'ARNt suppresseurs. L'ARNt suppresseur fait référence à un aminoacyl-ARNt avec des mutations dans les anticodons. Ces ARNt sont modifiés au niveau du triplet de l'anticodon, leur permettant de

reconnaitre le codon stop avec une complémentarité parfaite et permettant la continuation de la traduction et le « masquage » des mutations non-sens (Keeling et al., 2013; Lueck et al., 2019). L'ARNt suppresseur a été utilisé *in vitro* comme stratégie thérapeutique potentielle pour supprimer le PTC dans l'ARNm de la  $\beta$ -globine (Temple et al., 1982) et de la dystrophine (Kiselev et al., 2002) responsables respectivement de la  $\beta$ -thalassémie et de la dystrophie musculaire de Duchenne. L'efficacité de cette stratégie a été aussi montrée dans un modèle *in vivo* de souris transgénique avec une mutation ocre (UAA). En effet, une injection directement dans le muscle squelettique et dans le cœur de ces souris avec un plasmide portant plusieurs copies d'ARNt sérine humaine permet de produire le chloramphénicol acétyltransférase, et de supprimer le PTC reconnu par ARNt sérine (Buvoli et al., 2000).

L'efficacité de cette approche dépend de plusieurs facteurs : le niveau d'expression, la stabilité des ARNt suppresseurs dans les tissus cibles, la nature de codon stop, le contexte nucléotidique, et le mode d'administration. Ce qui est avantageux avec cette approche, c'est qu'elle ne provoque aucune réponse immunitaire et peu de toxicité puisque la composition chimique de l'ARNt suppresseur est similaire à celle de l'ARNt naturel (Keeling et al., 2013; Yu et al., 2022). Pour surpasser le problème d'administration, une étude très récente a réussi à administrer un ARNt suppresseur véhiculé dans un rAAV chez un modèle murin porteur d'une mutation non-sens. Le traitement avec cette thérapie n'a pas eu d'impact sur le codon stop naturel (NTC), ni sur la totalité des ARNt endogènes (Wang et al., 2022).

#### **IV.2.1.2. Oligonucléotides**

Ces oligonucléotides antisense ont déjà été définis dans le chapitre 1.2.1. Néanmoins, il est nécessaire de préciser ici qu'ils peuvent être synthétisés avec différentes modifications de leur structure chimique et être soit de type 2-O-méthylphosphorothioate (2OMePS) (Neil and Bisaccia, 2019), soit de type oligomère morpholino (PMO) dans le but d'éviter leur dégradation rapide par des endo- et des exo-nucléases (Amantana and Iversen, 2005).

La stratégie basée sur le saut d'exon est développée depuis une vingtaine d'année. Elle a montré des résultats prometteurs sur des modèles cellulaires et animaux. L'utilisation d'ASO ciblant les PTC a connu un développement clinique dans plusieurs maladies génétiques telles que la dystrophie musculaire de Duchenne et la mucoviscidose (Sanderlin et al., 2022; Schneider and Aartsma-Rus, 2021). Un traitement avec des ASO était capable de récupérer partiellement la fonction de la protéine CFTR après une élimination de l'exon 23 dans les cellules primaires épithéliales bronchiques d'un patient atteint de mucoviscidose avec une mutation à l'état homozygote CFTR-p.Trp1282\* (Michaels et al., 2022).

#### **IV.2.1.3. Edition de l'ARNt par les enzymes ADA « Adenosine deaminase acting on RNA »**

Dans le but de traiter les maladies génétiques causées par des mutations non-sens, Woolf et al. ont développé un nouveau concept de stratégie thérapeutique basé sur un mécanisme d'édition de l'ARN (Woolf et al., 1995). L'édition de l'ARN est un processus post-transcriptionnel qui permet la conversion des adénosines (A) en inosines (I) par désamination de la base, catalysée par une enzyme appelée ADAR (adenosine deaminase acting on RNA). Les enzymes ADAR possèdent un ARN guide (ARNg) qui se fixe sur la région cible d'ARN double brin. Suite à une injection dans les embryons de xénope de l'enzyme ADAR dirigée par un oligonucléotide ciblant un PTC UAG de l'ARNm de la dystrophine, une édition de l'ARNm a converti l'adénosine de ce PTC en inosine (Woolf et al., 1995). Vu la similarité d'appariement de base entre l'inosine et la guanosine, lors de la désamination, les adénosines sont fonctionnellement lues en guanosines par la machinerie de traduction et dans le cas ci-dessus, c'est le codon GAG qui est alors lu à la place de la mutation PTC UAG (Woolf et al., 1995).

#### **IV.2.1.4. La technologie de CRISPR**

Cette technologie a précédemment été définie dans le chapitre 1.2.3. Elle offre une grande opportunité pour la correction des mutations non-sens. La correction ou la création de mutation

est également efficace en utilisant des éditeurs de base de cytidine désaminase (CBE) par substitution directe des bases d'ADN C→T (ou G→A), mais aussi en convertissant l'adénine en guanine ou la thymine en cytosine obtenue par les éditeurs de base d'adénine (ABE) (C. Lee et al., 2019). Récemment, il a été rapporté que la suppression des mutations non-sens peut être effectuée par la méthode ABE en utilisant les éditeurs de base d'adénine, appelés CRISPR-pass pour contourner les PTC (C. Lee et al., 2019). Ce procédé a été appliqué sur des fibroblastes prélevés chez des patients atteints de xeroderma pigmentosum complémentation groupe C, présentant une mutation non-sens (c.1840C>T, p.Arg579\*(UGA)) du gène XPC. Le PTC 5'-TGA-3' a été converti en guanine 5'-TGG-3' ce qui a permis de récupérer une fonction partielle du gène XPC (C. Lee et al., 2019).

#### **IV.2.2. Stratégie par des approches basées sur des molécules de translecture (Revue)**

Environ 10% des maladies génétiques, sont causées par une mutation non-sens (Mort et al., 2008). L'une des stratégies thérapeutiques envisagées pour contourner le PTC est la lecture « forcée » par de petites molécules médicamenteuses appelées molécules de translecture (ou Read through). Ces molécules favorisent l'incorporation d'un acide aminé au niveau du PTC à travers la chaîne polypeptidique native.

Les pages suivantes correspondent à une revue rédigée au cours de ma thèse, qui reprend les mécanismes d'actions des différentes molécules de translecture et leurs efficacités potentielles pour induire la lecture de PTC. Certaines d'entre elles ont déjà été évaluées dans plusieurs modèles expérimentaux.

La deuxième partie de la revue présente le système NMD, et notamment son mécanisme d'action, ainsi que les molécules inhibitrices de ce système. Je finis cette revue par une description de thérapies innovantes pour le traitement de maladies neurodégénératives héréditaires induites par des mutations non-sens.

## Objectifs

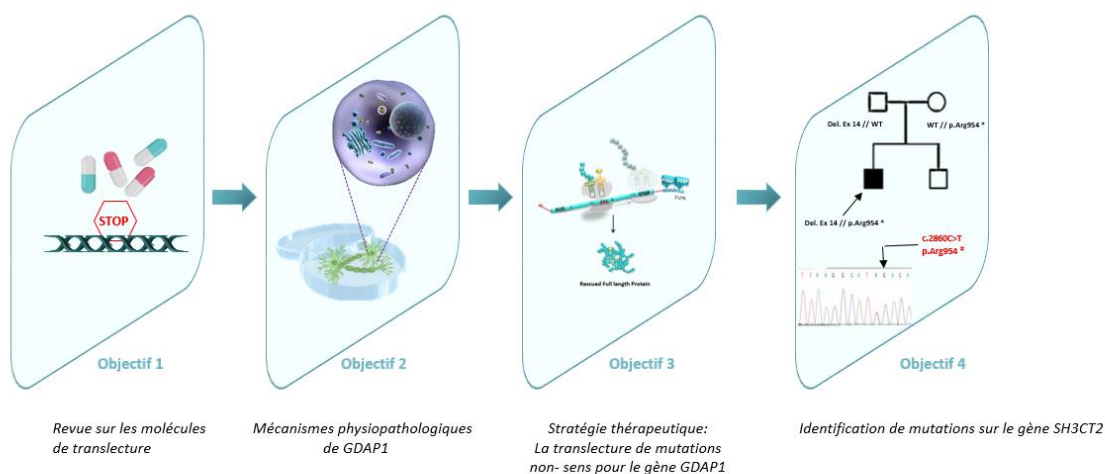


Figure 26 : Représentation schématique des objectifs de la thèse

L'unité de recherche NeurIT, vise à comprendre les mécanismes physiopathologiques des Neuropathies périphériques, et plus particulièrement, ceux de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, dans le but de développer d'éventuelles approches thérapeutiques.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT), est une neuropathie périphérique héréditaire sensitivomotrice, pouvant être provoquée par des mutations dans plus de 100 gènes, dont le gène *GDAP1*. Ce gène est principalement exprimé dans la membrane externe mitochondriale des cellules du système nerveux périphériques (motoneurones, cellules de Schwann). À l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'a été proposé pour cette maladie liée au gène *GDAP1*. Comme précisé précédemment, cette maladie touche principalement les motoneurones, qui ne peuvent être prélevés pour des études *in vitro*. C'est pourquoi notre laboratoire a décidé de générer des cellules iPSc à partir de patients atteints par une mutation sur le gène *GDAP1*, afin d'obtenir des motoneurones comme modèle d'étude permettant de comprendre les mécanismes

physiopathologiques associés à des dysfonctionnements de *GDAP1*, et potentiellement développer des stratégies thérapeutiques.

**Ce projet doctoral s’articule autour de quatre objectifs principaux :**

Objectif 1 : Dans un premier temps, nous avons réalisé une revue sur les différents mécanismes d’actions des molécules de translecture et inhibiteurs du NMD connus à ce jour. Cette revue fait partie du chapitre IV de l’introduction de la thèse.

Objectif 2 : Le but de ce travail était d’explorer les mécanismes moléculaires associés à la forme axonale spécifique de la maladie CMT, liée à une mutation homozygote sur le gène *GDAP1* (p.Ser194\*) qui conduit à l’apparition d’un PTC. Pour cela, un modèle cellulaire de motoneurones issus de cellules iPSc, elles-même issues de fibroblastes d'un patient porteur de la mutation d'intérêt sur le gène *GDAP1* a été créé au sein du laboratoire avant mon arrivée.

Un de mes objectifs de thèse était de participer à la caractérisation de ce modèle afin de découvrir les mécanismes moléculaires induits par cette mutation. Les résultats sont présentés dans l’article 2, publié dans *Biomedicines* en 2021.

Objectif 3 : Lors de la caractérisation du modèle précédemment cité, nous avons montré la présence d’une très faible expression de l’ARN *GDAP1* et de la protéine *GDPA1* dans les motoneurones issus d’iPSc du patient porteur du PTC UGA comparé au contrôle. Ce résultat montre que le système NMD détruit, comme attendu, les ARNm porteurs de la mutation STOP, mais qu’une portion de ces ARNm est encore présente.

L’objectif principal de ma thèse était d’explorer une stratégie thérapeutique visant à corriger l’expression de *GDAP1* dans ce modèle de motoneurones en testant des inhibiteurs du NMD afin d’augmenter la quantité d’ARNm *GDAP1* et/ou en testant des molécules de translecture afin de permettre une traduction complète de l’ARNm en protéine en « glissant » sur le codon

STOP. Nous avons évalué ces molécules sur l'expression protéique de GDAP1 mais également sur la morphologie des organites cellulaires tels que les mitochondries et l'appareil de Golgi (Article 3). Ce travail a été réalisé grâce à une étroite collaboration avec le Dr Fabrice Lejeune de l'Institut Pasteur de Lille, qui nous a offert gracieusement certaines de ces molécules.

Objectif 4 : Nous nous sommes intéressés dans cette étude à un autre gène impliqué dans la CMT et responsable de la majorité des formes démyélinisantes autosomiques récessives : le gène *SH3TC2*. Dans ce gène, 62% des mutations détectées sont des mutations non-sens. En collaboration avec les collègues du service de Biochimie et Génétique Moléculaire et l'unité fonctionnelle de Bioinformatique du CHU de Limoges, nous avons recherché, identifié et caractérisé les mutations présentes chez un patient atteint de CMT. Ce travail est présenté dans l'article 4, publié dans *Journal of Personalized Medicine* en 2022.



## *Résultats*

---



*Article 1 (revue): Read-through activator and NMD inhibitors  
molecules in neurodegenerative diseases*

---

**Auteurs:**

Nesrine Benslimane, et co-auteurs

Revue en préparation.



## Présentation résumée de la revue N°1

Des mutations non-sens générant un codon de terminaison prématuré (PTC) peuvent induire à la fois une dégradation prématurée de l'ARNm muté ou la production d'une protéine tronquée. L'une des stratégies thérapeutiques envisagées pour contourner le PTC est «la translecture» basée sur des médicaments à petites molécules. Ces molécules favorisent l'incorporation d'un ARNt proche cognat à la position du PTC à travers la chaîne polypeptidique native. Dans cette revue, nous avons détaillé les différentes stratégies existantes organisées selon les types de molécules pharmacologiques à travers leurs différents mécanismes. Les résultats positifs des molécules de translecture testés dans de multiples modèles de troubles neuromusculaires indiquent le potentiel de cette approche dans les neuropathies périphériques.

# Read-through activator and NMD inhibitors molecules in neurodegenerative diseases

Nesrine Benslimane <sup>1</sup>, and co-authors.

<sup>1</sup> NeurIT UR 20218, GEIST Institute, University of Limoges, F-87000 Limoges, France

<sup>2</sup> Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Limoges, Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France.

<sup>3</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France.

**Abstract:** Nonsense mutations generating a premature termination codon (PTC) can induce both premature degradation of the mutated mRNA or the production of a truncated protein. One of the considered therapeutic strategies to bypass PTC is their “readthrough” based on small molecules drugs. These molecules promote incorporation of a near cognate tRNA at the PTC position through the native polypeptide chain. In this review, we detailed the various existing strategies organized according to pharmacological molecules types through their different mechanisms. The positive results that followed readthrough molecules testing in multiple neuromuscular disorders models indicate the potential of this approach in peripheral neuropathies.

**Keywords:** Nonsense mutation; Read-through; premature termination codon.

## Introduction

It has been estimated that one third of genetic diseases are genetically caused by a premature termination codon (PTC) within coding genes [1]. According to the National Organization for Rare Disorders (<http://www.rarediseases.org>), among the 7,000 rare genetic diseases existing in the human population, about 2,400 distinct genetic diseases result from the presence of PTC [2]. Among those diseases, we could name the Cystic Fibrosis (CF) resulting from an alteration within the *CFTR* gene (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), the Duchenne muscular dystrophy (DMD) characterized by progressive muscle degeneration caused by mutations in the *DMD* gene, as well as many cancers often linked with *TP53* mutations. Also, multiple neurodegenerative disorders (1.1) are found within those 2,400 PTC triggered rare genetic disorders, often leading to a serious and progressive condition, observed in various age onset.

The Charcot-Marie-Tooth disease (CMT): the most common inherited peripheral disease with a prevalence of one in 2,500 cases. Also known as sensory-motor neuropathy, this disorder affects both motor and sensory nerves. First onset symptoms affect early childhood to late adulthood, typically with muscular atrophy in the feet and/or hand, and weakness of limb muscles [3]. Nonsense alterations in many CMT associated genes results in a PTC as it was previously shown, among others, in the *GDAP1* gene. Nonsense mutations have been associated with both axonal [4] and demyelinating form of neuropathies [5]. Indeed, sequencing performed on 17,880 patients suffering of CMT associated to a panel of 14 genes, reported in the case of *SH3TC2* a very high majority of nonsense mutations amid pathological ones [6].

The Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of motor neurons (MNs). The most common age of disease onset varies between 40 to 70 years old. In some cases, mutations inducing premature stop

**Citation:** To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname

Lastname

Received: date

Accepted: datePublished: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

codons in the gene encoding the Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*), were reported as responsible for this disorder.

The Frontotemporal Dementia (FTD): refers to a group of heterogeneous neurodegenerative dementias characterized by frontal and temporal brain deteriorations leading to behavioral troubles and language disorders [7]. Pathogenic mutations have been detected in FTD patients, 40 to 65 years old, especially in the *PGRN* gene whose main role is to regulate the production of progranulin [8]. Most of them are classified as nonsense mutations, resulting in lysosomal dysfunction [9].

### 1.1 Origin of the PTC

Just as it occurs with natural stop codons, UAA UAG, and UGA are the three types of codon that are able to give rise to PTCs. The emergence of such premature stop codons in the mRNAs can occur at different level (DNA, RNA, translation) related to gene expression [10].

#### 1.1.1 DNA level

PTC can be introduced in the DNA molecule through DNA replication or transcription processes resulting in frame-shift or nonsense mutation [1]. A frame-shift mutation generally refers to the deletions or insertions of a number of nucleotides not divisible by three, changing the reading frame and perturbing the genetic translation. Meanwhile, nonsense mutations are defined as the substitution of a single DNA base pair, and, according to meta-analysis of the Human Gene Mutation Database (HGMD), those account for approximately 11% of alterations affecting gene-coding regions. It has been reported that 23 different nucleotide substitutions affecting the gene coding region could give rise to a PTC. Of the three nonsense codons, TAG (40.4 %) and TGA (38.5 %) represent the two most frequent pathological nonsense mutations reported from 995 genes, with approximately the same ratio, when the nonsense codons TAA (21.1%) is less described. According to this same meta-analysis [11], the conversion of CGA (Arg) to TGA and CAG (Gln) to TAG represent the highest proportion of PTC causing transition. The majorly observed substitution of a C to a T (44%) result from the deamination property of the 5-methylcytosine, within CpG sites, that converts the cytidine into a uracil, later corrected in a thymidine [11] [12].

#### 1.1.2 RNA level

mRNA carrying PTC, can be the result of errors occurring during the transcription and splicing processes [13] [10]. Splicing mutations occurs within an intron or an exon, and results in the creation of new splice sites, or in the disruption of existing one. Transcription is a high-fidelity mechanism through which errors occurs only from 0.05 to 0.5% [10] of the time compared to alternative pre-mRNA splicing (35%). [14] In the past decades, various therapeutic approaches have been developed to counteract the negative effect of PTCs. Some of them, known as Nucleic Acid-Based Approaches, exploit different molecular therapy strategies, such as tRNA suppressors, antisense oligonucleotides, and genome editing [15]. Here, we will focus on two alternative methods, based on small molecules drugs [16]: Read-through molecules and NMD inhibitors. Several studies have already demonstrated the effectiveness of nonsense restoration by these pharmacologic drugs.

## 2 Natural translation mechanism

To synthesize a protein, a cell needs the corresponding genetic code, also known as DNA. First the nucleotidic sequence is transcribed and processed into mRNA, then, mRNA is subjected to translation into an amino acids chain forming the protein of interest. mRNA is therefore an essential molecule for the proper functioning of cells since it establishes the link between genetic information and protein production. mRNA is made up of a series of nucleotides which, by triplet, correspond to a particular codon. Each of

the 61 existing codons are associated with one of the 20 amino acids. With each codon composing the mRNA, the ribosome associates a particular aminoacyl-tRNA anticodon.

The ribosome, is composed of two subunits made of protein components and ribonucleic acid (rRNA). In eukaryote cells, the 80S ribosome consists of the 60S large subunit and the 40S small subunit with 18S RNA and 33 proteins. While, in prokaryote cell, the 70S ribosome consists of the 50S large subunit and the 30S small subunit with a 16S RNA subunit and 21 proteins. At the interface of these two subunits, reside three main active binding sites in which interact mRNA and tRNAs: The A site (for Aminoacyl), correspond to the first location the amino-acylated tRNA carrying an amino acid bind when entering the ribosome, the P site (for Peptidyl) detains the tRNA carrying the current peptide chain synthesis, and finally, the E site (for Exit) in which stand the deacylated tRNA ready to leave the ribosome.

### 2.1 Ribosome fidelity: the role of the decoding center

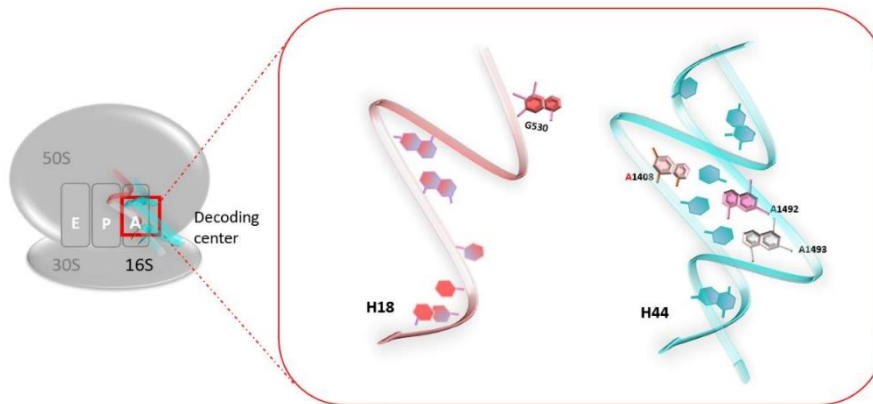
The ribosome holds the main role in translational fidelity. The decoding center, situated on the small ribosomal subunit at the interference with the big one, is involved in the recognition and faithful selection of the codon-anticodon tRNA. The distinction between cognate t-RNA and near cognate t-RNA happen when mRNA codons are positioned at the A-site, located within the small subunit. Among the 20 aminoacyl-tRNA (aa-tRNA), only the cognate one is to be presented at the A-site. We may wonder how the ribosome manages to discriminate with high fidelity cognate tRNAs from near-cognate (single mismatch with the mRNA codon) or non-cognate (more than one mismatch with the mRNA codon) one?

During the translation step of the elongation, the process of aa-tRNA selection is monitored by two distinct steps: the initial selection and the proofreading. The latter is driven by the energy produced following GTP hydrolysis right after the initial selective binding.

Noncognate tRNA are rejected during the first step, while near cognate tRNA that escape the first selection end up rejected during the second one. The accuracy of tRNA selection by the ribosome alone is not enough to discriminate noncognate/near-cognate codon-anticodon interactions, other elements of monitoring present in the decoding center are necessary to adjust the ribosome accuracy [3].

At the atomic level, previous foot-printing experiment allowed to identify significant regions encompassing the A-site, and in particular the two universally conserved adenines at position 1492 and 1493 (prokaryote numbering), A1755 and A1756 (eukaryote numbering). The helix 18 (H18) also encompass an important region as it carries the conserved G530 base (**Figure 1**). These nucleotides are essential for the binding of the cognate tRNA at the A-Site since they play a fundamental role in the discrimination between correct and incorrect codon/anticodon pairing as consecutive adenines have a strong preference for canonical Watson-Crick pairs. In prokaryote, A1493, the 3' adenine, interacts with both the first base of the codon of the messenger RNA and the third base of the anticodon. Meanwhile, the 5' adenine, A1492, interacts only with the second base of the codon of the messenger RNA.

When no ligand bound to the ribosomal A-site, residues A1492 and A1493 are positioned in the internal loop of the helix 44 (H44). When cognate tRNA binds to their codon at the A-site, both the A1492 and the A1493 residues are displaced outside the helix loop 44, altering its conformation from an "off" state to an "on" state. The observed conformational change is necessary to allow A1492 and A1493 to interact specifically with the base pairs formed by the cognate codon: anticodon interaction, therefore stabilizing preferentially the minihelix formed between cognate tRNAs and mRNA codons. At the same time, the G530 base undergoes changes from a *syn* conformation to a *trans* one. G530 therefore interacts with A1492, just like the second position of the anticodon and the third base of codon. The same phenomenon is observed with A1755 and A1756 in eukaryote.



**Figure 1:** The decoding center of the 70S ribosome in prokaryote. The two universally conserved adenines at position 1492 and 1493 of the helix 44 (H44) (Green), and conserved G530 of the helix 18 (H18) (Red).

148  
149  
150

## 2.2 Course of natural translation termination mechanism

151

Physiologically, during the translation, the ribosome moves along the mRNA by incorporating the corresponding amino acid until it reaches the native stop codon (NTC). When one of the three stop codons UAA, UAG, or UGA occurs through the ribosomal A-site, it will not be recognized by any existing tRNA as other codons are, but by a release factor (RF).

152  
153  
154  
155  
156

In eukaryotic cells, translation termination is managed by two factors: eRF1 and eRF3. eRF1 first recognizes the three-termination codon at the A site, then forms a complex with eRF3, which possess a GTPase activity. The hydrolysis of GTP provides the energy that allows the cleavage between the polypeptide chain and the tRNA to which it is attached and thus releases the polypeptide chain [17] (**Figure 2A**), allowing the production of the normal protein.

157  
158  
159  
160  
161  
162

To enhance the translation termination efficiency, the ternary termination complex (eRF1-eRF3-GTP) requires other stimulation, notably the one provided by the complex polyA-binding protein (PABP) located at the 3'UTR of mRNA [17].

163  
164  
165

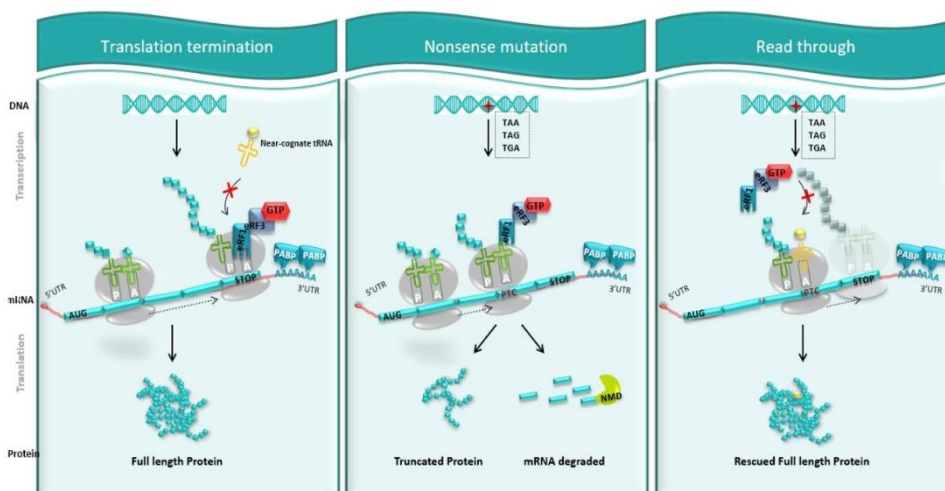
## 3 Disturbance of the translation mechanism: consequences of PTCs within the mRNA

166  
167

The presence of a PTC in the mRNA sequence prevents the ribosome from continuing the translation process up to the end of the mRNA, leading to the recruitment of the release factors eRF1 and eRF3 which favors translation termination (**Figure 2B**). This disturbance results in either the production of a truncated protein or the degradation of the altered mRNA by the nonsense mediated decay (NMD) system.

168  
169  
170  
171  
172





**Figure 2. Readthrough strategy.** A. Normal translation: DNA is transcribed into mRNA. On this mRNA, there is normal stop codon at the end, which will be translated into full length protein by the ribosome. B. Nonsense mutation: introducing codon stop (TAA, TAG, TGA), this mutation causes the appearance of a premature stop codon PTC that prevents the ribosome from continuing to translate mRNA. This leads to the synthesis of a truncated protein and potentially to the degradation of this mRNA by NMD pathway. C. Strategy of readthrough: the use of pharmacological molecules promotes the entry of tRNA at the level of PTC during translation that allows the ribosome to pass PTC and continue the translation and re-express a whole and protein from a gene interrupted by a stop codon.

173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181

### 3.1 Truncated protein: the aftermath

The presence of a PTC in the mRNA sequence might lead to three main consequences. First, (i) the predicted truncated protein could accumulate in the cell leading to high toxicity. The regular effect of such protein could get stronger, furthermore, a new abnormal function may appear. This phenomenon, also known as “gain-of-function”, was previously described in ALS. In this disorder, PTCs in SOD1mRNA was proposed to led the protein to adopt a new conformation. This change would likely enabled the misfolding of SOD1 and as a consequence its interaction with other molecules, leading to the formation of aggregates, toxic for the cells [18].

Besides the gain-of-function mechanism, the existence of a PTC within the mRNA could induce a (ii) “dominant negative effect” in which the unfunctional truncated protein could interfere in *trans* with the wild type one and subsequently void its function [19]. This mechanism was previously identified by Ken *et al* that studied different mutations of the *MPZ* gene, known for its involvement in the development of myelinopathy [20]. In a similar case to the one encountered with *MPZ*, truncating mutations of *SOX10* were showed to cause various serious neurological phenotypes such as peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, or less serious one as Waardenburg syndrome and Hirschsprung disease (PCWH) [20].

Finally, (iii) “loss-of-function” is the third of the main consequences that could arise. In the event of disorders transmitted as a recessive trait as in *GDAP1*-associated recessive CMT neuropathy, the predictable truncated protein carrying a mutation would be totally deprived of its function. Due to this loss-of function, calcium homeostasis, and mitochondria–endoplasmic reticulum interaction would be altered [21] [22]. Also, loss-of-function could arise as a consequence of haploinsufficiency. This mechanism is exclusively found when the disorder is transmitted as a dominant trait, as it was previously shown in Frontotemporal Dementia [8]. This phenomenon occurs when one

182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207



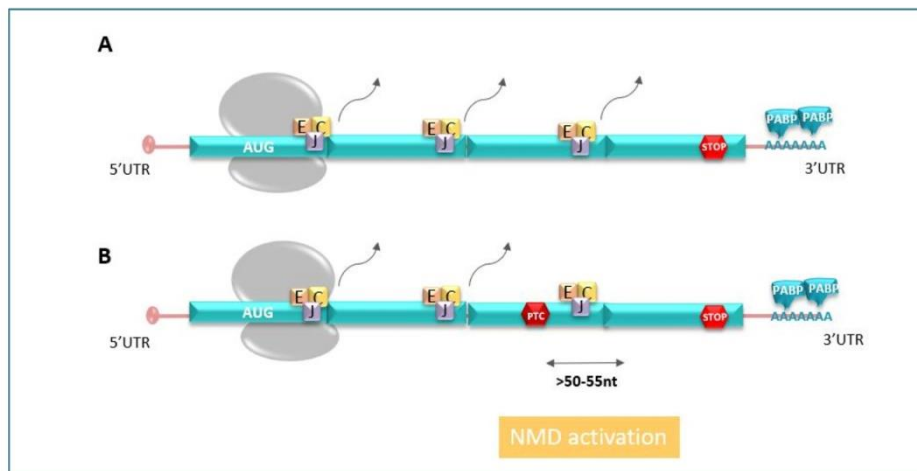
copy of a gene become dysfunctional and the remaining functional copy cannot solely 208  
preserve the normal function. 209

### 3.2 Degradation of altered mRNA by the NMD system 210

Cells are able to deploy natural mechanisms to protect themselves from PTCs 211  
adverse effects. We will focus on one of them, known as the NMD system. PTC-containing 212  
mRNA does not necessarily lead to truncated protein production as they can potentially 213  
be recognized and degraded by this system. NMD is an mRNA, cytoplasmic and 214  
translation-dependent quality control mechanism, conserved across all eukaryotic cells. 215  
The pivotal role of this system concerns the recognition and the degradation of aberrant 216  
mRNAs harboring a PTC. Thereby, the NMD system prevents the production of truncated 217  
or erroneous protein that could hold deleterious effects against the organism. 218

In mammalian cells, the NMD can discriminate between a natural termination codon 219  
(NTC) and a PTC based on the presence of a multi-subunit protein complex (eIF4A3, 220  
MAGOH et Y14, MLN51) named Exon Junction Complex (EJC) [23]. Amid the pre-mRNA 221  
splicing, EJCs are laid by the spliceosome, a protein complex that precisely cut out introns 222  
from pre-mRNA, 20 to 24 nucleotides (nt) upstream of the exon- junction complex. EJCs 223  
accompanies mRNA from the nucleus to the cytoplasm where the single-stranded RNA 224  
is translated [24] [25]. 225

In physiological circumstance, the force of the ribosome during the pioneer round of 226  
translation process is sufficient to remove all EJCs carried by the mRNA until the NTC. 227  
This process ensures that no EJCs remain on mRNA up to the translation termination. 228  
However, if the ribosome displacing the EJCs encounter a PTC, its progression is 229  
disrupted and the EJCs removal ceased. The remaining EJC signals the presence of the 230  
PTC located typically > 50-55 nucleotides upstream of the last exon-exon 231  
junction and leads the abnormal mRNA to its degradation. The resulting discharge of the ribosome 232  
from the mRNA transcript provides enough time to recruit NMD factors [26]. (Figure 3). 233



**Figure 3.** A. During splicing, a multiprotein complex is laid 20 to 24 nucleotides upstream exon junctions complex (EJC), located upstream of an NTC. During the translation, the ribosome removes all the EJCs present on the open phase reading until the STOP codons. B. PTC located typically > 50-55 nucleotides upstream of the last exon-exon junction, holds back EJC complexes downstream of the premature STOP codon which are recognized as a signal for the presence of a PTC, therefore mRNA is targeted to degradation by NMD pathway. 234

#### 3.2.1 NMD Factors 240

Genetic screens in *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* were used to 241  
identify conserved factors that constitute the core machinery of the NMD system. hUPFs 242

factors includes UPF1, UPF2 and the least conserved of the UPF core factor, UPF3X.  
 Meanwhile, the associated suppressors comprise SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8, and  
 SMG9 [27]. See below a brief description of each of the NMD core factors to clarify their  
 different functions involved in the NMD mechanism conserved in human cells [28],  
 consists of both hUPFs (human UP-frameshift) [29] and six associated suppressors  
 proteins known as SMG (Table 1).

**Table 1: Functions of NMD factors.**

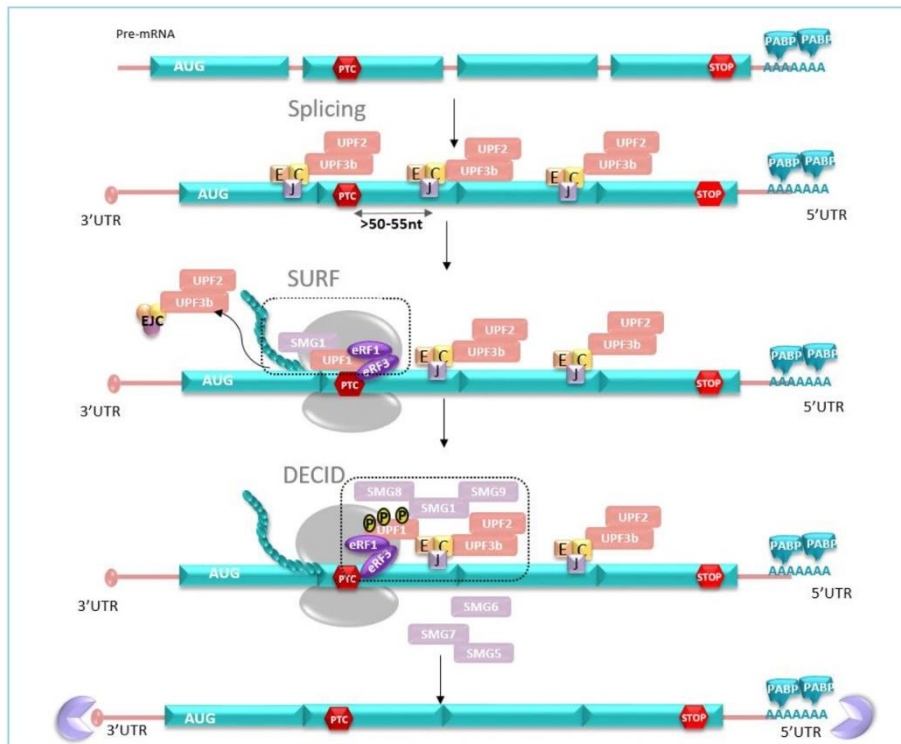
	NMD factors	Functions
hUPFs	UPF1	* Key factor to trigger the NMD mechanism when translation termination takes place at a PTC * ATP-dependent RNA helicase activity
	UPF2	* Stimulate UPF1 helicase activity by interacting, via its CH domain, with UPF1 * Also interact with UPF3
	UPF3/X	* Stimulate helicase and ATPase activity of UPF1
hSMGs	SMG1	* Involved in the phosphorylation of UPF1 including the Threonine 28 (N-terminal) and several serine motifs, especially Serine 1096 (C-terminal). * Facilitates the recruitment of SMG5, SMG6 et SMG7
	SMG5 SMG6 SMG7	* Essential factors involved in the dephosphorylation of UPF1 * SMG6 and SMG5-SMG7 complex binds respectively to phosphorylated Threonine 28 and Serine 1096 of UPF1 * SMG5-SMG7 complex recruit protein phosphatase 2A (PP2A) to phosphorylate hUPF1 * SMG6 with its endonuclease role cleaves the mRNA near the PTC position
	SMG8 SMG9	* Interaction of SMG8 and SMG9 with SMG1 inhibit its kinase activity

### 3.2.2 NMD mechanism course

To achieve the degradation of mRNAs containing an early stop codon, UPF1, considered as the main key factor, trigger the NMD mechanism and undergoes phosphorylation and dephosphorylation cycles steps, that are essential for NMD progression [30]. This phenomenon intervenes exclusively when the translation termination take place at a PTC [31] [32].

Briefly, when the ribosome is stalled at the PTC position, UPF1 binds to the translation termination complex, composed of the eukaryotic release factor 1 (eRF1) and 3 (eRF3), already located at the PTC position. This complex, together with UPF1, associate with the SMG1 kinase to form the surveillance complex named SURF (NN1). Thanks to the recruitment of UPF2 and UPF3b at EJCs position, a bridge is form to join UPF1 to the mRNA, allowing the whole SURF complex to interact with UPF2 (via its CH domain) and UPF3b, as well as with the EJC complex to form the decay-inducing complex (DECID) (NN3). Stimulated by the DECID complex formation, phosphorylation of UPF1 is carried out by the SMG1c complex, comprised of the protein kinase SMG1, and two additional sub-units, SMG8 and SMG9. SMG9 associates tightly with SMG1, then SMG8 binds to the preformed SMG1c complex. All three factor regulate UPF1 activity through the induction of conformational changes impacting its phosphorylation state. [33] [34]

mRNA degradation can proceed through several pathways. Indeed, subsequently to its phosphorylation, UPF1 induces the recruitment of either the endonuclease SMG6 or the SMG5-SMG7 complex that participates to mRNA decay and prevents to resume the translation. SMG6 cleaves the mRNA in the vicinity of the PTC, whereas the SMG5-SMG7 complex not only recruits both a decapping and a deadenylation complex but also triggers the dephosphorylation of UPF1 through recruitment of the protein phosphatase 2A (PP2A). mRNA degradation occurs at both 3' and 5' ends [35]. After its deadenylation, the 5' to 3' end will be the target of exoribonucleolytic enzymes XRN1, meanwhile, the 3' to 5' end is exposed to degradation by the exosome [25] (Figure 4).



278

**Figure 4.** When the ribosome stops at PTC, protein UPF1-SMG1 and eRF1 eRF3 factors form a SURF complex. Then, SURF complex interacts with a complex EJC-UPF2-UPF3 to form DECID complex, this allows UPF1 phosphorylation by SMG1 kinase, inducing the recruitment of SMG6 SMG7-SMG5 to dephosphorylate UPF1, phosphorylation/dephosphorylation steps set off degradation events.

279  
280  
281  
282

### 3.3 Impact of the PTC position in the NMD system, illustration in peripheral Neuropathy

283  
284  
285

The PTC location within the mRNA sequence influences the way the NMD system carry out such mRNAs degradation, therefore affecting the severity of the phenotype. In the neurological phenotypes, the position of the nonsense mutation seems to hold a significant impact depending on the disorder. It has been shown that in both the Congenital Hypomyelinating Neuropathy (CHN) and in the Dejerine-Sottas Neuropathy (DSS), when the nonsense mutation is located in 3', the NMD system is unable to recognize it. This occurrence induces the production of a truncated protein, leading to a more severe forms of the disorder. On the contrary, when nonsense mutations are localized in 5', the NMD system is able to recognize the mRNA resulting, for instance, in a more severe form of the Charcot-Marie-Tooth disease type 1B (CMT1B) [11] [1].

286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294

## 4 Read-through mechanism

295

As previously mentioned, natural translation termination is elicited by the ternary termination complex (eRF1-eRF3-GTP) at the NTC. However, several mechanisms of translation termination suppression exist. Among them a process called stop codon "readthrough" enable the natural translation of STOP codon [36], thus driving to read the nonsense codon as a sense one, in the same reading frame [36], until the next termination signal. However, this phenomenon remains quite rare, with a frequency <0.1%.

296  
297  
298  
299  
300  
301

#### 4.1 Natural process 302

Readthrough as a natural process was first discovered in both the E.Coli bacteria and in the tobacco mosaic virus (TMV). In the latter case, the tobacco virus was able to produce two polypeptide chains of 126 KDa and 186 KDa that resulted from the readthrough of an UGA codon by incorporation of a non-cognate tRNA AUG (Tyr) [37]. In this case, natural readthrough was shown essential for both the viability of the virus and the control of its replication level. Translational readthrough has now been identified in many viruses [38], yeast [39], Drosophila (4R) and mammalian models. More recently, readthrough has been identified in few human genes as a mechanism meant to regulate their expression by producing two isoforms from a single mRNA [38]. One of the rare cases of natural translational readthrough in human concerns the transmembrane protein MPZ (myelin protein zero), that accounts for approximately 50% of the peripheral myelin protein content. Readthrough phenomenon led to a C-terminally extended myelin zero (L-MPZ) proteins, which could still be involved in myelination [40]. Also, in a second case, natural readthrough has been shown to provoke the addition of a peptide-extensions to the sequence encoding the human vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), generating a VEGF-Ax (x:extended). This extension allowed to decode the STOP codon into a serine one, which led to a change in its activity from pro-angiogenic to anti-angiogenic [17].

#### 4.2 Readthrough therapeutical approach 320

As part of a promising therapy for the treatment of neuropathies resulting from an alteration inducing a PTC, natural or designed small molecules conferring a readthrough potential needs to be strongly considered. Such components could allow the ribosome to pass through the PTC and resume the translation until the natural termination codon, inserting a stand-in amino acid in place of the one originally constituting the PTC (**Figure 2C**). The new protein may differ by only one amino acid from the normal one, leading to a possible missense mutation. Nonetheless, such protein could still offer patients a less severe phenotype [41] as it is suggested in the case of the GDAP1 gene. Indeed, CMT patients carrying a homozygous nonsense mutation in GDAP1 develop a more severe form of the disease compared to patients harboring a missense mutation.

When the PTC pass through at the ribosomal A-site, a competition between tRNA near cognate and the complex of translation termination eRF1/eRF3-GTPase will arise. Certain events like the nature of stop codon, the nucleotide sequence in the vicinity of the PTC post-transcriptional modifications or small drugs could promote readthrough mechanism (**Figure 2C**).

As detailed above, the natural read-through process allows to insert an amino acid into the polypeptide chain at the PTC during translation. Researchers hijacked this mechanism as a therapeutic approach to insert a near cognate amino acid at the PTC level. This paved the way for the search of molecules activating the read-through system to correct disorder induced by nonsense mutations. In this review, we classified the read-through activating molecules according to their mechanism of action into three main categories:

- Ribosome targeting molecules 343
- tRNA post-transcriptional inhibitors 344
- eRF1 targeting molecules 345

## 5 Ribosome targeting molecules 346

### 5.1 Aminoglycoside (Natural molecules) 347

#### 5.1.1 Discovery 348

Initially, aminoglycosides are natural compounds synthesized by microorganisms. The first aminoglycoside ever discovered was the streptomycin, in 1944. This component was previously used as an antibacterial agent against *Mycobacterium Tuberculosis* in the treatment of tuberculosis [42]. Following this discovery, several drugs naturally produced



were isolated from soil bacteria such as neomycin, kanamycin, paromomycin, gentamicin, amikacin and geneticin (also known as G418) [43] [44]. Most aminoglycosides are known as antibacterial components, mainly prescribed to treat gram-negative bacterial infections.

### 5.1.2 Chemical structure

Aminoglycosides are characterized by a common central ring, called 2-deoxystreptamine (2-DOS), which represent ring II. This ring can be linked to a variety of amino sugars by glycosidic linkage. According to the carbon substitution position, aminoglycosides can be classified into mono-substituted aminoglycosides (substitution at C4 position, refers to ring I) and di-substituted one (substitution at both C4 and C5 position or at both C4 and C6 position). The substituent in C5 or C6 position of the 2-DOS referred as Ring III [45]. (Figure 4)

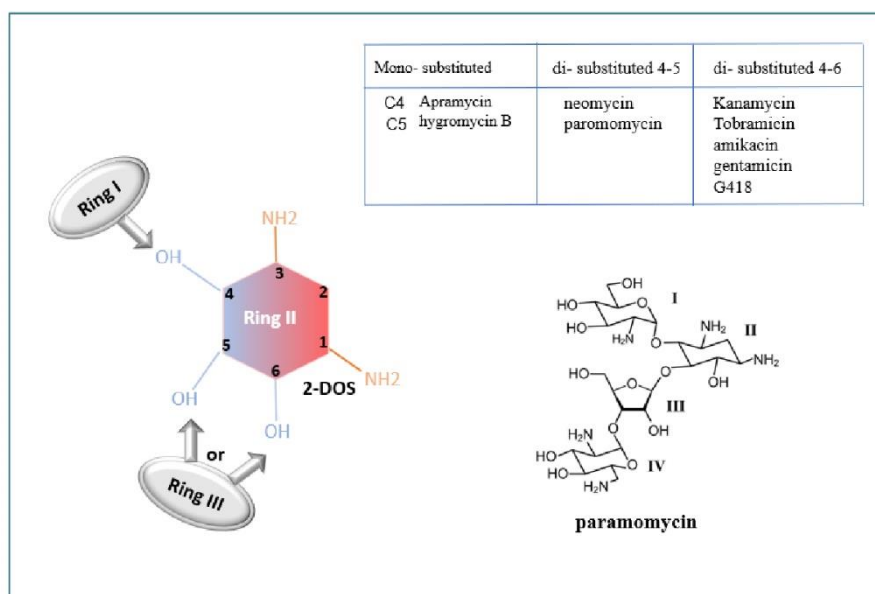


Figure 5. Aminoglycoside chemical structure. Example of aminoglycoside "paramomycin" [46].

### 5.1.3 Mechanism of action

Aminoglycosides are polar polycationic compounds that strongly bind to the ribosomal decoding center (A-site) located in the small ribosomal subunit in both prokaryotes and eukaryotes. In view of the A-site role, Aminoglycosides mechanism of action is mainly centered on the loss of translation accuracy and fidelity. [47]

### 5.1.4 Aminoglycosides interaction with the prokaryote's ribosome

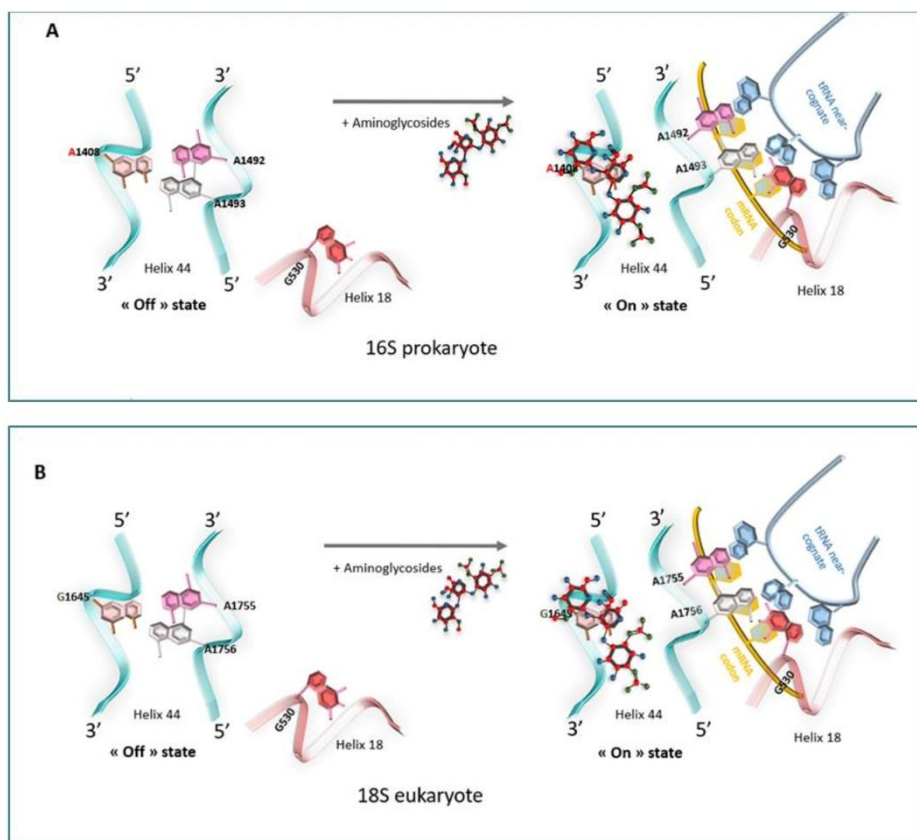
Several studies based on crystallography and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) have helped to understand how aminoglycosides stimulate the misreading of the genetic code to allow the acceptance of near cognate codon-anticodon interaction [48] [49]. One of the most studied structural model concerning the interaction of aminoglycosides with the bacterial ribosome relates to the paramomycin [48] [49] [50]. In the presence of paramomycin, the 2-DOS ring strongly binds to the A1408 residue in the 16S rRNA of the A-site just across the A1492 and A1493 residues. This tight link induces residues A1492 and A1493 to bulge outside of the internal loop of the helix 44 in an "on" state [48]. Then, the bacterial ribosome then loses its ability to discriminate between cognate versus non-cognate tRNA-mRNA association, thus introducing dysfunctions in the protein sequence

during the elongation of the translation, leading to the inhibition of protein synthesis and to bacterial death, hence its antibiotic effect [51] (**figure 6A**)

#### 5.1.5 Aminoglycosides interaction with the eukaryote's ribosome

Using X-ray crystallography and single-molecule FRET (smFRET) imaging, Prokhorova *et al* highlighted that G418 (4,6-linked aminoglycoside) could interact with the 80S ribosome of *S. cerevisiae* [52]. At the molecular level, aminoglycosides bind to the canonical eukaryotic ribosomal decoding center 18S rRNA and displace the universally conserved nucleotide A1755 and A1756 outside of the helix 44 [52]. The link is weaker than the one displayed in prokaryotes, which results in the progression of the translation. The difference in read-through efficiency of aminoglycosides between eukaryotes and prokaryotes can be explained by the presence of a guanosine nucleotide in eukaryotes 18S rRNA at position 1645. Nucleotides responsible for the weak affinity of aminoglycosides to the mammalian ribosomal 18S [52] (**figure 2C**) (**figure 6B**).

Due to their ability to interact with ribosomal RNAs during the translation process, aminoglycosides can be used as drugs to potentially treat several human genetic disorders caused by nonsense mutation [53]. Aminoglycosides are the first and the best-characterized drugs that enhance PTC read-through. Not all aminoglycosides induce the PTC translation with the same mechanism. Notably, aminoglycosides containing in the ring I a 6'-OH group, such as paromomycin are more efficient to promote the readthrough of PTC compared to aminoglycosides containing an 6'-NH<sub>2</sub> group at this same position [52] [16].



**Figure 6.** Aminoglycosides mechanism of action. (A) 16S prokaryote, from the left side of the panel, at the A-site: site of the ribosome, bases A1492 and A1493 are positioned towards the inside of the helix 44 (off state). On the right side, the codon is recognized by the tRNA, A1492 and A1493 switch outside of the helix 44 (On state). Strong fixation of aminoglycosides to A1408 in the rRNA of the A site changes the conformation in which the adenines A1492 and A1493 are directed towards the outside of the helix in the presence of a near-cognate tRNA inducing inhibition of protein synthesis. (B) 18S eukaryote, low fixation of aminoglycosides to G1645 in the rRNA of the A site displaces the adenines A1755 and A1756 of the helix 44 outside of the helix in the presence of a near-cognate tRNA, maintaining the translation process. A1408: high affinity= bacterial death; G1645: low affinity = continuity of translation

### 5.1.6 Aminoglycosides as a readthrough inducer in various model

For many cancer as well as for various neuromuscular and neurodegenerative disorders caused by nonsense mutations, aminoglycosides represented, thanks to their ability to promote PTC read-through, a promising therapeutical approach [53]. Thus, many studies have demonstrated the capacity of aminoglycosides as read-through molecules in different genetic disease models *in vitro*, *in vivo*, until clinical trials.

In 1985 and for the first time, *Julian and Mogg* published their results concerning the phenotypic suppression of nonsense mutations after aminoglycosides (paromomycin and G418) treatment. In this study, they treated mammalian cells (Cos-7) with various doses of paromomycin and G418. Cos-7 cells had previously been transfected with a plasmid containing a bacterial gene comprising an amber nonsense (TAG) codon at position 38. With either treatment, the read-through of this mutation was restored up to 20% levels of wild type protein [54]. Later on, in 1996, the efficacy of G418 and gentamicin were

demonstrated in Hela cells. In this study, cells were transfected with a plasmid vector harboring either the nonsense mutation p.Gly542\* or p.Arg553\*, inducing an UGA mutation in the *CFTR* gene. Alteration in this gene is at the origin of cystic fibrosis (CF) development (27). Aminoglycosides were also evaluated in neurological disease such as Ataxia-Telangiectasia (A-T) that encode *ATM* gene. In this model, various lymphoblastoid cell lines derived from A-T patients harboring different PTC were treated with geneticin and gentamicin. Following the treatment, cells were able to restore the synthesis functional ATM protein. [55]

*mdx* mice model generated to mimic the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the first animal model for which the efficacy of aminoglycosides has been tested. *mdx* rodents underwent subcutaneous injections of gentamicin once per day for 14 days. After the treatment, expression of the dystrophin protein was restored up to 10 to 15% of the level found in wild type mice. This therapeutical approach also promoted a significant improvement of the muscle function [56]. However, the beneficial results of gentamicin treatment in the *mdx* model could not be replicate by other teams [57]. Nonetheless, a second positive result was observed in a different mice model created by Ming Du *et al* [58]. They reported that *transgenic* mice carrying a human nonsense mutation (p.Gly542\*) in *CFTR* (*Cftr* *-/-*) exhibited re-expression of functional CFTR under gentamicin (14%) or tobramycin (5%) through daily administration [58].

Two previous encouraging pilot studies set up by Wilschanski *et al* [59], and Clancy *et al* [60] investigating the consequences of gentamicin treatment in *CFTR* patients were quickly supported by a randomized, double-blind, placebo clinical trial. This third study reported that gentamicin therapy administrated during two successive week in 19 CF patients carrying a PTC (in either an homozygote or heterozygote state) led to the production of full-length CFTR protein [61]. 25 % and 35% of recovery were observed in patients carrying the p.Arg553\* and p.Gly542\* mutation respectively. Wistfully, in another clinical trial, daily intravenous gentamicin administrated to four patients suffering from DMD and Becker Muscular Dystrophy (BMD) carrying various stop codon sequences, did not permit to achieve any dystrophin re-expression. [62] [63]

Later on, in 2016, five patients suffering from Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB), an incurable disease caused by mutations in the gene encoding type VII collagen, entered in another aminoglycoside's PTCs corrections therapy clinical trial. In this study, patients harboring various nonsense mutations (p.Arg236\*, p.Arg2814\*, p.Arg578\*, p.Arg613\*, and p.Arg683\*) in the *COL7A1* gene were treated with topical and intradermal administration of gentamicin during 3 months. A recovery varying from 20% to 165% of the level of functional type VII collagen protein was obtain and persisted for 3 months [64]. Topical gentamicin administration also corrected dermal-epidermal separation, improved wound closure, and reduced blister formation in the treated patients.

Earlier this year, a single patient suffering from both Epidermolysis Bullosa Simplex and Muscular Dystrophy (EBS-MD) carrying a nonsense mutation in *PLEC1* underwent aminoglycoside treatment. EBS-MD is an autosomal recessive disorder caused by pathogenic variants in *PLEC1*, which encodes plectin protein. The patient was administrated with gentamicin (7.5 mg/kg/d) for 14 consecutive days on July 2019 and February 2020. Following the treatment, expression of plectin in the skin was detected for at least 5 months (A), the patient also showed sign of both skeletal and respiratory muscles improvement.

### 5.1.7 Aminoglycosides side effects

Despite the read-through efficiency displayed by many aminoglycosides in several genetic disease models, those molecules are also well known, after long-term treatment, to induce side effects such as ototoxicity, nephrotoxicity, and to a lesser extent retinal toxicity which limit their clinical use as PTCs correction therapy [65] [66]. These adverse effects can partially be explained by the selective accumulation of aminoglycosides in the kidney and in the cochlear hair cells of the inner ear [65] [66]. Indeed, previous studies



suggested that the nephrotoxicity following accumulation of aminoglycosides in the kidney could result in their binding to the large glycoprotein receptor named LRP2 (also known as megalin). This receptor, mainly present at the apical surface of absorptive epithelia such as in the kidney, mediates the uptake of aminoglycosides into the cell by endocytosis. Also, aminoglycosides were described to be endocytosed at the apical membranes of hair cells and transported to lysosomes. Such lysosomal sequestration, with accumulation, was hypothesized to induce lysosomal lysis, releasing aminoglycosides in the cytoplasm. Such adverse effects can also be explained by the role of aminoglycosides in ROS generation. Indeed, the positive charge carried by aminoglycosides facilitate their interaction with several negatively charged components of the cell, such as phospholipids and phospholipases. This property allows aminoglycosides to bind to the site A of the mitochondrial eukaryote ribosomal 12S rRNA that share similarity with the A site of the bacterial ribosome [67]. Thus, mitochondrial proteins production is hindered leading to mitochondrial dysfunction, ROS generation and resulting in cell death [68] [69] [70]. [67]

### 5.1.8 Molecules capable to enhance aminoglycoside activity 496

Interestingly, some studies reported that G418 PTC read-through activity could be enhance by other compounds, allowing to reduce G418 treatment concentration. Those molecules are referred as CDX molecules and Y-320. Among CDX chemical molecules identified, CDX5 displayed the best read-through activity [71]. CDX5 combined with G418 have showed high read-through capacities when tested on a neuronal model derived from human induced pluripotent stem cell (hiPSc) bearing nonsense mutations in the progranulin gene (*PGRN*).

Recently, a new small read-through molecules (SRTM) known as Y-320 was identified. Alone, this molecule did not permit to achieve any read-through efficacy. In contrast, co-treatment with G418 and Y-320 increased PTC read-through at a higher level than G418 alone [72]. Study on Y-320 mechanism highlighted that this component could increase the ribosome biogenesis improving proteins production.

#### 1.1 Aminoglycosides derivatives 509

To overcome side effects that hampered the potential of aminoglycosides read-through therapeutical approaches, derivatives were chemically designed, separating structural components with read-through properties from those affecting cell viability [73] [74] [75].

### 5.1.9 Development, chemical structure and mechanism 514

Structural modifications of certain aminoglycosides allowed to generate three class of derivatives: TC derivatives, designed from neomycin; JL derivatives, designed from kanamycin B and NB derivatives designed from paromomycin or G418 [76]. The modification of paromomycin structure led to the development of the first NB generation, named NB30. They preserved the pseudo-trisaccharide **structure** as it is the main recognition element for the rRNA. The pseudo-trisaccharide is used as the main structure on which other designed chemical structures can be attach [77]. Four other generations were developed later on. The second generation, named compound NB54, was designed after introduction of an AHB group (4-amino-2-hydroxy-butanoyl) at the position N-1 of paromomycin ring II. The third one was obtained by modifications of G418. This aminoglycoside contains a (R)-6' methyl group on the glucosamine ring (I ring), making it the highest reading efficiency among all aminoglycosides. This (R)-6' methyl group was used to generate the third generation by adding it on the ring I of NB30 and NB54 to forms NB74 and NB84 respectively. The fourth generation, called NB124, was developed after including an 5''-(S)-Me group on ring III, allowing NB124 to bind cytoplasmic ribosomes [75]. The last generation, in order to target the eukaryotic cytoplasmic rRNA A site, was recently synthesized. An additional hydroxyl group was added on the side chain of the glucosamine ring I of G418, producing new molecules NB156 and NB157 [78].

<b>5.1.10 Aminoglycosides derivatives as a readthrough inducer studied in various model</b>	533
	534
<i>In vitro</i> , NB30 showed mutation-correcting activity on the nonsense mutation p.Arg31* on a Usher syndrome cellular model [79]. NB54 enhanced nonsense mutation readthrough activity on various genetic diseases such as the Usher syndrome, CF, DMD, and Hurler syndrome, observed in cellular models at a level at least twice as high as gentamicin, paromomycin or NB30 [80]. In the same cellular models and compared to gentamicin, the new synthetic drugs NB74 and NB84 displayed superior read-through efficiency and reduced toxicity [81].	535
	536
	537
	538
	539
	540
	541
NB124 derivative restored full-length CFTR for three CFTR UGA mutations (p.Gly542*, p.Arg1162*, and p.Trp1282*). Also, the chloride transport function was restored at 7% of its wild type level in primary human bronchial epithelial CF cells [81]. NB124 was recently evaluated in the human tumor cells HDQ-P1 (human primary breast carcinoma) carrying nonsense mutation of p53 (Arg213*; UGA). This molecule promoted the significant production of an endogenous and functional p53 protein [74].	542
	543
	544
	545
	546
	547
To determine <i>in vivo</i> efficacy of NB54 in Usher syndrome, day 0 postnatal mice were transfected with a plasmid carrying mutated (p.Arg31*) <i>USH1C</i> (gene encoding the scaffold protein harmonin). The transfection was performed into retinas by electroporation. After 6 weeks, mice were injected sub-retinally by either NB54 (125 µg/µl). Both induced recovery of the full-length harmonin associated to high biocompatibility [82]. Also, NB124 has been tested on mice expressing a human <i>CFTR-Gly542*</i> transgene in a <i>Cftr</i> knockout model. This treatment improved the mice therapeutic index by a factor 10 compared to gentamicin, with cytotoxicity reduction [81].	548
	549
	550
	551
	552
	553
	554
	555
In a clinical trial, NB124 was referred as ELX-02 [6'-(R)-Methyl-5-O-(5-amino-5,6-dideoxy- $\alpha$ -L-talofuranosyl)-paromamine sulfate]. Indeed, this aminoglycoside analogue targets the ribosome with low affinity. This characteristic allowed to increase the specificity toward the cytoplasmic ribosome but also to decrease the affinity for the mitochondrial one [83]. [75] ELX-02 binds preferentially to the A-site of the eukaryotic ribosome, which allow significant readthrough of the UGA stop codon of <i>TP53</i> mRNA, leading to the synthesis of full-length functional protein in DMS-114 cells. In addition, it allows to decrease the NMD activity [84]. Currently this compound is tested in phase II clinical trial as a therapeutic approaches to treat cystic fibrosis ( <a href="#">NCT04135495</a> ) and cystinosis ( <a href="#">NCT04069260</a> ) patients carrying nonsense mutations. This molecule showed lower toxicity than gentamicin [85].	556
	557
	558
	559
	560
	561
	562
	563
	564
	565
	566
<b>5.2 Ataluren (PTC124)</b>	567
<b>5.2.1 Discovery</b>	568
Following the screening of an 800,000 small chemical compounds library using a firefly luciferase reporter gene, one molecule ((3-[5-(2-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-benzoic acid) also known as Ataluren or Translarna, structurally different from aminoglycosides, was identified. Interestingly, ataluren resulted in low toxicity and higher read-through activity using lower doses [86].	569
	570
	571
	572
	573
<b>5.2.2 Mechanism of action</b>	574
Considering the particular chemical structure of PTC124 compared to original aminoglycosides, a different mechanism of action was expected. Indeed, two recent study highlighted that PTC124 read-through potential, contrary to natural aminoglycoside such as G418, derive from its ability to inhibit the release factor activity by competition. Thus, molecule binds with rRNA at specific sites (18S-A1195), proximal to the decoding center, but also to the peptidyl transfer center (26S-A2669, 26S-A2672, and 26S-A3093) of the ribosome. [87] [88]	575
	576
	577
	578
	579
	580
	581
<b>5.2.3 Ataluren as a readthrough inducer studied in various model</b>	582

Since its discovery in 2007 by Welch *et al*, PTC124 ability to correct nonsense mutation has been the subject of several *in vitro* studies. At low concentrations (0.01–0.1 mM), this molecule showed ability to promote read-through of PTCs in primary muscle human cells from DMD patients, with higher results in UGA stop codon, followed by UAG and then UAA [86]. PTC124 has also shown its effectiveness on nonsense mutations in the *USH1C* [89], *CFTR* [52] and *dystrophin* gene [86] [53].

Recently, an *in vivo* study on dystrophin-deficient zebrafish has pointed out that PTC124 only displayed read-through efficacy for the UAA stop codon. This results was pretty unexpected as UAA is normally considered as displaying the lowest level of read-through activity [90]. The efficiency of PTC124 was also demonstrated in other mice models for different genetic diseases: DMD [86], *CFTR* [91], Usher syndrome and the neuronal ceroid lipofuscinoses. [92]

Supported by phase I and IIb clinical trials with beneficial results in DMD patients [93], this therapeutic drug was indicated in a phase III clinical trials for the ambulatory treatment of patients aged 5 years or older. Its efficiency was evaluated on various criteria based on a walking perimeter (6 minutes test; 150 meters) [94]. The clinical trials has now ended but publications are yet to be available.

Other preclinical study did not confirm the readthrough activity of Ataluren. Indeed, when the drug was administrated for over 48 weeks in a cohort of 238 patients exhibiting nonsense-mutations inducing CF (NCT00803205, phase III), there was no significant improvement in patients lung function [95]. This disappointing result observed in most patients could be explain by the prescription of a parallel treatment with Tobramycin. Indeed, the authors considered Tobramycin as a potential antagonist which could inhibit the effect of PTC124. However, in another phase III clinical trial (NCT02139306) in which 279 patients randomly received either Ataluren treatment or a placebo, with no further prescription of Tobramycin, no significant lung function improvement were obtained [96].

Still, PTC124 received conditional approval by the European Medicines Agency in 2014 and is licensed in the European Economic Area for the treatment of nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (nmDMD) in ambulatory patients aged 2 years and older under the trade name Translarna™ (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/translarna>) [97]. In 2014, Ataluren first enrolled for the FDA's approval. However, after a second submission in 2017, the Office of New Drugs of the U.S. Food and Drug Administration reiterated the FDA's prior position and denied PTC's appeal of the Complete Response Letter in relation to the New Drug Application (NDA) for Ataluren.

#### 5.2.4 Ataluren side effects

PTC124 was reported as a nontoxic drug, orally bioavailable [86]. Currently, this is the only read-through molecule that received the global approval for a phase III test to treat cystic fibrosis and DMD diseases [94] [98]. Nevertheless, after the contradictory results of phase III clinical study, PTC124 was suspended in 2017 for the treatment of CF and DMD patients [56] [94]. Besides its ineffectiveness, PTC124 was the subject of much criticism and questions as a recent study indicated that the initial discovery of PTC124 by HTS may have been biased by its direct effect on the FLuc (firefly luciferase) reporter used [99].

### 5.3 PTC414

#### 5.3.1 Discovery

To counter the feeble and fluctuating read-through efficiency achieved by PTC124 treatment, chemical optimization of PTC124 was performed leading to the creation of the PTC414 molecule. PTC414 allows to keep the beneficial activity of PTC124 with higher level of plasma exposure and tissue penetration, improving the pharmacokinetic characteristics in all three different PTC [100].

#### 5.3.2 PTC414 as a read-through inducer studied in various model

Fibroblasts harboring an UAG PTC collected from human suffering from Choroideremia (CHM), an X-linked chorioretin dystrophy due to mutations in the *CHM* gene coding for REP-1 protein, were treated by PTC414. No increase of REP1 protein was detected after the treatment.

PTC414 has been tested in a zebrafish model with a *CHM* gene harboring an UAA PTC *chm<sup>ru848</sup>* [100]. This molecule restored the expression of the REP-1 protein (17.2%).

### 5.3.3 Side effect

In a zebrafish model, after PTC414 (2µM) treatment, sign of renal toxicity was observed. Such side effect was never detected after PTC124 (10 µM) treatment [100].

## 5.4 RT13 et RT14

### 5.4.1 Discovery

To overcome the bias encountered when using the firefly luciferase gene reporter assay, a luciferase independent HTS assay was developed for future drug screening. This alternative system exploited a protein transcription/translation (PTT) assay coupled to an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to test multiple compound that may enhance PTC readthrough. To perform the PTT-ELISA assay, the plasmid used harbored a PTC mutation (either UGA or UAA) in the *ATM* gene, responsible for the development of ataxia-telangiectasia (A-T). The sequence carrying the PTC was N- and C-terminally tagged by two epitopes, Myc and V5 respectively. Any partially or fully translated protein would be caught on the ELISA plate thanks to an anti-myc antibody. If the compound tested promoted PTC readthrough, the concerned translated protein would be detected with anti-V5-horseradish peroxidase (HRP) antibody. [101]. On the contrary, truncated protein would miss the C-ter sequence and so would not contain the V5 epitope. Consequently, such protein would not be detected by the anti-V5-horseradish peroxidase (HRP) antibody. This new method was applied to a 34,000 SRTM library. Two leading compounds were identified: RT13 (2-imino-5-[[5-(2-nitrophenyl)-2-furyl]methylene]-1,3-thiazolidin-4-one) and RT14 (4-tert-butyl-2-[(3-nitrobenzylidene)amino]phenol).

### 5.4.2 Mechanism of action

The molecular mechanism that lie behind RTC13 read-through activity effectiveness remain unknown. This molecule possibly displays a similar mechanism of action as aminoglycoside, interfering with ribosomal translation.

### 5.4.3 RTC13 and RTC14 studied in various model

Both RTC13 and RTC14 induced the restoration of the full-length dystrophin protein expression in myotubes derived from skeletal muscle mouse *mdx* carrying an UAA nonsense mutation [101].

Intramuscular injection of RTC14 compound into skeletal muscles of *mdx* mice showed no significant read-through activity. However, intramuscular injection of the RTC13 compound led to re-expression of dystrophin in mice's diaphragm and heart. RTC13 treatment also improved muscles function [102].

## 5.5 GJ071 and GJ072

### 5.5.1 Discovery

GJ071 and GJ072, have been identified in a screening of 36,000 other molecules with the same biological system previously described to identified RT13 and RT14 [103].

### 5.5.2 Mechanism of action

GJ072 share the same mechanism of action than PTC124. [104]

### 5.5.3 GJ071 and GJ072 as readthrough inducer studied in various model



Treatment with GJ071 and GJ072 in cells derived from an A-T patient offered equal read-through activity regardless of the three stop codons compared to RT13 and PTC124 that display various activity depending on the stop codon. [103].

## 6 tRNA post-transcriptional inhibitors

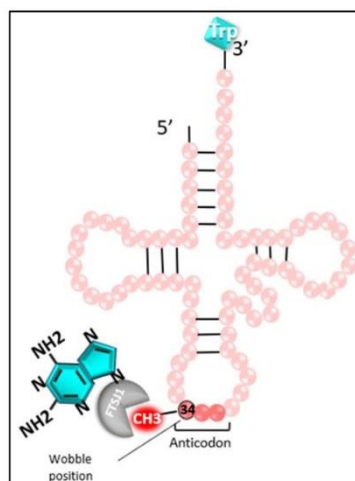
### 6.1 2,6-diaminopurine

#### 6.1.1 Discovery

In order to identify new drugs with higher efficiency to treat inherited genetic diseases resulting from nonsense mutations, several natural extracts of fungi or marine invertebrates were screened. A new construct encoding a firefly Luciferase was used to evaluate those compounds. Its novelty lies in the fact that it carries both an intronic sequence and a nonsense mutation (TGA, TAG or TAA) [37], therefore mimicking efficiently mRNA submission to the NMD system. This screening allowed to identify an extract from fungus *Lepista inversa* named H7. This extract reveals a luciferase activity on both the UGA and UAA stop codon with a correction almost twice as good as the one offered by the aminoglycoside G418 at 1mg/ml [37]. Splitting of this extract allowed to discover a new active component named 2,6-diaminopurine (DAP) [105].

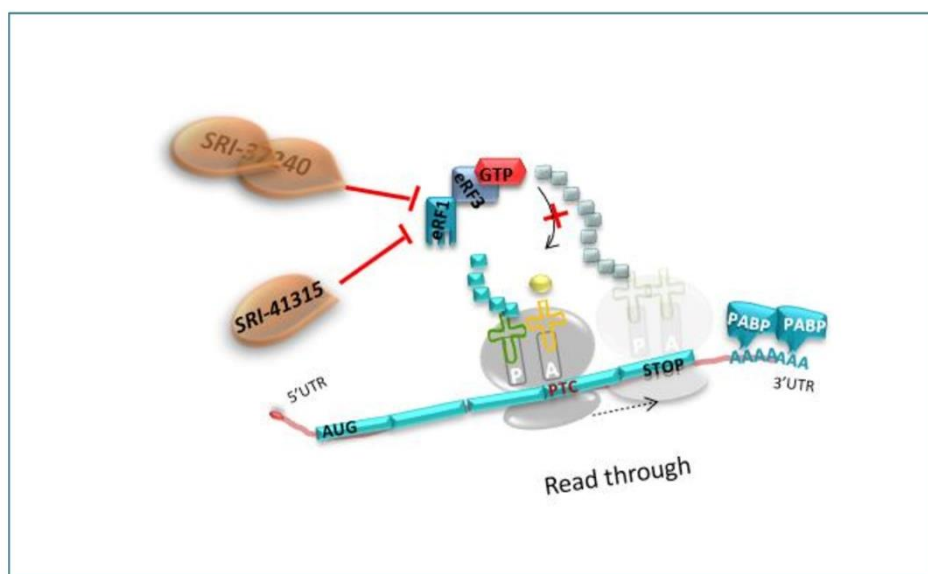
#### 6.1.2 Mechanism of action

It is well known that various post-transcriptional modifications induced at the tRNA level are crucial for their structure, function and stability, especially at position 34 of the tRNA anticodon. Among those modifications, the 2'-O-methylation of the cytosine 34 induced by the 2'-O-methyltransferase (FTSJ1) in human, or TRM7 in yeast, is strongly involved in the fidelity of the codon recognition. It is possible to exploit these essential modifications using 2,6-diaminopurine like inhibitors such as DAP to decode mRNAs disrupted by a PTC (UGA) [106]. Indeed, this molecule allows to hinder the cytosine 34 methylation (Cm<sup>34</sup>) of tRNA by FTSJ1 enzymes, hampering the post-transcriptional modifications process (Figure 7).



**Figure 3.** Mechanism of action of 2-Diaminopurine. Dap (blue) inhibits FTSJ1 enzyme, which is responsible for the 2'-O-methylation of cytosine 34 of the anticodon in tRNA<sup>Trp</sup>

<b>6.1.3 2,6-diaminopurine like inhibitors as a read-through inducer studied in various model</b>	712
	713
DAP was tested on three cancer cell lines: Calu-6 cells, Caco-2 cells and Caov-3 cells harboring three different endogenous nonsense mutation in the <i>TP53</i> gene UGA, UAG, and UAA respectively. Interestingly, DAP (25 $\mu$ M) was more efficient than G418 at 1mg/ml. In particular for UGA nonsense mutations, allowing to restore the function of p53, increasing transcriptional activity on its target gene (p21 protein).	714
	715
	716
	717
	718
The efficiency of DAP to correct nonsense UGA mutations was confirmed in immunodeficient nude mice injected with Calu-6 cells carrying a UGA nonsense mutation in the <i>TP53</i> gene. After 5 weeks of treatment with either DMSO (vehicle) or DAP (5 mg/ml) every day, tumor growth was significantly decreased with DAP treatment compared to DMSO.	719
	720
	721
	722
	723
<b>6.2 Molecules targeting eRF1: SRI-37240 SRI-41314</b>	724
<b>6.2.1 Discovery</b>	725
In order to identify molecules with higher readthrough efficiency, Jyoti et al searched among 771,345 compounds. They developed a novel bioluminescence system based on NanoLuc, a small luciferase enzyme derived from the deep-sea shrimp <i>Oplophorus gracilirostris</i> . Compared to other luciferase such as Firefly or Renilla, limited by their size, stability and luminescence efficiency, NanoLuc reacts with the furimazine as substrate to produce furimamide, a luminescent component, in the presence of molecular oxygen. This system offers more stability and a smaller size luciferase (19kDa) with high duration and luminescence intensity (>150-fold compared to firefly luciferase) [107]. This process identified two molecules named SRI3F240 and SRI41314 known as molecules targeting eRF1.	726
	727
	728
	729
	730
	731
	732
	733
	734
	735
<b>6.2.2 Mechanism of action</b>	736
As previously detailed, competition constantly occurs between the translation termination and the readthrough process. The readthrough efficiency depends on the capacity of the decoding center to incorporate a tRNA near cognate at the PTC position before eRF1 terminates the translation. Therefore, molecules that could deplete eRF1, such as SRI-41315 allow an extended pause at any stop codons. Hence, the crucial point is to investigate whether the NTC can also be disturbed using these molecules targeting eRF1. [108]	737
	738
	739
	740
	741
	742
	743
However, the translation termination at PTC or at NTC is different since translation termination at NTC is well known to be more efficient. Only a high reduction of eRF1 activity at the level of NTC would be necessary to disturb the normal translation termination [108] [109] (Figure 8). Thus, it has been demonstrated that depletion of eRF1 using oligonucleotides( ASO), reduced by 40% the abundance of eRF1 and promoted translational readthrough in hFIX-p.Arg338* hemophilia mice [109].	744
	745
	746
	747
	748
	749
<b>6.2.3 eRF1 inhibitors as a read-through inducer studied in various model</b>	750
SRI-41314 and its derivatives: SRI-37240 were able to rescue efficiently CFTR expression (~6%) in FRT cells expressing a human gene harboring a UGA nonsense mutation in CFTR gene compared to G418 (~9%) alone. Co-treatment with SRI-37240 and G418 mediated better readthrough efficacy, resulting in 25% of wild type CFTR protein expression and function compared to the control group [108].	751
	752
	753
	754
	755



**Figure 8:** Mechanism of action of molecules targeting eRF1. The molecule SRI-41315 and its derivative SRI-37240. The latter is a promising candidate to blocks eRF1, paving the way for the incorporation of a near cognate amino acid at the PTC position

#### 6.2.4 Side effect

It has been reported that the SRI-37240 and SRI-41315 induces modifications on cell sodium transport [109].

## 7 Readthrough limits

Certain events like the nature of the stop codon, the nucleotide sequence in the stop codon vicinity as well as post-transcriptional modifications can impact the readthrough process, either promoting or tempering it.

### 7.1 Selected amino acids incorporation on premature termination codon promoted by readthrough molecules

In cells, the genetic code is read by complementarity between tRNA cognate anticodon and mRNA codon. However, it can be read with near cognate tRNA, establishing only 2 codon-anticodon bonds with a mismatch on either the third or first position of the codon and anticodon (called wobble position). Thus, explaining how, thanks to readthrough molecules, near-cognate tRNAs can be inserted to resume translation at stop codons that normally do not match any specific tRNA. This potential therapeutic approach could help treat patients with many genetic diseases harboring PTC [110].

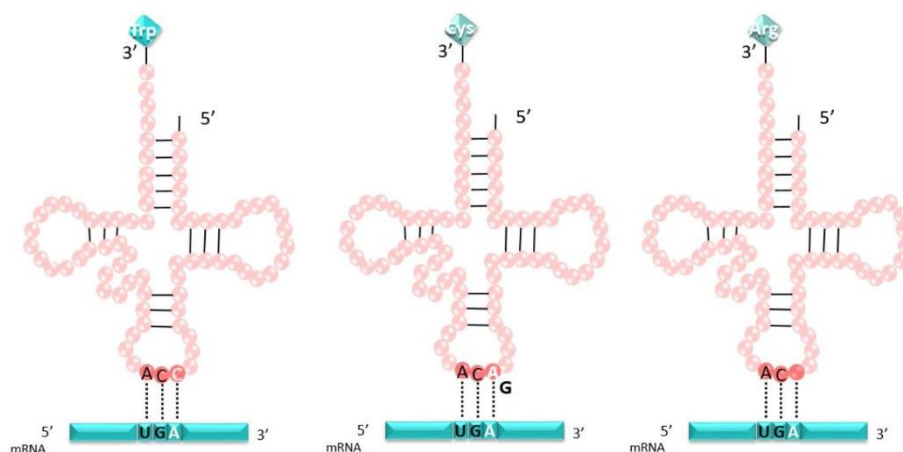
At the mispaired wobble position 3, SRTM almost exclusively allow the readthrough of UGA stop codon by inserting Trp, followed by Arg and then Cys. As for the UAG stop codon, correction was mostly performed by inserting Gln, then Tyr and Lys. Finally, with the UAA stop codon, PTC were predominantly readthrough after insertion of Gln, followed by Tyr and rarely by Lys. As for the wobble position 1, mispairing, U-G is the most authorized readthrough of UAG which can be read by the tRNA-Arg-UCG than U-U and U-C mispairing [41].

In an *in vitro* yeast system and in human cell lines [41], using mass spectrometry, Roy *et al* reported that Ataluren promoted insertion of near-cognate tRNAs at PTC position

with some preferences. As expected, UGA was rather associated with arginine, tryptophan, and cysteine, while UAA and UAG rather incorporated glutamine, tyrosine, and lysine [41] [111].

Recently, readthrough studies using mass spectrometry realized by Fabrice Lejeune's team revealed that treatment by 2,6-diaminopurine (25 $\mu$ M) of HEK293FT cells transfected with a plasmid carrying Fluc-int-UGA led to exclusively incorporation of *Trp* at the UGA PTC position.

UGA



**Figure 9:** At the mispaired wobble position 3, readthrough molecules allow insertion of either Trp, Arg or Cys specifically.

### 7.2 Function and structure of proteins restored by readthrough process

Promoted by readthrough process, the incorporation of an amino acid at the PTC position could induce the production of either a native protein or could lead to the production of a modified one (varying by only one amino acid). In the latter case, whether the stand-in amino acid permit to maintain the same activity and the stability of the newly expressed protein needs to be investigated.

It was previously shown that treatment with Gentamicin in order to correct nonsense mutations in the *CD18* gene responsible for Leukocyte adhesion deficiency 1 (LAD1), an inherited disorder of neutrophil functions, was able to increase the expression of entire proteins CD18. However, their function and subcellular localization were impaired *in vitro*, also abnormal adhesion and chemotactic functions were observed *in vivo* [112]. Those side effects were due to the replacement of Arg, the wild type codon, by Trp at the PTC position. Therapeutical approaches should therefore pay close attention to the possible codons transition.

### 7.3 Factors influencing readthrough efficacy

#### 7.3.1 The stop codon nature

*In vitro*, *in vivo* and clinical trials studies have been performed to evaluate the efficiency of readthrough molecules treatments on different PTC for many genetic disorders. However, various results were observed linked to several factors that impact the effectiveness of readthrough such as the PTC nature and nucleotide sequence surrounding it. [113]. It is crucial to underline that RT molecules do not have the same influence on all three PTC. Thus, it is well known that pharmacological drugs exposed



previously are able to correct the UGA PTC more efficiently than the UAG and UAA ones, with the proposed gradual intensity: UGA>UAG>UAA [114]. The stop codon UGA differs only by the wobble position with Trp (UGG) and Cys (UGC), which increases the chances of efficient readthrough with this codon.

### 7.3.2 The nucleotide context

Experimental results have shown that the identity of the nucleotide sequence upstream and downstream the PTC could influence the translation termination efficiency.

#### ➤ 3' context

The presence of a pyrimidine located in +4 position, right after the PTC (position 1 to 3), highly stimulates drugs readthrough capacity. Especially, the presence of a cytosine next to the stop codon UGA and UAA and a uracil next to the UAG stop codon enhance the RT efficacy [88].

At this position, a tetranucleotides hierarchy: C>A>G>U was observed, from the nucleotide allowing the highest readthrough levels to the lowest [104]. Several studies revealed that the consensus sequence CAA, either downstream or upstream the stop codon UAG could influence the efficiency of the readthrough process [115,116].

#### ➤ 5' context

In addition, it was also established that the vicinity of the 5' stop codon nucleotide context could impact the readthrough mechanism. Tork and collaborators hypothesized that the presence of two adjacent adenines (referred as position -2 and -1) upstream of the PTC (referred as position 1 to 3) could influence translation termination. To explain this phenomenon, it was hypothesized that the two A localized at -2 and -1 position of the ribosomal P site could directly bind the structural helix 44 of 18S rRNA which then would influence the incorporation of a tRNA at the A site [117].

Additionally, it has been reported that the presence of the two nucleotides upstream (uridine) and downstream (cytosine) at positions -1 and +4 respectively of the PTC carries a decisive role in the readthrough efficiency after treatment with gentamicin [118].

### 7.4 Readthrough of NTC

The important point that we would like to underline in the review is: How these readthrough molecules manage to distinguish (or differentiate) between a PTC and a native stop codon? Translation of PTC and NTC are two distinct mechanisms. Several hypotheses were made to explain how readthrough molecules were able to not hinder the physiological stop codon. The natural stop codon found near to the poly (A) binding protein (PABP) is associated with the 3'poly (A) tail of the mRNA, which facilitate its interaction with the release factor eRF3, stimulating the efficiency of translation termination.

However, the distance between PTC and the PABP protein decreases the interaction between PABP and eRF3, which makes their translation termination less efficient [119].

## 8 NMD Inhibitors

### 8.1 Different types of NMD inhibitors (NMDI)

In some cases, truncated protein synthesis could be sufficient to ensure partial or complete function of the wild-type protein. Thus, the inhibition of the NMD system could be beneficial to stabilize the amount of mRNA carrying a PTC and to increase the protein synthesized [120]. NMD system is not usually 100 % efficient, indeed, it has been reported that 5-25% of mRNA containing a PTC escaped the NMD [121]. A reduced NMD efficiency might influence the disease severity and thus potentially save the clinical phenotype as observed in Becker muscular dystrophy (BMD). In this case, a truncated form of the

dystrophin is still synthesized in insufficient quantity which gave a less severe phenotype than the one observed in DMD where the dystrophin protein is totally absent [122].

As describing previously, NMD undergoes phosphorylation/dephosphorylation cycle of UPF1. Based on this mechanism, NMD inhibitor molecules can be classified in multiple categories. Among others we can quote translation inhibitor, cytoskeleton disruptors and apoptosis inducers [123]. Here, we are going to focus on another category that can be sub-categories in NMDI : Acting on phosphorylation (Caffeine and Wortmannin) or on dephosphorylation (NMDI 1, NMDI 14). (Figure 10).

### 8.2 Molecules targeting the phosphorylation cycle

#### ➤ Caffeine and Wortmannin

Among NMD inhibitors, Caffeine and Wortmannin were investigated. Those molecules target the phosphorylation of hUPF1 through the inhibition of SMG1 kinase. Both compounds previously showed beneficial effects on fibroblasts from patients suffering from Ulrich's disease (congenital muscular dystrophy) carrying a PTC in the collagen IV gene, resulting in extracellular matrix defects in patients [124]. Inhibition of the NMD system by treatment with caffeine or wortmannin allowed to stabilize mRNA levels and to synthesize a truncated form of the protein of interest. Restoration of extracellular matrix were observed, however, their therapeutic uses were restricted due to their inhibiting activity of other kinases such as PIKKs, essential in DNA damage repair [125].

### 8.3 Molecules targeting dephosphorylation cycle

#### ➤ NMDI 1

NMDI 1 (Nonsense-Mediated mRNA Decay Inhibitor 1) was identified as the first small specific inhibitor of the NMD pathway. This molecule reduced the interaction between hSMG5 and hUPF1 [126] leading to hUPF1 hyperphosphorylation in P-bodies (eukaryote cytoplasmic structures containing some NMD factors). Unfortunately, the usefulness of NMDI 1 is limited since its chemical structure mimics DNA intercalating agents [127].

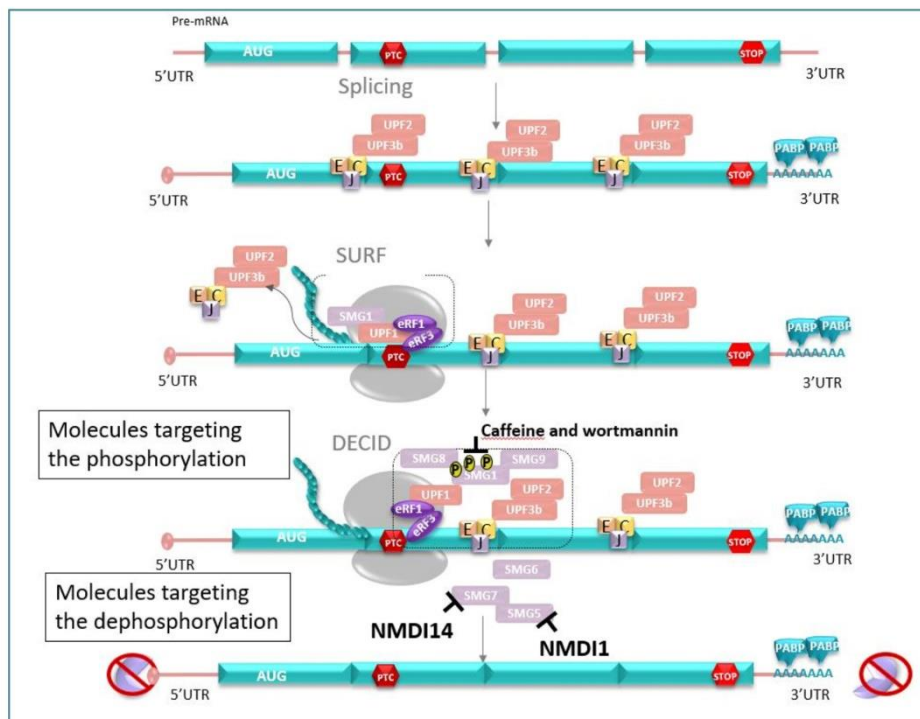
#### ➤ NMDI 14

A decade later, another NMD inhibitor, the NMDI 14, was discovered. This NMDI exhibited promising results in cancer cells containing a PTC in the *P53* gene, disrupting the interactions between UPF1 and SMG7 with low toxicity. [128]

#### ➤ Amlexanox

In order to unearth new NMDI, scientists developed cell lines able to artificially reproduce the NMD mechanism. On mRNA encoding the firefly luciferase, directed by NMD factors (one of the UPF protein) downstream of the NTC in its 3'UTR, causes the recognition of this NTC as a PTC inducing the degradation of mRNA by the NMD. This system enabled the identification among 1200 marketed drugs of a compound named Amlexanox (2-amino-7-isopropyl-5-oxo-5H-chromeno[2,3-b]pyridine-3-carboxylic acid). In this system, no cytotoxicity was reported with of this molecule employment [129].

Treatment at a concentration of 25  $\mu$ M of Amlexanox stabilized the amount of PTC containing mRNA. Truncated protein were awaited after treatment with this NMDI, however, full length protein of dystrophin, P53 and CFTR were surprisingly produced in several cellular models derived from patients with DMD, cancer and CF respectively [129]. Therefore, Amlexanox seems to bear the ability to both stabilize mRNA containing nonsense mutation and promote PTC readthrough. Recently, Amlexanox showed readthrough activity, in human cells harboring PTC mutation in *COL7A1*, from patients with RDEB [130]. However, the mechanism combining both effects in cells still remains unclear [131] [132].



**Figure 10** NMD inhibitors pathway. Molecules targeting the phosphorylation: Caffeine and Wortmannin inhibit SMG. Molecules targeting the dephosphorylation: NMDI 1 inhibits SMG5, and NMDI 14 inhibits SMG7.

916

917

918

#### 8.4 Limits of NMD inhibition

919

Additionally, to the quality control function of the NMD, this system also take part in the expression regulation of more than 10% of the transcriptome. Indeed, NMD plays a crucial role in the regulation of essential biological processes such as the embryonic development, homeostasis of the cell, cellular response to stress, regulation of the immune response and viral replication [133]. Therefore, treatment with NMDI could affect the expression of genes that are submitted to NMD transcriptomic regulation. In human cells subjected to depletion of hUPF1 or hUPF2 following NMDI treatment, transcriptomic microarrays analysis of physiological transcripts revealed an overexpression of 1.5 to 4.9% of the genes analyzed.

920

921

922

923

924

925

926

927

928

A comprehensible fear regarding the use of NMDI concerns its impact on natural NMD substrates. However, a recent study displayed some fairly encouraging results. They established that Amlexanox treatment did not affect the mRNA levels of three genes NAT9, TBL2, SC35 that is known to employ the NMD system to reduces the amount of its translated mRNA [129] [105].

929

930

931

932

933

#### 9 By itself, readthrough mechanism is insufficient

934

The cocktail associating readthrough molecules and NMD inhibitors could be an interesting strategy to treat patients with genetic diseases and cancer caused by non-sense mutations. Some molecules even display a therapeutic potential identified with the dual effect: NMD inhibition and PTC readthrough activation[71] [129]. Among them, G418 harbors a high readthrough efficiency and is also an NMDI activity. Recently, Amlexanox has also been reported as being able to promote PTC readthrough and to stabilize nonsense mRNAs on three different cell lines issued from patients with CF, DMD and

935

936

937

938

939

940

941

lung cancer [127]. Thus far, mechanism of action of molecules bearing this dual activity 942  
remains unclear. 943

## 10 Conclusion 944

Aminoglycosides were the first molecules to be identified as a readthrough inducer. 945  
Since, several studies have investigated possible new NMDI and/or readthrough activator 946  
that can correct nonsense mutations and thus partially or completely restore the protein 947  
of interest. These molecules have the potential to radically improve the treatment of many 948  
diseases linked to nonsense mutations, especially for disorders lacking therapeutic 949  
approaches (neurological diseases, cancer, rare genetic diseases). Better knowledge and 950  
understanding of molecular mechanisms that lies behind these strategies, and their 951  
variety of efficiencies according to the PTC are essential to target molecules that will be 952  
designed for personalized medicine. 953  
954

- References** 955
1. Frischmeyer, P.A.; Dietz, H.C. Nonsense-Mediated mRNA Decay in Health and Disease. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 1893–1900, doi:10.1093/hmg/8.10.1893. 956
  2. Peltz, S.W.; Morsy, M.; Welch, E.M.; Jacobson, A. Ataluren as an Agent for Therapeutic Nonsense Suppression. *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64*, 407–425, doi:10.1146/annurev-med-120611-144851. 957
  3. Lombardi, S.; Testa, M.F.; Pinotti, M.; Branchini, A. Molecular Insights into Determinants of Translational Readthrough and Implications for Nonsense Suppression Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, E9449, doi:10.3390/ijms21249449. 958
  4. Miressi, F.; Benslimane, N.; Favreau, F.; Rassat, M.; Richard, L.; Bourthoumieu, S.; Laroche, C.; Magy, L.; Magdelaine, C.; Sturtz, F.; et al. GDAPI Involvement in Mitochondrial Function and Oxidative Stress, Investigated in a Charcot-Marie-Tooth Model of HiPSCs-Derived Motor Neurons. *Biomedicines* **2021**, *9*, 945, doi:10.3390/biomedicines9080945. 959
  5. Pyromali, I.; Benslimane, N.; Favreau, F.; Goizet, C.; Lazaro, L.; Vitry, M.; Derouault, P.; Sturtz, F.; Magdelaine, C.; Lia, A.-S. From Negative to Positive Diagnosis: Structural Variation Could Be the Second Mutation You Are Looking for in a Recessive Autosomal Gene. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 212, doi:10.3390/jpm12020212. 960
  6. DiVincenzo, C.; Elzinga, C.D.; Medeiros, A.C.; Karbassi, I.; Jones, J.R.; Evans, M.C.; Braastad, C.D.; Bishop, C.M.; Jarekko, M.; Wang, Z.; et al. The Allelic Spectrum of Charcot-Marie-Tooth Disease in over 17,000 Individuals with Neuropathy. *Mol. Genet. Genomic Med.* **2014**, *2*, 522–529, doi:10.1002/mgg3.106. 961
  7. Bang, J.; Spina, S.; Miller, B.L. Non-Alzheimer’s Dementia 1. *Lancet Lond. Engl.* **2015**, *386*, 1672–1682, doi:10.1016/S0140-6736(15)00461-4. 962
  8. Takada, L.T. The Genetics of Monogenic Frontotemporal Dementia. *Dement. Neuropsychol.* **2015**, *9*, 219–229, doi:10.1590/1980-57642015DN93000003. 963
  9. Gass, J.; Cannon, A.; Mackenzie, I.R.; Boeve, B.; Baker, M.; Adamson, J.; Crook, R.; Melquist, S.; Kuntz, K.; Petersen, R.; et al. Mutations in Progranulin Are a Major Cause of Ubiquitin-Positive Frontotemporal Lobar Degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 2988–3001, doi:10.1093/hmg/ddl241. 964
  10. Mühlemann, O.; Eberle, A.; Stalder, L.; Orozco, R. Recognition and Elimination of Nonsense mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1779*, 538–549, doi:10.1016/j.bbagr.2008.06.012. 965
  11. Mort, M.; Ivanov, D.; Cooper, D.N.; Chuzhanova, N.A. A Meta-Analysis of Nonsense Mutations Causing Human Genetic Disease. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 1037–1047, doi:10.1002/humu.20763. 966
  12. Atkinson, J.; Martin, R. Mutations to Nonsense Codons in Human Genetic Disease: Implications for Gene Therapy by Nonsense Suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 1327–1334. 967
  13. Lynch, M.; Kewalramani, A. Messenger RNA Surveillance and the Evolutionary Proliferation of Introns. *Mol. Biol. Evol.* **2003**, *20*, 563–571, doi:10.1093/molbev/msg068. 968
  14. Green, R.E.; Lewis, B.P.; Hillman, R.T.; Blanchette, M.; Lareau, L.F.; Garnett, A.T.; Rio, D.C.; Brenner, S.E. Widespread Predicted Nonsense-Mediated mRNA Decay of Alternatively-Spliced Transcripts of Human Normal and Disease Genes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2003**, *19 Suppl 1*, i118–121, doi:10.1093/bioinformatics/btg1015. 969
  15. Morais, P.; Adachi, H.; Yu, Y.-T. Suppression of Nonsense Mutations by New Emerging Technologies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, E4394, doi:10.3390/ijms21124394. 970
  16. Lee, H.-L.R.; Dougherty, J.P. Pharmaceutical Therapies to Recode Nonsense Mutations in Inherited Diseases. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *136*, 227–266, doi:10.1016/j.pharmthera.2012.07.007. 971
  17. Ivanov, P.V.; Gehring, N.H.; Kunz, J.B.; Hentze, M.W.; Kulozik, A.E. Interactions between UPF1, ERFs, PABP and the Exon Junction Complex Suggest an Integrated Model for Mammalian NMD Pathways. *EMBO J.* **2008**, *27*, 736–747, doi:10.1038/emboj.2008.17. 972
  18. Guissart, C.; Mouzat, K.; Kantar, J.; Louveau, B.; Vilquin, P.; Polge, A.; Raoul, C.; Lombroso, S. Premature Termination Codons in SOD1 Causing Amyotrophic Lateral Sclerosis Are Predicted to Escape the Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 20738, doi:10.1038/s41598-020-77716-5. 973

19. Sylvain, V.; Lafarge, S.; Bignon, Y.-J. Dominant-Negative Activity of a Brcal Truncation Mutant: Effects on Proliferation, Tumorigenicity in Vivo, and Chemosensitivity in a Mouse Ovarian Cancer Cell Line. *Int. J. Oncol.* **2002**, doi:10.3892/ijo.20.4.845. 1006–1008
20. Inoue, K.; Khajavi, M.; Ohyama, T.; Hirabayashi, S.; Wilson, J.; Reggin, J.D.; Mancias, P.; Butler, I.J.; Wilkinson, M.F.; Wegner, M.; et al. Molecular Mechanism for Distinct Neurological Phenotypes Conveyed by Allelic Truncating Mutations. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 361–369, doi:10.1038/ng1322. 1009–1011
21. Wolf, C.; Pouya, A.; Bitar, S.; Pfeiffer, A.; Bueno, D.; Rojas-Charry, L.; Arndt, S.; Gomez-Zepeda, D.; Tenzer, S.; Bello, F.D.; et al. GDAP1 Loss of Function Inhibits the Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Complex by Altering the Actin Cytoskeleton. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 1–15, doi:10.1038/s42003-022-03487-6. 1012–1015
22. Barneo-Muñoz, M.; Juárez, P.; Civera-Tregón, A.; Yndriago, L.; Pla-Martin, D.; Zenker, J.; Cuevas-Martín, C.; Estela, A.; Sánchez-Aragó, M.; Forteza-Vila, J.; et al. Lack of GDAP1 Induces Neuronal Calcium and Mitochondrial Defects in a Knockout Mouse Model of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005115, doi:10.1371/journal.pgen.1005115. 1016–1019
23. Melero, R.; Buchwald, G.; Castaño, R.; Raabe, M.; Gil, D.; Lázaro, M.; Urlaub, H.; Conti, E.; Llorca, O. The Cryo-EM Structure of the UPF-EJC Complex Shows UPF1 Poised toward the RNA 3' End. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 498–505, S1-2, doi:10.1038/nsmb.2287. 1020–1022
24. Le Hir, H.; Izaurralde, E.; Maquat, L.E.; Moore, M.J. The Spliceosome Deposits Multiple Proteins 20–24 Nucleotides Upstream of mRNA Exon-Exon Junctions. *EMBO J.* **2000**, *19*, 6860–6869, doi:10.1093/emboj/19.24.6860. 1023–1025
25. Lejeune, F.; Li, X.; Maquat, L.E. Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells Involves Decapping, Deadenylation, and Exonucleolytic Activities. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 675–687, doi:10.1016/s1097-2765(03)00349-6. 1026–1028
26. Lewis, B.P.; Green, R.E.; Brenner, S.E. Evidence for the Widespread Coupling of Alternative Splicing and Nonsense-Mediated mRNA Decay in Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 189–192, doi:10.1073/pnas.0136770100. 1029–1031
27. Bhattacharya, A.; Czaplinski, K.; Trifillis, P.; He, F.; Jacobson, A.; Peltz, S.W. Characterization of the Biochemical Properties of the Human Upf1 Gene Product That Is Involved in Nonsense-Mediated mRNA Decay. *RNA N. Y. N* **2000**, *6*, 1226–1235, doi:10.1017/s1355838200000546. 1032–1034
28. Schweingruber, C.; Rufener, S.C.; Zünd, D.; Yamashita, A.; Mühlemann, O. Nonsense-Mediated mRNA Decay - Mechanisms of Substrate mRNA Recognition and Degradation in Mammalian Cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1829*, 612–623, doi:10.1016/j.bbtagm.2013.02.005. 1035–1037
29. Losson, R.; Lacroute, F. Interference of Nonsense Mutations with Eukaryotic Messenger RNA Stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 5134–5137, doi:10.1073/pnas.76.10.5134. 1038–1039
30. Chakrabarti, S.; Jayachandran, U.; Bonneau, F.; Fiorini, F.; Basquin, C.; Domcke, S.; Le Hir, H.; Conti, E. Molecular Mechanisms for the RNA-Dependent ATPase Activity of Upf1 and Its Regulation by Upf2. *Mol. Cell* **2011**, *41*, 693–703, doi:10.1016/j.molcel.2011.02.010. 1040–1042
31. Singh, G.; Rebbapragada, I.; Lykke-Andersen, J. A Competition between Stimulators and Antagonists of Upf Complex Recruitment Governs Human Nonsense-Mediated mRNA Decay. *PLOS Biol.* **2008**, *6*, e111, doi:10.1371/journal.pbio.0060111. 1043–1045
32. Raimondeau, E.; Bufton, J.C.; Schaffitzel, C. New Insights into the Interplay between the Translation Machinery and Nonsense-Mediated mRNA Decay Factors. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 503–512, doi:10.1042/BST20170427. 1046–1048
33. Kashima, I.; Yamashita, A.; Izumi, N.; Kataoka, N.; Morishita, R.; Hoshino, S.; Ohno, M.; Dreyfuss, G.; Ohno, S. Binding of a Novel SMG-1-Upf1-ERF1-ERF3 Complex (SURF) to the Exon Junction Complex Triggers Upf1 Phosphorylation and Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 355–367, doi:10.1101/gad.1389006. 1050–1052
34. Yamashita, A.; Ohnishi, T.; Kashima, I.; Taya, Y.; Ohno, S. Human SMG-1, a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Protein Kinase, Associates with Components of the mRNA Surveillance Complex and Is Involved in the Regulation of Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2215–2228, doi:10.1101/gad.913001. 1053–1055



35. Boehm, V.; Kueckelmann, S.; Gerbracht, J.V.; Kallabis, S.; Britto-Borges, T.; Altmüller, J.; Krüger, M.; Dieterich, C.; Gehring, N.H. SMG5-SMG7 Authorize Nonsense-Mediated mRNA Decay by Enabling SMG6 Endonucleolytic Activity. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3965, doi:10.1038/s41467-021-24046-3. 1057-1058-1059-1060
36. Dabrowski, M.; Bukowy-Bieryllo, Z.; Zietkiewicz, E. Translational Readthrough Potential of Natural Termination Codons in Eucaryotes – The Impact of RNA Sequence. *RNA Biol.* **2015**, *12*, 950–958, doi:10.1080/15476286.2015.1068497. 1061-1062-1063
37. Benhabiles, H.; Gonzalez-Hilarion, S.; Amand, S.; Bailly, C.; Prévotat, A.; Reix, P.; Hubert, D.; Adriaenssens, E.; Rebuffat, S.; Tulasne, D.; et al. Optimized Approach for the Identification of Highly Efficient Correctors of Nonsense Mutations in Human Diseases. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0187930, doi:10.1371/journal.pone.0187930. 1064-1065-1066-1067
38. Firth, A.E.; Brierley, I. Non-Canonical Translation in RNA Viruses. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 1385–1409, doi:10.1099/vir.0.042499-0. 1068-1069
39. Williams, I.; Richardson, J.; Starkey, A.; Stansfield, I. Genome-Wide Prediction of Stop Codon Readthrough during Translation in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 6605–6616, doi:10.1093/nar/gkh1004. 1070-1071-1072
40. Yamaguchi, Y.; Hayashi, A.; Campagnoni, C.W.; Kimura, A.; Inuzuka, T.; Baba, H. L-MPZ, a Novel Isoform of Myelin P0, Is Produced by Stop Codon Readthrough. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 17765–17776, doi:10.1074/jbc.M111.314468. 1073-1074-1075
41. Roy, B.; Friesen, W.J.; Tomizawa, Y.; Leszyk, J.D.; Zhuo, J.; Johnson, B.; Dakka, J.; Trotta, C.R.; Xue, X.; Mutyam, V.; et al. Ataluren Stimulates Ribosomal Selection of Near-Cognate TRNAs to Promote Nonsense Suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 12508–12513, doi:10.1073/pnas.1605336113. 1076-1077-1078-1079
42. Schatz, A.; Bugle, E.; Waksman, S.A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.\*†. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1944**, *55*, 66–69, doi:10.3181/00379727-55-14461. 1080-1081-1082
43. Obrecht, D.; Bernardini, F.; Dale, G.; Dembowski, K. Chapter 15 - Emerging New Therapeutics Against Key Gram-Negative Pathogens. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Macor, J.E., Ed.; Academic Press, 2011; Vol. 46, pp. 245–262. 1083-1084-1085
44. Krause, K.M.; Serio, A.W.; Kane, T.R.; Connolly, L.E. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a027029, doi:10.1101/cshperspect.a027029. 1086-1087
45. Chittapragada, M.; Roberts, S.; Ham, Y.W. Aminoglycosides: Molecular Insights on the Recognition of RNA and Aminoglycoside Mimics. *Perspect. Med. Chem.* **2009**, *3*, 21–37. 1088-1089
46. Wang, G.; Inaoka, T.; Okamoto, S.; Ochi, K. A Novel Insertion Mutation in *Streptomyces Coelicolor* Ribosomal S12 Protein Results in Paromomycin Resistance and Antibiotic Overproduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1019–1026, doi:10.1128/AAC.00388-08. 1090-1091-1092
47. Borovinskaya, M.A.; Pai, R.D.; Zhang, W.; Schuwirth, B.S.; Holton, J.M.; Hirokawa, G.; Kaji, H.; Kaji, A.; Cate, J.H.D. Structural Basis for Aminoglycoside Inhibition of Bacterial Ribosome Recycling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 727–732, doi:10.1038/nsmb1271. 1093-1094-1095
48. Lynch, S.R.; Gonzalez, R.L.; Puglisi, J.D. Comparison of X-Ray Crystal Structure of the 30S Subunit-Antibiotic Complex with NMR Structure of Decoding Site Oligonucleotide-Paromomycin Complex. *Structure* **2003**, *11*, 43–53, doi:10.1016/S0969-2126(02)00934-6. 1096-1097-1098
49. Fourmy, D.; Yoshizawa, S.; Puglisi, J.D. Paromomycin Binding Induces a Local Conformational Change in the A-Site of 16 s rRNA Edited by I. Tinoco. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 333–345, doi:10.1006/jmbi.1997.1551. 1099-1100-1101
50. Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of Paromomycin Docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A Site. *Structure* **2001**, *9*, 647–658, doi:10.1016/S0969-2126(01)00629-3. 1102-1103
51. Carter, A.P.; Clemons, W.M.; Brodersen, D.E.; Morgan-Warren, R.J.; Wimberly, B.T.; Ramakrishnan, V. Functional Insights from the Structure of the 30S Ribosomal Subunit and Its Interactions with Antibiotics. *Nature* **2000**, *407*, 340–348, doi:10.1038/35030019. 1104-1105-1106

52. Yusupova, G.; Prokhorova, I.; Altman, R.; Djumagulov, M.; Shrestha, J.; Urzhumtsev, A.; Ferguson, A.; Chang, C.-W.T.; Yusupov, M.; Blanchard, S. Aminoglycoside Interactions and Impacts on the Eukaryotic Ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, E10899–E10908, doi:10.1073/pnas.1715501114. 1107–1110
53. Hermann, T. Aminoglycoside Antibiotics: Old Drugs and New Therapeutic Approaches. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2007**, *64*, 1841–1852, doi:10.1007/s00018-007-7034-x. 1111–1112
54. Burke, J.; Mogg, A. Suppression of a Nonsense Mutation in Mammalian Cells in Vivo by the Aminoglycoside Anthiotics G-418 and Paromomycin. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 6265–6272, doi:10.1093/nar/13.17.6265. 1113–1115
55. Lai, C.-H.; Chun, H.H.; Nahas, S.A.; Mitui, M.; Gamo, K.M.; Du, L.; Gatti, R.A. Correction of ATM Gene Function by Aminoglycoside-Induced Read-through of Premature Termination Codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 15676–15681, doi:10.1073/pnas.0405155101. 1116–1118
56. Barton-Davis, E.R.; Cordier, L.; Shoturma, D.I.; Leland, S.E.; Sweeney, H.L. Aminoglycoside Antibiotics Restore Dystrophin Function to Skeletal Muscles of Mdx Mice. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 375–381, doi:10.1172/JCI7866. 1119–1121
57. Dunant, P.; Walter, M.C.; Karpati, G.; Lochmüller, H. Gentamicin Fails to Increase Dystrophin Expression in Dystrophin-Deficient Muscle. *Muscle Nerve* **2003**, *27*, 624–627, doi:10.1002/mus.10341. 1122–1123
58. Du, M.; Jones, J.R.; Lanier, J.; Keeling, K.M.; Lindsey, J.R.; Tousson, A.; Bebök, Z.; Whitsett, J.A.; Dey, C.R.; Colledge, W.H.; et al. Aminoglycoside Suppression of a Premature Stop Mutation in a Cftr-/- Mouse Carrying a Human CFTR-G542X Transgene. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **2002**, *80*, 595–604, doi:10.1007/s00109-002-0363-1. 1124–1127
59. Wilschanski, M.; Famini, C.; Blau, H.; Rivlin, J.; Augarten, A.; Avital, A.; Kerem, B.; Kerem, E. A Pilot Study of the Effect of Gentamicin on Nasal Potential Difference Measurements in Cystic Fibrosis Patients Carrying Stop Mutations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, 860–865, doi:10.1164/ajrccm.161.3.9904116. 1128–1131
60. Clancy, J.P.; Bebök, Z.; Ruiz, F.; King, C.; Jones, J.; Walker, L.; Greer, H.; Hong, J.; Wing, L.; Macaluso, M.; et al. Evidence That Systemic Gentamicin Suppresses Premature Stop Mutations in Patients with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *163*, 1683–1692, doi:10.1164/ajrccm.163.7.2004001. 1132–1135
61. Wilschanski, M.; Yahav, Y.; Yaacov, Y.; Blau, H.; Bentur, L.; Rivlin, J.; Aviram, M.; Bdolah-Abram, T.; Bebok, Z.; Shushi, L.; et al. Gentamicin-Induced Correction of CFTR Function in Patients with Cystic Fibrosis and CFTR Stop Mutations. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1433–1441, doi:10.1056/NEJMoa022170. 1136–1139
62. Wagner, K.R.; Hamed, S.; Hadley, D.W.; Gropman, A.L.; Burstein, A.H.; Escolar, D.M.; Hoffman, E.P.; Fischbeck, K.H. Gentamicin Treatment of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Due to Nonsense Mutations. *Ann. Neurol.* **2001**, *49*, 706–711. 1140–1142
63. Malik, V.; Rodino-Klapac, L.R.; Viollet, L.; Wall, C.; King, W.; Al-Dahhak, R.; Lewis, S.; Shilling, C.J.; Kota, J.; Serrano-Munuera, C.; et al. Gentamicin-Induced Readthrough of Stop Codons in Duchenne Muscular Dystrophy. *Ann. Neurol.* **2010**, *67*, 771–780, doi:10.1002/ana.22024. 1143–1145
64. Woodley, D.T.; Cogan, J.; Hou, Y.; Lyu, C.; Marinkovich, M.P.; Keene, D.; Chen, M. Gentamicin Induces Functional Type VII Collagen in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Patients. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 3028–3038, doi:10.1172/JCI92707. 1146–1148
65. Guthrie, O.W. Aminoglycoside Induced Ototoxicity. *Toxicology* **2008**, *249*, 91–96, doi:10.1016/j.tox.2008.04.015. 1149–1150
66. Wargo, K.A.; Edwards, J.D. Aminoglycoside-Induced Nephrotoxicity. *J. Pharm. Pract.* **2014**, *27*, 573–577, doi:10.1177/0897190014546836. 1151–1152
67. Fu, X.; Wan, P.; Li, P.; Wang, J.; Guo, S.; Zhang, Y.; An, Y.; Ye, C.; Liu, Z.; Gao, J.; et al. Mechanism and Prevention of Ototoxicity Induced by Aminoglycosides. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*. 1153–1154
68. Laurent, G.; Rollman, B. MECHANISM OF AMINOGLYCOSIDE-INDUCED LYSOSOMAL PHOSPHOLIPIDOSIS: IN VITRO AND IN VIVO STUDIES WITH GENTAMICIN AND AMIKACIN. *10*. 1155–1156



69. Sha, S.H.; Schacht, J. Stimulation of Free Radical Formation by Aminoglycoside Antibiotics. *Hear. Res.* **1999**, *128*, 112–118, doi:10.1016/s0378-5955(98)00200-7. 1158  
1159
70. Vicens, Q.; Westhof, E. RNA as a Drug Target: The Case of Aminoglycosides. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2003**, *4*, 1018–1023, doi:10.1002/cbic.200300684. 1160  
1161
71. Baradaran-Heravi, A.; Balgi, A.D.; Zimmerman, C.; Choi, K.; Shidmoosavee, F.S.; Tan, J.S.; Bergeaud, C.; Krause, A.; Flibotte, S.; Shimizu, Y.; et al. Novel Small Molecules Potentiate Premature Termination Codon Readthrough by Aminoglycosides. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 6583–6598, doi:10.1093/nar/gkw638. 1162  
1163  
1164  
1165
72. Hosseini-Farahabadi, S.; Baradaran-Heravi, A.; Zimmerman, C.; Choi, K.; Flibotte, S.; Roberge, M. Small Molecule Y-320 Stimulates Ribosome Biogenesis, Protein Synthesis, and Aminoglycoside-Induced Premature Termination Codon Readthrough. *PLoS Biol.* **2021**, *19*, e3001221, doi:10.1371/journal.pbio.3001221. 1166  
1167  
1168  
1169
73. Nudelman, I.; Glikin, D.; Smolkin, B.; Hainrichson, M.; Belakhov, V.; Baasov, T. Repairing Faulty Genes by Aminoglycosides: Development of New Derivatives of Geneticin (G418) with Enhanced Suppression of Diseases-Causing Nonsense Mutations. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3735–3746, doi:10.1016/j.bmc.2010.03.060. 1170  
1171  
1172  
1173
74. Bidou, L.; Bugaud, O.; Belakhov, V.; Baasov, T.; Namy, O. Characterization of New-Generation Aminoglycoside Promoting Premature Termination Codon Readthrough in Cancer Cells. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 378–388, doi:10.1080/15476286.2017.1285480. 1174  
1175  
1176
75. Kandasamy, J.; Atia-Glikin, D.; Shulman, E.; Shapira, K.; Shavit, M.; Belakhov, V.; Baasov, T. Increased Selectivity toward Cytoplasmic versus Mitochondrial Ribosome Confers Improved Efficiency of Synthetic Aminoglycosides in Fixing Damaged Genes: A Strategy for Treatment of Genetic Diseases Caused by Nonsense Mutations. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10630–10643, doi:10.1021/jm3012992. 1177  
1178  
1179  
1180  
1181
76. Mattis, V.B.; Ebert, A.D.; Fosso, M.Y.; Chang, C.-W.; Lorson, C.L. Delivery of a Read-through Inducing Compound, TC007, Lessens the Severity of a Spinal Muscular Atrophy Animal Model. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 3906–3913, doi:10.1093/hmg/ddp333. 1182  
1183  
1184
77. Nudelman, I.; Rebibo-Sabbah, A.; Shallom-Shezifi, D.; Hainrichson, M.; Stahl, I.; Ben-Yosef, T.; Baasov, T. Redesign of Aminoglycosides for Treatment of Human Genetic Diseases Caused by Premature Stop Mutations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 6310–6315, doi:10.1016/j.bmcl.2006.09.013. 1185  
1186  
1187  
1188
78. Sabbavarapu, N.M.; Shavit, M.; Degani, Y.; Smolkin, B.; Belakhov, V.; Baasov, T. Design of Novel Aminoglycoside Derivatives with Enhanced Suppression of Diseases-Causing Nonsense Mutations. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 418–423, doi:10.1021/acsmchemlett.6b00006. 1189  
1190  
1191
79. Goldmann, T.; Rebibo-Sabbah, A.; Overlack, N.; Nudelman, I.; Belakhov, V.; Baasov, T.; Ben-Yosef, T.; Wolfrum, U.; Nagel-Wolfrum, K. Beneficial Read-Through of a USH1C Nonsense Mutation by Designed Aminoglycoside NB30 in the Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, *51*, 6671–6680, doi:10.1167/iovs.10-5741. 1192  
1193  
1194  
1195
80. Nudelman, I.; Rebibo-Sabbah, A.; Cherniavsky, M.; Belakhov, V.; Hainrichson, M.; Chen, F.; Schacht, J.; Pilch, D.S.; Ben-Yosef, T.; Baasov, T. Development of Novel Aminoglycoside (NB54) with Reduced Toxicity and Enhanced Suppression of Disease-Causing Premature Stop Mutations. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2836–2845, doi:10.1021/jm801640k. 1196  
1197  
1198  
1199
81. Xue, X.; Mutyam, V.; Tang, L.; Biswas, S.; Du, M.; Jackson, L.A.; Dai, Y.; Belakhov, V.; Shalev, M.; Chen, F.; et al. Synthetic Aminoglycosides Efficiently Suppress Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Nonsense Mutations and Are Enhanced by Ivacaftor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2014**, *50*, 805–816, doi:10.1165/rcmb.2013-0282OC. 1200  
1201  
1202  
1203
82. Goldmann, T.; Overlack, N.; Möller, F.; Belakhov, V.; van Wyk, M.; Baasov, T.; Wolfrum, U.; Nagel-Wolfrum, K. A Comparative Evaluation of NB30, NB54 and PTC124 in Translational Read-through Efficacy for Treatment of an USH1C Nonsense Mutation. *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 1186–1199, doi:10.1002/emmm.201201438. 1204  
1205  
1206  
1207

83. Kerem, E. ELX-02: An Investigational Read-through Agent for the Treatment of Nonsense Mutation-Related Genetic Disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2020**, *29*, 1347–1354, doi:10.1080/13543784.2020.1828862. 1208  
1209
84. Crawford, D.K.; Alroy, I.; Sharpe, N.; Goddeeris, M.M.; Williams, G. ELX-02 Generates Protein via Premature Stop Codon Read-Through without Inducing Native Stop Codon Read-Through Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2020**, *374*, 264–272, doi:10.1124/jpet.120.265595. 1211  
1212  
1213
85. Leubitz, A.; Frydman-Marom, A.; Sharpe, N.; van Duzer, J.; Campbell, K.C.M.; Vanhoutte, F. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single Ascending Doses of ELX-02, a Potential Treatment for Genetic Disorders Caused by Nonsense Mutations, in Healthy Volunteers. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **2019**, *8*, 984–994, doi:10.1002/cpdd.647. 1214  
1215  
1216  
1217
86. Welch, E.M.; Barton, E.R.; Zhuo, J.; Tomizawa, Y.; Friesen, W.J.; Trifillis, P.; Paushkin, S.; Patel, M.; Trotta, C.R.; Hwang, S.; et al. PTC124 Targets Genetic Disorders Caused by Nonsense Mutations. *Nature* **2007**, *447*, 87–91, doi:10.1038/nature05756. 1218  
1219  
1220
87. Huang, S.; Bhattacharya, A.; Ghelfi, M.D.; Li, H.; Fritsch, C.; Chenoweth, D.M.; Goldman, Y.E.; Cooperman, B.S. Ataluren Binds to Multiple Protein Synthesis Apparatus Sites and Competitively Inhibits Release Factor-Dependent Termination. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 2413, doi:10.1038/s41467-022-30080-6. 1221  
1222  
1223  
1224
88. Beznosková, P.; Cuchalová, L.; Wagner, S.; Shoemaker, C.J.; Gunišová, S.; von der Haar, T.; Valášek, L.S. Translation Initiation Factors EIF3 and HCR1 Control Translation Termination and Stop Codon Read-Through in Yeast Cells. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003962, doi:10.1371/journal.pgen.1003962. 1225  
1226  
1227
89. Samanta, A.; Stingl, K.; Kohl, S.; Ries, J.; Linnert, J.; Nagel-Wolfrum, K. Ataluren for the Treatment of Usher Syndrome 2A Caused by Nonsense Mutations. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6274, doi:10.3390/ijms20246274. 1228  
1229  
1230
90. Berger, J.; Li, M.; Berger, S.; Meilak, M.; Rientjes, J.; Currie, P.D. Effect of Ataluren on Dystrophin Mutations. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 6680, doi:10.1111/jcmm.15319. 1231  
1232
91. M, D.; X, L.; Em, W.; S, H.; Sw, P.; Dm, B. PTC124 Is an Orally Bioavailable Compound That Promotes Suppression of the Human CFTR-G542X Nonsense Allele in a CF Mouse Model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, doi:10.1073/pnas.0711795105. 1233  
1234  
1235
92. Miller, J.N.; Kovács, A.D.; Pearce, D.A. The Novel ClnR151X Mouse Model of Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (INCL) for Testing Nonsense Suppression Therapy. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 185–196, doi:10.1093/hmg/ddu428. 1236  
1237  
1238
93. Guglieri, M.; Bushby, K. Molecular Treatments in Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 331–337, doi:10.1016/j.coph.2010.03.005. 1239  
1240
94. McDonald, C.M.; Campbell, C.; Torricelli, R.E.; Finkel, R.S.; Flanigan, K.M.; Goemans, N.; Heydemann, P.; Kaminska, A.; Kirschner, J.; Muntoni, F.; et al. Ataluren in Patients with Nonsense Mutation Duchenne Muscular Dystrophy (ACT DMD): A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *The Lancet* **2017**, *390*, 1489–1498, doi:10.1016/S0140-6736(17)31611-2. 1241  
1242  
1243  
1244  
1245
95. Kerem, E.; Konstan, M.W.; De Boeck, K.; Accurso, F.J.; Sermet-Gaudelus, I.; Wilschanski, M.; Elborn, J.S.; Melotti, P.; Bronsveld, I.; Fajac, I.; et al. Ataluren for the Treatment of Nonsense-Mutation Cystic Fibrosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Trial. *Lancet Respir. Med.* **2014**, *2*, 539–547, doi:10.1016/S2213-2600(14)70100-6. 1246  
1247  
1248  
1249
96. Walker, S.; Flume, P.; McNamara, J.; Solomon, M.; Chilvers, M.; Chmiel, J.; Harris, R.S.; Haseltine, E.; Stiles, D.; Li, C.; et al. A Phase 3 Study of Tezacaftor in Combination with Ivacaftor in Children Aged 6 through 11 years with Cystic Fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **2019**, *18*, 708–713, doi:10.1016/j.jcf.2019.06.009. 1250  
1251  
1252  
1253
97. Translarna-Epar-Product-Information\_en.Pdf. 1254
98. Ryan, N.J. Ataluren: First Global Approval. *Drugs* **2014**, *74*, 1709–1714, doi:10.1007/s40265-014-0287-4. 1255  
1256

99. Auld, D.S.; Thorne, N.; Maguire, W.F.; Inglese, J. Mechanism of PTC124 Activity in Cell-Based Luciferase Assays of Nonsense Codon Suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 3585–3590, doi:10.1073/pnas.0813345106. 1257–1259
100. Moosajee, M.; Tracey-White, D.; Smart, M.; Weetall, M.; Torriano, S.; Kalatzis, V.; da Cruz, L.; Coffey, P.; Webster, A.R.; Welch, E. Functional Rescue of REP1 Following Treatment with PTC124 and Novel Derivative PTC-414 in Human Choroideremia Fibroblasts and the Nonsense-Mediated Zebrafish Model. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 3416–3431, doi:10.1093/hmg/ddw184. 1260–1263
101. Du, L.; Damoiseaux, R.; Nahas, S.; Gao, K.; Hu, H.; Pollard, J.M.; Goldstine, J.; Jung, M.E.; Henning, S.M.; Bertoni, C.; et al. Nonaminoglycoside Compounds Induce Readthrough of Nonsense Mutations. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2285–2297, doi:10.1084/jem.20081940. 1264–1266
102. Kayali, R.; Ku, J.-M.; Khitrov, G.; Jung, M.E.; Prikhodko, O.; Bertoni, C. Read-through Compound 13 Restores Dystrophin Expression and Improves Muscle Function in the Mdx Mouse Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 4007–4020, doi:10.1093/hmg/dds223. 1267–1269
103. Du, L.; Jung, M.E.; Damoiseaux, R.; Completo, G.; Fike, F.; Ku, J.-M.; Nahas, S.; Piao, C.; Hu, H.; Gatti, R.A. A New Series of Small Molecular Weight Compounds Induce Read through of All Three Types of Nonsense Mutations in the ATM Gene. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2013**, *21*, 1653–1660, doi:10.1038/mt.2013.150. 1270–1273
104. Ng, M.Y.; Li, H.; Ghelfi, M.D.; Goldman, Y.E.; Cooperman, B.S. Ataluren and Aminoglycosides Stimulate Read-through of Nonsense Codons by Orthogonal Mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, *118*, e2020599118, doi:10.1073/pnas.2020599118. 1274–1276
105. Viegas, M.H.; Gehring, N.H.; Breit, S.; Hentze, M.W.; Kulozik, A.E. The Abundance of RNPS1, a Protein Component of the Exon Junction Complex, Can Determine the Variability in Efficiency of the Nonsense Mediated Decay Pathway. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4542–4551, doi:10.1093/nar/gkm461. 1277–1280
106. Trzaska, C.; Amand, S.; Bailly, C.; Leroy, C.; Marchand, V.; Duvernois-Berthet, E.; Saliou, J.-M.; Benhabiles, H.; Werkmeister, E.; Chassat, T.; et al. 2,6-Diaminopurine as a Highly Potent Corrector of UGA Nonsense Mutations. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-15140-z. 1281–1283
107. England, C.G.; Ehlerding, E.B.; Cai, W. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 1175–1187, doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00112. 1284–1285
108. Sharma, J.; Du, M.; Wong, E.; Mutyam, V.; Li, Y.; Chen, J.; Wangen, J.; Thrasher, K.; Fu, L.; Peng, N.; et al. A Small Molecule That Induces Translational Readthrough of CFTR Nonsense Mutations by ERF1 Depletion. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-24575-x. 1286–1288
109. Huang, L.; Aghajan, M.; Quesenberry, T.; Low, A.; Murray, S.F.; Monia, B.P.; Guo, S. Targeting Translation Termination Machinery with Antisense Oligonucleotides for Diseases Caused by Nonsense Mutations. *Nucleic Acid Ther.* **2019**, *29*, 175–186, doi:10.1089/nat.2019.0779. 1289–1291
110. Blanchet, S.; Cornu, D.; Hatin, I.; Grosjean, H.; Bertin, P.; Namy, O. Deciphering the Reading of the Genetic Code by Near-Cognate tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, 3018–3023, doi:10.1073/pnas.1715578115. 1292–1294
111. Roy, B.; Leszyk, J.D.; Mangus, D.A.; Jacobson, A. Nonsense Suppression by Near-Cognate tRNAs Employs Alternative Base Pairing at Codon Positions 1 and 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 3038–3043, doi:10.1073/pnas.1424127112. 1295–1297
112. Simon, A.J.; Lev, A.; Wolach, B.; Gavrieli, R.; Amariglio, N.; Rosenthal, E.; Gazit, E.; Eyal, E.; Rechavi, G.; Somech, R. The Effect of Gentamicin-Induced Readthrough on a Novel Premature Termination Codon of CD18 Leukocyte Adhesion Deficiency Patients. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13659, doi:10.1371/journal.pone.0013659. 1299–1301
113. Bidou, L.; Hatin, I.; Perez, N.; Allamand, V.; Panthier, J.-J.; Rousset, J.-P. Premature Stop Codons Involved in Muscular Dystrophies Show a Broad Spectrum of Readthrough Efficiencies in Response to Gentamicin Treatment. *Gene Ther.* **2004**, *11*, 619–627, doi:10.1038/sj.gt.3302211. 1302–1304
114. Tate, W.P.; Poole, E.S.; Mannering, S.A. Hidden Infidelities of the Translational Stop Signal. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1996**, *52*, 293–335, doi:10.1016/s0079-6603(08)60970-8. 1305–1306

115. Cassan, M.; Rousset, J.-P. UAG Readthrough in Mammalian Cells: Effect of Upstream and Downstream Stop Codon Contexts Reveal Different Signals. *BMC Mol. Biol.* **2001**, *2*, 3, doi:10.1186/1471-2199-2-3. 1307–1309
116. Pelham, H.R. Leaky UAG Termination Codon in Tobacco Mosaic Virus RNA. *Nature* **1978**, *272*, 469–471, doi:10.1038/272469a0. 1310–1311
117. Tork, S.; Hatin, I.; Rousset, J.-P.; Fabret, C. The Major 5' Determinant in Stop Codon Read-through Involves Two Adjacent Adenines. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 415–421, doi:10.1093/nar/gkh201. 1312–1313
118. Floquet, C.; Hatin, I.; Rousset, J.-P.; Bidou, L. Statistical Analysis of Readthrough Levels for Nonsense Mutations in Mammalian Cells Reveals a Major Determinant of Response to Gentamicin. *PLOS Genet.* **2012**, *8*, e1002608, doi:10.1371/journal.pgen.1002608. 1314–1316
119. Ivanov, A.; Mikhailova, T.; Eliseev, B.; Yeramala, L.; Sokolova, E.; Susorov, D.; Shuvalov, A.; Schaffitzel, C.; Alkalaeva, E. PABP Enhances Release Factor Recruitment and Stop Codon Recognition during Translation Termination. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7766–7776, doi:10.1093/nar/gkw635. 1317–1319
120. Keeling, K.M.; Du, M.; Bedwell, D.M. *Therapies of Nonsense-Associated Diseases*; Landes Bioscience, 2013; 1320–1321
121. Stephenson, L.S.; Maquat, L.E. Cytoplasmic mRNA for Human Triosephosphate Isomerase Is Immune to Nonsense-Mediated Decay despite Forming Polysomes. *Biochimie* **1996**, *78*, 1043–1047, doi:10.1016/s0300-9084(97)86728-4. 1322–1324
122. Torella, A.; Zanolio, M.; Zeuli, R.; Del Vecchio Blanco, F.; Savarese, M.; Giugliano, T.; Garofalo, A.; Piluso, G.; Politano, L.; Nigro, V. The Position of Nonsense Mutations Can Predict the Phenotype Severity: A Survey on the DMD Gene. *PloS One* **2020**, *15*, e0237803, doi:10.1371/journal.pone.0237803. 1325–1328
123. Jia, J.; Werkmeister, E.; Gonzalez-Hilarion, S.; Leroy, C.; Gruenert, D.C.; Lafont, F.; Tulasne, D.; Lejeune, F. Premature Termination Codon Readthrough in Human Cells Occurs in Novel Cytoplasmic Foci and Requires UPF Proteins. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 3009–3022, doi:10.1242/jcs.198176. 1329–1331
124. Usuki, F.; Yamashita, A.; Higuchi, I.; Ohnishi, T.; Shiraishi, T.; Osame, M.; Ohno, S. Inhibition of Nonsense-Mediated mRNA Decay Rescues the Phenotype in Ullrich's Disease. *Ann. Neurol.* **2004**, *55*, 740–744, doi:10.1002/ana.20107. 1332–1334
125. Kuzmiak, H.A.; Maquat, L.E. Applying Nonsense-Mediated mRNA Decay Research to the Clinic: Progress and Challenges. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 306–316, doi:10.1016/j.molmed.2006.05.005. 1335–1336
126. Durand, S.; Cougot, N.; Mahuteau-Betzer, F.; Nguyen, C.-H.; Grierson, D.S.; Bertrand, E.; Tazi, J.; Lejeune, F. Inhibition of Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) by a New Chemical Molecule Reveals the Dynamic of NMD Factors in P-Bodies. *J. Cell Biol.* **2007**, *178*, 1145–1160, doi:10.1083/jcb.200611086. 1337–1340
127. Hendry, L.B.; Mahesh, V.B.; Bransome, E.D.; Ewing, D.E. Small Molecule Intercalation with Double Stranded DNA: Implications for Normal Gene Regulation and for Predicting the Biological Efficacy and Genotoxicity of Drugs and Other Chemicals. *Mutat. Res.* **2007**, *623*, 53–71, doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.03.009. 1341–1344
128. Martin, L.; Grigoryan, A.; Wang, D.; Wang, J.; Breda, L.; Rivella, S.; Cardozo, T.; Gardner, L.B. Identification and Characterization of Small Molecules That Inhibit Nonsense-Mediated RNA Decay and Suppress Nonsense P53 Mutations. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3104–3113, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2235. 1345–1348
129. Gonzalez-Hilarion, S.; Beghyn, T.; Jia, J.; Debreuck, N.; Berte, G.; Mamchaoui, K.; Mouly, V.; Gruenert, D.C.; Déprez, B.; Lejeune, F. Rescue of Nonsense Mutations by Amlexanox in Human Cells. *Orphanet J. Rare Dis.* **2012**, *7*, 58, doi:10.1186/1750-1172-7-58. 1349–1351
130. Atanasova, V.S.; Jiang, Q.; Prisco, M.; Gruber, C.; Piñón Hofbauer, J.; Chen, M.; Has, C.; Bruckner-Tuderman, L.; McGrath, J.A.; Uitto, J.; et al. Amlexanox Enhances Premature Termination Codon Read-Through in COL7A1 and Expression of Full Length Type VII Collagen: Potential Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **2017**, *137*, 1842–1849, doi:10.1016/j.jid.2017.05.011. 1352–1355

131. Ohguchi, Y.; Nomura, T.; Suzuki, S.; Takeda, M.; Miyauchi, T.; Mizuno, O.; Shinkuma, S.; Fujita, Y.; Nemoto, O.; Ono, K.; et al. Gentamicin-Induced Readthrough and Nonsense-Mediated mRNA Decay of SERPINB7 Nonsense Mutant Transcripts. *J. Invest. Dermatol.* **2018**, *138*, 836–843, doi:10.1016/j.jid.2017.10.014. 1357  
1358  
1359  
1360
132. Floquet, C.; Deforges, J.; Rousset, J.-P.; Bidou, L. Rescue of Non-Sense Mutated P53 Tumor Suppressor Gene by Aminoglycosides. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3350–3362, doi:10.1093/nar/gkq1277. 1361  
1362  
1363
133. Pawlicka, K.; Kalathiya, U.; Alfaro, J. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Pathologies and the Potential for Novel Therapeutics. *Cancers* **2020**, *12*, E765, doi:10.3390/cancers12030765. 1364  
1365  
1366

## *Article 2: GDAP1 Involvement in Mitochondrial Function and Oxidative Stress, Investigated in a Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived Motor Neurons*

---

### **Auteurs:**

Federica Miressi, Nesrine Benslimane, Frédéric Favreau, Marion Rassat, Laurence Richard, Sylvie Bourthoumieu, Cécile Laroche, Laurent Magy, Corinne Magdelaine, Franck Sturtz, Anne-Sophie Lia, and Pierre-Antoine Faye.

Article publié dans le journal «Biomedicines » le 02 Aout 2021

## Présentation résumée de l'article N°2

Des mutations dans le gène *GDAP1* ont été décrites comme étant responsables des formes démyélinisantes et axonales de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). La protéine GDAP1, est une protéine de la membrane externe mitochondriale exprimée principalement dans les cellules des nerfs périphériques, et notamment les motoneurones.

La protéine GDAP1 a récemment intégré la famille des Glutathion-S-transférases (GST). Certains aspects fonctionnels sur le rôle de *GDAP1* restent encore à explorer. Néanmoins, il semble que GDAP1 soit impliqué dans la fission mitochondriale, l'homéostasie du calcium, et le stress oxydant. Plus récemment, l'interaction de GDAP1 avec le réseau trans-Golgien, l'autophagie et la maturation des lysosomes a été proposée.

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques induits par la mutation STOP homozygote c.581C>G (p.Ser194\*) de *GDAP1*. Pour pouvoir évaluer ces mécanismes, l'équipe a acquis une technologie innovante basée sur les cellules souches induites à la pluripotence (iPSc). Les membres du laboratoire ont ainsi créé, à partir de fibroblastes humains d'individus sains et d'individus porteurs d'une mutation homozygote non-sens sur le gène *GDAP1* des iPSc. Ces iPSc ont été ensuite différenciées en progéniteurs neuronaux (PN) puis en motoneurones, utilisables pour l'étude des mécanismes physiopathologiques d'intérêt.

J'ai participé à la caractérisation de ce modèle, qui correspondait à la première étude fonctionnelle de motoneurones mutés sur *GDAP1* et issus de cellules iPSc humaines. Dans cette étude, l'analyse par RT-PCR a montré que, chez les contrôles, l'ARNm *GDAP1* est exprimé principalement dans les cellules neuronales (PN et motoneurone) comparé aux autres types cellulaires (fibroblastes, iPSc). Nous avons observé que, dans les motoneurones du patient, ce niveau d'ARNm est drastiquement réduit, probablement dégradé par le système de NMD. Les études morphologiques et fonctionnelles ont révélé dans les motoneurones issus de patient CMT

une diminution de la viabilité cellulaire associée à un dysfonctionnement lipidique et au développement d'un stress oxydant. La mitochondrie est un organite clé dans la génération du stress oxydant mais elle est aussi principalement impliquée dans le métabolisme énergétique. Ainsi, dans les motoneurones du patient CMT, des anomalies des crêtes mitochondriales ont été observées, même si aucun déficit de production d'ATP n'a été mis en évidence.

En conclusion, ce modèle cellulaire de motoneurones dérivées d'iPSc souligne le rôle de la mitochondrie et du stress oxydant dans la maladie de CMT.

Ces résultats ont démontrés que les cellules hiPS peuvent être un outil puissant pour recréer n'importe quel modèle cellulaire approprié à partir des cellules de patients porteurs de mutations. Les hiPSC se révèlent donc essentielles pour comprendre le rôle physiopathologique de la protéine altérée, mais aussi pour l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques.



Article

# GDAP1 Involvement in Mitochondrial Function and Oxidative Stress, Investigated in a Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived Motor Neurons

Federica Miressi <sup>1,\*</sup>, Nesrine Benslimane <sup>1</sup>, Frédéric Favreau <sup>1,2</sup>, Marion Rassat <sup>1</sup>, Laurence Richard <sup>1,3</sup>, Sylvie Bourthoumieu <sup>1,4</sup>, Cécile Laroche <sup>5,6</sup>, Laurent Magy <sup>1,3</sup>, Corinne Magdelaine <sup>1,2</sup>, Franck Sturtz <sup>1,2</sup>, Anne-Sophie Lia <sup>1,2,7,†</sup> and Pierre-Antoine Faye <sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup> Maintenance Myélinique et Neuropathies Périphériques, EA6309, University of Limoges, F-87000 Limoges, France; nesrine.benslimane@unilim.fr (N.B.); frederic.favreau@unilim.fr (F.F.); marion.rassat@gmail.com (M.R.); laurence.richard@unilim.fr (L.R.); sylvie.bourthoumieu@unilim.fr (S.B.); laurent.magy@unilim.fr (L.M.); corinne.magdelaine@unilim.fr (C.M.); franck.sturtz@unilim.fr (F.S.); anne-sophie.lia@unilim.fr (A.-S.L.); pierre-antoine.faye@unilim.fr (P.-A.F.)

<sup>2</sup> CHU Limoges, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France

<sup>3</sup> CHU Limoges, Service de Neurologie, F-87000 Limoges, France

<sup>4</sup> CHU Limoges, Service de Cytogénétique, F-87000 Limoges, France

<sup>5</sup> CHU Limoges, Service de Pédiatrie, F-87000 Limoges, France; cecile.laroche@chu-limoges.fr

<sup>6</sup> CHU Limoges, Centre de Compétence des Maladies Héritaires du Métabolisme, F-87000 Limoges, France

<sup>7</sup> CHU Limoges, Service de Bioinformatique, F-87000 Limoges, France

\* Correspondence: federica.miressi@unilim.fr

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Miressi, F.; Benslimane, N.; Favreau, F.; Rassat, M.; Richard, L.; Bourthoumieu, S.; Laroche, C.; Magy, L.; Magdelaine, C.; Sturtz, F.; et al. GDAP1 Involvement in Mitochondrial Function and Oxidative Stress, Investigated in a Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived Motor Neurons. *Biomedicines* **2021**, *9*, 945. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080945>

Academic Editor: M. Esther Gallardo

Received: 29 June 2021

Accepted: 29 July 2021

Published: 2 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Mutations in the ganglioside-induced differentiation associated protein 1 (*GDAP1*) gene have been associated with demyelinating and axonal forms of Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease, the most frequent hereditary peripheral neuropathy in humans. Previous studies reported the prevalent *GDAP1* expression in neural tissues and cells, from animal models. Here, we described the first *GDAP1* functional study on human induced-pluripotent stem cells (hiPSCs)-derived motor neurons, obtained from normal subjects and from a CMT2H patient, carrying the *GDAP1* homozygous c.581C>G (p.Ser194\*) mutation. At mRNA level, we observed that, in normal subjects, *GDAP1* is mainly expressed in motor neurons, while it is drastically reduced in the patient's cells containing a premature termination codon (PTC), probably degraded by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) system. Morphological and functional investigations revealed in the CMT patient's motor neurons a decrease of cell viability associated to lipid dysfunction and oxidative stress development. Mitochondrion is a key organelle in oxidative stress generation, but it is also mainly involved in energetic metabolism. Thus, in the CMT patient's motor neurons, mitochondrial cristae defects were observed, even if no deficit in ATP production emerged. This cellular model of hiPSCs-derived motor neurons underlines the role of mitochondrion and oxidative stress in CMT disease and paves the way for new treatment evaluation.

**Keywords:** CMT disease; *GDAP1*; hiPSCs; motor neurons; mitochondria

## 1. Introduction

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is a heterogeneous group of sensory-motor disorders belonging to the larger class of genetic neuropathies. With an estimated prevalence of 1:2500, it is considered as the most frequent inherited pathology of the peripheral nervous system. It indifferently affects both sexes, of any geographical origin and age, and it is clinically defined by muscular weakness and atrophy, foot deformities such as pes cavus, and sometimes sensory loss and balance issues [1]. Traditionally, based on electrophysiological studies, demyelinating forms characterized by reduced nerve conduction velocity (NCV)

can be distinguished from axonal CMT forms, with preserved NCV values. A third group, identified as intermediate CMT, has been described, ranking between demyelinating and axonal forms in its clinical aspects [2]. According to the associated mode of inheritance of the disease, CMT can be further classified in autosomal, dominant or recessive forms, and X-linked, dominant or recessive forms. More than 80 genes have been identified to be mutated in these different CMT subgroups [1], although the complete duplication of *PMP22* gene, responsible of the so-called CMT1A, remains the main genetic cause of this pathology.

Mutations in *GDAP1* (ganglioside-induced differentiation protein 1) gene have been reported for the first time in 2001 [3,4], and are well known to induce multiple types of Charcot-Marie-Tooth disease. Autosomal recessive mode of inheritance has been observed in demyelinating (CMT4A or AR-CMTde-GDAP1), intermediate (RI-CMTA or AR-CMTin-GDAP1) and axonal (CMT2H or AR-CMTax-GDAP1) forms, while autosomal dominant mutations seem to lead exclusively to axonal CMT (CMT2K or AD-CMTax-GDAP1) [5,6]. *GDAP1*, located on chromosome 8 of the human genome, encodes a 358 aa protein, expressed on the outer mitochondrial membrane of neurons and, at lower levels, of myelinating Schwann cells [7–9]. Even if *GDAP1* CMT-inducing mutations have been largely described in their clinical aspects and associated phenotypes, fewer studies have deeply investigated the molecular mechanisms altered in motor neurons and responsible for the neural degeneration.

Three main model organisms have been developed to elucidate *GDAP1* role in cellular physiology, through its up- or down- regulation, in *Drosophila melanogaster* [10,11], its depletion, in mice [12,13], or its mutation in yeasts [14]. Concerning the cellular models, given the inaccessibility of human neurons, all functional studies employed a large amount of alternative strategies, such as primary cultures of murine neurons [9,15], rat Schwann cells [7], and human fibroblasts [16–18], but also transfected, or non-transfected, cell lines, such as Cos7, HeLa, SH-SY5Y, N1E-115, HT22 [7–9,15,19–24]. These existing models have been fundamental to highlight some *GDAP1* functions. *GDAP1* involvement in mitochondria fission and fusion events has been observed in N1E-115 cells and in a model of transfected Cos7 cells [7,15,19,20], while HT22 cells and human fibroblasts have been fundamental to reveal *GDAP1* implication in protection from oxidative [17,22]. In addition, it seems that *GDAP1* takes part, also, in regulating  $Ca^{2+}$  homeostasis, as shown in SH-SY5Y and transfected HeLa cells [23,24]. More recently, *GDAP1* interaction with the trans-Golgi network, and its involvement in autophagy and maturation of lysosomes, have been suggested in SH-SY5Y and HeLa models [25,26]. However, the lack of motor neurons of human origin did not allow demonstration of the potential extrapolation of these investigations in the CMT patients.

Human induced-pluripotent stem cells (hiPSCs), created for the first time in 2006 [27], have become a powerful tool in the exploration of neurological and neuromuscular diseases. The main advantage of hiPSCs is that they can be obtained from an easy-to-take cell types such as fibroblasts, and they can be potentially differentiated in any kind of cell of human body, such as neurons or glial cells. Moreover, it has been shown that they can be generated from unaffected individuals, but also from affected patients [28]. In the case of Charcot-Marie-Tooth disease, models of hiPSCs-derived motor neurons have been established for different forms associated to different genes, such as *NELF*, *MFN2* [29,30], *HSPB1* [30,31], but also hiPSCs-derived Schwann cells presenting the *PMP22* duplication [32]. HiPSCs for *GDAP1* are reported in three studies [28,29,33], and differentiated into motor neurons only once, in our recent publication [28].

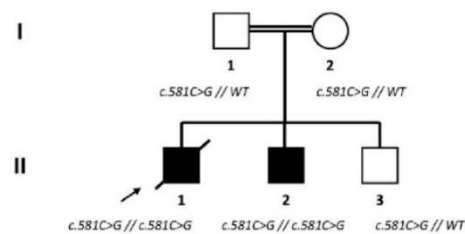
Here, we report the first functional study on human hiPSCs-derived motor neurons from a CMT2H patient, carrying the homozygous c.581C>G (p.Ser194\*) mutation in *GDAP1*, underlining the role of mitochondria and oxidative stress in this human *GDAP1*-defective CMT disease.



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Subjects

Ethics approval was obtained from the ethic committee of Limoges University Hospital (n°384-2020-40, 10/07/2020), as well as the informed consent of all participants. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The family of the CMT-patient presented two cases (Figure 1). The propositus, here reported as “patient”, showed first gait disturbances when he was 18 months old. This young boy was characterized by a severe axonal neuropathy, with subacute progression and polyvisceral disorders, leading him to an early death at the age of three. His 5-year-old younger brother developed motor impairment in feet, distal atrophy and abolished deep tendon reflexes associated to mental retardation. Parents, with a first degree of consanguinity, were asymptomatic, as well as the 13-year-old elder brother. In the *GDAP1* gene genetic analyses detected the c.581C>G (p.Ser194\*) mutation, homozygous in the patient and his affected brother, and heterozygous in the other family members. No other mutation in CMT- and peripheral neuropathies-associated genes was detected by targeted Next Generation Sequencing (NGS) (see [34] for the detailed protocol). Two control subjects, without any clinical neurological signs, were enrolled in this study: Ctrl-1, a 24-year-old man, and Ctrl-2, a 28-year old woman. Sanger sequencing excluded any *GDAP1* mutation in these controls.



**Figure 1.** Pedigree of patient’s family with *GDAP1* genotype; the propositus (“patient”) is indicated by the black arrow (WT: wildtype).

### 2.2. Skin Biopsies and Fibroblasts Cell Culture

Skin biopsies were obtained from patient, Ctrl-1, and Ctrl-2, and incubated in CHANG Medium<sup>®</sup> D (Irvine Scientific, Santa Ana, CA., USA), with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA). After two weeks, once fibroblasts (FBs) have migrated from the skin fragment and grew in the culture dish, they were isolated using trypsin. In the first three days, fibroblasts were cultivated combining the Chang Medium<sup>®</sup> D (25%) with the RPMI 1640 medium (75%) (Gibco, Thermo Fisher SCIENTIFIC), supplemented with 10% FBS. Then, Chang medium D was completely replaced by RPMI medium and FBS.

### 2.3. hiPSCs Generation and Characterization

hiPSCs were generated following the iStem (INSERM/UEVE UMR861, AFM, Genopole, Evry, France) protocol. First day, CF-1 Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), Mitomycin-C treated (TebuBio, Le-Perray-en-Yvelines, France), were seeded on gelatin coating (Sigma-Aldrich, Merck, Kenilworth, NJ, USA), at 25,000 cells/cm<sup>2</sup> density. The second day, 600,000 fibroblasts, from patient and controls, were reprogrammed with three plasmids (Plasmid #6 pCXLE-hOCT3/4 shp53-F Addgene, Plasmid #7 pCXLE-hSK Addgene, Plasmid #8 pCXLE-hUL Addgene), through the Nucleofector II device (Amaxa, Lonza, Basel Switzerland). Reprogrammed cells were cultured in DMEM+GlutaMAX medium (Gibco, Thermo Fisher SCIENTIFIC), supplemented with 10% FBS, 1% MEM non-essential amino acids (Thermo Fisher SCIENTIFIC), 1% sodium pyruvate (Thermo Fisher SCIENTIFIC), and, at day 1, with 0.1% gentamycin (Thermo Fisher SCIENTIFIC). Culture medium was replaced every day. After 14–21 days, colonies were selected, using a needle, and transferred

in new gelatin/MEF coated dishes. hiPSCs colonies grew in a KO-DMEM medium (Gibco, Thermo Fisher SCIENTIFIC), with 20% KnockOut Serum Replacement (Gibco, Thermo Fisher SCIENTIFIC), 1% MEM non-essential amino acids, 1% Glutamine (Gibco, Thermo Fisher SCIENTIFIC), 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol (Gibco, Thermo Fisher SCIENTIFIC), and 0.1% gentamycin. It was replaced every day, extemporaneously supplemented with 20 ng/mL Fibroblast Growth Factor (FGF2) (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA). After hiPSCs amplification, all quality controls were performed (Supplementary Materials).

#### 2.4. Motor Neurons Generation and Culture

Differentiation protocol was applied as previously described by Faye et al. [28]. After neural progenitors (NPs) were obtained, they were seeded on poly-L-ornithine/laminine-coated dishes, and cultured in neural media, adding 100 ng/mL Sonic Hedgehog (Shh) (PeproTech Inc.), 5  $\mu$ M RA (Sigma-Aldrich, Merck), 10 ng/mL BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (PeproTech Inc.), 10 ng/mL GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) (PeproTech Inc.), and 10 ng/mL IGF-1 (insulin-like growth factor-1) (PeproTech Inc.). Then, they were passed every 3 to 4 days, and maintained at high density. In order to generate completely differentiated motor neurons (MNs), NPs were seeded at a density of 20,000 to 30,000 cells/cm<sup>2</sup>, using the same coating and the same culture medium.

#### 2.5. RNA Analysis

Total RNA was extracted from fibroblasts, hiPSCs, NPs and MNs of Ctrl-1 and patient, using the miRNeasy Mini kit (QIAGEN<sup>®</sup>, Venlo, The Netherlands). After verifying RNA integrity with the Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies), it was converted in cDNA with the QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription kit (QIAGEN<sup>®</sup>). For the quantitative PCR (qPCR, or Real-Time PCR), primers were designed between the fifth and the sixth exon of *GDAP1*, and between the fifth and the sixth exon of *TBP* (TATA-Box Binding Protein), chosen as reference gene. Reactions were prepared with the Rotor-Gene SYBR-Green PCR Kit (400) (©QIAGEN) and performed on the Corbett Rotor-Gene 6000 Machine (© QIAGEN). All qPCR reactions were performed four times.

#### 2.6. Immunocytochemistry (ICC)

For the immunofluorescence, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich, Merck) for 10 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Merck) for one hour. They were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody, prepared in 3% BSA, and then the next day with the secondary antibody for one hour at room temperature. PFA, Triton X-100 and BSA were diluted in Dulbecco's phosphate-buffered saline 1X (DPBS) (Gibco, Thermo Fisher SCIENTIFIC). Nuclei were stained with 2  $\mu$ g/mL 4',6'-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich, Merck). Images captures were performed using a fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) or a confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), while their processing and analysis were made with NIS Element BR software, Zen Black and Zen Bleu software, and Image J software. All antibodies' dilutions and references are reported in Table S1. PGP9.5, the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, Tuj-1, the neural-specific  $\beta$ -tubulin III, and the choline acetyltransferase (ChAT) enzyme, were chosen as neural markers. The Prolyl 4-hydroxylase subunit- $\beta$  (P4HB) was chosen as fibroblasts' marker, as indicated by previous publications [35,36] and manufacturer instructions (OriGene, Rockville, MD, USA).

The chromogenic 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining was used as complementary ICC method to immunofluorescence, by reason of its high sensitivity. For the DAB staining, MNs were fixed, permeabilized, and incubated with the GDAP1 primary antibody overnight. Next day, the VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used for the avidin-biotin/oxidase detection. The DAB+ chromogen, i.e., the peroxidase substrate solution, was added to induce the formation of the brown precipitate, visualized with a light microscope.

### 2.7. Electron Microscopy

All manipulations for the electron microscopy were performed in Neurology and Anatomic Pathology departments at University Hospital of Limoges. Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde, then incubated 30 min, at RT, in 2% OsO<sub>4</sub> (Euromedex, Souffelweyersheim, France). After washing them with distilled water, they were dehydrated 10 min in a series of ethanol dilutions (30%, 50%, 70%, 95%) and three times in 100% ethanol. At the end, they were embedded overnight in Epon 812. Thin blocks were selected and stained with uranyl acetate and lead citrate and examined using a Jeol 1011 electron microscope.

### 2.8. Adenosine Triphosphate (ATP) Quantification

ATP was dosed using CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega, Madison, WI, USA), and the luminescent signal was recorded with the Fluoroskan Ascent<sup>®</sup> FL (Thermo Fisher SCIENTIFIC,) following manufacturer instructions. DAPI staining was used to normalize luminescence's values to the number of cells. Reactions were performed in triplicate, and experiments were repeated three times.

### 2.9. Succinate Dehydrogenase (Complex II) Activity

Succinate dehydrogenase activity was measured using the Cell Proliferation Kit I (Roche, Basel, Switzerland), following manufacturer conditions. Absorbance of formazan crystals, at 595 nm, was recorded with the Multiskan<sup>™</sup> FC Microplate Photometer (Thermo Fisher SCIENTIFIC), and normalized to the number of cells, measured with the DAPI staining. Reactions were performed in triplicate, and experiments were repeated three times.

### 2.10. Mitochondrial Superoxide Quantification

Fibroblasts and MNs were analyzed in basal conditions as well as in stressed conditions. Stressed wells were treated two hours with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution, prepared in culture medium. After the treatment, 5 μM MitoSOX<sup>™</sup> Red mitochondrial superoxide marker (Molecular Probes, Thermo Fisher SCIENTIFIC) was added to the whole of the plate and incubated for 10 min at 37 °C. Fluorescent signal was detected using the Leica DM IRB microscope and normalized to the number of cells, measured with the DAPI staining. Reactions were performed in triplicate, and experiments were repeated three times.

### 2.11. Statistical Analysis

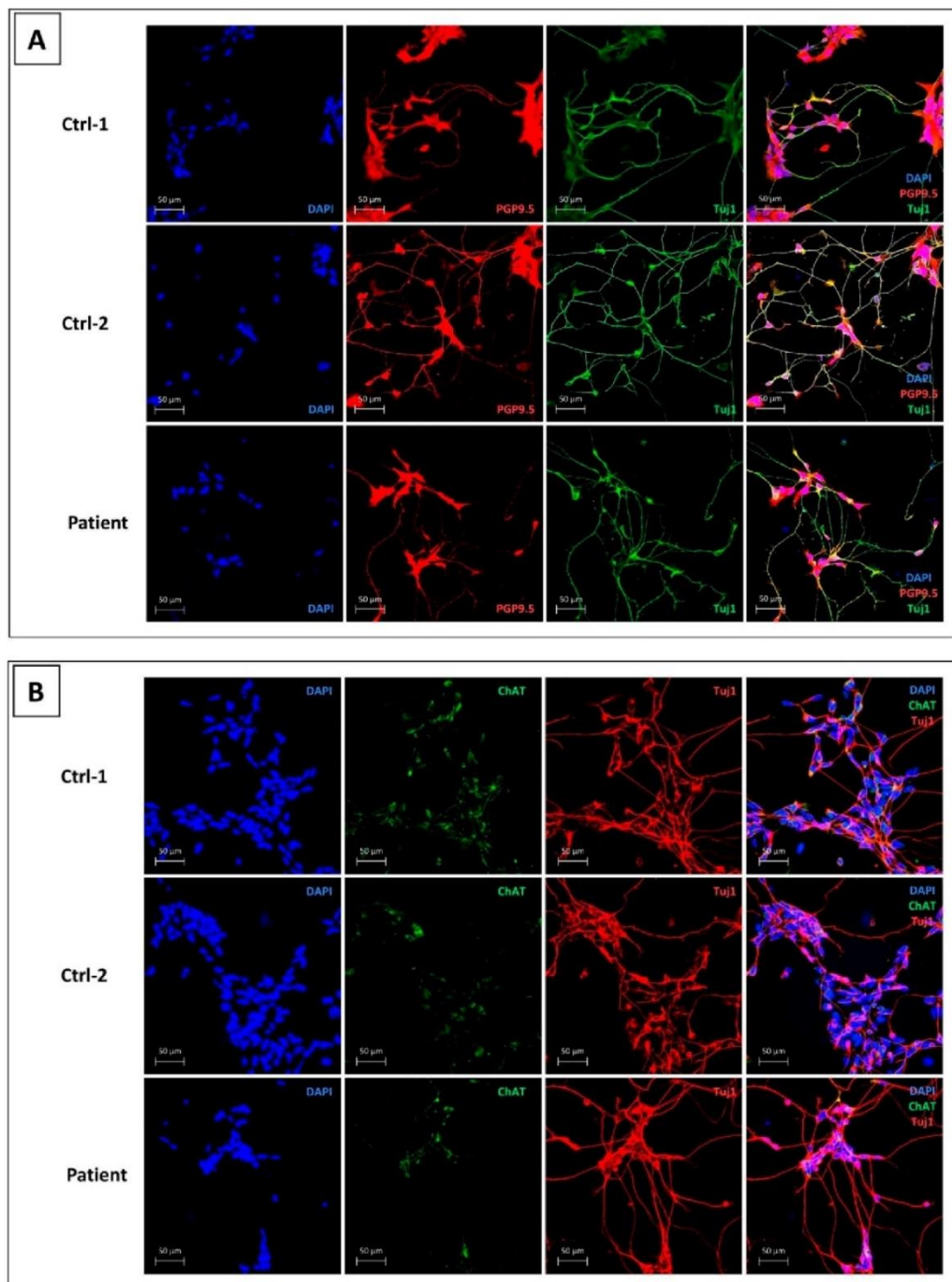
All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Data were expressed as mean ± SEM (Standard Error of the Mean). They were compared using the nonparametric Mann–Whitney U test;  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Control and CMT2H hiPSCs Efficiently Differentiate into MNs

Fibroblasts of Ctrl-1, Ctrl-2, and the CMT2H patient were reprogramed in hiPSCs. After validating hiPSCs of the three subjects for all quality controls (Figure S2), our differentiation protocol was applied in order to generate NPs first, then MNs (all differentiation steps for Ctrl-1, Ctrl-2, and patient are reported in the Figure S3). Figure 2A shows that all cells were PGP9.5-positive (red) and Tuj-1-positive (green), validating their neuronal profile. Cells expressed also the choline acetyltransferase (ChAT) enzyme (green), confirming the cholinergic function of these hiPSCs-derived motor neurons (Figure 2B).

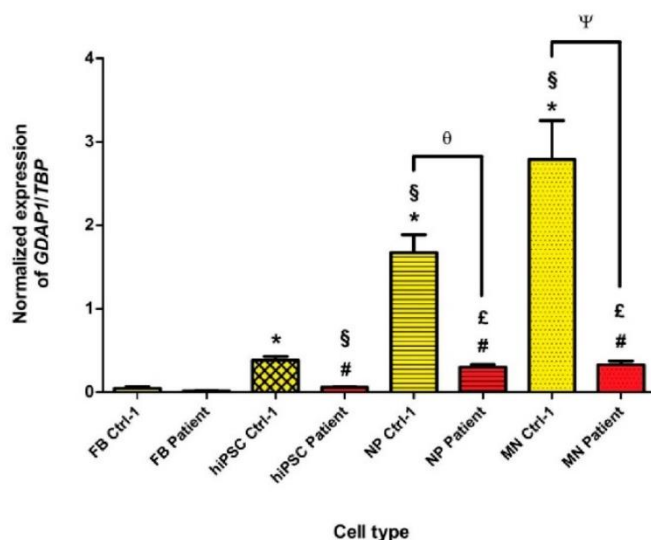




**Figure 2.** Characterization of hiPSCs-derived motor neurons, for Ctrl-1, Ctrl-2, and patient. (A) DAPI (blue) for nuclei staining, PGP9.5 (red), and  $\beta$ -tubulin III (TuJ1) (green); (B) DAPI (blue) for nuclei staining, choline acetyltransferase (ChAT) (green) and  $\beta$ -tubulin III (TuJ1) (red). Scale bar = 50  $\mu$ m.

### 3.2. *GDAP1* mRNA Is Expressed in Neural Cells of Controls, but It Is Absent in *p.Ser194\** Cells

In order to investigate *GDAP1* functions and *GDAP1*-associated mechanisms, we evaluated the expression of *GDAP1* mRNA, from fibroblasts to hiPSCs, neural progenitors, and motor neurons, of patient and Ctrl-1 subject. In Ctrl-1, we showed that *GDAP1* is differently expressed in the four cell types (Figure 3, yellow plots). It was clear that *GDAP1* is weakly expressed in fibroblasts ( $0.05 \pm 0.02$ , normalized to *TBP*), and slightly more expressed in hiPSCs ( $0.38 \pm 0.05$ ;  $p < 0.05$ ). In contrast, *GDAP1* mRNA levels significantly increased in neural cell types, associated with the progression of neural differentiation. In particular, *GDAP1* expression was around 33-fold higher in NPs ( $1.67 \pm 0.21$ ;  $p < 0.05$ ), and 56-fold higher in MNs ( $2.79 \pm 0.47$ ;  $p < 0.05$ ), compared to fibroblasts' levels. In patient's cells, the same expression trend was observed in the four cell types, thus *GDAP1* mRNA was nearly absent in patient's fibroblasts ( $0.01 \pm 0.003$ ), and significantly higher in hiPSCs ( $0.06 \pm 0.005$ ;  $p < 0.05$ ), NPs ( $0.3 \pm 0.03$ ;  $p < 0.05$ ), and MNs ( $0.33 \pm 0.04$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 3, red plots). Nevertheless, for each cell type, except fibroblasts, patient's mRNA levels of *GDAP1* were drastically reduced compared to Ctrl-1, as confirmed by statistical analysis ( $p < 0.05$  hiPSC patient vs. hiPSC Ctrl-1;  $p < 0.05$  NP patient vs. NP Ctrl-1;  $p < 0.05$  MN patient vs. MN Ctrl-1).



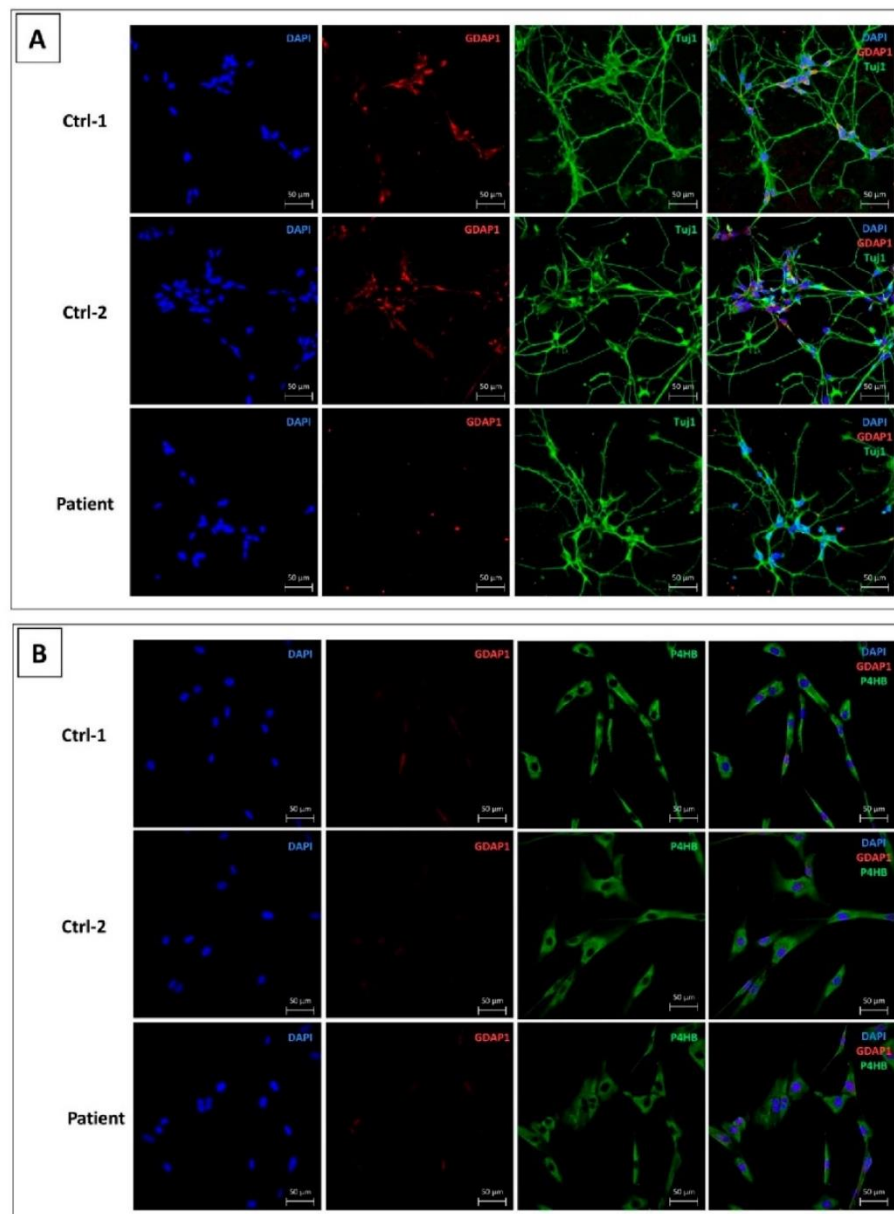
**Figure 3.** Normalized *GDAP1* expression in fibroblasts (FBs), human induced-pluripotent stem cells (hiPSCs), neural progenitors (NPs), and motor neurons (MNs), from Ctrl-1 subject (yellow plots) and CMT patient (red plots). *TBP* was chosen as reference gene. \*  $p < 0.05$  vs. FB Ctrl-1; §  $p < 0.05$  vs. hiPSC Ctrl-1; #  $p < 0.05$  vs. FB patient; £  $p < 0.05$  vs. hiPSC patient; θ  $p < 0.05$  vs. NP Ctrl-1; Ψ  $p < 0.05$  vs. MN Ctrl-1.

### 3.3. *GDAP1* Protein Is Expressed in MNs of Controls and Absent in *p.Ser194\** MNs

To complete the expression study, we evaluated *GDAP1* protein expression on MNs, the cellular type known to express *GDAP1*, in comparison with fibroblasts. The experiment was performed for the two control subjects and the CMT patient (Figure 4).

For the immunofluorescence analysis, MNs were stained with *GDAP1* antibody (red), and Tuj-1 antibody (green), specific of neural cells. As shown in Figure 4A, *GDAP1* protein was detected in MNs of Ctrl-1 and Ctrl-2, located in neurons' cell body. In contrast, no fluorescent red signal was observed in patient's MNs, suggesting the weak expression of *GDAP1* protein (Figure 4A).

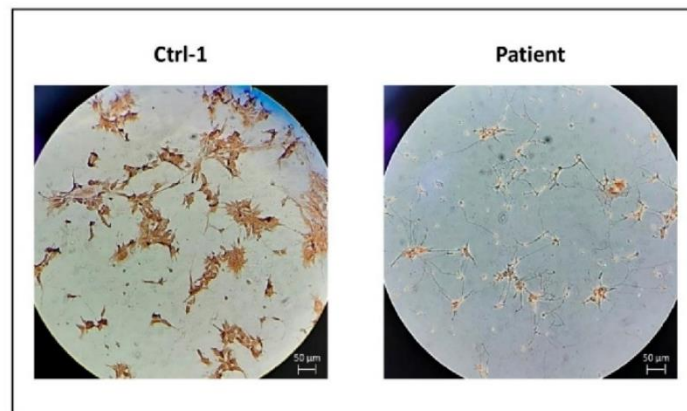




**Figure 4.** GDAP1 protein expression in MNs (A) and fibroblasts (B). (A) DAPI (blue) for nuclei staining, GDAP1 (red), and  $\beta$ -tubulin III (green), as neural marker. (B) DAPI (blue) for nuclei staining, GDAP1 (red), and prolyl 4-hydroxylase subunit- $\beta$  antibody (P4HB) (green), as fibroblast marker. Scale bar = 50  $\mu$ m.

In fibroblasts, GDAP1 staining (red) was associated to Prolyl 4-hydroxylase subunit- $\beta$  antibody (P4HB) (green). As expected, according to the RNA measurement, a weak GDAP1 signal was observed, both in controls' and patient's fibroblasts (Figure 4B).

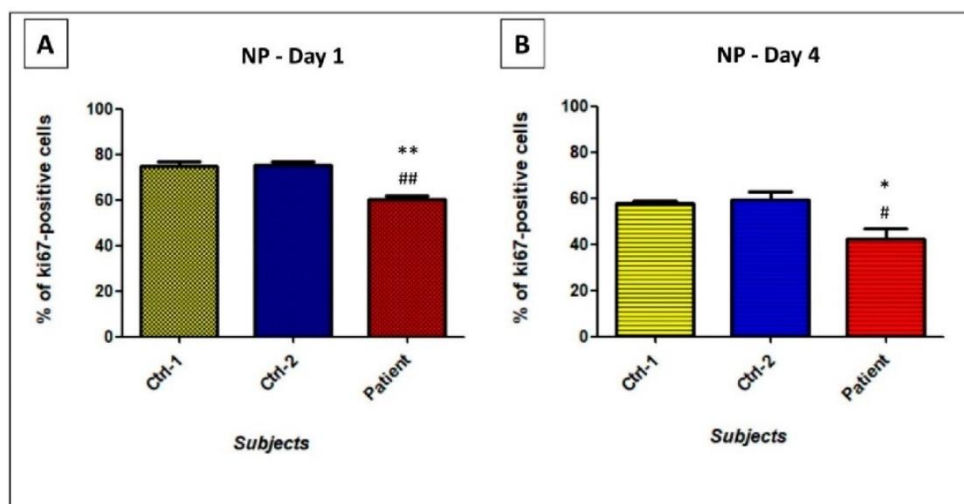
These results were supported by the DAB staining showing the higher expression of GDAP1 protein in MNs of Ctrl-1 compared to patient (Figure 5).



**Figure 5.** DAB staining for GDAP1, in MNs from Ctrl-1 and patient. Scale bar = 50 µm.

### 3.4. GDAP1 Mutation Impacts Cell Proliferation and Viability of Neural Cells

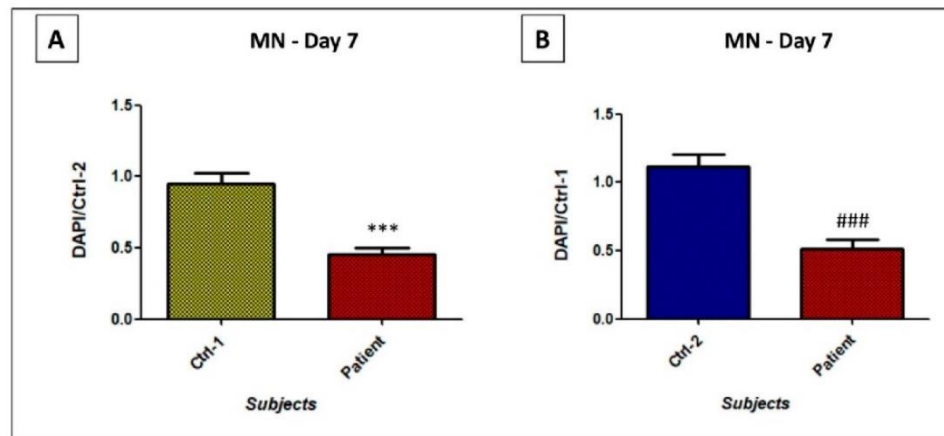
Neural progenitors are known to rapidly proliferate. However, this proliferation decreases throughout their final differentiation into motor neurons. Among all existing markers, we analyzed proliferation rate of NPs with the Ki-67 staining. It was evaluated at day 1, right after NPs seeding, and at day 4, when neurons have started their differentiation process. As shown in Figure 6A, at d1, about 75% of NPs of Ctrl-1 ( $75.04 \pm 1.83\%$ ) and Ctrl-2 ( $75.45 \pm 1.58\%$ ) were Ki-67-positive, whereas only 60% of patient's NPs expressed Ki-67 ( $60.26 \pm 1.60\%$ ;  $p < 0.01$ ). At d4, proliferating cells were slightly lower than 60% in Ctrl-1 ( $57.7 \pm 1.37\%$ ) and Ctrl-2 ( $59.38 \pm 3.69\%$ ), and considerably reduced to 40% in patient's cells ( $42.23 \pm 4.54\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 6B).



**Figure 6.** Percentage of Ki-67 expressing-NPs of Ctrl-1, Ctrl-2, and Patient, at day 1 (A) and day 4 (B) after the beginning of the differentiation process. Lower growth rate in patient's neural cells, carrying the p.Ser194\* mutation in *GDAP1*, was observed. \*\*  $p < 0.01$  vs. Ctrl-1; ##  $p < 0.01$  vs. Ctrl-2; \*  $p < 0.05$  vs. Ctrl-1; #  $p < 0.05$  vs. Ctrl-2.

These results were supported by motor neurons viability. Throughout the NPs differentiation, we observed, for patient, a high number of dead cells. Given that, at d0, the same cells' number had been plated for the three subjects, at day 7, we performed a DAPI staining to evaluate the number of surviving cells. A significant 60% reduction of patient's

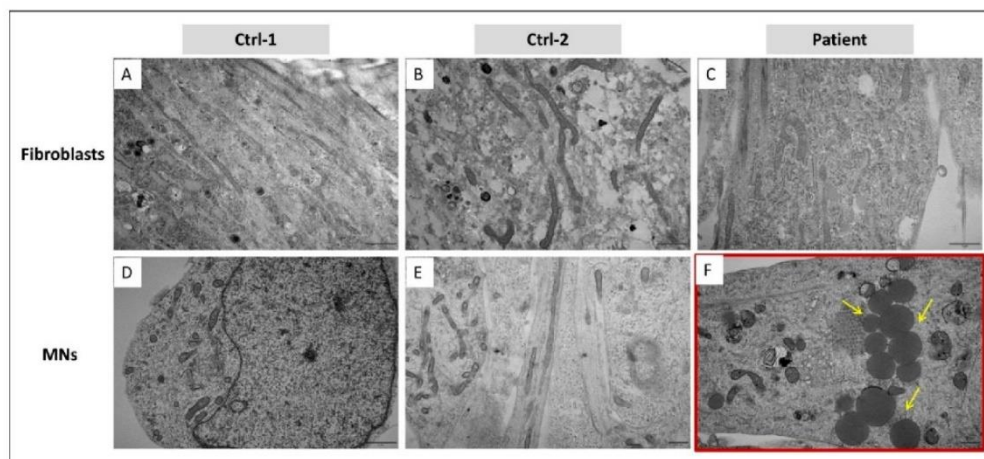
MNs viability was revealed, compared to Ctrl-1 ( $0.45 \pm 0.05$  vs.  $0.95 \pm 0.08$ ;  $p < 0.001$ ) or Ctrl-2 ( $0.52 \pm 0.06$  vs.  $1.12 \pm 0.09$ ;  $p < 0.001$ ) (Figure 7).



**Figure 7.** DAPI staining on MNs from patient vs. Ctrl-1 (A), and Ctrl-2 (B), at day 7 after the beginning of the differentiation process. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Ctrl-1; ###  $p < 0.001$  vs. Ctrl-2.

### 3.5. In MNs, GDAP1 Mutation Is Associated with Cytosolic Lipid Droplets and Perturbed Mitochondrial Morphology

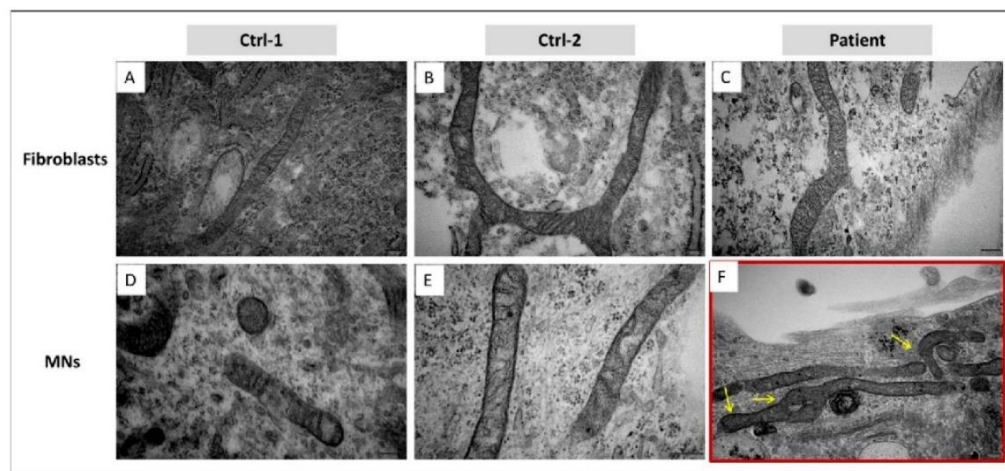
HiPSCs-derived motor neurons of controls and patient were analyzed by electron microscopy. Surprisingly, in the cytoplasm of multiple patient's MNs, we observed the emergence of several round structures, of various sizes, suspected to be lipid droplets (LDs) (Figure 8F). These structures appeared electron-dense, with a homogeneous content surrounded by a more electron-dense line, presumably a lipid monolayer, supporting their identity as LDs. However, we cannot exclude the possibility of a bilayer, and a different nature of these structures. They were not observed in controls' MNs, nor in fibroblasts of the three subjects (Figure 8A–E).



**Figure 8.** Ultrastructure analysis, by EM, on fibroblasts of Ctrl-1 (A), Ctrl-2 (B), and patient (C), and MNs of Ctrl-1 (D), Ctrl-2 (E), and patient (F). Lipid droplets (LDs), in patient's MNs, are indicated by yellow arrows. Scale bar =  $1 \mu\text{m}$  in (A–D); Scale bar =  $500 \text{ nm}$  in (E,F).



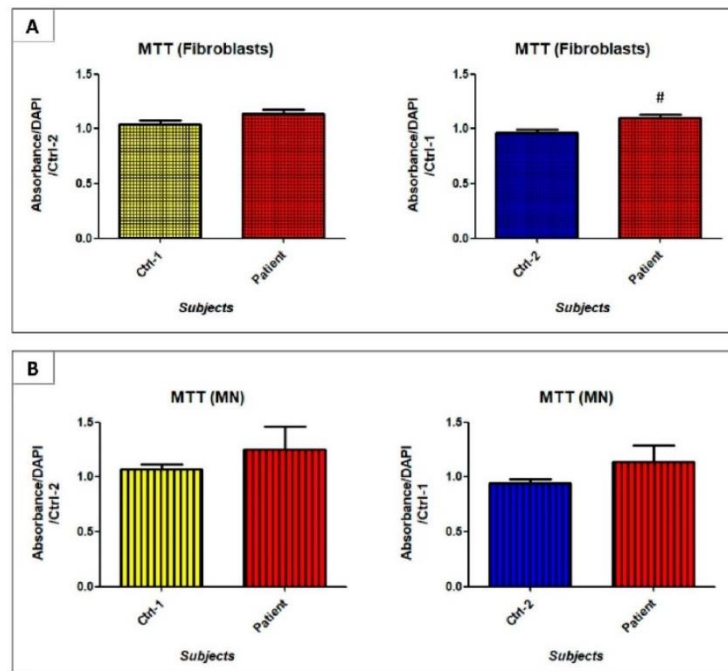
Given the mitochondrial localization of GDAP1 protein, we investigated mitochondrial morphology and structure. Looking at MNs' ultrastructure, any difference in mitochondrial size and shape was remarked between controls and patient. Moreover, MNs of both subjects presented elongated and fragmented mitochondria. However, focusing on mitochondrial cristae, we observed that their organization was altered in mitochondria of patient's MNs. In particular, cristae's regular distribution and thickness were perturbed, preventing to discriminate their structure in the internal mitochondrial compartment. Swollen cristae were also observed (Figure 9F). This disorganization of mitochondrial cristae was not present in Ctrl-1 and Ctrl-2 MNs, as well as in fibroblasts of the three subjects (Figure 9A–E).



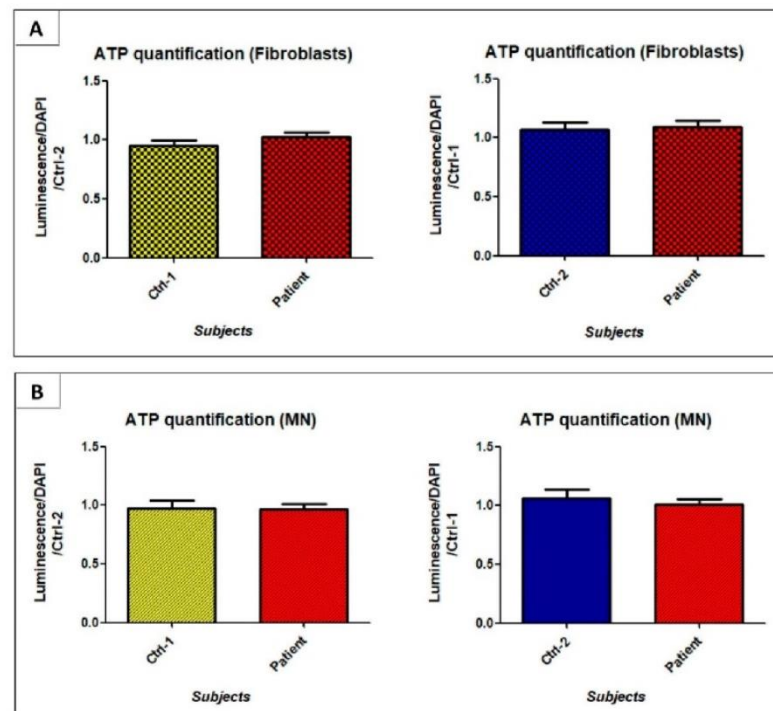
**Figure 9.** Ultrastructure analysis, by EM on ultrathin sections, of mitochondria in fibroblasts of Ctrl-1 (A), Ctrl-2 (B), and patient (C), and MNs of Ctrl-1 (D), Ctrl-2 (E), and patient (F). Yellow arrows point out the alteration of patient's MNs' mitochondrial cristae, exhibiting a perturbation of distribution and thickness. Scale bar = 200 nm in (A–F).

### 3.6. GDAP1 Mutation Does Not Strongly Alter Oxidative Phosphorylation

The alteration of cristae organization in mitochondria of patient's MNs, led us to investigate the oxidative phosphorylation through the activity of the electron transport chain (ETC) complexes and the ATP production. Given the limited availability of hiPSCs-derived MNs, we performed the MTT test to evaluate the activity of the succinate dehydrogenase (complex II). In both fibroblasts and motor neurons, succinate dehydrogenase activity seemed to be slightly increased in patient's cells, compared to Ctrl-1 and Ctrl-2, and it reached significant difference in fibroblasts (Ctrl-2 FB  $0.97 \pm 0.03$  vs. patient FB  $1.099 \pm 0.03$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 10). In contrast, ATP levels were not significantly different between patient's and controls' fibroblasts and motor neurons (Figure 11).



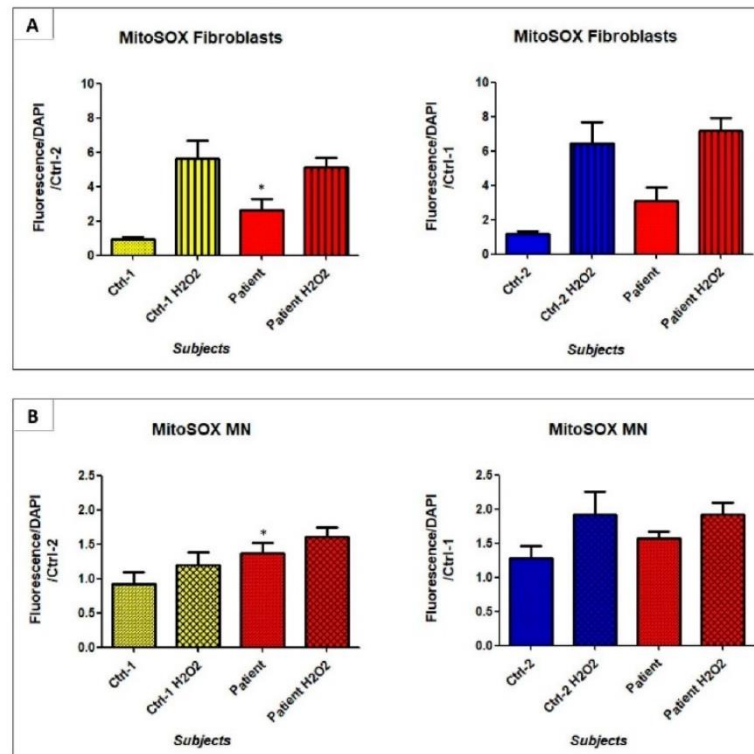
**Figure 10.** Succinate dehydrogenase activity evaluated in fibroblasts (A) and MNs (B) of Ctrl-1, Ctrl-2, and patient. #  $p < 0.05$  vs. Ctrl-2.



**Figure 11.** ATP production evaluated in fibroblasts (A) and MNs (B) of Ctrl-1, Ctrl-2, and patient.

### 3.7. *GDAP1* Mutation Could Promote Mitochondrial Oxidative Stress

Mitochondria are also the main producers of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion, inducing oxidative stress. A perturbation of mitochondrial cristae could promote redox imbalance. As expected, and shown in Figure 12, in patient's MNs, superoxide anion levels were significantly higher than in Ctrl-1 (Ctrl-1 MN  $0.92 \pm 0.17$  vs. patient MN  $1.37 \pm 0.15$ ;  $p < 0.05$ ). This significant difference was even observed in fibroblasts (Ctrl-1 FB  $0.92 \pm 0.17$  vs. patient FB  $2.61 \pm 0.68$ ;  $p < 0.05$ ). The same trend emerged in the comparison with Ctrl-2 cells, but significant difference was not reached.



**Figure 12.** Superoxide anion quantification in fibroblasts (A) and MNs (B) of Ctrl-1, Ctrl-2, and patient, using the MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator. Cells treated with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 h at 37 °C (fibroblasts and MN) were used as positive controls. \*  $p < 0.05$  vs. Ctrl-1.

## 4. Discussion

More than 80 mutations in *GDAP1* gene have already been reported to be responsible for demyelinating, axonal, and intermediate forms of Charcot-Marie-Tooth disease, and associated to heterogeneous phenotypic manifestations [37]. However, *GDAP1* role in cellular functions and processes has not been clearly elucidated, although several relevant studies have been performed [7,13,16,22,38]. Thus, the pathological role of *GDAP1* in this disease development remains to be understood. Cellular and animal models expressing *GDAP1* mutations surely represent the most accessible and easier tool to mimic *GDAP1*-induced pathophysiology. Murine and human *GDAP1* proteins share 94% of amino acid homology supporting the relevance of this rodent model in expression and localization studies [7,9], structural studies [39], functional studies on knockout animal models [12,13]. Further analyses were conducted using *Drosophila*, and its *GDAP1*-ortholog gene (*CG4623*) [10,11], or yeast models, transfected with the human *GDAP1* [14,40]. The high intra-species and inter-species variability, together with the complexity of *GDAP1* molecular mechanisms



involved in Charcot-Marie-Tooth disease, may limit the animal models' reliability. Concerning the cellular models developed for *GDAP1*, most of them have animal origin (mice, rats) [7,9,15], or are immortalized cell lines, naturally expressing *GDAP1* (SH-SY5Y, N1E-115, HT22) [7,8,22,24], or by transfection (HeLa, Cos7) [9,15,20,21]. Indeed, a limited number of cell types express *GDAP1*, notably neurons and Schwann cells. These cell types cannot be obtained from humans, and used in vitro as cellular models. Given the inability to culture human neural cells, the only model available in these conditions was represented by human fibroblasts [16–18,22], which, unfortunately, poorly express *GDAP1* [22]. The aim of this study was to go beyond limits imposed by existing animal and cellular models, developing a new solid model of human motor neurons, carrying the homozygous p.Ser194\* mutation in *GDAP1*, to investigate *GDAP1* functions and *GDAP1*-associated mechanisms in CMT disease.

We first questioned about *GDAP1* expression. In animal models, such as mice and rats, *GDAP1* has been shown to be largely expressed in neurons. In particular, the higher expression was detected in cerebellum, cerebral cortex, hippocampus, olfactory bulb, spinal nerve, but also in sciatic nerve, and motor and sensory neurons [7–9]. *GDAP1* expression in Schwann cells was controversial, whereas, in non-neural tissues, it was poorly explored [7–9]. Here, we compared, for the first time, *GDAP1* mRNA expression in four human cell types of the same control subject (Ctrl-1): fibroblasts, hiPSCs, NPs, and MNs. Our study revealed, on Ctrl-1 cells, that *GDAP1* is weakly expressed in fibroblasts and hiPSCs, while its expression was significantly higher in NPs, and, above all, in MNs. It is interesting to note that *GDAP1* mRNA in fibroblasts represented only 3% of NPs-*GDAP1* mRNA, and 1.8% of MNs-*GDAP1* mRNA. This is in agreement with Noack et al. work, who showed that control human fibroblasts expressed only 2.6% of *GDAP1* mRNA compared to embryonic stem cells-derived motor neurons [22]. In contrast, in patient's cells, presenting the homozygous codon-stop mutation c.581C>G in exon 5, *GDAP1* mRNA was only 10–20% of mRNA estimated in each cell type of Ctrl-1, up to 6- and 8-fold smaller than those assessed in Ctrl-1 NPs and Ctrl-1 MNs. Our data seem to suggest that *GDAP1* mRNA is degraded in patient's cells. As mutated *GDAP1* mRNA contains a premature termination codon (PTC), the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) system could be activated and induce its degradation, preventing the synthesis of a truncated, and maybe non-functional, protein [41]. In any case, the NMD system is not always 100% efficient and some PTC-mRNA can escape NMD, and be detected by qPCR, as shown here. Real time qPCR results were also supported by *GDAP1* protein expression. Indeed, *GDAP1* was not expressed in fibroblasts, both in controls and patient, while the *GDAP1* staining was present in Ctrl's MNs, and, as expected, lacked in patient's MNs. Given the high *GDAP1* neural expression, we chose MNs and NPs, as cellular models to investigate its functions, and evaluate its role in Charcot-Marie-Tooth disease development.

However, the weak *GDAP1* expression detected in fibroblasts does not exclude a *GDAP1* role in this cell type, and the possibility of conducting functional studies on them [16–18]. In our case, in the examination of electron transport chain's (ETC) activity, any big difference emerged between controls and patient, neither in fibroblasts, nor in MNs. Only a slight increase in succinate dehydrogenase activity was observed, but did not reach significant levels in MNs, and ATP production was preserved in patient's fibroblasts and MNs. Nevertheless, we cannot exclude that markers used to evaluate oxidative phosphorylation can be limited, and the analysis not-exhaustive. Thus, the measurement of each complex activity, by oxygraphy, could prove more comprehensive in investigation of ETC function.

On the other hand, morphological and oxidative stress analyses, allowed highlighting, exclusively in MNs, two main mechanisms which could play a key role in CMT disease progression: the deregulation of mitochondria morphology and dynamics, and the redox imbalance. These aspects support the relevance of our MNs cellular model in the study of *GDAP1*-associated pathophysiology. First, we investigated mitochondrial morphology. Electron microscopy revealed, only in patient's MNs, a general disorganization of



mitochondrial cristae, which could affect the inner mitochondrial space and subsequent metabolism. The disruption of cristae structure has already been associated to other pathological conditions induced by mutations or lack of proteins involved in mitochondrial dynamics, such as optic atrophy 1 (OPA1) protein [42], or mitofusin 2 (Mfn2) protein [43]. Cristae abnormalities were also reported in nerves' axonal mitochondria of a CMT2 patient, carrying the c.174\_176delGCCinsTGTC (p.Pro59Valfs\*4) mutation in *GDAP1* [44], but also, more recently, in muscular tissue of a patient carrying the c.77T>G (p.Leu26Arg) and the c.505\_511del (p.Ser169\*) *GDAP1* mutations [18].

Interestingly, some additional findings of our cell culture need to be pointed out. We observed in patient's hiPSCs carrying the p.Ser194\* mutation a higher spontaneous differentiation and a reduced maintenance of stemness compared to controls' hiPSCs, where *GDAP1* seems to be expressed, even if at a low level. Moreover, we have demonstrated that patient's neural cells present a lower proliferation rate, compared to controls. Both these aspects could potentially be related to *GDAP1* involvement in mitochondrial dynamics. Indeed, it is now well known that the proper preservation of mitochondrial dynamics is a fundamental condition for cell cycle progression, and fragmentation of mitochondrial network is required during the mitosis phase [45]. Thus, the deficiency of a fission protein, such as *GDAP1*, could impact the regulation of cell proliferation mechanisms. Indeed, Prieto et al., demonstrated that *GDAP1* knockout, altering the fission machinery, impairs OSKM (Oct4/Klf4/Sox2/cMyc) reprogramming, and cell cycle progression, in murine iPSCs [46]. Based on our preliminary results and previous studies, we can assume that *GDAP1* protein may be a key component in controlling mitochondrial morphology and dynamics, and its lack may disturb mitochondrial-dependent processes, such as in different cell types.

In the cytoplasm of patient's MNs, round electron-dense structures were observed, suspected to be lipid droplets. LDs could be considered as an accumulation of energetic substrate, such as triglycerides, linked to a defect of mitochondrial beta oxidation, or a hallmark of cellular stress, previously observed in nutrient imbalance, inflammation and oxidative stress [47]. Moreover, several studies have demonstrated that their accumulation is one of earliest events following the induction of cellular apoptosis [48]. Thus, the accumulation of LDs could also be considered as an early signal of apoptotic pathways' activation, explaining the significant reduction of patient's MNs observed in last steps of neural differentiation. The synthesis of lipid droplets in neurons has been observed in pathogenesis of several neurodegenerative diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Hereditary spastic paraplegia [49]. LDs were also described in the ultrastructural analysis of motor neurons obtained from *GDAP1* knockout mice [13], in accordance with our results, corroborating the consistency of our cellular model. In stress conditions, a cytoprotective role against reactive oxygen species (ROS) is also supplied by LDs. As polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are more susceptible to ROS-induced peroxidation when they are integrated in cellular membranes, LDs sequester them as triacylglycerols (TAGs) in their core, protecting cellular structures from ROS damage [50]. This phenomenon could probably be responsible for the LDs formation in our cellular model of CMT-motor neurons carrying the *GDAP1* p.Ser194\* mutation. In fact, *GDAP1* has been suggested to have an antioxidant role in cellular homeostasis [10,22]. Consequently, in patient's MNs, the lack of *GDAP1* protein increases the amount of generated ROS, proven, in our study, by the MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator analysis. However, we have also detected a significant increase of ROS in patient's fibroblasts, where *GDAP1* is weakly expressed and LDs lacking. The overproduction of superoxide anion, in *GDAP1*-mutated fibroblasts, has also been reported in a recent work [17]. Moreover, the same study demonstrated that *GDAP1*-mutated fibroblasts presented also a reduced expression of Sirtuin 1 (SIRT1) enzyme, which activates the PPARgamma coactivator-1alpha (PGC1  $\alpha$ ) [17]. PGC1  $\alpha$  is a fundamental factor in mitochondrial biogenesis, and it has been associated to neurological disorders and diabetic peripheral neuropathy [51–54]. These data could strengthen the idea that *GDAP1*

protein, even if at lower levels, could also be present in cell types other than neural cells. In this case, nevertheless, other molecular mechanisms and proteins would take part to the cellular antioxidant defense, counterbalancing GDAP1 deficiency.

## 5. Conclusions

In conclusion, the role of *GDAP1* impairment in Charcot-Marie-Tooth pathophysiology through mitochondrial dysfunction and oxidative stress development was underlined in an original human model of motor neuron from patient's fibroblasts, carrying the homozygous codon-stop c.581C>G (p.Ser194\*) mutation. The results underlined that *GDAP1* is mostly expressed in neural cell types such as MNs and PNs, but also, at lower levels, in fibroblasts and hiPS cells. In patient's cells, 80–90% of *GDAP1* mRNA would be degraded by the NMD system, leading to the considerable reduction of GDAP1 protein. Taken together, these results demonstrated that hiPS cells can be a powerful tool to recreate any suitable cellular model from patients carrying mutations and are essential for understanding the pathophysiological role of the altered protein, but also necessary to develop new therapeutic strategies.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines9080945/s1>, Figure S1: Sanger Sequencing confirmed the *GDAP1* homozygous c.581C>G mutation in patient's fibroblasts, not observed in controls; Figure S2: hiPSCs quality controls for Ctrl-1 (A), Ctrl-2 (B), and patient (C). Figure S3: hiPSCs differentiation into motor neurons, for Ctrl-1, Ctrl-2 and patient from D0 to D30-40; Table S1: Primary antibodies used for characterization of hiPSCs, fibroblasts, and neural cells.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.-S.L. and P.-A.F.; methodology, F.M., N.B., M.R. and P.-A.F.; validation, F.M., N.B., M.R., L.R., S.B., C.M. and A.-S.L.; formal analysis, F.M. and N.B.; investigation, F.M., N.B., F.F., M.R., L.R., C.L., L.M., A.-S.L. and P.-A.F.; resources, S.B., C.L. and L.M.; data curation, F.M., C.M., F.S., A.-S.L. and P.-A.F.; writing—original draft preparation, F.M., F.F., A.-S.L. and P.-A.F.; writing—review and editing, N.B., M.R., L.R., S.B., C.L., L.M., C.M. and F.S.; visualization, F.M., F.F., A.-S.L. and P.-A.F.; supervision, F.F., F.S., A.-S.L. and P.-A.F.; project administration, A.-S.L.; funding acquisition, F.F., F.S., A.-S.L. and P.-A.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of LIMOGES UNIVERSITY HOSPITAL (N°384-2020-40, 10/07/2020).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors thank the “Région Limousin”, “Club 41-098”, “Lions Club St Yrieix La Perche”, “Rotary Club”, “Mairie de St Yrieix La Perche”, and the University Hospital of Limoges for their support. We thank the I-Stem institute (INSERM/UEVE UMR 861, AFM, Genopole, Evry, France) and the AFM-Téléthon institute for the training they offered to help us to generate hiPSCs, and Claire Carrion of University of Limoges for the help in ICC acquisitions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bird, T.D. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. In *GeneReviews*<sup>®</sup>; Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Stephens, K., Amemiya, A., Eds.; University of Washington: Seattle, WA, USA, 2020.
2. Liu, L.; Zhang, R. Intermediate Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neurosci. Bull.* **2014**, *30*, 999–1009. [[CrossRef](#)]
3. Baxter, R.V.; Ben Othmane, K.; Rochelle, J.M.; Stajich, J.E.; Hulette, C.; Dew-Knight, S.; Hentati, F.; Ben Hamida, M.; Bel, S.; Stenger, J.E.; et al. Ganglioside-Induced Differentiation-Associated Protein-1 Is Mutant in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 4A/8q21. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 21–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



4. Cuesta, A.; Pedrola, L.; Sevilla, T.; García-Planells, J.; Chumillas, M.J.; Mayordomo, F.; LeGuern, E.; Marín, I.; Vilchez, J.J.; Palau, F. The Gene Encoding Ganglioside-Induced Differentiation-Associated Protein 1 Is Mutated in Axonal Charcot-Marie-Tooth Type 4A Disease. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 22–25. [[CrossRef](#)]
5. Mathis, S.; Goizet, C.; Tazir, M.; Magdelaine, C.; Lia, A.-S.; Magy, L.; Vallat, J.-M. Charcot-Marie-Tooth Diseases: An Update and Some New Proposals for the Classification. *J. Med. Genet.* **2015**, *52*, 681–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sivera, R.; Frassetto, M.; Lupo, V.; García-Sobrino, T.; Blanco-Arias, P.; Pardo, J.; Fernández-Torrón, R.; de Munain, A.L.; Márquez-Infante, C.; Villarreal, L.; et al. Distribution and Genotype-Phenotype Correlation of GDAP1 Mutations in Spain. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6677. [[CrossRef](#)]
7. Niemann, A.; Rugg, M.; La Padula, V.; Schenone, A.; Suter, U. Ganglioside-Induced Differentiation Associated Protein 1 Is a Regulator of the Mitochondrial Network. *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 1067–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Pedrola, L.; Espert, A.; Wu, X.; Claramunt, R.; Shy, M.E.; Palau, F. GDAP1, the Protein Causing Charcot-Marie-Tooth Disease Type 4A, Is Expressed in Neurons and Is Associated with Mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1087–1094. [[CrossRef](#)]
9. Pedrola, L.; Espert, A.; Valdés-Sánchez, T.; Sánchez-Piris, M.; Sirkowski, E.E.; Scherer, S.S.; Fariñas, I.; Palau, F. Cell Expression of GDAP1 in the Nervous System and Pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth Type 4A Disease. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 679–689. [[CrossRef](#)]
10. López Del Amo, V.; Seco-Cervera, M.; García-Giménez, J.L.; Whitworth, A.J.; Pallardó, F.V.; Galindo, M.I. Mitochondrial Defects and Neuromuscular Degeneration Caused by Altered Expression of Drosophila Gdap1: Implications for the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 21–36. [[CrossRef](#)]
11. López del Amo, V.; Palomino-Schätzlein, M.; Seco-Cervera, M.; García-Giménez, J.L.; Pallardó, F.V.; Pineda-Lucena, A.; Galindo, M.I. A Drosophila Model of GDAP1 Function Reveals the Involvement of Insulin Signalling in the Mitochondria-Dependent Neuromuscular Degeneration. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 801–809. [[CrossRef](#)]
12. Niemann, A.; Huber, N.; Wagner, K.M.; Somandin, C.; Horn, M.; Lebrun-Julien, F.; Angst, B.; Pereira, J.A.; Halfter, H.; Welzl, H.; et al. The Gdap1 Knockout Mouse Mechanistically Links Redox Control to Charcot-Marie-Tooth Disease. *Brain* **2014**, *137*, 668–682. [[CrossRef](#)]
13. Barneo-Muñoz, M.; Juárez, P.; Civera-Tregón, A.; Yndriago, L.; Pla-Martin, D.; Zenker, J.; Cuevas-Martín, C.; Estela, A.; Sánchez-Aragó, M.; Forteza-Vila, J.; et al. Lack of GDAP1 Induces Neuronal Calcium and Mitochondrial Defects in a Knockout Mouse Model of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. *PLOS Genet.* **2015**, *11*, e1005115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rzepnikowska, W.; Kaminska, J.; Kabzińska, D.; Kochański, A. Pathogenic Effect of GDAP1 Gene Mutations in a Yeast Model. *Genes* **2020**, *11*, 310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Huber, N.; Guimaraes, S.; Schrader, M.; Suter, U.; Niemann, A. Charcot-Marie-Tooth Disease-associated Mutants of GDAP1 Dissociate Its Roles in Peroxisomal and Mitochondrial Fission. *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 545–552. [[CrossRef](#)]
16. Cassereau, J.; Chevrollier, A.; Gueguen, N.; Malinge, M.-C.; Letournel, F.; Nicolas, G.; Richard, L.; Ferre, M.; Verny, C.; Dubas, F.; et al. Mitochondrial Complex I Deficiency in GDAP1-Related Autosomal Dominant Charcot-Marie-Tooth Disease (CMT2K). *Neurogenetics* **2009**, *10*, 145–150. [[CrossRef](#)]
17. Cassereau, J.; Chevrollier, A.; Codron, P.; Goizet, C.; Gueguen, N.; Verny, C.; Reynier, P.; Bonneau, D.; Lenaers, G.; Procaccio, V. Oxidative Stress Contributes Differentially to the Pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2K. *Exp. Neurol.* **2020**, *323*, 113069. [[CrossRef](#)]
18. Chen, C.X.; Li, J.Q.; Dong, H.L.; Bai, G.; Wu, Z.Y. Identification and Functional Characterization of Novel GDAP1 Variants in Chinese Patients with Charcot-Marie-Tooth Disease. *Authorea* **2020**. [[CrossRef](#)]
19. Niemann, A.; Wagner, K.M.; Rugg, M.; Suter, U. GDAP1 Mutations Differ in Their Effects on Mitochondrial Dynamics and Apoptosis Depending on the Mode of Inheritance. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *36*, 509–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wagner, K.M.; Rugg, M.; Niemann, A.; Suter, U. Targeting and Function of the Mitochondrial Fission Factor GDAP1 Are Dependent on Its Tail-Anchor. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5160. [[CrossRef](#)]
21. Kabzińska, D.; Niemann, A.; Drac, H.; Huber, N.; Potulska-Chromik, A.; Hausmanowa-Petrusewicz, I.; Suter, U.; Kochański, A. A New Missense GDAP1 Mutation Disturbing Targeting to the Mitochondrial Membrane Causes a Severe Form of AR-CMT2C Disease. *Neurogenetics* **2011**, *12*, 145–153. [[CrossRef](#)]
22. Noack, R.; Frede, S.; Albrecht, P.; Henke, N.; Pfeiffer, A.; Knoll, K.; Dehmel, T.; Meyer zu Hörste, G.; Stettner, M.; Kieseier, B.C.; et al. Charcot-Marie-Tooth Disease CMT4A: GDAP1 Increases Cellular Glutathione and the Mitochondrial Membrane Potential. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 150–162. [[CrossRef](#)]
23. Pla-Martín, D.; Rueda, C.B.; Estela, A.; Sánchez-Piris, M.; González-Sánchez, P.; Traba, J.; de la Fuente, S.; Scorrano, L.; Renau-Piqueras, J.; Alvarez, J.; et al. Silencing of the Charcot-Marie-Tooth Disease-Associated Gene GDAP1 Induces Abnormal Mitochondrial Distribution and Affects Ca<sup>2+</sup> Homeostasis by Reducing Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Neurobiol. Dis.* **2013**, *55*, 140–151. [[CrossRef](#)]
24. González-Sánchez, P.; Pla-Martín, D.; Martínez-Valero, P.; Rueda, C.B.; Calpena, E.; del Arco, A.; Palau, F.; Satrustegui, J. CMT-Linked Loss-of-Function Mutations in GDAP1 Impair Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry-Stimulated Respiration. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42993. [[CrossRef](#)]
25. Cantarero, L.; Juárez-Escoto, E.; Civera-Tregón, A.; Rodríguez-Sanz, M.; Roldán, M.; Benítez, R.; Hoenicka, J.; Palau, F. Mitochondria-Lysosome Membrane Contacts Are Defective in GDAP1-Related Charcot-Marie-Tooth Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2021**, *29*, 3589–3605. [[CrossRef](#)]



26. Binięda, K.; Rzepnikowska, W.; Kolakowski, D.; Kaminska, J.; Szczepankiewicz, A.A.; Nieznańska, H.; Kochański, A.; Kabzińska, D. Mutations in GDAP1 Influence Structure and Function of the Trans-Golgi Network. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 914. [[CrossRef](#)]
27. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Faye, P.-A.; Vedrenne, N.; Miressi, F.; Rassat, M.; Romanenko, S.; Richard, L.; Bourthoumieu, S.; Funalot, B.; Sturtz, F.; Favreau, F.; et al. Optimized Protocol to Generate Spinal Motor Neuron Cells from Induced Pluripotent Stem Cells from Charcot Marie Tooth Patients. *Brain Sci.* **2020**, *10*, 407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Saporta, M.A.; Dang, V.; Volfson, D.; Zou, B.; Xie, X.S.; Adebola, A.; Liem, R.K.; Shy, M.; Dimos, J.T. Axonal Charcot–Marie–Tooth Disease Patient-Derived Motor Neurons Demonstrate Disease-Specific Phenotypes Including Abnormal Electrophysiological Properties. *Exp. Neurol.* **2015**, *263*, 190–199. [[CrossRef](#)]
30. Van Lent, J.; Verstraelen, P.; Asselbergh, B.; Adriaenssens, E.; Mateiu, L.; Verbist, C.; De Winter, V.; Eggermont, K.; Van Den Bosch, L.; De Vos, W.H.; et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Motor Neurons of CMT Type 2 Patients Reveal Progressive Mitochondrial Dysfunction. *Brain* **2021**, awab226. [[CrossRef](#)]
31. Kim, J.-Y.; Woo, S.-Y.; Hong, Y.B.; Choi, H.; Kim, J.; Choi, H.; Mook-Jung, I.; Ha, N.; Kyung, J.; Koo, S.K.; et al. HDAC6 Inhibitors Rescued the Defective Axonal Mitochondrial Movement in Motor Neurons Derived from the Induced Pluripotent Stem Cells of Peripheral Neuropathy Patients with *HSPB1* Mutation. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Shi, L.; Huang, L.; He, R.; Huang, W.; Wang, H.; Lai, X.; Zou, Z.; Sun, J.; Ke, Q.; Zheng, M.; et al. Modeling the Pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A Using Patient-Specific iPSCs. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 120–133. [[CrossRef](#)]
33. Martí, S.; León, M.; Orellana, C.; Prieto, J.; Ponsoda, X.; López-García, C.; Vilchez, J.J.; Sevilla, T.; Torres, J. Generation of a Disease-Specific IPS Cell Line Derived from a Patient with Charcot-Marie-Tooth Type 2K Lacking Functional GDAP1 Gene. *Stem Cell Res.* **2017**, *18*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Miressi, F.; Faye, P.-A.; Pyromali, I.; Bourthoumieu, S.; Derouault, P.; Husson, M.; Favreau, F.; Sturtz, F.; Magdelaine, C.; Lia, A.-S. A Mutation Can Hide Another One: Think Structural Variants! *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 2095–2099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wetzig, A.; Alaiya, A.; Al-Alwan, M.; Pradez, C.; Pulicat, M.S.; Al-Mazrou, A.; Shinwari, Z.; Sleiman, G.; Ghebeh, H.; Al-Humaidan, H.; et al. Differential Marker Expression by Cultures Rich in Mesenchymal Stem Cells. *BMC Cell Biol.* **2013**, *14*, 54. [[CrossRef](#)]
36. Itoh, M.; Umegaki-Arao, N.; Guo, Z.; Liu, L.; Higgins, C.A.; Christiano, A.M. Generation of 3D Skin Equivalents Fully Reconstituted from Human Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77673. [[CrossRef](#)]
37. Rzepnikowska, W.; Kochański, A. A Role for the GDAP1 Gene in the Molecular Pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **2018**, *78*, 1–13. [[CrossRef](#)]
38. Civera-Tregón, A.; Domínguez, L.; Martínez-Valero, P.; Serrano, C.; Vallmitjana, A.; Benítez, R.; Hoenicka, J.; Satrustegui, J.; Palau, F. Mitochondria and Calcium Defects Correlate with Axonal Dysfunction in GDAP1-Related Charcot-Marie-Tooth Mouse Model. *Neurobiol. Dis.* **2021**, *152*, 105300. [[CrossRef](#)]
39. Googins, M.R.; Woghiren-Afegbua, A.O.; Calderon, M.; St. Croix, C.M.; Kiselyov, K.I.; VanDemark, A.P. Structural and Functional Divergence of GDAP1 from the Glutathione S-transferase Superfamily. *FASEB J.* **2020**, *34*, 7192–7207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Estela, A.; Pla-Martín, D.; Sánchez-Piris, M.; Sesaki, H.; Palau, F. Charcot-Marie-Tooth-Related Gene *GDAP1* Complements Cell Cycle Delay at G<sub>2</sub>/M Phase in *Saccharomyces Cerevisiae* *Fis1* Gene-Defective Cells. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 36777–36786. [[CrossRef](#)]
41. Auer-Grumbach, M.; Fischer, C.; Papić, L.; John, E.; Plecko, B.; Bittner, R.; Bernert, G.; Pieber, T.; Miltenberger, G.; Schwarz, R.; et al. Two Novel Mutations in the GDAP1 and PRX Genes in Early Onset Charcot-Marie-Tooth Syndrome. *Neuropediatrics* **2008**, *39*, 33–38. [[CrossRef](#)]
42. Perkins, G.; Bossy-Wetzell, E.; Ellisman, M.H. New Insights into Mitochondrial Structure during Cell Death. *Exp. Neurol.* **2009**, *218*, 183–192. [[CrossRef](#)]
43. Vallat, J.-M.; Ouvrier, R.A.; Pollard, J.D.; Magdelaine, C.; Zhu, D.; Nicholson, G.A.; Grew, S.; Ryan, M.M.; Funalot, B. Histopathological Findings in Hereditary Motor and Sensory Neuropathy of Axonal Type with Onset in Early Childhood Associated With *Mitofusin 2* Mutations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2008**, *67*, 1097–1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Benedetti, S.; Previtali, S.C.; Coviello, S.; Scarlato, M.; Cerri, F.; Di Pierri, E.; Piantoni, L.; Spiga, I.; Fazio, R.; Riva, N.; et al. Analyzing Histopathological Features of Rare Charcot-Marie-Tooth Neuropathies to Unravel Their Pathogenesis. *Arch. Neurol.* **2010**, *67*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chen, H.; Chan, D.C. Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 39–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Prieto, J.; León, M.; Ponsoda, X.; García-García, F.; Bort, R.; Serna, E.; Barneo-Muñoz, M.; Palau, F.; Dopazo, J.; López-García, C.; et al. Dysfunctional Mitochondrial Fission Impairs Cell Reprogramming. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 3240–3250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Jarc, E.; Petan, T. Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. *Yale J. Biol. Med.* **2019**, *18*, 435–452.
48. Boren, J.; Brindle, K.M. Apoptosis-Induced Mitochondrial Dysfunction Causes Cytoplasmic Lipid Droplet Formation. *Cell Death Differ.* **2012**, *19*, 1561–1570. [[CrossRef](#)]
49. Farmer, B.C.; Walsh, A.E.; Klumper, J.C.; Johnson, L.A. Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 742. [[CrossRef](#)]

50. Bailey, A.P.; Koster, G.; Guillermier, C.; Hirst, E.M.A.; MacRae, J.I.; Lechene, C.P.; Postle, A.D.; Gould, A.P. Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* **2015**, *163*, 340–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Panes, J.; Wendt, A.; Ramirez-Molina, O.; Castro, P.; Fuentealba, J. Deciphering the Role of PGC-1 $\alpha$  in Neurological Disorders: From Mitochondrial Dysfunction to Synaptic Failure. *Neural Regen. Res.* **2022**, *17*, 237. [[CrossRef](#)]
52. Chaturvedi, R.K.; Calingasan, N.Y.; Yang, L.; Hennessey, T.; Johri, A.; Beal, M.F. Impairment of PGC-1 $\alpha$  Expression, Neuropathology and Hepatic Steatosis in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease Following Chronic Energy Deprivation. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 3190–3205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Choi, J.; Chandrasekaran, K.; Inoue, T.; Muragundla, A.; Russell, J.W. PGC-1 $\alpha$  Regulation of Mitochondrial Degeneration in Experimental Diabetic Neuropathy. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *64*, 118–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chandrasekaran, K.; Anjaneyulu, M.; Choi, J.; Kumar, P.; Salimian, M.; Ho, C.-Y.; Russell, J.W. Role of Mitochondria in Diabetic Peripheral Neuropathy: Influencing the NAD<sup>+</sup>-Dependent SIRT1–PGC-1 $\alpha$ –TFAM Pathway. *Int. Rev. Neurobiol.* **2019**, *145*, 177–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Actualité depuis la publication de l'article N°2

Depuis la publication de cet article, la liste des rôles de GDAP1 a progressé. On rapporte à présent l'implication de GDAP1 dans le contact entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique en interagissant avec la protéine actine-collifine-1. Comme l'actine-cofiline-1 est une protéine liant l'actine, une réduction de filaments d'actine à proximité des mitochondries a été observée dans les cellules avec GDAP1 muté (Wolf et al., 2022). Un rôle également dans le contact entre la mitochondrie et le lysosome a été aussi décrit (Pijuan et al., 2022), ainsi que dans le processus d'autophagie (Pijuan et al., 2022). Très récemment, dans une étude métabolomique, GDAP1 a été identifié parmi les dix gènes impliqués dans l'action de l'ostholé sur le microbiote intestinal, dans le cadre de douleur neuropathique (Li et al., 2022). Ces différents processus restent à caractériser dans notre modèle cellulaire.

Le protocole de la différenciation des motoneurones dérivé d'iPSc pour GDAP1 a été rapporté pour la première fois dans notre équipe. Récemment une équipe allemande a créé un modèle d'iPSc GDAP1 (p.Leu239Phe+p.Arg273Gly et c.579 + 1G>A) (Wolf et al., 2022), qu'ils ont différencié en motoneurones en adaptant le protocole de différenciation neuronale décrit par Reinhardt *et al* (Reinhardt et al., 2013).

# *Efficacité des molécules de translecture et inhibiteurs du NMD sur des progéniteurs neuronaux porteurs de la mutation c.581C>G (p.Ser194\*), à l'état homozygote sur le gène GDAP1*

---

## I. Introduction

Avant de tester une stratégie thérapeutique visant les mutations non-sens de notre modèle cellulaire de neuropathies CMT-GDAP1, nous avons voulu vérifier si les molécules pouvaient entrer et agir dans les progéniteurs neuronaux de contrôle et agir sur un système rapporteur. Cela correspondrait alors à une preuve de concept de l'efficacité de telles molécules dans un modèle cellulaire de neuropathies.

Nous avons également vérifié que les ARNm GDAP1 muté de notre modèle pouvaient être une cible possible pour les molécules de translecture et pour les inhibiteurs du système NMD.

Et nous avons modifié le protocole de différenciation des iPSc en motoneurones afin de « simplifier » leur création.

Ces trois points sont présentés dans les pages suivantes en préambule de l'article N°3.

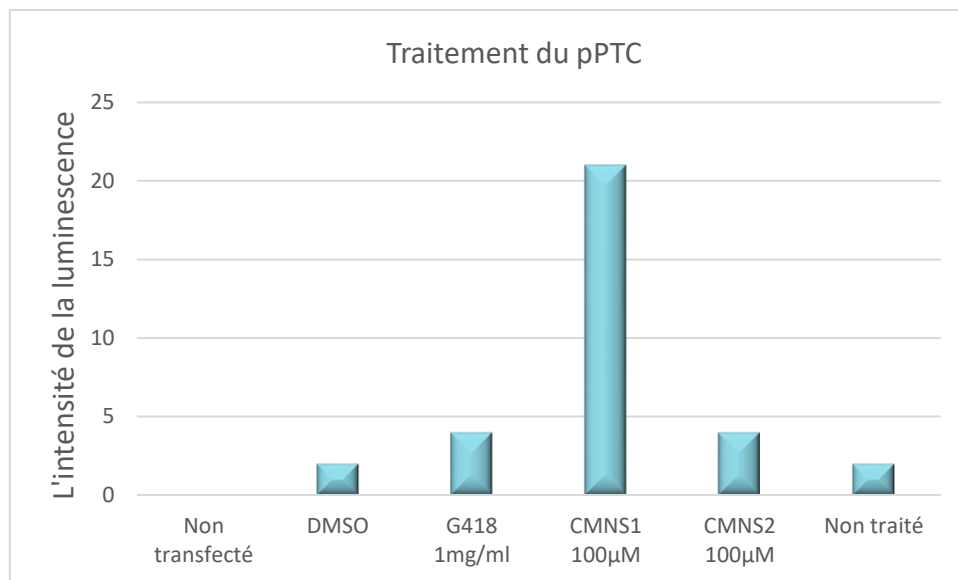
### 1. Preuve de concept : Molécules de translecture

Avant de tester ces molécules sur les MN dérivés d'iPSc du patient, nous avons confirmé dans un premier temps si ces molécules pénétraient dans les cellules neuronales dérivées d'iPSc. Nous avons également recherché leur efficacité sur la correction de mutations non-sens d'intérêt présentes dans un système rapporteur inséré au sein de notre modèle. Pour cela, j'ai transfecté des progéniteurs neuronaux issus d'iPSc de contrôle avec des constructions plasmidiques adéquates soit avec le plasmide pFlucWT ou pFlucUGA (Benhabiles et al., 2017). Ce dernier plasmide exprime la luciférase firefly (Fluc) avec une mutation non-sens dans la partie codante. Cette construction contient également une séquence intronique qui sera soumise au système



NMD. Ces constructions plasmidiques ont été conçues par nos collègues de l'institut Pasteur de Lille.

Les cellules transfectées ont ensuite été traitées pendant une durée de 20h avec 1mg/ml de G418 (contrôle positif), et de 100 $\mu$ M de molécules de translecture identifiées par nos collègues lillois : CMNS1 et CMNS2. Nous avons observé des augmentations de la luminescence dans les PN transfectés avec pFlucUGA traités avec la molécule CMNS1 à 100 $\mu$ M de façon plus importante que pour le traitement avec G418 (figure 27).



*Figure 27: Résultats des tests des molécules de translecture dans des PN transfectés par pFlucUGA. Les PN ont été traités avec CMNS1 et CMNS2 à 100 $\mu$ M, et avec du G418 à 1mg/ml (Contrôle positif), et DMSO (contrôle négatif) pendant 20h. L'intensité de la luminescence a été normalisée par rapport à celles des PN non transfectés.*

Les résultats obtenus pour le pFlucWT a servi de témoin pour montrer que nous étions capables de transfecter correctement les PN. Pour le plasmide pFlucUGA, un effet de translecture sur l'expression de la protéine Luciférase a été observé avec les molécules de translecture CMNS1 et CMNS2, ainsi qu'avec notre témoin positif G418.

## 2. Vérification de la présence de la mutation non-sens sur le gène *GDAP1* dans notre modèle cellulaire.

Dans notre modèle, la mutation non-sens c.581C>G (p.Ser194\*) de *GDAP1* se localise sur une bordure intron-exon, en 5' de l'exon 5. Avant de tester des molécules de translecture sur notre modèle, il était donc important de vérifier que l'épissage de l'ARNm muté était toujours correct et que la mutation non-sens était toujours présente. Après extraction d'ARNm des motoneurons, reverse transcription, PCR avec des amorces présentes sur les exons 5 et 6, permettant ainsi l'amplification de l'ensemble de l'ARNm, puis séquençage Sanger, nous avons confirmé la présence de la mutation ponctuelle c.581C>G à l'état homozygote dans les MN dérivés d'iPSc du patient induisant ainsi le remplacement du codon sens TCA codant l'acide aminé sérine par un codon stop TGA en position 194 (figure 28). Nous avons ainsi confirmé la présence de ce codon STOP prématuré au niveau de l'ARNm *GDAP1* muté.

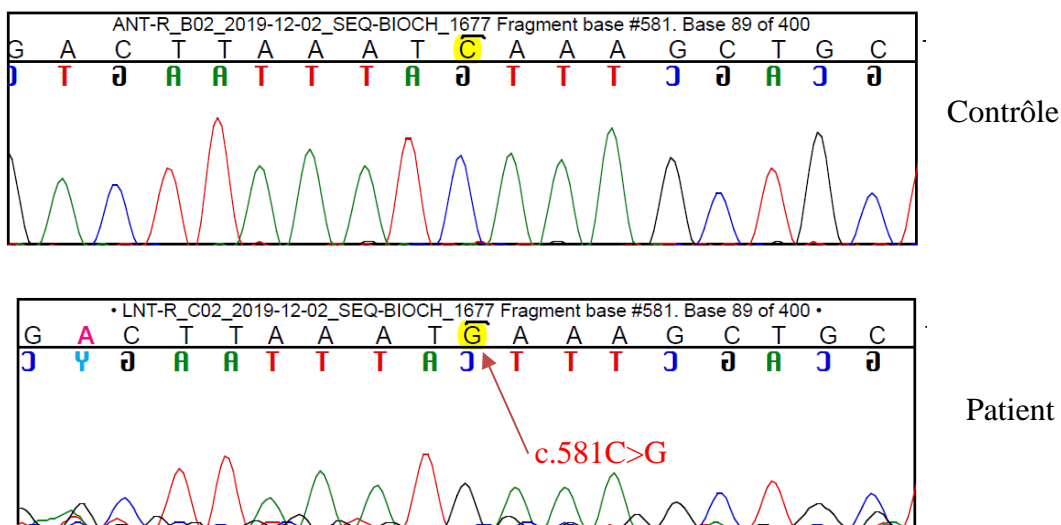


Figure 28 : Résultats obtenus par le séquençage Sanger confirmant la présence de la mutation c.581C>G, p.Ser194\* à l'état homozygote de l'exon 5 de *GDAP1* dans les MN issus de patient comparé aux MN contrôle.

La présence de PTC au niveau de l'ARNm, pose alors la question de la stabilité de cet ARNm et de sa sensibilité au système NMD. Ce système dégrade en effet les ARNm porteur de PTC uniquement s'il se trouve à plus de 55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon. Dans notre cas, le PTC est sur l'avant dernier exon du gène (Exon 5 sur 6) et il est localisé à 193 nucléotides en amont de la dernière EJC. Tous ces éléments sont donc en faveur d'une action très probable du système NMD sur cet ARNm muté (figure 29).



Figure 29: Représentation schématique du gène *GDAP1* avec la position de la mutation *c.581C>G*, montrant la possible action du système NMD sur cet ARNm muté.

### 3. Adaptation du protocole de différenciation en PN et MN.

#### 3.1 Optimisation de la culture des iPSc de feeder en feeder free

La culture des iPSc en feeder (boite « coatée » avec des MEF : Mouse embryonic fibroblasts) est chronophage. En effet, un entretien régulier est nécessaire, le passage des iPSc se fait par une sélection à l'aiguille afin de nettoyer les zones différenciées, et la culture est réalisée sur des MEF qui doivent être préalablement ensemencées une journée avant le passage des cellules. De plus, les MEF ont une origine animale ce qui présente un inconvénient majeur d'interaction inter-espèce.

Afin d'optimiser certains de ces aspects, les iPSc ont été cultivées en feeder-free. Leur entretien consiste en un simple changement de milieu déjà prêt à l'emploi avec du mTeSR, et un «coattage » en Geltrex. Ces conditions ont amélioré le rendement d'obtention et ont largement simplifié la culture journalière.

### 3.2 Différenciation d'iPSc en cellules neuronales

Le protocole mis au point précédemment dans notre laboratoire conduisait à la création de motoneurons de qualité, mais il ne permettait pas d'avoir une quantité suffisante de cellules neuronales pour pouvoir réaliser tous les tests nécessaires à l'évaluation de l'efficacité de différentes molécules thérapeutiques. De plus, l'étape d'apparition des rosettes, est une étape lente, qui nécessite un travail très minutieux et difficile pour sélectionner des PN et des MN. J'ai donc mis en place au sein du laboratoire un nouveau protocole de différenciation qui nous a permis d'obtenir facilement des précurseurs neuronaux qui seront utilisés dans la suite des expérimentations.

Ce protocole a été adapté à partir du protocole de différenciation décrit précédemment par Hörner *et al.* Seule la partie protocolaire concernant la différenciation des MN issues de hiPSc a été utilisée et adaptée dans notre laboratoire. Ce protocole englobe 4 phases pour obtenir des MN matures en partant d'iPSc.

Phase 1 : les hiPSc de patients CMT et de contrôle à 75 % de confluence ont été placés dans un milieu de différenciation (milieu Neurobasal : Ko-DMEMF12 avec 1X B27, 1X N2, 1 % acides aminées non essentiels, et 1 % de Glutamax) complété avec 2 $\mu$ M SB-431542, 2  $\mu$ M dorsomorphine, 3  $\mu$ M CHIR 99021 et 0.1 mM Acide Ascorbique (AA). Le milieu a été changé quotidiennement pendant 5 jours.

Phase 2 : Pour obtenir les précurseurs neuronaux, les cellules ont ensuite été dissociées à l'aide d'Accutase, etensemencées dans un ratio de 1/6 sur une plaque 6 puits recouverte de Geltrex. Le milieu de différenciation a ensuite été complété avec 2  $\mu$ M d'SB-431542, 2  $\mu$ M

dorsomorphine, 1  $\mu$ M CHIR 99021, 0.1mM d'acide Ascorbique, 0,1  $\mu$ M d'acide rétinoïque, et 0,5  $\mu$ M purmorphamine. Le milieu a été changé également quotidiennement pendant 5 jours.

Phase 3 : À J10, les cellules ont ensuite été dissociées à l'aide de la Dispase II, et transférées dans un tube de 15ml. Lorsque les cellules sédimentent au fond du tube, elles sont alors récupérées dans le milieu de différenciation complété avec 0,1 mM Acide Ascorbique, 0,5 $\mu$ M Acide rétinoïque, 0,5 $\mu$ M Purmorphamine, 10ng/ml BDNF, 10ng/ml GDNF, 10ng/ml IGF-1, et cultivées en 100 mm (1 :1) ou en 60 mm (1 :2) Ultra-Low attachement. Tous les jours, les cellules sont récupérées dans des tubes 15 ml, après sédimentation, le surnageant est aspiré et remplacé par un nouveau milieu de différenciation pendant 5 à 6 jours.

Phase 4 : À J15/J16, lorsque les corps embryonnaires (EB) sont bien formés, ils sont dissociés avec de l'Accumax, puis ensemencés dans des boîtes « coatées » avec 20 $\mu$ g/ml de poly-L-ornithine et 5  $\mu$ g/ml de laminine. Le milieu de culture correspondant au milieu de différenciation de la phase 3, additionné de 0,1 $\mu$ M de composé E, et en réduisant la concentration de la purmorphamine à 0.1 $\mu$ M. Le changement de milieu se fait le lendemain du passage, puis tous les deux jours de façon très délicate pour ne pas détacher les MN.

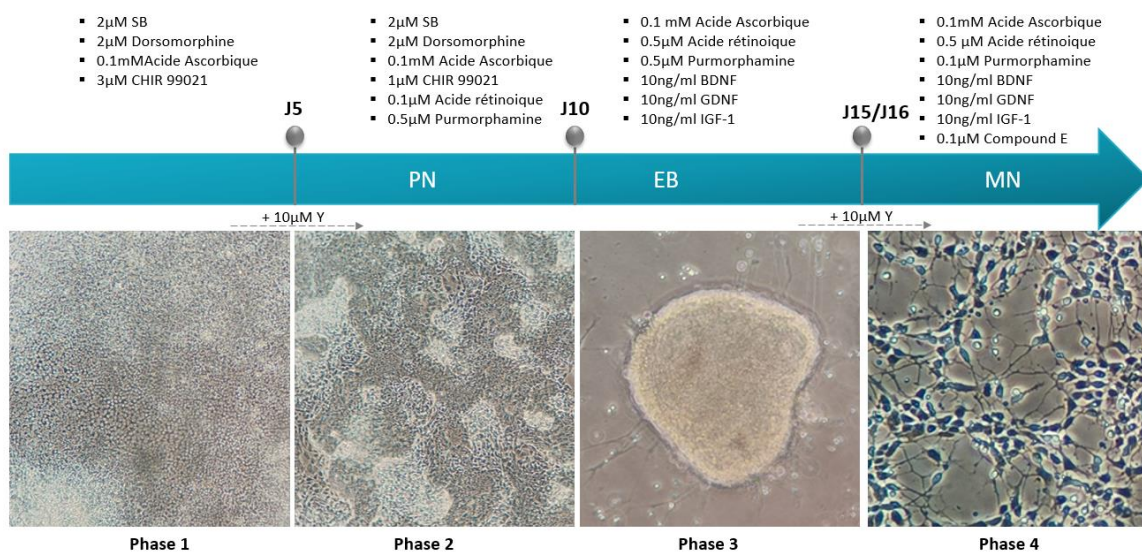


Figure 30: Représentation schématique du protocole de différenciation d'iPSc en MN.

## **Impact des changements du protocole de différenciation**

### Molécules de différenciation

- DMH1 : cette molécule a été remplacée par la dorsomorphine. Ces deux molécules contribuent à l'inhibition de la voie BMP via le récepteur ALK2 (receptor activin receptor-like kinase 2).
- Y : l'inhibiteur de ROCK1, 10 $\mu$ M a été additionné durant le passage de la phase 1 en phase 2, et de la phase 3 en phase 4. Il offre une adhésion cellulaire après chaque passage, améliorant la survie des cellules neuronales.

### Le temps

- Le temps des passages pour chaque phase a été réduit de 6 à 5 jours.

### Le milieu de différenciation

- DMEMF12 a été remplacé par le Ko-DMEMF12, qui contient du KnockOut. Ce dernier permet de réduire la différenciation spontanée des cellules iPS et des cellules souches embryonnaires (Chaudhry et al., 2008).
- 1% d'acides aminés non essentiels ont été rajoutés au milieu de différenciation.

### Ensemencement des cellules

Les PN et les MN sont ensemencés à une densité cellulaire de  $5 \cdot 10^5$  cellules sur des lamelles dans des plaques 12 puits « coatés » préalablement avec du Geltrex pour les PN, et ornithine à 1mg/ml plus laminine à 5 $\mu$ g/ml pour les MN. Ce dernier coatage est également adapté pour les chambres microfluidiques permettant la survie des MN et la réalisation des études en multielectrodes array (MEA).

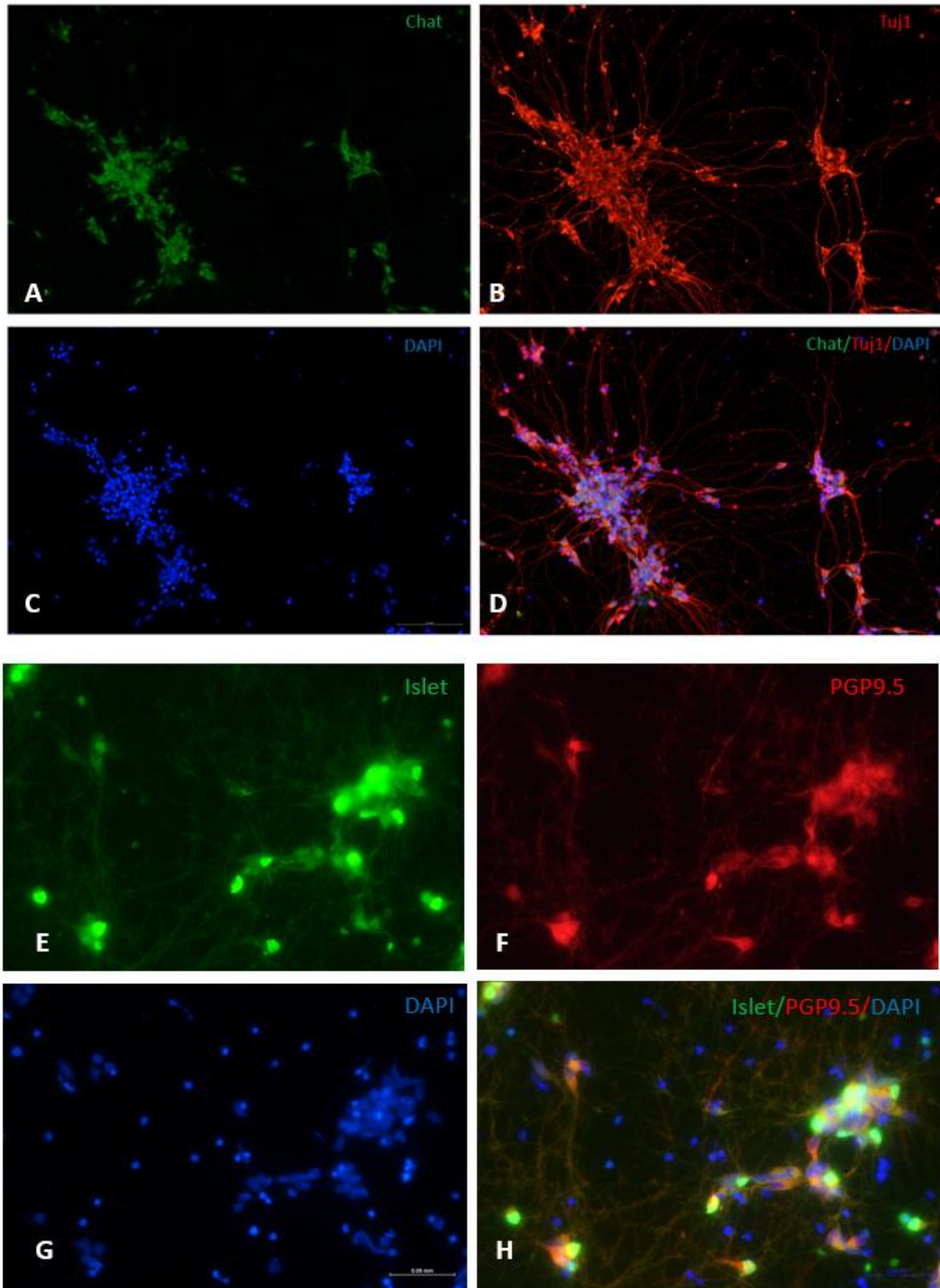


Dans les plaques 6 puits, il est nécessaire de préciser que l'ensemencement des PN se fait au 1:6, et celui des MN à  $4.10^6$  cellules.

### 3.3. Caractérisation des MN avec ce nouveau protocole de différenciation

- Phénotype neuronal des cellules obtenues

La majorité des MN obtenus après différenciation (J22), sont positifs pour les marqueurs PGP9.5 et Tuj1, ce qui confirme leur profil neuronal. Ils sont également positifs pour le marqueur islet qui caractérise les MN matures. Ils expriment également la ChAT (Choline acétyltransférase validant la présence de MN cholinergiques (figure 31).



*Figure 31: Caractérisation des motoneurones obtenus par le nouveau protocole de différenciation optimisé.*

*Images réalisées par immunohistochimie sur MN. (C, G) DAPI, (A) ChaT, (B) Tuj1, (D) ChaT+Tuj1+DAPI, (E) PGP9.5, (F) (Islet), (H) PGP9.5+ Islet+ DAPI.*

- Expression de l'ARNm *GDAP1* dans les PN et les MN

L'analyse par RT-qPCR, montre que de l'ARNm *GDAP1* portant le PTC est faiblement exprimé par rapport à celui issu du contrôle dans les PN et MN. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment obtenus avec les cellules neuronales issues du protocole initial (figure 32).

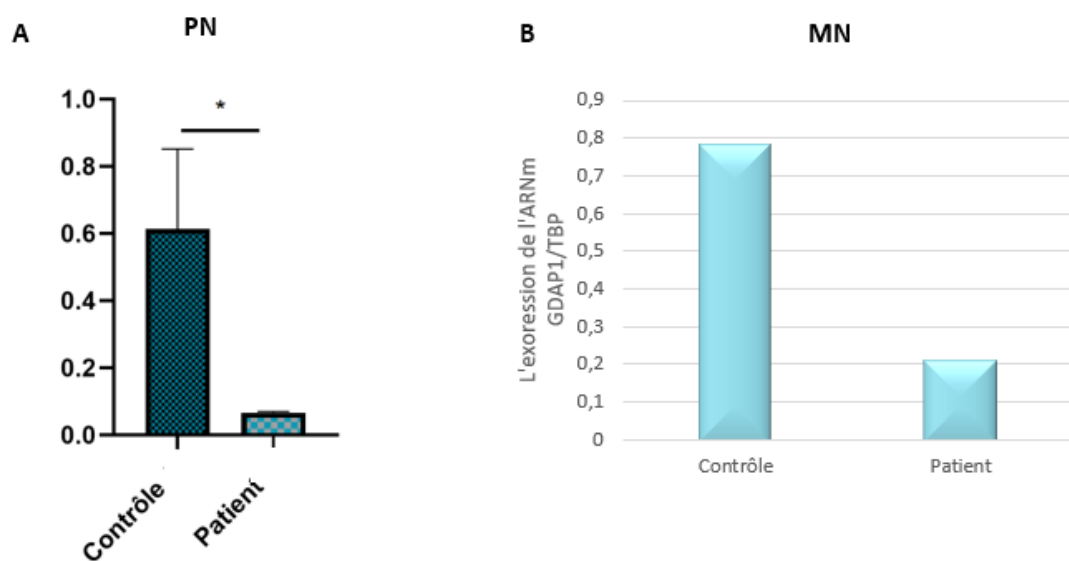
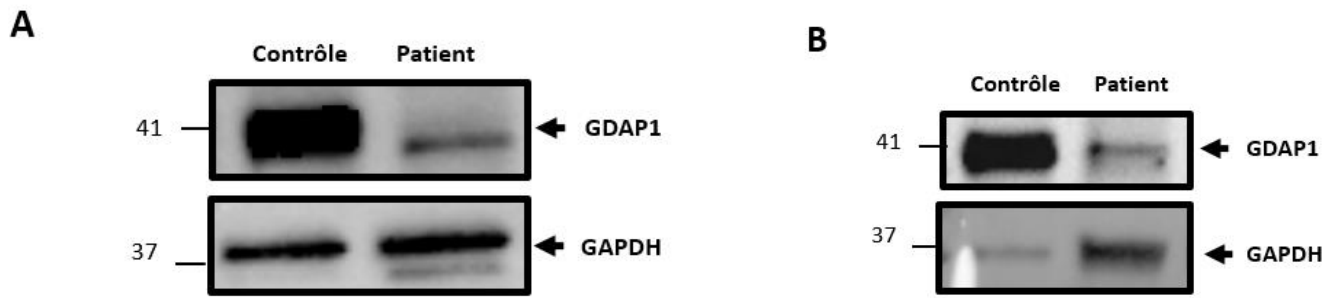


Figure 32: Expression de l'ARNm de *GDAP1* dans les MN issus d'iPSc du chez des patient porteur de la mutation *c.581C>G* dans le gène *GDAP1* et le du contrôle dans les PN.

PN : N=3, MN : N=1

- Expression de la protéine *GDAP1* dans les PN et les MN

En accord avec les résultats sur l'expression de l'ARNm, l'analyse par Western Blot utilisant un anticorps anti-*GDAP1* (polyclonal), montre une très faible expression de la protéine *GDAP1* dans les PN (A) et les MN (B) (figure 7) matures issus du patient comparés au contrôle. Cette petite expression de la protéine *GDAP1* pourrait être expliquée par le fait qu'une faible proportion de l'ARNm portant le PTC arrive à échapper au système NMD.



*Figure 33: Analyse par western blot de l'expression protéique de GDAP1 chez les cellules issues du contrôle et du patient et le patient porteur de la mutation d'intérêt dans les PN (A), et les MN (B).*

*Article 3: Amlexanox: A double property of Read-through and Nonsense Mediated Decay Inhibition in Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived neuronal cells harboring a nonsense mutation in the GDAP1 gene.*

---

**Auteurs:**

Nesrine Benslimane, et co-auteurs

Article en préparation

### Présentation résumée de l'article N°3

Les mutations non-sens sont à l'origine de multiples neuropathies périphériques. Ces mutations induisent la présence d'un codon stop prématuré (PTC) au niveau de l'ARNm. En conséquence, une protéine dysfonctionnelle ou tronquée est synthétisée ou même totalement absente en raison de l'activation du système de dégradation de l'ARNm à médiation non-sens (NMD). Charcot-Marie-Tooth (CMT) est la pathologie héréditaire la plus courante du système nerveux périphérique, affectant 1 personne sur 2 500 dans le monde. Des mutations non-sens du gène *GDAP1* ont été associées à une forme sévère de CMT, nous incitant à étudier l'effet de la translecture et des molécules inhibitrices de la NMD. Bien que son rôle ne soit pas complètement défini, *GDAP1* pourrait être impliqué dans des fonctions mitochondriales telles que la mitophagie. Nous nous sommes concentrés sur la mutation homozygote c.581C>G (p.Ser194\*) induisant un CMT2H en utilisant des cellules neuronales dérivées de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) du patient. Les molécules de translecture ou les inhibiteurs de NMD pourraient être une thérapie innovante dans ces neuropathies héréditaires, en particulier les molécules portant la double activité comme l'amlexanox. Un traitement pendant 20h avec 100µM d'amlexanox sur des progéniteurs neuronaux est capable de stabiliser les ARNm *GDAP1* portant un UGA-PTC et d'induire une restauration de la morphologie des mitochondries et de l'appareil de Golgi. Ces résultats soulignent que les molécules de translecture associées aux inhibiteurs de NMD pourraient être utilisées dans ces altérations génétiques de la CMT, ouvrant la voie à de futures investigations et à une thérapie potentielle.



# Amlexanox: A double property of Readthrough and Nonsense Mediated Decay Inhibition in Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived neuronal cells harboring a nonsense mutation in the *GDAP1* gene.

Nesrine Benslimane <sup>1</sup>, and co-authors.

<sup>1</sup> NeurIT UR 20218, GEIST Institute, University of Limoges, F-87000 Limoges, France;

<sup>2</sup> Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Limoges, Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France.

<sup>3</sup> CHU Limoges, Service de Neurologie, F-87000 Limoges, France

<sup>4</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France.

**Abstract:** Nonsense mutations are the cause of multiple peripheral neuropathies. These mutations induce the presence of a premature stop codon (PTC) at the mRNA level. As a result, a dysfunctional or truncated protein is synthesized, or it is even entirely absent, because of nonsense-mediated mRNA degradation (NMD) system activation. Charcot-Marie-Tooth (CMT) is the most common inherited pathology of the peripheral nervous system, affecting 1 in 2,500 people worldwide. Nonsense mutations in the *GDAP1* gene have been associated with a severe form of CMT, prompting us to investigate the effect of readthrough and NMD inhibitors molecules. Although non clearly defined, *GDAP1* could be involved in mitochondrial functions such as mitophagy. We focused on the homozygous c.581C>G (p.Ser194\*) mutation inducing CMT2H using patient's human induced-pluripotent stem cells (hiPSCs)-derived neuronal cells. Readthrough molecules or NMD inhibitors could be an innovative therapy in these hereditary neuropathies, particularly molecules harboring the dual activity as Amlexanox. Treatment during 20h with 100µM of Amlexanox on this cell model stabilized *GDAP1* mRNAs carrying UGA-PTC and induced a restoration of the mitochondrial and Golgi apparatus morphology. These results underline that readthrough molecules associated to NMD inhibitors could be used in these genetic alterations in CMT, opening the way for future investigations and a potential therapy.

**Citation:** To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname  
Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

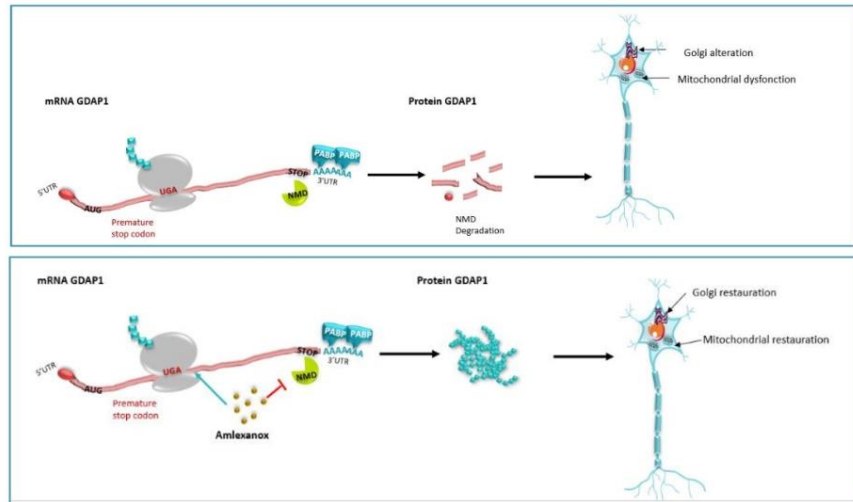
**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Graphical abstract

**Keywords:** GDAP1; CMT disease ; nonsense mutation, nonsense mRNA decay (NMD), readthrough molecules.



48

**1. Introduction**

49

Nonsense mutations cause 11% of genetic diseases (1), and are mainly induced by single nucleotide changes in the DNA coding region. These mutations can lead to a premature stop codon (PTC) in the mRNA, stopping the translation process before the natural termination codon (NTC). The presence of such PTC in the mRNA sequence has two main consequences. First, the PTC can induce the synthesis of an aberrant, even nonfunctional, truncated protein. Also, the corresponding PTC-containing mRNA could be recognized and degraded by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) system, leading to the lack of protein expression, and preventing the production of dysfunctional or non-functional proteins (2)

50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58

Recent therapeutic strategies, based on small pharmacological molecules, can be applied to limit or inhibit nonsense mutations consequences. The first approach consists in using readthrough (RT) molecules, that are able to bypass the PTC (3,4). These molecules allow, by the incorporation of a near cognate amino acid at the PTC position, to restore the full protein expression sometimes potentially modified. The second conceivable therapeutic approach, which is commonly associated to the first one, involves molecules able to inhibit the NMD system in order to prevent mRNA degradation.

59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Both types of molecules have been previously identified and characterized, and, it has been shown that, sometimes, they even combine both mechanical approaches. The first class, the RT molecules, is organized in aminoglycosides and nonaminoglycosides compounds (5). Aminoglycosides, such as G418 and gentamicin, induce translational readthrough by binding to the decoding center (A-site) of the rRNA, which is located in the small ribosomal subunit of the ribosome. This binding interacts to the ribosome translation fidelity (6). Despite their high efficiency to bypass nonsense mutations, these molecules are unfortunately known to induce ototoxicity and nephrotoxicity (7-9). To overcome this pitfall, new molecules, referred as aminoglycosides derivatives, were engineered. These molecules have been tested in several *in vitro* and *in vivo* models, and few of them have even reached clinical trials (10-12). The second type of molecule is represented by NMD inhibitors, interfering to prevent PTC detection and mRNA - containing PTC degradation by NMD. Moreover, some molecules, such as Amllexanox, are known to harboring both activities, offering an interesting and comprehensive strategy (13).

66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80

In neurodegenerative disorders, the readthrough strategy has been displayed only twice in the literature, both times regarding the central nervous system (13,14). For disorders affecting the peripheral nervous system, such as peripheral neuropathies like Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease, one study has been described (15). CMT is the most common inherited pathology of the peripheral nervous system, affecting 1 in 2,500 people worldwide. CMT disease is a heterogeneous group of sensory-motor disorders transmitted in either autosomal or X-linked mode of inheritance, in dominant or recessive forms. Clinical manifestations include muscular weakness and atrophy, foot deformities, such as *pes cavus*, and sometimes sensory loss and balance issues (16). In CMT, PTC, detected in numerous genes such as *GDP1*, are often responsible of this disease development.

*GDAP1* is part of the glutathione S-transferases (GST) family as it possesses two GST domains (GST N and GST C) (17). *GDAP1* protein is highly expressed in the outer mitochondrial membrane of neuronal cells (18,19) (Pedrola et al., 2005; Niemann et al., 2014) such as motor neurons (MN) and neuronal progenitors (PN). More than 100 mutations in this gene have been described as related to CMT (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), including, as the vast majority of them, autosomal recessive traits. Therefore, in view of the lack of efficient therapeutic approaches, assessing readthrough molecules for patients displaying nonsense mutation in this gene represents a major challenge. However, these therapeutic developments are often limited by the lack of pertinent *in vitro* models. Our team developed few years ago a human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) *in vitro* model from CMT patient's fibroblasts carrying the nonsense mutation c.581C>G in *GDAP1*(20) (Miressi et al., 2021).

To our knowledge, no curative and efficiency treatment has ever been proposed for CMT caused by nonsense mutations in *GDAP1* gene. In this study, originally, we propose to assess the effect of readthrough molecules and NMD inhibitor on neuronal progenitors derived from CMT patients' hiPSCs, harboring the homozygous c.581C>G nonsense mutation in *GDAP1* (p.Ser194\*). We underlined the rescue effects of cellular treatments at molecular and protein level, but also investigating their impact on mitochondrial and Golgi apparatus morphology.

## 2. Materials and Methods

### Cell Culture of Human iPS Lines

The Human induced-pluripotent stem cells (hiPSCs) were obtained from dermal fibroblasts of a CMT patient and a control subject. The patient was a male child carrying the homozygous c.581C>G (p.Ser194\*) mutation in *GDAP1*. He presented a severe axonal peripheral neuropathy and a polyvisceral disorder, which led to his death at the age of three. The control was a healthy 24-years-old male donor. Previous investigations allowed us to determine that the healthy individual did not show any signs of peripheral neuropathy, and did not carry any mutations in *GDAP1* (data not shown). hiPSCs clones of both subjects were obtained as previously described (20). hiPSCs were feeder-free cultured on a coating of diluted Geltrex (STEMCELL Technologies) and in mTeSR™1 medium (STEMCELL Technologies), at 37° C, 5% CO2. The culture medium was changed daily. Passages were carried out every 5 to 8 days using StemMACS Passaging solution XF (Miltenyi). Cells at passage 18 to 26 were used in this study.

### Differentiation of hiPSCs into Neuronal Progenitors (NPs)

The differentiation protocol was adapted from Hörner *et al* (21). Briefly, when hiPSCs reached 75 % confluence, mTeSR™1 medium was replaced with differentiation medium composed by Neurobasal medium and Ko-DMEMF12 (Thermo Fisher SCIENTIFIC) (1:1) complemented with 1X B27 (Thermo Fisher SCIENTIFIC), 1X N2 (Thermo Fisher SCIENTIFIC), 1% AANE (Non-essential amino acids, Thermo Fisher SCIENTIFIC), 1% Glutamax



(Thermo Fisher SCIENTIFIC), extemporaneously supplemented with 2 $\mu$ M SB-431542 (Tocris, Bio-Techne), 2  $\mu$ M dorsomorphin (Sigma-Aldrich, Merck), 3  $\mu$ M CHIR 99021 (Sigma-Aldrich, Merck), and 0.1 mM  $\mu$ M Ascorbic Acid (Tocris, Bio-Techne). The medium was changed daily for 5 days. To obtain NPs, cells were then dissociated using Accutase (STEMCELL Technologies) and plated at 1:6 ratio on Geltrex-coated 6-well plates. The culture medium was then supplemented with 2  $\mu$ M SB-431542, 2  $\mu$ M dorsomorphin, 1  $\mu$ M CHIR 99021, 0.1 $\mu$ M Ascorbic Acid, 0.1 $\mu$ M retinoic acid (Sigma-Aldrich, Merck), 0.5 $\mu$ M purmorphamin (Abcam). The medium was changed daily for 5 days.

### RNA extraction and analysis

RNAs were extracted from patient's and control's NPs following the instructions of the RNeasy Plus Mini Kit (©QIAGEN). Reverse transcription of 1 $\mu$ g of total RNA into cDNA was performed using the QuantiTect Reverse Transcription kit (©QIAGEN) and following the manufacturer's protocol. The analysis of gene expression was carried out by Real-Time Quantitative PCR (qPCR). Primers were designed spanning the exon/exon boundaries, of exons 5 and 6 of the *GDAP1* gene and exons 7 and 8 of the *TATA box binding protein (TBP)* gene, chosen as reference gene. All primers used are reported in **Table 1**. Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (400) (©QIAGEN) was used following the standard protocol. Reactions were performed on the Corbett Rotor-Gene 6000 Machine (© QIAGEN). The Ct values of each Real-Time reaction were normalized, using *TBP* as endogenous control gene.

**Table 1:** Primers of *GDAP1* and *TBP* used.

Gene	Direction	Exons	Primer sequence
<i>GDAP1</i>	F	5-6	GCTGCTTGATCATGACAATGT
	R	5-6	CCTCTTCTGGGGTTTCTCA
<i>TBP</i>	F	7-8	ACAGGTGCTAAAGTCAGAGC
	R	7-8	GAGGCAAGGGTACATGAGAG

### Immunocytochemistry and Immunoblots

Expression of GDAP1 protein has been assessed by immunofluorescence (IF). NPs were seeded on glass slides coated with diluted Geltrex. On day 4, cells were treated either with DMSO, or readthrough molecules, or NMDI molecules, using preset concentrations according to literature (**Table 2**). After 20 hours of treatment, cells were fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma-Aldrich, Merck), and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Merck) for one hour. Cells were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody, prepared in 3% BSA (bovine serum albumin) DPBS (Thermo Fisher SCIENTIFIC), then the next day with the secondary antibody (Alexa Fluor™ 488 or Alexa Fluor™ 594; Molecular Probes, Thermo-Fisher SCIENTIFIC, 1:2000 dilution), for 1h at room temperature. Nuclei were stained with 2  $\mu$ g/mL 4',6'-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich, Merck). Images captures were acquired using a fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar Germany). All antibodies' dilutions and references are reported in **Supplementary Table 1**. Tuj-1 and Nestin were chosen as neural progenitors' markers. Immunoblots were performed as previously described using GDAP1 antibody.

**Table 2.** Activity and Concentration of cell treatments.

Molecules	Concentration	Effects	Ref
G418	1mg/ml	Read through and NMDI	Life technologies
CMNS1	25µM	Read through	Pasteur institut of Lille
CMNS2	25µM	Read through	Pasteur institut of Lille
Amlexanox	100µM	Read through and NMDI	Sigma
NMDILim40	25µM	NMDI	Pasteur institut of Lille
NMDILim25	25µM	NMDI	Pasteur institut of Lille

**Supplementary Table 3.** Antibodies' dilutions and references.

Antibody	Concentration	Effects	Ref
GDAP1	1:25	Polyclonal-Rabbit	Proteintech
Tom20	1:200	Monoclonal-Mouse	Santa Cruz technologie
Tuj1	1:1000	Monoclonal-Mouse	R&D
Nestin	1:400	Polyclonal-Rabbit	Merck
Olig2	1:200	Polyclonal-Rabbit	Abcam
GAPDH	1:25000	Monoclonal-Mouse	Sigma

### Electron microscopy

All manipulations for the electron microscopy were performed in the Neurology and Anatomic Pathology departments at the University Hospital of Limoges. Cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde, then incubated 30 min, at RT, in 2% OsO<sub>4</sub> (Euromedex, Souffelweyersheim, France). After washing them with distilled water, they were dehydrated 10 min in a series of ethanol dilutions (30%, 50%, 70%, 95%) and three times in 100% ethanol. Finally, they were embedded overnight in Epon 812. Thin blocks were selected and stained with uranyl acetate and citrate and examined using a Jeol 1011 electron microscope.

### Western Blot Analysis.

NPs were treated with readthrough molecules, or NMDI small molecules, for 20h. Cells were then harvested by treatment with trypsin-EDTA (Invitrogen) and lysed in following the manufacturer's instruction (Cell Signaling Technology). Total proteins were quantified, using BSA for standard concentrations. 15µg of total protein extracts were denatured by incubation in Laemmli buffer (95%) and β-mercaptoéthanol (5%) for 5 min at 95 °C. After denaturation, protein samples were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide-gel electrophoresis in 4/20% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ gels (Bio-Rad). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, using the Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad). Membranes were saturated by overnight immersion with 1% BSA TBS (Tris buffers saline)- Tween 20 (1x PBS or TBS, 0.05% (v/v) Tween 20) at 4°C. The next day, membranes were incubated with the primary polyclonal

antibody (Table 3) overnight at 4 °C. After three washes in PBS supplemented with 0.1% Tween, the membranes were incubated with the secondary antibody for one hour at room temperature. The membranes were washed three times and chemiluminescence was detected with hyperfilm-PCL.

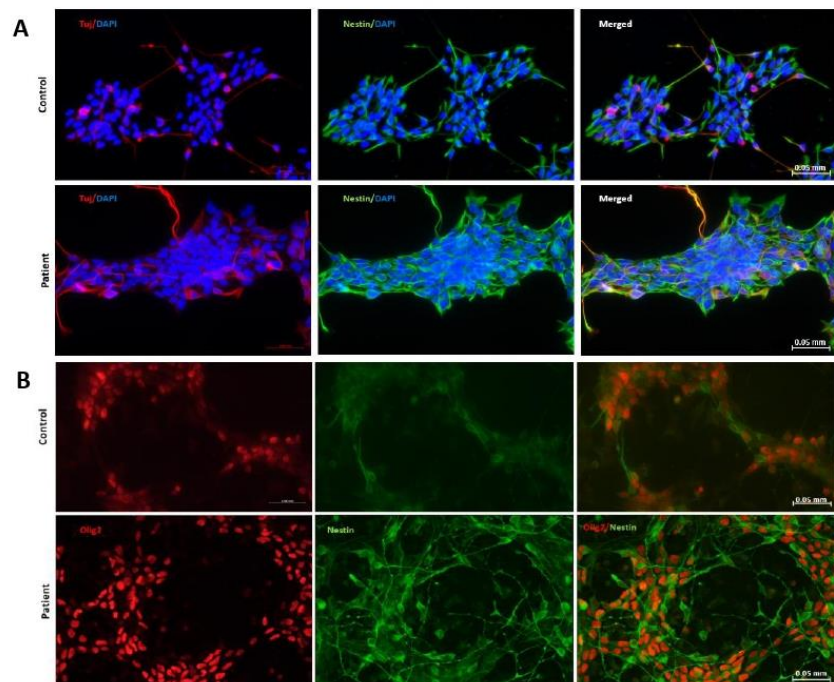
### Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Data were expressed as mean ± SEM (Standard Error of the Mean). Data were compared using the nonparametric Mann-Whitney test ( $p < 0.05$  was considered significant).

## 3. Results

### 3.1 Generation and characterization of neuronal progenitors (NPs) from hiPSCs

Two human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) clones, previously reprogrammed by our team (20) (Miressi et al., 2021), were used in this study: one harboring the homozygous *GDAP1* nonsense mutation (c.581C>G, p.Ser194\*) from patient's CMT and the other, that was used as a control, free from any mutations in this same gene (data not shown). To generate neuronal progenitors (NPs), we used a protocol adapted from Hörner *et al.* pMNs were obtained in 10 days. Both control and patient clones expressed the typical neuronal progenitor's markers Tuj1 and Nestin (Figure 1). These patients and control cells expressed also Olig 2, a marker for motor-neurons precursors. These proteins expressions validate the cells orientation towards the motor-neuron pathway.



**Figure 1.** Characterization of NPs in control's and patient's clones at day 10 assessed by neural markers. (A) Nestin (green), Tuj1 (red), DAPI counterstain (blue). (B) Olig2 (red) and Nestin (green). Scale bar = 0.05mm.



### 3.2 Readthrough and NMD inhibitors treatments on *GDAP1* mRNA expression in NPs

We previously observed, by RT-qPCR, in neuronal cells (NPs and MNs) that patient's mRNA levels of *GDAP1* represented only 10 to 20% of mRNA levels in the control, suggesting that PTC-containing *GDAP1* mRNA could be degraded by NMD (Miressi et al., 2021). To investigate the effect of small drugs molecules on PTC-mRNA levels, patient and control pMN cells were treated with either readthrough inducing molecules or NMD inhibitors at day 4 after differentiation (J14) for 20h. With real-Time PCR (RT-qPCR), we highlighted that molecules CMNS1 and CMNS2, known as readthrough molecules, were not able to increase *GDAP1* mRNA-carrying-PTC. The same result was obtained with NMD inhibitors molecules NMDLim40 and NMDLim25. However, the patient's clone treatment with Amlexanox (AML) at 100 $\mu$ M led to a significant increase of *GDAP1* mRNA to 3.35 fold compared to untreated pMNs. Our data supported that this mRNA carrying PTC is the substrate of the NMD system.

236

237

238

239

240

241

242

243

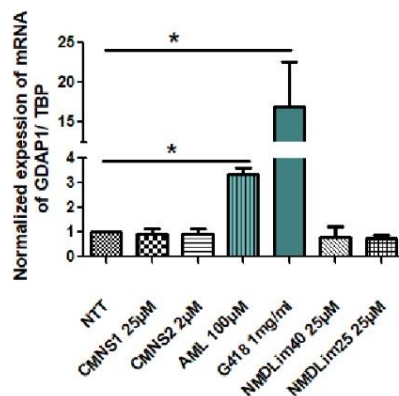
244

245

246

247

248



**Figure 2.** Effect of small molecules treatment on *GDAP1* mRNA expression in NPs. The NPs of patient were treated with different readthrough molecules (CMNS1, CMNS2, AML) or NMDI (AML, NMDLim40 and NMDLim25) molecules; G418 was used as positive control. After 20h of treatment, total RNAs were extracted. Reverse transcription and PCR was performed to measure the level of *GDAP1* mRNA. To normalize the amount of PTC containing mRNA, *TBP* was used as reference gene. NTT: non treated cells; AML: Amlexanox. Non-parametric Mann Whitney test was performed; \* $p < 0.05$ . N=3.

249

250

251

252

253

254

255

256

257

### 3.3 Readthrough and NMD inhibitors treatments on *GDAP1* protein expression in NPs

Due to the degradation of the *GDAP1* PTC-mRNA by the NMD system, absence of *GDAP1* protein was awaited. Using immunoblotting analysis, a weak expression of *GDAP1* protein was detected in patient's pMNs compared to control. Our data seem to suggest that a small portion of *GDAP1* mRNA containing the UGA-PTC can escape the NMD machinery and be translated into protein (**Figure 3A**).

258

259

260

261

262

263

To determine whether readthrough and NMD inhibitors molecules allow *GDAP1* full-length protein re-expression, immunofluorescence staining was performed in a qualitative manner. NPs were incubated for 20h. Treating cells with either specific readthrough or NMDI molecules, no *GDAP1* protein expression was detected. In contrast, in the presence of Amlexanox that display both activities, the protein re-expression of full-length *GDAP1* protein was observed (**F**).

264

265

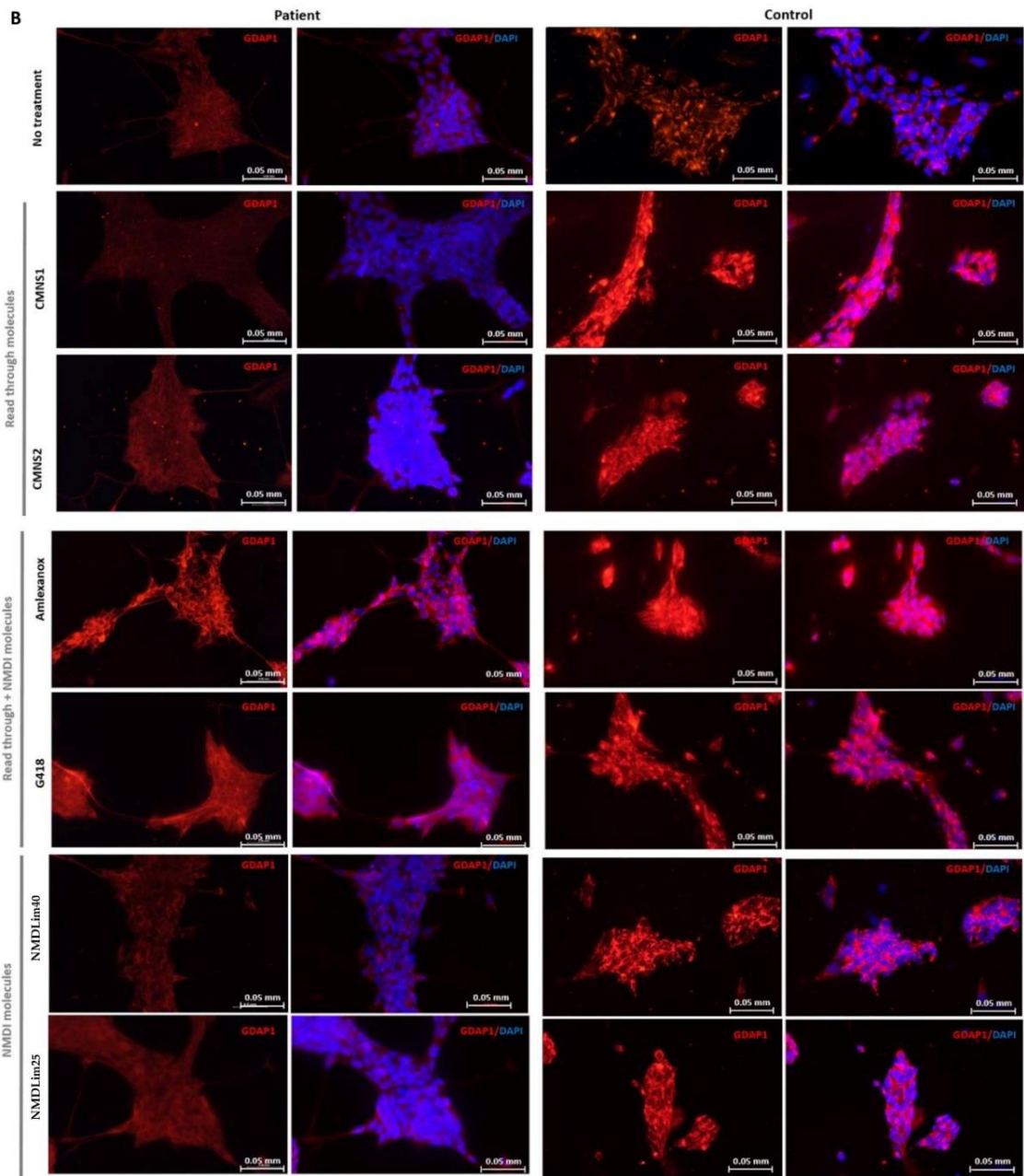
266

267

268

269

270



**Figure 3. A.** GDAP1 protein expression in patient's pMNs compared to the control by western blotting. GAPDH was used as loading control. **B.** pMNs of patient and control were treated with different readthrough and / or NMDI molecules; G418 was used as positive control. After 20h of treatment, cells were fixed and stained with GDAP1 antibody (red), and DAPI (blue) for nuclei staining. Scale bar 0.05mm.

3.4 Readthrough and NMD inhibitors treatments on mitochondrial morphology in NPs

320

According to previous results on mitochondrial morphology alteration observed in patient's MNs (21), we investigated the effect of readthrough and /or NMDI molecules treatment on the structure of mitochondria using electron microscopy (EM) in NPs.

321

322

323

At mitochondrial level, no structural modifications emerged in control's cells, in untreated and treated conditions. In contrast, in untreated patient's pMNs, we observed that mitochondrial cristae were disorganized and morphologically altered. This aspect was also confirmed in patient's cells treated with RT molecules (CMNS1, CMNS2) or NMDI molecules (NMDLim40 and NMDLim25). In line with immunocytochemistry results, EM showed that only Amlexanox was able to restore inner mitochondrial morphology, with regular cristae, in patients's pMNs. G418 seemed to have a toxic effect on mitochondrial morphology, in both patient's and control's cells.

324

325

326

327

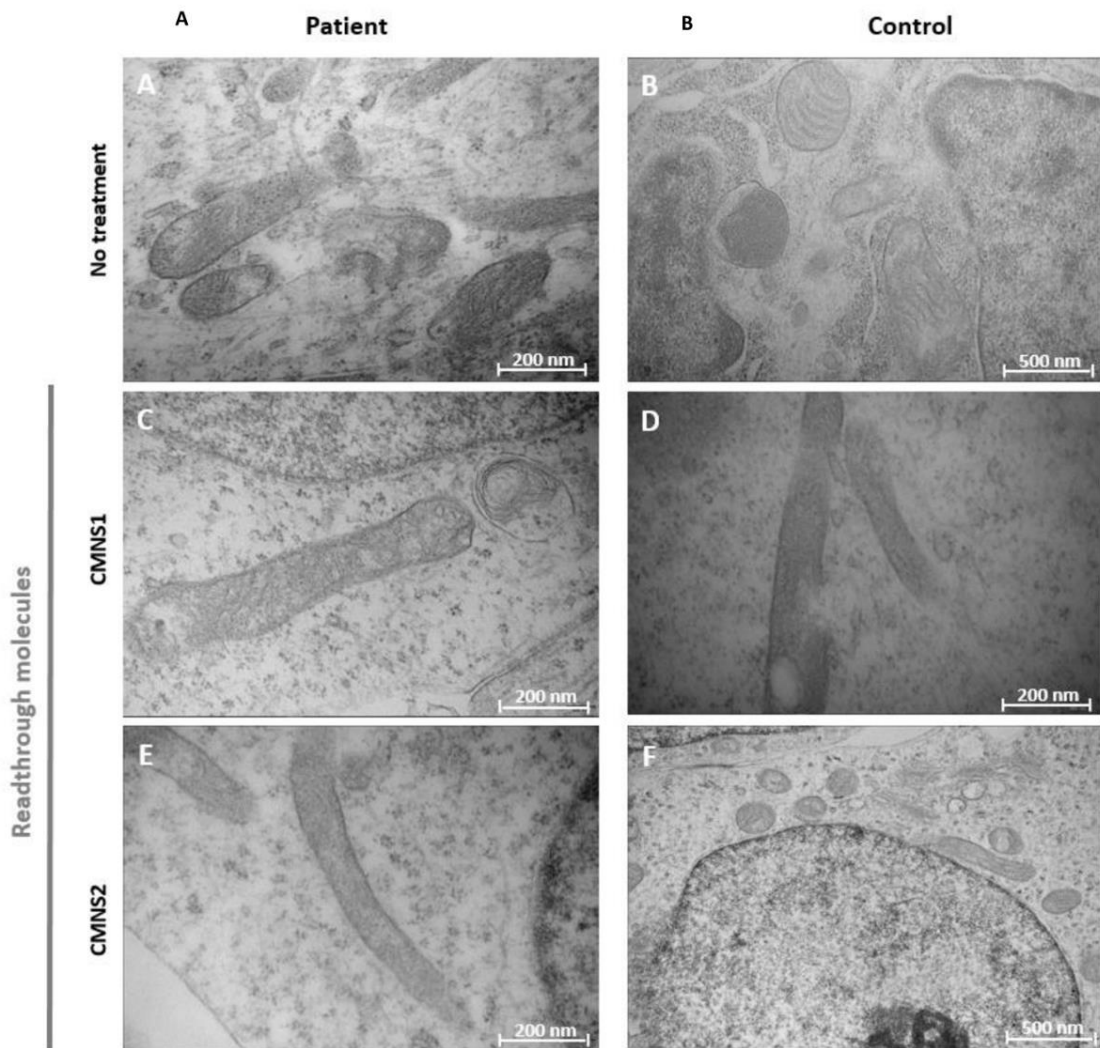
328

329

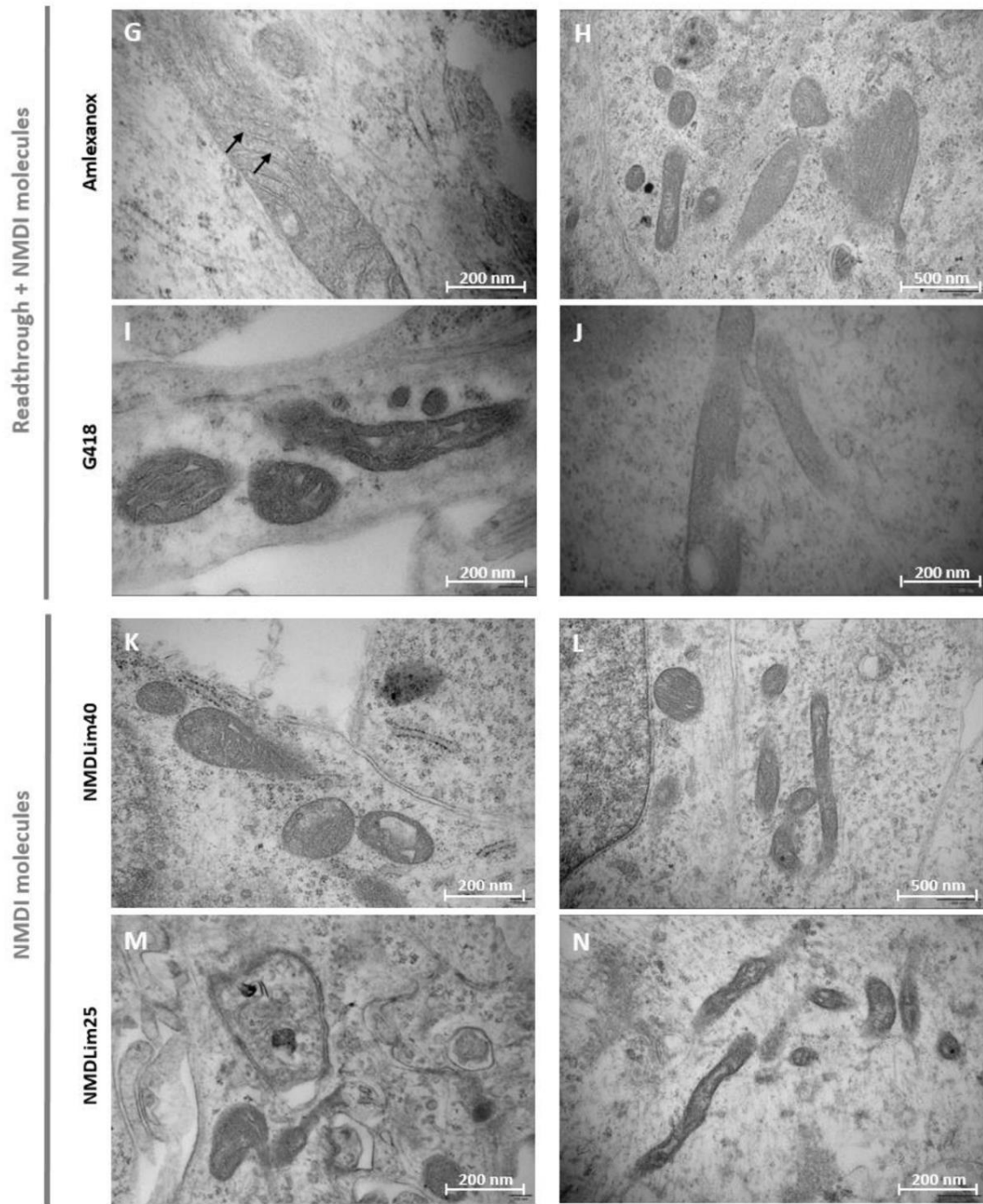
330

331

332



333



329

330  
331  
332



#### 4. Discussion

Cellular models allow to screen a high number of molecules simultaneously. Unfortunately, a pertinent cellular model suitable for the evaluation of specific nonsense mutation is not always available. Cells of interest could be isolated from tissues of patients with genetic diseases, but, sometimes, the cell purification is difficult or impossible (neurons), leading to use the induced pluripotent stem cell (iPSc) strategy. Indeed, iPSc, obtained from adult somatic cells (often fibroblasts), can be differentiated into all cell types including neurons. In our lab, we previously created hiPSCs from patient's CMT fibroblasts carrying the nonsense mutation c.581C>G to characterize cells injuries (1). In this study, we examine whether read-through and NMD inhibitors molecules could rescue, in NPs, the native full-length GDAP1 protein and its associated regular phenotype, overcoming the effects of PTC (UGA) mutation in *GDAP1* gene.

Our analysis has shown that, in NPs carrying the nonsense mutations in *GDAP1*, Amlexanox (or 2-amino-7-isopropyl-5-oxo-5H-chromeno[2,3-b]pyridine-3-carboxylic acid) exhibited a promising beneficial action, without an apparent cytotoxic effect. Thanks to its bivalent activity, Amlexanox is known to both stabilize mRNA containing nonsense mutation and promote PTC readthrough. These activities have previously reported in several cellular models derived from patients with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), cancer and Cystic Fibrosis (CF) (22). However, the mechanism combining both effects in cells remains unclear (22). Here, Amlexanox has been shown to stabilize the mRNA of *GDAP1* and to restore the synthesis of the GDAP1 protein. This molecule also induced a morphological improvement in mitochondria inner organization, evaluated by electron microscopy. These encouraging results indicate that Amlexanox is able to display efficient readthrough inside neuronal cells, suggesting that it could be used as a strategy to treat neurological diseases induced by PTCs. This dual property has also been observed for the aminoglycoside G418 used as a positive control in our study. Unfortunately, this molecule exhibits toxic side effects that forced it to be withdraw from clinical use in this indication. In order to reduce this toxicity, several G418 derivatives have been developed, such as ELX02 (or NB124) (23) which is currently in a phase 2 clinical trial for the treatment of CF (Leubitz et al., 2021) and could be a good candidate in our model.

In NPs, we demonstrated that both G418 and Amlexanox offer the double property to stabilize mRNA, countering the involvement of the NMD system, and to induce readthrough activity. Previous studies are consistent with our results (Gonzalez-Hilarion et al., 2012) (24). On the other hand, a recent study demonstrated that Amlexanox was not able to increase the expression of the NEFL (Neurofilament light) protein in iPSc-derived motor neurons presenting a nonsense mutation in the related gene, which is involved in a CMT axonal form (15). The efficiency discrepancy observed could be explained by the difference in dose used in treatment. Sainio *et al.* employed low concentration of the molecule (25µM). Also, in the same study, they observed that this concentration was toxic for neuronal cells. In our model, no side effects on neuronal development were detected even with higher concentration (100µM). Moreover, we decided to carry out the treatment on NPs, not directly on MNs which are more mature and specialized cells. Cells at different differentiation stages, could differently allow the molecule's entry, and differently react to its specific action.

On the other hand, molecules such as CMNS1 (the 2-diaminopurin) (4), CMNS2, as readthrough activators and 40F and 25H molecules as NMD inhibitors did not show any

effect at both molecular and protein GDAP1 levels. These results suggest that, in our conditions, the inhibition of NMD must be associated with readthrough activity to restore the production of full-length protein.

Our results show that Amlexanox and G418 have an activity to bypass the UGA-PTC on the *GDAP1* gene. Further investigations with adapted models, potentially created by the CRISPR-Cas9 technology, will be necessary to determine whether Amlexanox display the ability to bypass all three PTC on NPs. Indeed, Amlexanox, was first characterized as an NMDI and its ability to correct the three forms of PTC has been highlighted on three different cellular models (DMD, CF, and Cancer) (22). Moreover, it has been previously reported that the success of readthrough strategy depends on the PTC nature but also on the nucleotide context (25,26)(Atanasova et al., 2017; Manuvakhova et al., 2000). Thus, Amlexanox activity can be potentiated by the nucleotide context in the vicinity of the PTC. Indeed, a better readthrough efficiency of Amlexanox was shown with an UGA-PTC followed by a C base compared to an UGA-PTC followed by a G base (25). In our model, the UGA-PTC is followed by an A suggesting a relative Amlexanox readthrough activity.

Furthermore, it is essential to inquire which amino acid is incorporated at the PTC position. Previous studies highlighted that, in case of readthrough, cysteine, arginine, and tryptophan were preferentially inserted at UGA stop codon. Among these three amino acids, none can help, in our model, to regain the amino acid of the wild-type GDAP1 protein (serine). However, the effect of Amlexanox, in patient's PNs, seems to restore mitochondrial morphology suggesting that the amino acid incorporated could induce a beneficial function. These results underlined the proof of concept that this strategy could be applied to CMT patients exhibited nonsense mutations in *GDAP1*, offering a restored, or a less severe, phenotype. However, it will be important to conduct further analysis to investigate the toxicity of Amlexanox, since NMD system also regulates others cellular physiological processes such as post-transcriptional regulatory mechanisms (22).

## 5. Conclusions

In conclusion, this study demonstrates the efficiency of Amlexanox to rescue the synthesis of GDAP1 protein in a PNs model exhibiting an UGA-PTC mutation in the *GDAP1* gene, mimicking the condition of patients suffering from CMT. Moreover, Amlexanox induced a restoration of the mitochondrial and Golgi apparatus morphology. These results underline that readthrough molecules, associated to NMD inhibitors, could be used in these genetic alterations of CMT, opening the way for future investigations and a potential therapy.



<b>References</b>	433
1. Mort M, Ivanov D, Cooper DN, Chuzhanova NA. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. <i>Hum Mutat.</i> août 2008;29(8):1037-47.	434 435
2. Guissart C, Mouzat K, Kantar J, Louveau B, Vilquin P, Polge A, et al. Premature termination codons in SOD1 causing Amyotrophic Lateral Sclerosis are predicted to escape the nonsense-mediated mRNA decay. <i>Sci Rep.</i> déc 2020;10(1):20738.	436 437 438
3. Benhabiles H, Gonzalez-Hilarion S, Amand S, Bailly C, Prévotat A, Reix P, et al. Optimized approach for the identification of highly efficient correctors of nonsense mutations in human diseases. <i>PLOS ONE.</i> 13 nov 2017;12(11):e0187930.	439 440 441
4. Trzaska C, Amand S, Bailly C, Leroy C, Marchand V, Duvernois-Berthet E, et al. 2,6-Diaminopurine as a highly potent corrector of UGA nonsense mutations. <i>Nat Commun.</i> 20 2020;11(1):1509.	442 443
5. Gómez-Grau M, Garrido E, Cozar M, Rodriguez-Sureda V, Domínguez C, Arenas C, et al. Evaluation of Aminoglycoside and Non-Aminoglycoside Compounds for Stop-Codon Readthrough Therapy in Four Lysosomal Storage Diseases. <i>PLoS ONE.</i> 19 août 2015;10(8):e0135873.	444 445 446
6. Nagel-Wolfrum K, Möller F, Penner I, Baasov T, Wolfrum U. Targeting Nonsense Mutations in Diseases with Translational Read-Through-Inducing Drugs (TRIDs). <i>BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther.</i> avr 2016;30(2):49-74.	447 448 449
7. Greenwood GJ. Neomycin ototoxicity; report of a case. <i>AMA Arch Otolaryngol.</i> avr 1959;69(4):390-7.	450
8. Hock R, Anderson RJ. Prevention of drug-induced nephrotoxicity in the intensive care unit. <i>J Crit Care.</i> mars 1995;10(1):33-43.	451 452
9. McWilliam SJ, Antoine DJ, Smyth RL, Pirmohamed M. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children. <i>Pediatr Nephrol Berl Ger.</i> 2017;32(11):2015-25.	453 454
10. Lai CH, Chun HH, Nahas SA, Mitui M, Gamo KM, Du L, et al. Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced read-through of premature termination codons. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 2 nov 2004;101(44):15676-81.	455 456
11. Du M, Jones JR, Lanier J, Keeling KM, Lindsey JR, Tousson A, et al. Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a <i>Cftr</i> <sup>-/-</sup> mouse carrying a human <i>CFTR</i> -G542X transgene. <i>J Mol Med Berl Ger.</i> sept 2002;80(9):595-604.	457 458
12. Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmüller H. Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. <i>Muscle Nerve.</i> mai 2003;27(5):624-7.	459 460
13. Frew J, Baradaran-Heravi A, Balgi AD, Wu X, Yan TD, Arns S, et al. Premature termination codon readthrough upregulates progranulin expression and improves lysosomal function in preclinical models of GRN deficiency. <i>Mol Neurodegener.</i> 16 mars 2020;15(1):21.	461 462 463
14. Lee P, Martin NT, Nakamura K, Azghadi S, Amiri M, Ben-David U, et al. SMRT compounds abrogate cellular phenotypes of ataxia telangiectasia in neural derivatives of patient-specific hiPSCs. <i>Nat Commun.</i> 2013;4:1824.	464 465

15. Sainio MT, Rasila T, Molchanova SM, Järvillehto J, Torregrosa-Muñumer R, Harjuhahto S, et al. Neurofilament Light Regulates Axon Caliber, Synaptic Activity, and Organelle Trafficking in Cultured Human Motor Neurons. <i>Front Cell Dev Biol.</i> 14 févr 2022;9:820105.	466 467 468
16. Bird TD. Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., éditeurs. <i>GeneReviews®</i> [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 17 oct 2022]. Disponible sur: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1358/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1358/</a>	469 470 471
17. Marco A. Evolutionary and Structural Analyses of GDAP1, Involved in Charcot-Marie-Tooth Disease, Characterize a Novel Class of Glutathione Transferase-Related Genes. <i>Mol Biol Evol.</i> 31 oct 2003;21(1):176-87.	472 473
18. Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. <i>Hum Mol Genet.</i> 15 avr 2005;14(8):1087-94.	474 475
19. Niemann A, Huber N, Wagner KM, Somandin C, Horn M, Lebrun-Julien F, et al. The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to Charcot-Marie-Tooth disease. <i>Brain.</i> mars 2014;137(3):668-82.	476 477
20. Miressi F, Benslimane N, Favreau F, Rassat M, Richard L, Bourthoumieu S, et al. GDAP1 Involvement in Mitochondrial Function and Oxidative Stress, Investigated in a Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived Motor Neurons. <i>Biomedicines.</i> 2 août 2021;9(8):945.	478 479 480
21. Hörner SJ, Couturier N, Bruch R, Koch P, Hafner M, Rudolf R. hiPSC-Derived Schwann Cells Influence Myogenic Differentiation in Neuromuscular Cocultures. <i>Cells.</i> déc 2021;10(12):3292.	481 482
22. Gonzalez-Hilarion S, Beghyn T, Jia J, Debreuck N, Berte G, Mamchaoui K, et al. Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. <i>Orphanet J Rare Dis.</i> 31 août 2012;7:58.	483 484
23. Crawford DK, Alroy I, Sharpe N, Goddeeris MM, Williams G. ELX-02 Generates Protein via Premature Stop Codon Read-Through without Inducing Native Stop Codon Read-Through Proteins. <i>J Pharmacol Exp Ther.</i> 1 août 2020;374(2):264-72.	485 486 487
24. Correa-Cerro LS. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. <i>J Med Genet.</i> 1 avr 2005;42(4):350-7.	488 489
25. Atanasova VS, Jiang Q, Prisco M, Gruber C, Hofbauer JP, Chen M, et al. Amlexanox enhances premature termination codon read-through in COL7A1 and expression of full length type VII collagen: potential therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. <i>J Invest Dermatol.</i> sept 2017;137(9):1842-9.	490 491 492
26. Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. <i>RNA N Y N.</i> juill 2000;6(7):1044-55.	493 494 495 496

### Actualités depuis l'obtention des résultats de l'article N°3

Pour examiner l'aptitude de la protéine ré-exprimée GDAP1 à restaurer le dysfonctionnement mitochondrial, les PN issus de patient et contrôle ont été traités avec de l'amlexanox et G418 respectivement 100µM et 1mg/ml. Après 20h de traitement, les PN fixés ont été traités avec un anticorps anti-Tom20. Après 20h de traitement, une augmentation de l'expression de Tom20 a été observée dans les PN traités par l'amlexanox comparés aux PN non traités (figure34). Ce résultat suggère que le gain de signal de Tom20 pourrait être un indicateur de la restauration de la mitophagie dans laquelle GDAP1 semble jouer un rôle.

Une étude a précédemment montré que la perte du signal de Tom20 était probablement liée à la perte de l'intégrité des mitochondries pouvant être lésées par le stress oxydant préalablement mis en évidence dans notre modèle cellulaire

ADDIN ZOTERO\_ITEM CSL\_CITATION {"citationID":"al8q113cp4","properties":{"formattedCitation":"(Sainio et al., 2022)","plainCitation":"(Sainio et al., 2022)","noteIndex":0},"citationItems":[{"id":1323,"uris":["http://zotero.org/users/local/wSc9SCgJ/items/6S9EH7L3"],"uri":["http://zotero.org/users/local/wSc9SCgJ/items/6S9EH7L3"],"itemData":{"id":1323,"type":"article-journal","title":"Neurofilament Light Regulates Axon Caliber, Synaptic Activity, and Organelle Trafficking in Cultured Human Motor Neurons","container-title":"Frontiers in Cell and Developmental Biology","page":"820105","volume":"9","source":"PubMed Central","abstract":"Neurofilament light (NFL) is one of the proteins forming multimeric neuron-specific intermediate filaments, neurofilaments, which fill the axonal cytoplasm, establish caliber growth, and provide structural support. Dominant missense mutations and

recessive nonsense mutations in the neurofilament light gene (NEFL) are among the causes of Charcot–Marie–Tooth (CMT) neuropathy, which affects the peripheral nerves with the longest axons. We previously demonstrated that a neuropathy-causing homozygous nonsense mutation in NEFL led to the absence of NFL in patient-specific neurons. To understand the disease-causing mechanisms, we investigate here the functional effects of NFL loss in human motor neurons differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSC). We used genome editing to generate NEFL knockouts and compared them to patient-specific nonsense mutants and isogenic controls. iPSC lacking NFL differentiated efficiently into motor neurons with normal axon growth and regrowth after mechanical axotomy and contained neurofilaments. Electrophysiological analysis revealed that motor neurons without NFL fired spontaneous and evoked action potentials with similar characteristics as controls. However, we found that, in the absence of NFL, human motor neurons 1) had reduced axonal caliber, 2) the amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) was decreased, 3) neurofilament heavy (NFH) levels were reduced and no compensatory increases in other filament subunits were observed, and 4) the movement of mitochondria and to a lesser extent lysosomes was increased. Our findings elaborate the functional roles of NFL in human motor neurons. NFL is not only a structural protein forming neurofilaments and filling the axonal cytoplasm, but our study supports the role of NFL in the regulation of synaptic transmission and organelle trafficking. To rescue the NFL deficiency in the patient-specific nonsense mutant motor neurons, we used three drugs, amlexanox, ataluren (PTC-124), and gentamicin to induce translational read-through or inhibit nonsense-mediated decay. However, the drugs failed to increase the amount of NFL protein to detectable levels and were toxic to iPSC-derived motor neurons.", "DOI": "10.3389/fcell.2021.820105", "ISSN": "2296-634X", "note": "PMID: 35237613\nPMCID: PMC8883324", "journalAbbreviation": "Front Cell Dev Biol", "author": [{" "family": "Sainio", "given": "Markus

T."},{ "family": "Rasila", "given": "Tiina"}, {"family": "Molchanova", "given": "Svetlana M."}, {"family": "Järvilehto", "given": "Julius"}, {"family": "Torregrosa-Muñumer", "given": "Rubén"}, {"family": "Harjuhahto", "given": "Sandra"}, {"family": "Pennonen", "given": "Jana"}, {"family": "Huber", "given": "Nadine"}, {"family": "Herukka", "given": "Sanna-Kaisa"}, {"family": "Haapasalo", "given": "Annakaisa"}, {"family": "Zetterberg", "given": "Henrik"}, {"family": "Taira", "given": "Tomi"}, {"family": "Palmio", "given": "Johanna"}, {"family": "Ylikallio", "given": "Emil"}, {"family": "Tynnismaa", "given": "Henna"}], "issued": {"date-parts": [{"2022", 2, 14}]}}, {"schema": "https://github.com/citation-style-language/schema/raw/master/csl-citation.json"} } (*Sainio et al., 2022*). Ces résultats, en lien avec l'altération de la mitophagie, pourront être vérifiés par un marquage protéique de l'autophagosome par des anticorps anti-LC3IIb, anti-PINK1 et anti-Park.

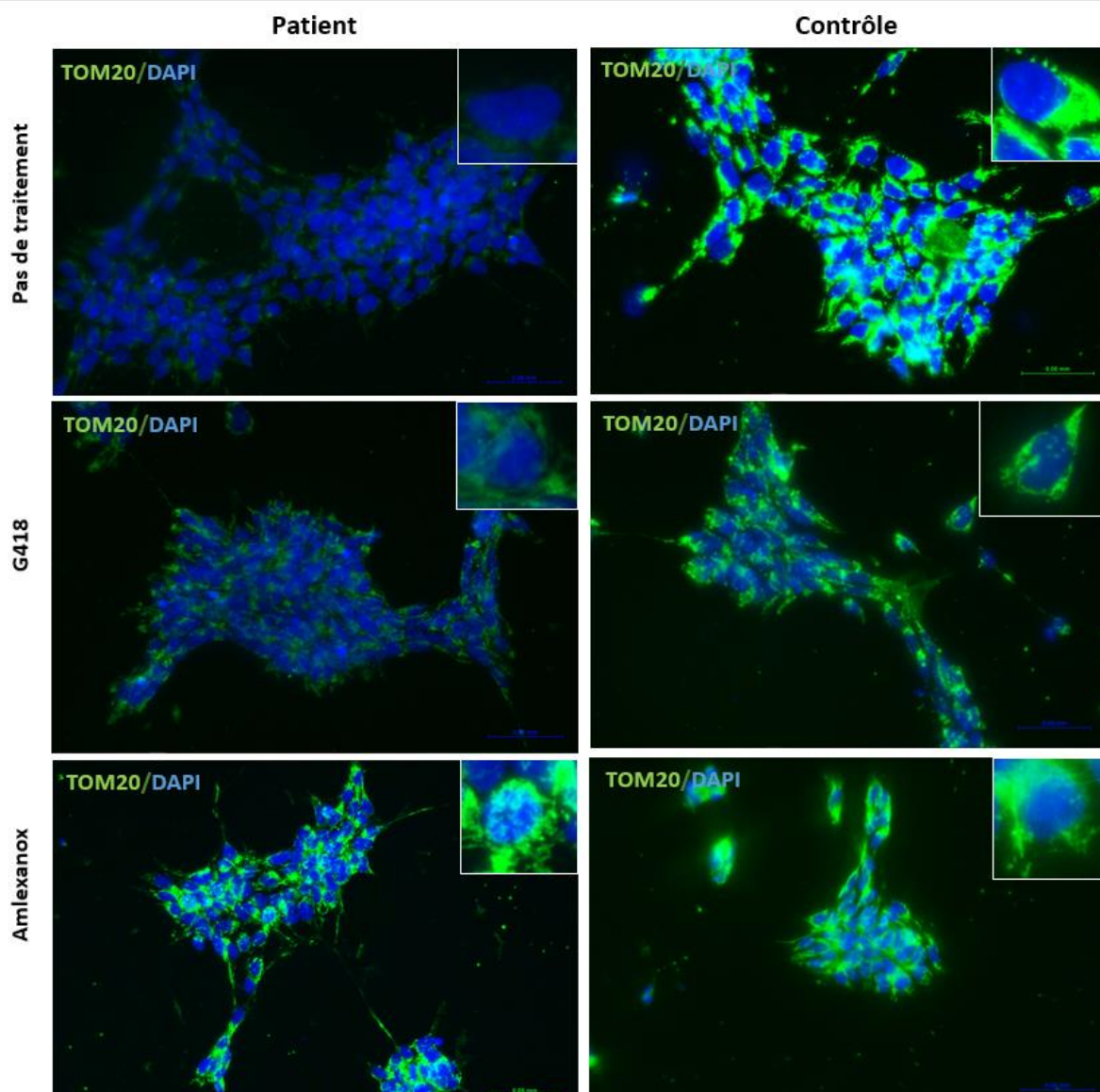


Figure 34: Expression de Tom20 (marquage mitochondriale) chez les PN de du patients porteur de la mutation *c.581C>G* dans le gène *GDAP1* et de du contrôle après traitement par des molécules de translecture et/ou inhibiteur du NMD.

Les résultats rapportés dans l'article 3 sont réalisés sur PN. Certains résultats présentés ci-dessous sont réalisés sur les MN matures.

1. Test préalable en vue de l'étude de l'efficacité des molécules de translecture et inhibiteurs du NMD sur les cellules neuronales de type MN porteuses de la mutation non-sens *c.581C>G* sur le gène *GDAP1*.

Pour ce premier test préalable, nous avons utilisé l'amlexanox, connu pour ses propriétés de translecture et d'inhibition du NMD et efficace sur les PN. Nous avons observé qu'une



concentration de 100 $\mu$ M augmente l'expression de l'ARNm *GDAP1* dans les MN comparé au MN non traités issus de patient (figure 35).

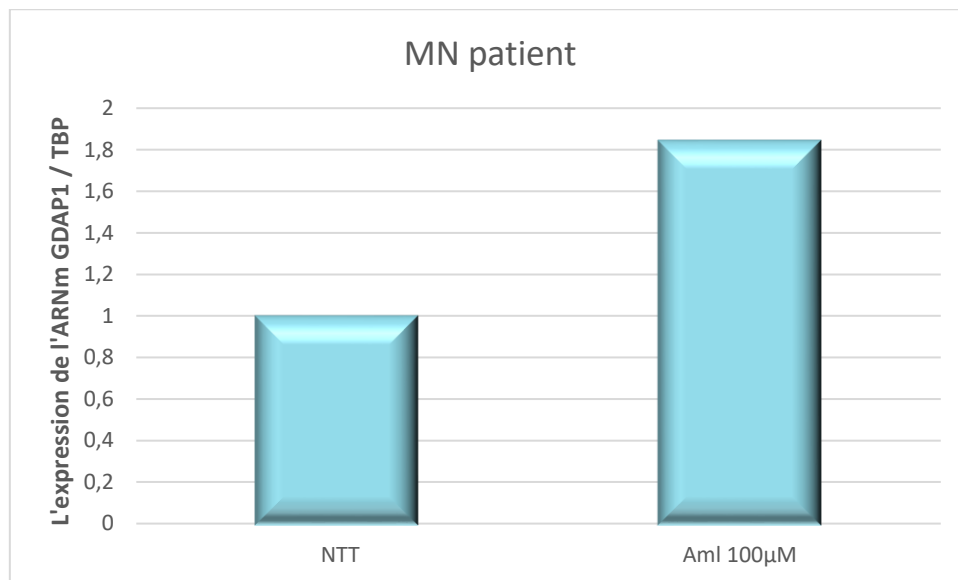


Figure 35: Expression de l'ARNm de *GDAP1* chez des MN porteurs de la mutation *c.581C>G* dans le gène *GDAP1* après traitement par l'amlexanox (*Aml*),  $N=1$ .

2. Test préalable de l'expression de la protéine *GDAP1* en vue d'étudier l'efficacité des molécules de translecture et inhibiteurs du NMD sur les cellules neuronales (MN) porteuses de la mutation non-sens *c.581C>G* sur le gène *GDAP1*.

L'analyse par immunofluorescence, sur MN du patient et de contrôles, confirment le résultat obtenu en ARNm. En effet, l'amlexanox augmente l'intensité de fluorescence de *GDAP1* traduisant la présence d'une plus grande quantité de cette protéine (figure 36).

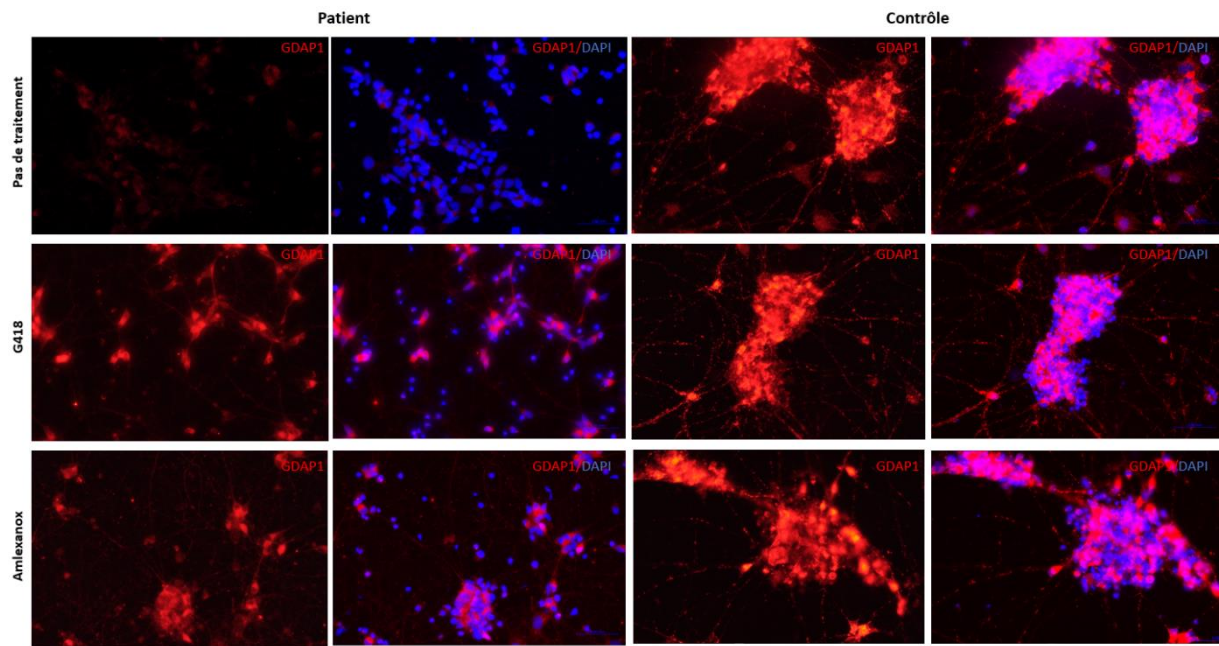


Figure 36: Expression de la protéine GDAP1 dans des MN porteurs de la mutation *c.581C>G* dans le gène *GDAP1* après traitement par l'amlexanox et G418.

## *Article 4: From Negative to Positive Diagnosis: Structural Variation Could Be the Second Mutation You Are Looking for in a Recessive Autosomal Gene*

---

### **Auteurs:**

Ioanna Pyromali<sup>†</sup>, Nesrine Benslimane<sup>†</sup>, Frédéric Favreau, Cyril Goizet, Leila Lazaro, Martine Vitry, Paco Derouault, Franck Sturtz, Corinne Magdelaine, and Anne-Sophie Lia

Article publié dans le journal «Personalized Medicine » le 03 Février 2022

<sup>†</sup> : Co-auteurs

## Actualité depuis la publication de l'article N°4

Dans la première partie de ces travaux, je me suis beaucoup axée sur l'étude d'une mutation non-sens du gène *GDAP1* associé à la CMT de forme axonale. Dans cette dernière partie, nous nous sommes concentrés sur un autre gène *SH3TC2*. Il est associé à la forme autosomique récessive démyélinisante la plus fréquente de CMT et conduit à des symptômes sévères apparaissant dès l'enfance. Actuellement, plus de 100 mutations impliquées ont été décrites sur le gène *SH3TC2* (Lerat et al., 2019). Certaines d'entre elles sont plus fréquentes, dont la mutation c.2860C > T (p.Arg954\*), avec une fréquence de 62 % de l'ensemble des mutations de ce gène. Dans cette étude, l'analyse par séquençage de nouvelle génération (NGS), nous a permis de mettre en évidence cette mutation non-sens sur le gène *SH3TC2* trouvé à l'état hétérozygote sur l'exon 14 chez un patient atteint de CMTde. Pour comprendre pourquoi la maladie à transmission récessive s'est développée chez le patient, il a été nécessaire de rechercher une mutation sur le deuxième allèle. Nous avons alors utilisé le logiciel CovCopCan développé au sein de notre équipe. Il a ainsi été possible d'identifier la deuxième mutation correspondant à une délétion de 922 pb dans *SH3TC2* (Chr5:148,390,609-Chr5:148,389,687), incluant uniquement l'exon 14 de ce gène.

Article

# From Negative to Positive Diagnosis: Structural Variation Could Be the Second Mutation You Are Looking for in a Recessive Autosomal Gene

Ioanna Pyromali <sup>1,†</sup>, Nesrine Benslimane <sup>1,†</sup>, Frédéric Favreau <sup>1,2</sup>, Cyril Goizet <sup>3</sup>, Leila Lazaro <sup>4</sup>, Martine Vitry <sup>2</sup>, Paco Derouault <sup>5</sup>, Franck Sturtz <sup>1,2</sup>, Corinne Magdelaine <sup>1,2</sup> and Anne-Sophie Lia <sup>1,2,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, MMNP (Maintenance Myélinique et Neuropathies Périphériques), University of Limoges, EA6309, F-87000 Limoges, France; ioanna.pyromali@unilim.fr (I.P.); nesrine.benslimane@unilim.fr (N.B.); frederic.favreau@unilim.fr (F.F.); franck.sturtz@unilim.fr (F.S.); corinne.magdelaine@chu-limoges.fr (C.M.)

<sup>2</sup> Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Limoges, Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France; martine.vitry@chu-limoges.fr

<sup>3</sup> Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Bordeaux-GH Pellegrin Tripode, Service de Génétique Médicale, F-33076 Bordeaux, France; cyril.goizet@chu-bordeaux.fr

<sup>4</sup> Centre Hospitalier (CH) de la Côte Basque, F-64100 Bayonne, France; llazaro@ch-cotebasque.fr

<sup>5</sup> Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Limoges, Service de Bioinformatique, F-87000 Limoges, France; paco.derouault@chu-limoges.fr

\* Correspondence: anne-sophie.lia@unilim.fr; Tel.: +33-555-435-938

† The authors contributed equally to this work.



**Citation:** Pyromali, I.; Benslimane, N.; Favreau, F.; Goizet, C.; Lazaro, L.; Vitry, M.; Derouault, P.; Sturtz, F.; Magdelaine, C.; Lia, A.-S. From Negative to Positive Diagnosis: Structural Variation Could Be the Second Mutation You Are Looking for in a Recessive Autosomal Gene. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 212. <https://doi.org/10.3390/jpm12020212>

Academic Editor: Greg Gibson

Received: 9 January 2022

Accepted: 29 January 2022

Published: 3 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Next-generation sequencing (NGS) allows the detection of plentiful mutations increasing the rate of patients getting a positive diagnosis. However, while single-nucleotide variants (SNVs) or small indels can be easily detected, structural variations (SVs) such as copy number variants (CNVs) are often not researched. In Charcot–Marie–Tooth disease (CMT), the most common hereditary peripheral neuropathy, the *PMP22*-duplication was the first variation detected. Since then, more than 90 other genes have been associated with CMT, with point mutations or small indels mostly described. Herein, we present a personalized approach we performed to obtain a positive diagnosis of a patient suffering from demyelinating CMT. His NGS data were aligned to the human reference sequence but also studied using the CovCopCan software, designed to detect large CNVs. This approach allowed the detection of only one mutation in *SH3TC2*, the frequent p.Arg954\*, while *SH3TC2* is known to be responsible for autosomal recessive demyelinating CMT forms. Interestingly, by modifying the standard CovCopCan use, we detected the second mutation of this patient corresponding to a 922 bp deletion in *SH3TC2* (Chr5:148,390,609–Chr5:148,389,687), including only one exon (exon 14). This highlights that SVs, different from *PMP22* duplication, can be responsible for peripheral neuropathy and should be searched systematically. This approach could also be employed to improve the diagnosis of all inherited diseases.

**Keywords:** Charcot–Marie–Tooth; structural variation; *SH3TC2*; CovCopCan; NGS

## 1. Introduction

The diagnosis of inherited genetic diseases to which several causative genes have been associated is usually performed using the targeted next-generation sequencing (NGS) technique. Thus, a disease-specific gene panel is used to detect genomic mutations, improving the rate of patients getting positive diagnosis. Bioinformatic analysis for the detection of variants consists in comparing the patient's sequences with those of reference sequences from human genome (GRCh37 or GRCh38). However, to date, most of the detected mutations by targeted NGS are SNVs or small indels, but the SVs are often underdiagnosed. This is probably because few user-friendly tools (ExomeDepth, IonCopy, Cov'Cop, CovCopCan,



DeviCNV) were available for geneticists to identify the SVs until recently and because these existing tools are maybe not systematically used in routine NGS analysis nowadays [1–5].

Charcot–Marie–Tooth disease (CMT) is the most frequent peripheral hereditary neuropathy, with a prevalence of 1:2500 worldwide, affecting both sensory and motor peripheral neurons and for which broadly two main types have been described based on electrophysiological measurements: CMT1 and CMT2. CMT1 (also known as the demyelinating form) is characterized by reduced nerve conduction velocities (NCV), whereas for CMT2 (called the axonal form) patients present normal NCV values. CMT patients usually manifest progressive distal neuropathy resulting in weakness and atrophy of limb muscles, weak ankle dorsiflexion, depressed tendon reflexes, foot deformities (e.g., *pes cavus*), and distal sensory loss, among others [6]. Symptom severity can differ among patients and disease onset can vary from early childhood to late adulthood. More than 70% of dominant CMT1 cases are explained by the duplication of *PMP22*, which was the first described mutation associated with the disease [7–11]. Currently more than 90 causative genes have been associated with CMT, but the majority of described mutations on these genes are small nucleotide variants (SNVs) or small indels. Only a few structural variations (SVs) have been described in CMT-associated genes, such as in *GJB1*, *MPZ*, *MFN2*, *GAN*, *SEPT9*, *FGD4*, *GDAP1*, *LRSAM1*, *INF2*, *PRX*, *NDRG1*, *MTMR2*, and more recently in *KIF5A* [12,13].

*SH3TC2* codes for SH3 domain and tetratricopeptide repeat-containing protein 2 (SH3TC2), a protein expressed in Schwann cells of peripheral nerves (ensembl: ENSG00000169247, Uniprot-KB: Q8TF17). This protein presents two N-terminal SH3 (Src homology-3) domains and ten tetratricopeptide repeat domains (TPR) arranged in tandem arrays [14]. SH3TC2 localizes to the plasma membrane of Schwann cells and has a role in maintaining the integrity of the node of Ranvier in peripheral nerves and in myelination [15]. SH3TC2 has also been reported localized to the intracellular endocytic recycling compartment, where it regulates the recycling of internalized membrane and receptors by associating with the small GTPase Rab11 [16]. Homozygous or compound heterozygous mutations in *SH3TC2* have been associated with CMT disease following an autosomal recessive transmission mode (OMIM: #601596) [14]. CMT patients harboring mutations in *SH3TC2* are characterized by the presence of severe spine deformities (such as scoliosis) and foot deformities (*pes cavus*, *pes planus*, or *pes valgus*) that typically present in childhood or early adolescence, and they can also present deafness [17,18]. *SH3TC2* is the most frequently mutated gene in patients with recessive demyelinating CMT, with a prevalence of approximately 18% [17,19]. According to Inherited Neuropathy Variant Browser (<https://neuropathybrowser.zuchnerlab.net/#/> (accessed on 7 October 2021)), more than 100 different mutations causing CMT have been described in *SH3TC2*. Some of them are more frequent among certain ethnic groups, while c.2860C > T, p.Arg954\* mutation is generally the most common mutation, estimated by several studies at 62% of all the SH3TC2 mutations [18,20–22].

Herein, by a variant calling analysis of the targeted-NGS data of a patient presenting with severe CMT1 symptoms, a nonsense mutation (p.Arg954\*) in *SH3TC2* in a heterozygous state was identified. Then, thanks to the user-friendly CovCopCan software [4], we investigated and detected the deletion of only a single exon in *SH3TC2* presented in a heterozygous state in the same patient. We suggest to regularly use such software to analyze NGS data in order to detect not only large SVs but also small SVs, such as single-exon variants, in order to improve patient diagnosis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

The proband, a 20-year-old man, presented with demyelinated CMT. His parents were healthy. Peripheral blood was collected into EDTA tubes after informed consent was obtained, and DNA extraction was performed using standard methods (Illustra-DNA-Extraction-kit-BACC3, GEHC). Clinical examination was performed and the Medical Research Council (MRC) Scale for Muscle Strength was used to assess muscle strength from Grade 5 (normal) to Grade 0 (no visible contraction) [23].



## 2.2. Next-Generation Sequencing (NGS) and Bioinformatics Analysis

A 93-gene custom panel designed for diagnosis of CMT and associated neuropathies (as described by [24]) was used for NGS. The amplified library was prepared with Ion-P1-HiQ-Template-OT2-200 kit (Ampliseq-Custom; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), sequenced on Ion-Proton sequencer (Life-Technologies), and mapped to the human reference genome GHCh37. Alamut Visual Interpretation Software v.2.11 (Interactive Biosoftware, Rouen, France), using the NM\_024577.4 reference sequence for the *SH3TC2* gene was used to evaluate the variants. Databases such as gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/> (accessed on 14 October 2021)), dbSNP135 (National Center for Biotechnology Information [NCBI], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> (accessed on 14 October 2021)) and Clin-Var ([www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) (accessed on 14 October 2021)) were also used.

SVs were detected using CovCopCan software starting from the coverage file provided after NGS by Ion-Proton sequencer [4]. In brief, CovCopCan software uses a two-stage correction and normalization algorithm to identify unbalanced SVs, such as CNVs (copy number variants) using NGS read depth.

## 2.3. Verification of Mutations

PCR and Sanger sequencing experiments were performed in order to verify the presence of the pointed mutation detected by the variant calling analysis of NGS data. The primers used were ACTCCAAGGTGAAGGCCGG and TAGAAATGGCAGAGGGATTG.

Regarding the deletion, long-range PCR and Sanger sequencing experiments were used in order to define the exact breakpoints of the deletion. For the PCR experiments, the Master Mix Phusion Flash (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and the following primers (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used: primer Int12-F: GCTGTTC-CTGCTCAGAGCTT in intron 12 and Int15-R: CACACCCAATAGTGAAGACCA in intron 15. Sanger sequencing experiments were performed on PCR products by a walking primer strategy and the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v2 (ABI Prism, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The exact breakpoints were identified thanks to primers (Sigma-Aldrich) Int13-F: AGGATTCCATCTCACTGCC in intron 13 and Int14-R: CTGAGATGGTCTTGATCTCC in intron 14.

## 3. Results

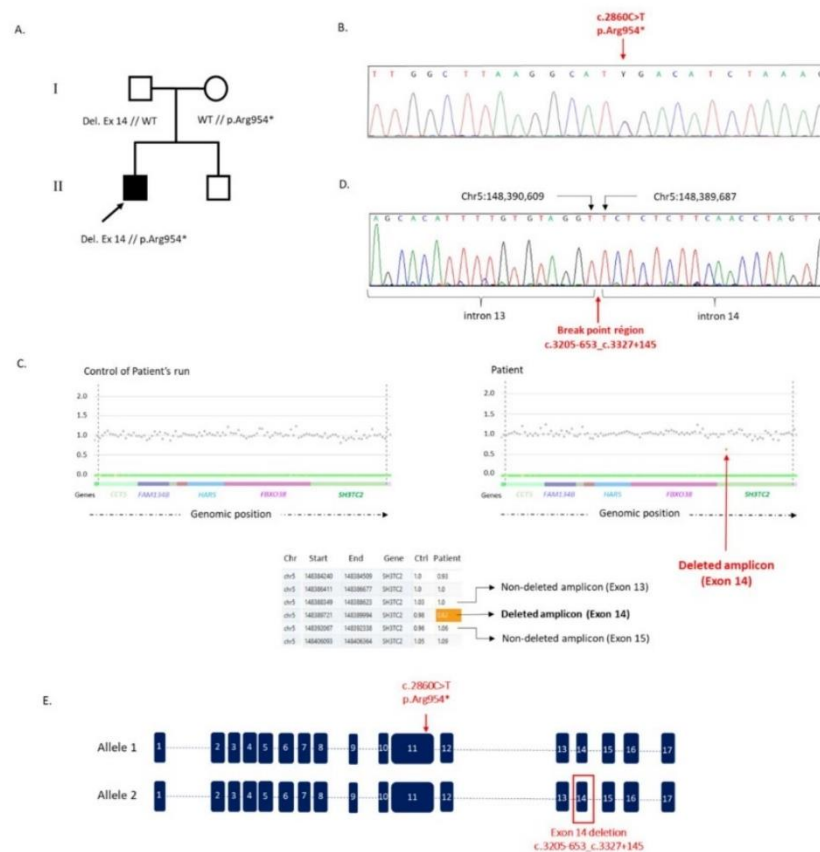
### 3.1. Patient's Clinical Description

Our current study focuses on the family of a single affected member. The propositus presented with a severe demyelinating neuropathy confirmed by electromyography (Table 1). Muscle testing, using the Medical Research Council (MRC) Scale for Muscle Strength revealed a deficit in all four limbs, predominantly in the lower limbs and essentially in the levators and evertors of the feet, with values of 3/5 [23]. There was also an impairment in the upper limbs with a muscular testing at 4/5 proximal and 3/5 in the hands. The patient's osteotendinous reflexes were abolished. He presented with a bilateral equinus also with a varus position and bilateral hollow feet that were painful. Achilles tendons retraction was present, leading to difficulties in standing without moving. He wore bilateral over-pedal splints to improve his walking and wore a corset to correct his scoliosis. Additionally, he had trouble in fine motor control and digital dissociation and a lack of strength, which did not impair his activities in daily life.

Regarding the sensory aspect, he presented a dysesthesia localized in the distal part of the lower limbs, with unpleasant tingling sensations either after hot shower or when immobile. In addition, he presented with disorder of superficial bilaterally, epicritic sensitivity, associated with proprioceptive disorder. Nevertheless, he had good superficial sensitivity in the proximal part of the lower limbs and in the upper limbs. The symptoms appeared in early childhood, and he was the only member of his family presenting such symptoms (Figure 1A).

**Table 1.** Patient’s neurophysiological recordings. Abnormal values are represented in bold. Normal values of MNCV: ulnar (>52 m/s; >7.9 mV), median (>49 m/s; >4.1 mV), tibial (>39 m/s; >4.4 mV), fibular (>43 m/s; >1.3 mV) [25]. (Vel: velocity; Amp: amplitude; NR: no response).

Motor Nerve Conduction Values (MNCV)									
Ulnar		Median		Tibial		Fibular Right		Fibular Left	
Vel (m/s)	Amp (mV)	Vel (m/s)	Amp (mV)	Vel (m/s)	Amp (mV)	Vel (m/s)	Amp (mV)	Vel (m/s)	Amp (mV)
20.7	2.9	26.2	0.97	NR	NR	22.1	0.23	21.0	0.23



**Figure 1.** Family’s pedigree, analysis of *SH3TC2* by CovCopCan and verification of mutations by Sanger sequencing. (A) Family’s pedigree. WT indicates the normal *SH3TC2* allele, “p.Arg954\*”, the allele presenting the missense mutation c.2860C > T leading to a premature terminal codon and Del ex14, the allele with *SH3TC2* deletion corresponding to c.3205-653\_c.3327 + 145 del including exon 14. (B) Sanger sequencing of the first mutation c.2860C > T, p.Arg954\* at the heterozygous state. (C) Graphical representation and table extracted from CovCopCan analysis for the patient and for a control (Ctrl). In the graphical representation, each dot represents an amplicon. Normal amplicons (in gray) have values around 1, whereas deleted amplicons (in orange) have values around 0.5. Deleted amplicon corresponds to *SH3TC2* exon 14. Start and end on the table correspond to the chromosomal positions of amplicons. (D) Detection of breakpoints in *SH3TC2* by Sanger sequencing. The breakpoints were localized in position Chr5:148,390,609 in intron 13 and in position Chr5: 148,389,687 in intron 14. (E) Schematic overview of *SH3TC2* and variations localization. Blue boxes correspond to *SH3TC2* exons.



### 3.2. Detection of SNPs and Structural Variants

Patient's DNA was analyzed by NGS using a 93-gene panel involved in peripheral neuropathies [24]. The standard alignment bioinformatic analysis of the NGS data revealed the presence of a unique mutation in *SH3TC2*, the known mutation c.2860C > T, p.Arg954\*, leading to the appearance of a premature termination codon (Figure 1B). This mutation, initially described by Senderek et al. in 2003 [14], appeared to be the most frequent mutation in *SH3TC2* gene, estimated recently to 62% of the mutations in a French *SH3TC2* cohort [18]. With *SH3TC2* being associated with a CMT form transmitted by autosomal recessive mode, this mutation could not explain by itself the severe symptoms of the patient [14]. However, no additional SNV or short indel was detected. In parallel, the standard use of CovCopCan, which easily highlights CNVs when at least three successive amplicons are deleted or duplicated, did not allow the detection of any CNVs in the 93 genes tested in the first place. Nevertheless, following the discovery of the point mutation in *SH3TC2*, we modified and personalized the use of CovCopCan by looking more specially for deletion or duplication in *SH3TC2* involving less than three amplicons. This new approach allowed pointing out a potential deletion of one amplicon covering the genomic region Chr5:148,389,721-Chr5:148,389,994 (Figure 1C). According to CovCopCan, this deletion would be in a heterozygous state and would correspond to the deletion of *SH3TC2* exon 14, whereas amplicons corresponding to exons 13 and 15 were not deleted.

### 3.3. Confirmation of the Structural Variant and of the Nonsense Mutation

A long-range PCR, using primers located on the non-deleted exons 13 and exon 15, was performed in order to confirm the presence of the potential deletion pointed out by CovCopCan software and allowing the detection of two bands, confirming the presence of the deletion in one allele (not shown). Sanger sequencing experiments were then conducted on the lower band in order to identify the exact breakpoint positions at Chr5:148,390,609 in intron 13 and Chr5:148,389,687 in intron 14 (Figure 1D), corresponding to a 922 base pairs deletion. The breakpoints of this *SH3TC2* deletion were located in intron 13 at position c.3205-654 and in intron 14 at position c.3327 + 146, leading to the mutation c.3205-653\_c.3327 + 145 del (p.Ala1069\_Arg1109 del), which corresponded to the deletion of exon 14 (Figure 1E). In addition, the c.2860C > T, p.Arg954\* was confirmed by PCR and Sanger sequencing (Figure 1B). Molecular analyses of the unaffected parents confirmed the compound heterozygous status of the proband.

## 4. Discussion

Herein, by analyzing NGS data of a patient presented with a severe demyelinating neuropathy, we detected the presence of the known nonsense mutation (c.2860C > T, p.Arg954\*) in heterozygous state thanks to standard variants detection software. However, this mutation alone was not enough to explain the severity of the patient's phenotype [14]. Thus, by modifying the use of the user-friendly software CovCopCan, we achieved the detection of a SV in *SH3TC2* in the second allele, corresponding to a deletion of exon 14. The presence of this deletion was confirmed, and the breakpoints were identified at positions Chr5:148,390,609 and Chr5:148,389,687, corresponding to a 922 bp deletion that may have led to the mutation c.3205-653\_c.3327 + 145 del (p.Ala1069\_Arg1109 del). Thus, this new approach allowed achieving the patient's correct diagnosis.

Patients harboring two mutations in *SH3TC2* present with severe neuropathy of the peripheral nervous system characterized by important decrease in NCVs, severe spine and foot deformities, and sometimes also a cranial nerve involvement (manifested by hearing impairment and facial weakness among others); symptoms usually appeared in the first decade of life [17,18]. The patient described in this paper presented a severe demyelinating neuropathy as well, associated with a motor and sensory disorder on the four limbs, severe foot deformities, and scoliosis since childhood, confirming the fact that the two detected mutations in *SH3TC2* were certainly the cause of his disease.

Regarding the effect of these mutations, our patient presented the nonsense mutation p.Arg954\* that could lead to the production of a truncated protein. In addition, he harbored a newly described SV leading to the deletion of exon 14 in *SH3TC2*. For this allele, if the splicing of the truncated mRNA was performed correctly between exon 13 and exon 15, the protein's translation would remain in phase. However, the deleted area would correspond to the final part of the tetratricopeptide repeat functional domain that would potentially alter *SH3TC2* function [16]. Another possibility would be that the truncated mRNA would not be spliced correctly between exon 13 and exon 15 and would generate an aberrant mature mRNA that would lead to a non-functional *SH3TC2* protein. Nevertheless, with *SH3TC2* being expressed mainly in Schwann cells, it is currently not possible to arrive at conclusions due to the lack of nervous tissue availability [15].

It is important to underline that, in this case, the small SV involving a single exon was detected only because there was already a nonsense mutation detected on the heterozygous state in *SH3TC2* in the patient that led us to look meticulously for a second mutation in order to explain the patient's symptoms. Indeed, we modified the use of CovCopCan by looking particularly for small deletion or duplication in *SH3TC2*. It is interesting to notice that software classically detecting CNVs from amplicons sequencing usually recommend the research of three successively deleted or duplicated amplicons in order to highlight with certainty real CNVs [1–5]. Indeed, while bioinformatic tools for CNVs detection broadly have a high specificity (96% for CovCopCan), false positives may occur, and thus it is not possible to routinely study every single deleted or duplicated amplicon. However, we proved here that this “classic” strategy has to be slightly modified in some cases. We suggest that, for patients for whom only one mutation is identified while two mutations are expected (whatever the gene), it would be interesting to check thoroughly the NGS analysis and verify whether a single amplicon deletion or duplication is present on the same gene. We believe that this approach could be performed for all NGS analyses, whatever the inherited studied diseases, in order to improve diagnosis.

## 5. Conclusions

In conclusion, we showed that the newly described exon 14 deletion associated with the nonsense c.2860C > T, p.Arg954\* in *SH3TC2* was responsible for the demyelinating CMT disease. This small deletion was identified thanks to a slightly modified use of CovCopCan software, a user-friendly software analyzing NGS data by using the reads' depth [4]. It is important to underline that SV of a single exon deletion type may cause or contribute to the appearance of a patient's symptoms and that software able to detect the deletion of a single exon should be widely used in order to improve a patient's diagnosis.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.-S.L.; methodology, A.-S.L.; software, P.D.; validation, I.P., N.B., F.F., M.V., P.D., C.G., L.L., F.S., C.M. and A.-S.L.; formal analysis, I.P., N.B. and M.V.; investigation, I.P., N.B., M.V., F.F., C.M. and A.-S.L.; resources, C.G., L.L., C.M. and A.-S.L.; data curation, I.P., N.B. and P.D.; writing—original draft preparation, I.P. and A.-S.L.; writing—review and editing, I.P., N.B., F.F., P.D., C.G., L.L., F.S., C.M. and A.-S.L.; visualization, I.P., N.B., P.D., C.M. and A.-S.L.; supervision, F.F., F.S. and A.-S.L.; project administration, F.F. and A.-S.L.; funding acquisition, F.F., F.S. and A.-S.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study and written informed consent was obtained from the patients to publish this paper.

**Data Availability Statement:** In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Please refer to suggested Data Availability Statements in section “MDPI Research Data Policies” at <https://www.mdpi.com/ethics> (accessed on 7 January 2022). You might choose to exclude this statement if the study did not report any data.



**Acknowledgments:** The authors would like to thank the technicians in the Biochemistry and Molecular Genetics Laboratory and the Sequencing and Bioinformatic platform at Limoges CHU for their excellent technical support, especially Emilie Guerin, Valentin Tilloy, and Sophie Alain.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Plagnol, V.; Curtis, J.; Epstein, M.; Mok, K.Y.; Stebbings, E.; Grigoriadou, S.; Wood, N.W.; Hambleton, S.; Burns, S.O.; Thrasher, A.J.; et al. A robust model for read count data in exome sequencing experiments and implications for copy number variant calling. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2747–2754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Budczies, J.; Pfarr, N.; Stenzinger, A.; Treue, D.; Endris, V.; Ismael, F.; Bangemann, N.; Blohmer, J.U.; Dietel, M.; Loibl, S.; et al. Ioncopy: A novel method for calling copy number alterations in amplicon sequencing data including significance assessment. *Oncotarget* **2016**, *7*, 13236–13247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Derouault, P.; Parfait, B.; Moulinas, R.; Barrot, C.C.; Sturtz, F.; Merillou, S.; Lia, A.S. ‘COV’COP’ allows to detect CNVs responsible for inherited diseases among amplicons sequencing data. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 1586–1588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Derouault, P.; Chauzeix, J.; Rizzo, D.; Miressi, F.; Magdelaine, C.; Bourthoumieu, S.; Durand, K.; Dzugas, H.; Feuillard, J.; Sturtz, F.; et al. CovCopCan: An Efficient Tool to Detect Copy Number Variation from Amplicon Sequencing Data in Inherited Diseases and Cancer. *PLoS Comput. Biol.* **2020**, *16*, e1007503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kang, Y.; Nam, S.H.; Park, K.S.; Kim, Y.; Kim, J.W.; Lee, E.; Ko, J.M.; Lee, K.A.; Park, I. DeviCNV: Detection and visualization of exon-level copy number variants in targeted next-generation sequencing data. *BMC Bioinform.* **2018**, *19*, 381. [[CrossRef](#)]
6. Bird, T.D. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. In *GeneReviews*<sup>®</sup>; Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J., Mirzaa, G., Amemiya, A., Eds.; University of Washington: Seattle, WA, USA, 2021.
7. Lupski, J.R.; de Oca-Luna, R.M.; Slaugenhaupt, S.; Pentao, L.; Guzzetta, V.; Trask, B.J.; Saucedo-Cardenas, O.; Barker, D.F.; Killian, J.M.; Garcia, C.A.; et al. DNA Duplication Associated with Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1. *Cell* **1991**, *66*, 219–232. [[CrossRef](#)]
8. Matsunami, N.; Smith, B.; Ballard, L.; Lensch, M.W.; Robertson, M.; Albertsen, H.; Hanemann, C.O.; Müller, H.W.; Bird, T.D.; White, R.; et al. Peripheral Myelin Protein-22 Gene Maps in the Duplication in Chromosome 17p11.2 Associated with Charcot-Marie-Tooth 1A. *Nat. Genet.* **1992**, *1*, 176–179. [[CrossRef](#)]
9. Valentijn, L.J.; Bolhuis, P.A.; Zorn, I.; Hoogendijk, J.E.; van den Bosch, N.; Hensels, G.W.; Stanton, V.P., Jr.; Housman, D.E.; Fischbeck, K.H.; Ross, D.A.; et al. The Peripheral Myelin Gene PMP-22/GAS-3 is Duplicated in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *Nat. Genet.* **1992**, *1*, 166–170. [[CrossRef](#)]
10. Timmerman, V.; Nelis, E.; Van Hul, W.; Nieuwenhuijzen, B.W.; Chen, K.L.; Wang, S.; Ben Othman, K.; Cullen, B.; Leach, R.J.; Hanemann, C.O.; et al. The Peripheral Myelin Protein Gene PMP-22 Is Contained within the Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A Duplication. *Nat. Genet.* **1992**, *1*, 171–175. [[CrossRef](#)]
11. Murphy, S.M.; Laura, M.; Fawcett, K.; Pandraud, A.; Liu, Y.T.; Davidson, G.L.; Rossor, A.M.; Polke, J.M.; Castleman, V.; Manji, H.; et al. Charcot-Marie-Tooth Disease: Frequency of Genetic Subtypes and Guidelines for Genetic Testing. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2012**, *83*, 706–710. [[CrossRef](#)]
12. Mortreux, J.; Bacquet, J.; Boyer, A.; Alazard, E.; Bellance, R.; Giguët-Valard, A.G.; Cerino, M.; Krahn, M.; Audic, F.; Chabrol, B.; et al. Identification of novel pathogenic copy number variations in Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Hum. Genet.* **2020**, *65*, 313–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pyromali, I.; Perani, A.; Nizou, A.; Benslimane, N.; Derouault, P.; Bourthoumieu, S.; Fradin, M.; Sole, G.; Duval, F.; Gomes, C.; et al. New structural variations responsible for Charcot-Marie-Tooth disease: The first two large KIF5A deletions detected by CovCop-Can software. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 4265–4272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Senderek, J.; Bergmann, C.; Stendel, C.; Kirfel, J.; Verpoorten, N.; De Jonghe, P.; Timmerman, V.; Chrast, R.; Verheijen, M.H.G.; Lemke, G.; et al. Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* **2003**, *73*, 1106–1119. [[CrossRef](#)]
15. Arnaud, E.; Zenker, J.; de Preux Charles, A.S.; Stendel, C.; Roos, A.; Médard, J.J.; Tricaud, N.; Kleine, H.; Luscher, B.; Weis, J.; et al. SH3TC2/KIAA1985 protein is required for proper myelination and the integrity of the node of Ranvier in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17528–17533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Roberts, R.C.; Peden, A.A.; Buss, F.; Bright, N.A.; Latouche, M.; Reilly, M.M.; Kendrick-Jones, J.; Luzio, J.P. Mistargeting of SH3TC2 away from the recycling endosome causes Charcot-Marie-Tooth disease type 4C. *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, 1009–1018. [[CrossRef](#)]
17. Azzedine, H.; Salih, M.A. SH3TC2-Related Hereditary Motor and Sensory Neuropathy. In *GeneReviews*<sup>®</sup>; Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J.H., Mirzaa, G., Amemiya, A., Eds.; Internet; Updated 11 March 2021; University of Washington: Seattle, WA, USA, 1993.
18. Lerat, J.; Magdelaine, C.; Lunati, A.; Dzugas, H.; Dejoie, C.; Rego, M.; Beze Beyrie, P.; Bieth, E.; Calvas, P.; Cintas, P.; et al. Implication of the SH3TC2 gene in Charcot-Marie-Tooth disease associated with deafness and/or scoliosis: Illustration with four new pathogenic variants. *J. Neurol. Sci.* **2019**, *406*, 116376. [[CrossRef](#)]

19. Fridman, V.; Bundy, B.; Reilly, M.M.; Pareyson, D.; Bacon, C.; Burns, J.; Day, J.; Feely, S.; Finkel, R.S.; Grider, T.; et al. Inherited Neuropathies Consortium. CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: A cross-sectional analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2015**, *86*, 873–878. [[CrossRef](#)]
20. Yger, M.; Stojkovic, T.; Tardieu, S.; Maisonobe, T.; Brice, A.; Echaniz-Laguna, A.; Alembik, Y.; Girard, S.; Cazeneuve, C.; Leguern, E.; et al. Characteristics of clinical and electrophysiological pattern of Charcot-Marie-Tooth 4C. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2012**, *17*, 112–122. [[CrossRef](#)]
21. Laššuthová, P.; Mazanec, R.; Vondráček, P.; Sišková, D.; Haberlová, J.; Sabová, J.; Seeman, P. High frequency of SH3TC2 mutations in Czech HMSN I patients. *Clin. Genet.* **2011**, *80*, 334–345. [[CrossRef](#)]
22. Piscosquito, G.; Saveri, P.; Magri, S.; Ciano, C.; Gandioli, C.; Morbin, M.; Bella, D.D.; Moroni, I.; Taroni, F.; Pareyson, D. Screening for SH3TC2 gene mutations in a series of demyelinating recessive Charcot-Marie-Tooth disease (CMT4). *J. Peripher. Nerv. Syst.* **2016**, *21*, 142–149. [[CrossRef](#)]
23. Compston, A. Aids to the investigation of peripheral nerve injuries. Medical Research Council: Nerve Injuries Research Committee. His Majesty's Stationery Office: 1942; pp. 48 (iii) and 74 figures and 7 diagrams; with aids to the examination of the peripheral nervous system. By Michael O'Brien for the Guarantors of Brain. Saunders Elsevier: 2010; pp. [8] 64 and 94 Figures. *Brain* **2010**, *133*, 2838–2844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Miressi, F.; Faye, P.A.; Pyromali, I.; Bourthoumieu, S.; Derouault, P.; Husson, M.; Favreau, F.; Sturtz, F.; Magdelaine, C.; Lia, A.S. A mutation can hide another one: Think Structural Variants! *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 2095–2099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chen, S.; Andary, M.; Buschbacher, R.; Del Toro, D.; Smith, B.; So, Y.; Zimmermann, K.; Dillingham, T.R. Electrodiagnostic reference values for upper and lower limb nerve conduction studies in adult populations. *Muscle Nerve* **2016**, *54*, 371–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



#### Présentation résumée de l'article N°4

Les mutations de *SH3TC2* sont associées à la forme démyélinisante de CMT. *SH3TC2* code pour une protéine exprimée principalement dans les cellules de Schwann des nerfs périphériques.

Fort de notre expérience dans la constitution du modèle iPS et de modèles cellulaires neuronaux appliqués à l'étude du gène *GDAP1*, nous avons décidé de mettre en place de nouveaux modèles d'étude et de nous intéresser aux formes démyélinisantes de la maladie CMT. Via la stratégie CRISPR-Cas 9 sur les iPSc de contrôle, nous souhaitons recréer la mutation p.Arg954\* à l'état homozygote sur le gène *SH3TC2*. Ce projet correspond à une partie de la thèse de Camille LORET. En parallèle, une partie de notre équipe s'intéressant plus particulièrement aux variations de structure, nous avons sollicité le patient décrit dans notre article, ainsi que son père pour participer à notre recherche via une biopsie cutanée. Les fibroblastes obtenus ont été manipulés pour créer des iPSc. Ce projet correspond à une partie de la thèse de Ioanna PYROMALI.

Une fois ces nouveaux modèles iPS obtenus, nous souhaitons les différencier en cellules de Schwann grâce à l'expertise du Dr Amandine ROVINI. Les modèles seront ensuite caractérisés, puis pourront être utilisés pour évaluer l'efficacité de molécules thérapeutiques.

## *Discussion et perspectives*

---



## *Partie I. Les iPSc : une technologie extrêmement utile à l'étude des neuropathies périphériques d'origine génétique.*

---

Les objectifs majeurs de notre laboratoire sont de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les neuropathies périphériques d'origine génétique, telle que la maladie de Charcot-Marie-Tooth, mais également de proposer des approches thérapeutiques. Dans ces buts, il est important d'avoir des modèles pertinents. Les modèles animaux (souris, rat, drosophile, etc ...) ont longtemps été choisis comme la stratégie la plus adaptée, mais les réflexions éthiques conduisent à présent à tenter au maximum de minimiser leur utilisation en privilégiant les modèles cellulaires. Cependant, selon les gènes étudiés, les modèles classiques fibroblastes, etc ... ne sont pas toujours idéaux et adaptés. C'est le cas pour le gène *GDAP1* qui est très faiblement exprimé dans les fibroblastes, comme nous avons pu le montrer. Grâce à la technologie iPSc, ceci est à présent possible. En effet, les iPSc, obtenus à partir de cellules somatiques adultes (souvent des fibroblastes), peuvent être différenciés en tout type cellulaire dont les neurones. Ainsi, dans notre laboratoire, nous avons développé un procédé pour générer des iPScs d'individus contrôles et d'un patient CMT à partir de fibroblastes de patients présentant une mutation non-sens dans le gène *GDAP1* (Faye et al., 2020; Miressi et al., 2021). Nous avons ensuite montré ici qu'en les différenciant en motoneurones, il était possible d'étudier une partie de la physiopathologie (article 2) et de tester des approches thérapeutiques (article 3).

Il est cependant extrêmement chronophage de créer des iPSc pour chaque mutation d'intérêt en partant d'une biopsie cutanée de patients (plus de 6 mois de manipulations). La stratégie que nous souhaitons développer à présent est l'édition de gènes par la technologie CRISPR-Cas9 sur nos iPSc contrôle. Nous estimons à un mois le temps de manipulation.



Cette ingénierie moléculaire intéressante est basée sur l'activité nucléase CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) et Cas9 (associée à CRISPR) qui coupe le double brin d'ADN et active le système de réparation de l'ADN pour générer une mutation stable, dont potentiellement les mutations non-sens qui nous intéressent. Actuellement, des travaux sont en cours dans notre équipe afin de créer de nouvelles mutations non-sens dans les gènes *GDAP1* et *SH3TC2* responsables respectivement de CMT axonal et démyélinisant dans les iPSc de contrôles. Les premiers résultats sont extrêmement encourageants, car dès la première expérience, des mutations non-sens à l'état homozygote ont pu être générées sur le gène *SH3TC2* par Camille LORET en première année de thèse, en collaboration avec l'équipe du Dr Béatrice Turcq de l'Université de Bordeaux.

## ***Partie II. Différenciation des iPSc en cellules neuronales : un modèle essentiel pour comprendre les voies physiopathologiques et développer de nouveaux modèles cellulaires innovants adaptés aux neuropathies périphériques d'origine génétique.***

---

Plusieurs études, dont une de notre équipe, ont rapporté la génération des motoneurones à partir d'iPSc (Faye et al., 2020; Miressi et al., 2021). Le protocole initial développé au sein de notre unité de recherche nous a permis d'étudier les mécanismes physiopathologiques sur des MN mutés avec la mutation non-sens (Article 2).

En utilisant ce protocole, la période de culture était d'environ de 30 jours pour obtenir des MN et le nombre de cellules obtenues était limité. Lors de ma thèse, j'ai modifié ce protocole de différenciation. Il repose sur une procédure simple et plus rapide, 10 jours pour obtenir des PN, suivis de 15 jours pour obtenir des MN. Ce protocole a donc été utilisé pour réaliser l'article 3 dans lequel est présenté nos résultats sur le PN. Les études complémentaires pourront également être réalisées sur les MN par mes successeurs.

Une analyse effectuée par MEA « Microélectrode array », par ma collègue la Dr Amandine ROVINI, a montré que les MN obtenus après différenciation sont bien fonctionnels avec une activité électrique (figure 37).

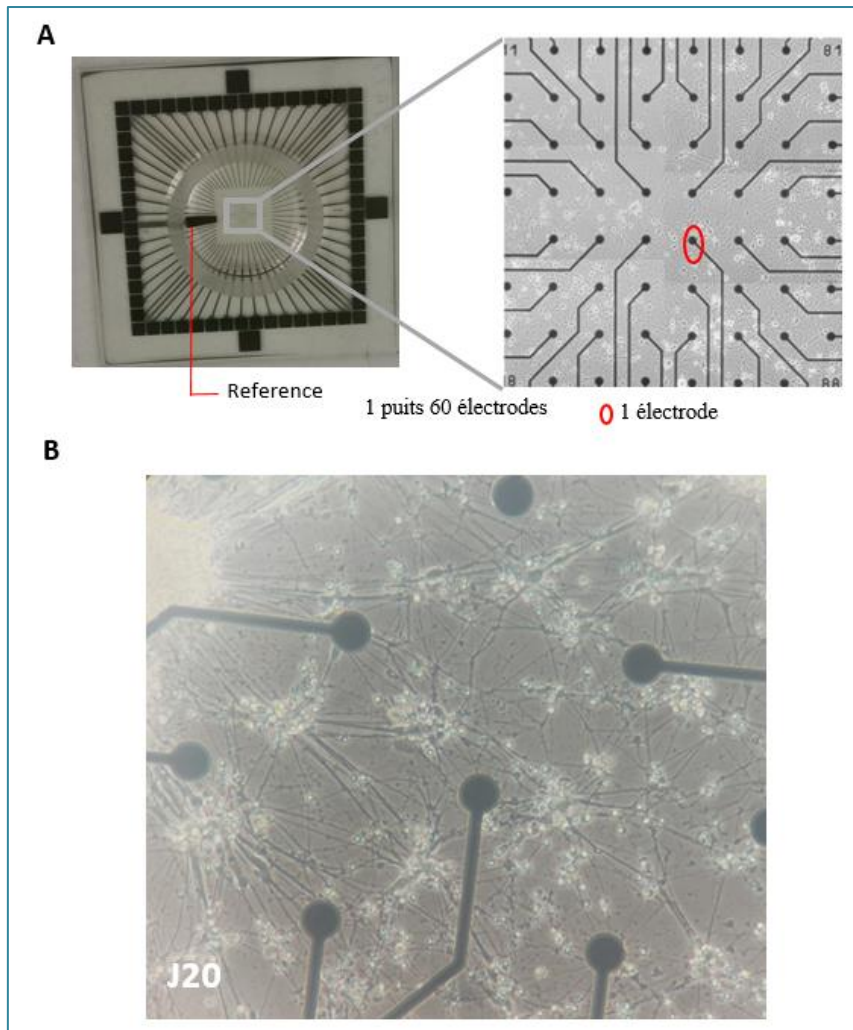


Figure 37: Activité électrique des MN.

A. Représentation schématique de la chambre MEA «MEA60», une chambre MEA contient 60 électrodes, dont une électrode de référence. B. MN à J20 dans la chambre MEA.

De façon complémentaire, il est à présent possible de créer des cellules de Schwann à partir de cellules iPS, au sein de notre laboratoire, grâce à l'expertise du Dr Amandine ROVINI. Ma collègue Camille LORET qui crée actuellement des iPSc mutées sur *SH3TC2* via la stratégie CRISPR-Cas9 utilisera cette voie de différenciation pour étudier la physiopathologie liée aux mutations *SH3TC2* et testera également des molécules thérapeutiques sur ce nouveau modèle cellulaire.

Dans la CMT, l'atteinte est neuro-musculaire. En effet, les patients souffrent souvent d'une faiblesse musculaire associée à une atrophie. Il est donc intéressant de développer de nouveaux protocoles de co-culture entre les MN et les cellules musculaires permettant de



former des jonctions neuromusculaires pour obtenir des modèles encore plus fonctionnels. Ceci correspond au projet de thèse de Camille SCHERRER, qui vient de débiter sa thèse dans notre équipe. Dans l'organisme, les axones des MN sont entourés d'une gaine de myéline formée par les cellules de Schwann. L'idéal serait donc d'établir un modèle de triculture de MN, de cellules de Schwann et de cellules musculaires afin d'être le plus proche possible de l'état physiologique et, ainsi, de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques.

De façon parallèle, afin de se rapprocher et de limiter les modèles physiologiques *in vivo*, des modèles avec une certaine complexité ont fait leur apparition, notamment la culture 3D de type organoïde. En effet, les organoïdes associant les MN sont cultivés dans des chambres microfluidiques qui offrent un microenvironnement physiologique. Une chambre microfluidique est constituée de deux compartiments qui permettent de séparer efficacement les axones des corps cellulaires et les dendrites. Cette méthode permet d'orienter de manière unidirectionnelle les axones, à la différence de la culture 2D où les axones sont aléatoirement orientés (Osaki et al., 2020). Cette approche est également envisagée au sein du laboratoire.

### *Partie III. Analyses fonctionnelles de GDAP1: caractérisation de son rôle dans le stress oxydant et les fonctions mitochondriales*

---

Dans les MN issus du patient porteur de la mutation c.581C>G, nous avons mis en évidence un stress oxydant, en particulier par la production excessive de l'anion superoxyde. Ces résultats confirment bien le rôle de GDAP1 dans la protection contre les ROS préalablement rapportée dans différents modèles cellulaires et animaux (Noack et al. 2012 ; López Del Amo et al. 2015 ; Cassereau et al. 2020). Nous avons observé que cet état de stress était associé dans les MN à l'accumulation de gouttelettes lipidiques sous forme de structures sphériques dans le cytoplasme des MN mutés. Ces gouttelettes lipidiques ont déjà été observées dans différentes maladies du CNS comme la SLA, la Chorée de Huntington, et Parkinson. De façon originale, nous avons observé ce phénomène pour la première fois dans un modèle mimant le SNP.

Des analyses lipidomiques plus approfondies seront nécessaires afin d'identifier le type de lipides impliqués. Les résultats préliminaires, à la suite d'expériences réalisées en collaboration avec le Pr Pascal Reynier de l'Université d'Angers, mettent en avant une accumulation de triglycérides constitués d'acide gras à chaîne longue. Il a été suggéré qu'il s'agirait d'un moyen de défense contre le stress oxydant. Ces résultats restent à être confirmés et des études approfondies sont envisagées.

Concernant les mitochondries, l'analyse ultrastructurale a révélé une désorganisation de crêtes mitochondriales dans les MN issus d'iPSc du patient. Des altérations morphologiques au niveau de la membrane mitochondriale interne ont été observées dans le cas de mutations d'autres gènes CMT impliqués dans la dynamique mitochondriale, comme *OPA1* (Perkins, 2009) ou *MFN2* (Vallat, 2008). Pour ce qui concerne *GDAP1*, des anomalies des crêtes ont été décrites au niveau de la biopsie nerveuse d'un patient CMT présentant la mutation p.Pro59Valfs\*4 de *GDAP1* (Benedetti, 2010), mais aussi au niveau musculaire de patients avec

les mutations p.Leu26Arg and p.Ser169fs (Chen, 2020). Ces observations sembleraient renforcer l'idée que *GDAP1* puisse jouer un rôle important dans la dynamique mitochondriale, non seulement dans les processus de fission et fusion, mais aussi dans la définition de l'architecture mitochondriale interne. C'est pour cette raison que nous avons envisagé de réaliser, sur nos modèles cellulaires, des analyses supplémentaires par microscopie de fluorescence à déconvolution, mais aussi par microscopie super résolution, avec l'objectif de détecter d'autres éventuelles perturbations du réseau mitochondrial associées à *GDAP1*.

Par microscopie électronique, nous avons récemment observé dans les PN dérivés d'hiPSc du patient, que la mutation influence la structure de l'appareil de Golgi. Ce résultat est en accord avec une étude précédente, menée sur des lignées SH-SY5Y et Hela transfectées avec *GDAP1* muté (p.Leu239Phe et p.Gly327Asp) (Katarzyna Binięda et al., 2021). Dans cette étude, les cellules présentaient une structure altérée des citernes et des vacuoles (Katarzyna Binięda et al., 2021). Un marquage par immunofluorescence sera nécessaire pour identifier les protéines impliquées dans cette dysfonction de l'appareil de Golgi, et vérifier quel niveau de l'appareil de Golgi est altéré par notre mutation : le cis-Golgien (avec un anticorps anti-GM130), le médial-Golgi (GORASP2) ou le trans-Golgien (avec un anticorps anti-TGN46 ou anti-B4GALT3).

Grâce à ce modèle cellulaire de MN issus d'iPSc, l'équipe pourra continuer les investigations concernant la physiopathologie de l'atteinte provoquée par des mutations non-sens dans le gène *GDAP1*. En plus des points développés ci-dessus, il serait aussi intéressant d'étudier l'intégrité des lysosomes (marquage avec LC3b), l'interaction entre la mitochondrie et le RE, l'homéostasie du calcium et la mitophagie.

## *Partie IV. Efficacité des Molécules de translecture et inhibiteurs du NMD sur les cellules neuronales porteuses de la mutation non-sens c.581C>G dans le gène GDAP1.*

---

Les mutations non-sens entraînent l'apparition d'un PTC et un arrêt prématuré de la traduction des protéines souvent responsables d'un phénotype CMT sévère. Le « masquage » des mutations non-sens représente donc une approche prometteuse pour traiter ces patients CMT qui restent dans l'espoir d'une thérapie.

- Molécules de translecture utilisée seule

L'activité de la translecture seule peut ne pas être suffisante pour permettre de restaurer la production en quantité suffisante d'une protéine, sachant que cette activité de translecture se fait sur le peu d'ARNm qui échappe au NMD. Dans notre étude, la CMNS1 (2- Diaminopurine) utilisée seule et connue pour son activité de translecture au niveau post transitionnel n'a pas montré d'effet sur l'expression protéique de GDAP1 chez les PN du patient, alors que cette molécule était capable de restaurer la protéine P53 dans un modèle cellulaire et chez la souris (Trzaska et al., 2020). Les résultats préliminaires obtenus lors de la transfection avec le système rapporteur PTC-UGA dans les PN traités avec 100µM de CMNS1 étaient pourtant extrêmement encourageants, car ils montraient que les molécules de translecture rentraient bien dans les cellules neuronales en culture et qu'elles avaient une activité de translecture. Le traitement avec cette molécule à 25µM et à 100µM n'a pas eu d'effet sur l'ARNm *GDAP1* portant le PTC. Cela pourrait être du (ou expliqué) par une trop faible quantité de l'ARNm suite à l'action du NMD ou à une localisation du PTC qui ne serait pas idéale pour l'action de cette molécule.

Si l'hypothèse du niveau d'ARNm trop faible est retenue, il faudrait ajouter à cette molécule de translecture un inhibiteur du NMD pour restaurer la production d'une protéine complète. En effet, la substitution c.581 C>G se trouve à 193 pb de la dernière jonction exon-exon (> 55pb),

et est donc très susceptible d'induire le système NMD. Afin de ré-exprimer une protéine GDAP1 complète, il serait nécessaire d'associer une activité de translecture et une inhibition du NMD.

- L'amlexanox, une molécule à double activité

La molécule amlexanox est connue pour son activité bivalente : elle est capable de stabiliser les ARNm qui sont supposés être dégradés par le système NMD et de rétablir la synthèse d'une protéine via son activité de translecture. L'amlexanox, est une molécule approuvée par la FDA (Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux) pour le traitement de stomatites aphteuses et d'asthme actuellement en essai clinique pour le traitement de diabète type 2 et l'obésité (NCT01842282). Elle est commercialisée dans certains pays (Etats-Unis, Japon et le Canada). Initialement, l'efficacité de l'amlexanox a été rapportée comme molécule de translecture sur trois modèles cellulaires différents (DMD, CF, et Cancer) (Gonzalez-Hilarion et al., 2012), évaluée *in vitro* sur des fibroblastes et kératinocytes de patients atteints d'épidermolyse bulleuse porteurs d'une mutation homozygote PTC sur le gène COL7A1 (Atanasova et al., 2017), elle a été récemment testée sur des motoneurones dérivés d'iPSc portant une mutation non-sens sur le gène NFL (Neurofilament light) responsable de CMT axonal (Sainio et al., 2022).

Dans notre modèle cellulaire portant la mutation non-sens sur *GDAP1*, la molécule amlexanox a été capable de stabiliser l'ARNm *GDAP1* et de rétablir la synthèse de la protéine GDAP1. Nous avons également observé, par microscopie électronique, que cette molécule permet une correction morphologique des mitochondries analysées. Ce résultat encourageant montre que la molécule est capable d'être efficace à l'intérieur des cellules neuronales et suggère qu'elle pourrait être utilisée pour traiter les maladies neurologiques induites par des PTC. La concentration de 100µM représente la concentration optimale d'amlexanox dans notre modèle. Aucune toxicité sur le développement neuronal n'a été observé pendant les 20h de

traitement. Ce résultat est en désaccord avec ce qui a été déjà observé dans une étude précédente avec un traitement de 25 (Sainio et al., 2022).

Cette double propriété a été également rapportée pour l'aminoglycoside G418. Malheureusement, cette molécule a des effets toxiques l'éloignant d'un usage clinique. Afin de réduire cette toxicité, plusieurs dérivés ont été développés comme ELX02 (ou NB124) qui est actuellement en essai clinique de phase 2 pour le traitement de la mucoviscidose (NCT04135495). Nous serions également intéressés par cette molécule afin d'évaluer son efficacité sur notre modèle cellulaire.

- Facteurs influençant la translecture par amlexanox

Des études précédentes ont montré que le traitement avec amlexanox permet une translecture du codon UGA (le PTC le plus translu), mais que cette molécule a aussi une activité sur les deux autres PTC (AUG, et UAA) (Gonzalez-Hilarion et al., 2012). Il a été rapporté que l'efficacité de l'amlexanox dépend de la nature du codon stop mais également du contexte nucléotidique. La présence d'un uracile en position -1 (juste avant le PTC) et d'une cytosine en position +4 (juste après le PTC) est reconnue pour influencer l'activité de la translecture (Atanasova et al., 2017; Manuvakhova et al., 2000). En effet, une meilleure efficacité de translecture de l'amlexanox a été montrée avec un PTC-UGA suivi de C comparé à un PTC-UGA suivi de G (Atanasova et al., 2017). Dans notre modèle, le PTC UGA est suivi d'un A en +4 avec une séquence AA en -2 et -1 (-2 -1 UGA +4) suggérant une activité de translecture de l'amlexanox relative. Les mutations de *GDAPI* et *SH3TC2* en cours de création par CRIPR/Cas9 dans nos modèles cellulaires pourront confirmer l'influence de ces facteurs sur le traitement par l'amlexanox.

- Inconvénients

Par ailleurs, il est important d'identifier l'acide aminé incorporé au niveau du codon UGA par le mécanisme de translecture. Des études antérieures ont montré qu'en majorité la cystéine,



l'arginine et le tryptophane sont préférentiellement insérés (Roy et al., 2016). Parmi ces trois acides aminés, aucun ne possède les propriétés de l'acide aminé natif en 194 de GDAP1 sauvage (Sérine). Le nouvel acide aminé incorporé sera donc différent conduisant à une variation dite faux-sens, mais qui peut conduire à un phénotype moins sévère pour le patient CMT par rapport au patient CMT portant une mutation non-sens. Une analyse par spectrométrie de masse en tandem sur des PN issus d'iPCs du patient traité avec amlexanox serait un bon moyen pour déterminer l'acide aminé incorporé en position 194-UGA dans notre modèle cellulaire. De plus, il sera important de vérifier si la protéine synthétisée avec ce nouvel acide aminé est fonctionnelle. La mutation p.Ser194\* touche la région alpha-loop de GDAP1, région impliquée dans de transport antérograde et rétrograde mitochondrial qui pourrait être évalué grâce à un marquage de caytaxin and RAB6B (González-Sánchez et al., 2017).

Une question importante qui reste en suspens en utilisant cette stratégie est la propriété d'inhibiteur du NMD de l'amlexanox. Il pourrait en effet perturber d'autres substrats physiologiques du NMD dans la cellule. À ce jour, dans la littérature, il a été montré que l'amlexanox n'affecte pas le niveau d'expression de l'ARNm de trois gènes qui utilisent le NMD comme mécanisme de régulation post-transcriptionnelle (Gonzalez-Hilarion et al., 2012). Des études complémentaires restent à réaliser pour vérifier ce point sur l'ensemble des ARNm de nos cellules.

## *Partie V. Autres molécules thérapeutiques : tests préliminaires*

---

Criblage de potentielles nouvelles molécules thérapeutiques issues d'extraits fongiques et lichéniques.

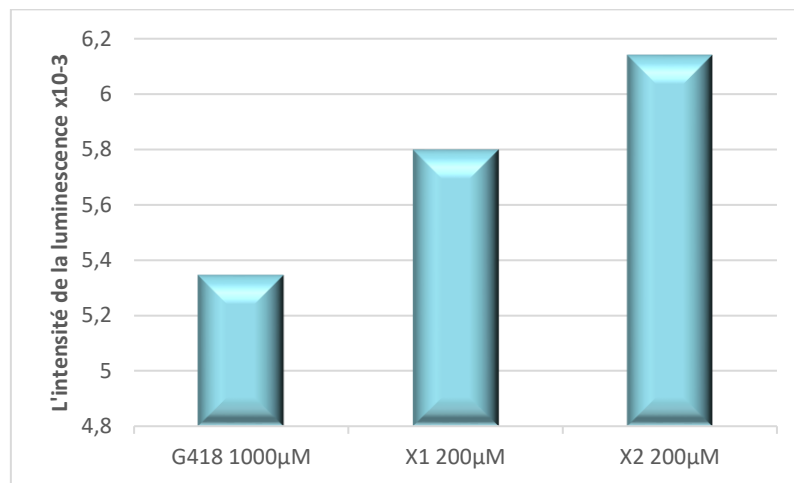
Lors de ce projet de thèse soutenu financièrement par l'ANR, nous avons contacté l'équipe INSERM U1194 du Pr Patrick Balaguer de Montpellier pour nous aider à obtenir des lignes stables contenant les constructions plasmidiques du Dr Fabrice Lejeune, afin *in fine* de pouvoir réaliser des screening de nouvelles molécules thérapeutiques plus facilement en s'affranchissant de l'étape de transfection cellulaire des plasmides. Cette collaboration a été couronnée de succès car quatre lignées U2OS (Ostéosarcome humain) contenant les constructions rapportrices d'intérêt avec la luciférase interrompue ou non par les 3 types de codons STOP ont été créées.

Notre collègue, la Dr Marion Millot, du laboratoire Peirene (UR 22722, Limoges, France) nous a alors sollicités pour tester des extraits fongiques et lichéniques, ainsi que des produits purs dérivés (molécules purifiées provenant de lichen). Les lichens sont des champignons associés à une algue, dont les propriétés biologiques sont nombreuses, certains d'entre eux ayant des propriétés antimicrobiennes et antiprolifératives.

Lors de ma dernière année de thèse, j'ai ainsi participé aux premiers tests de ces extraits sur les lignées cellulaires U2OS-UAA et U2OS-UGA, en suivant le protocole suivant. Les lignées sontensemencées dans une plaque 96 puits avec 17 000 cellules. Après 24h d'incubation, les cellules sont traitées avec les extraits lichéniques et les molécules pures de lichens dérivés à une concentration de 200 $\mu$ M, associés à des traitements avec G418 (1mg/ml) et CMNS1 (100 $\mu$ M) comme contrôles positifs, et DMSO comme contrôle négatif. Après 20h de traitement, la Luciférine, le substrat de la luciférase, est ajouté. L'activité de la luciférase est

ainsi mesurée par un luminomètre. L'intensité de la lumière produite est un reflet de l'activité de la luciférase et donc de la capacité de translecture des molécules d'intérêt sur les PTC étudiés.

Parmi les 46 extraits et molécules provenant de différents lichens qui ont été testés, nous avons pu mettre en évidence une activité de translecture par une molécule pure (X1), et un extrait (X2) de lichens. Les valeurs de luminescence obtenues étaient proches ou supérieures à celles obtenues avec le témoin positif G418 pour la lignée UGA, respectivement  $5,80 \cdot 10^{-3}$  UA et  $6,14 \cdot 10^{-3}$  UA pour X1 et X2 contre  $5,35 \cdot 10^{-3}$  UA pour G418 (figure 37).



*Figure 38: Résultats des premiers tests des molécules des extraits lichéniques et produits purs dérivés de translecture, dans la lignée U2OS-UGA.*

*Les cellules ont été traités avec la molécule X1 et X2 à 200µM, et avec du G418 à 1000µM (Contrôle positif) pendant 20h.*

Ces résultats préliminaires sont extrêmement intéressants, mais doivent être confirmés par des tests complémentaires. Si ces résultats sont confirmés, il sera nécessaire d'identifier les molécules d'intérêt, les purifier, puis les tester sur notre modèle innovant de motoneurones.

## Partie VI. Autres gènes CMT et autres modèles

---

Les mutations non-sens touchent plusieurs gènes impliqués dans la CMT tel que le gène *SH3TC2*. Dans ce gène, la mutation p.Arg954\*, est la mutation la plus fréquente (62% )des mutations détectées

Pour ce gène, nous avons récupéré des fibroblastes de patients portant cette mutation non-sens à l'état hétérozygote composite associée à une délétion de l'exon 14 sur le deuxième allèle. Des iPSc sont en cours de création par Ioanna Pyromali (doctorante en 3ème année). Cette même mutation STOP est en cours de création par CRISPR, à l'état homozygote, au sein d'iPSc de contrôle par Camille Loret (doctorante en 2ème année). Ces iPSc seront ensuite différenciés en cellules de Schwann. Après avoir caractérisé ce modèle *in vitro*, et étudié les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la CMT pour le gène *SH3TC2*, nous souhaitons tester les molécules de translecture et/ou inhibiteurs du NMD sur ce modèle cellulaire.

Dans le but de valider nos résultats, un modèle animal semble nécessaire. Pour le gène *SH3TC2*, il existe déjà un modèle de souris spontané portant une mutation non-sens et présentant une neuropathie très proche de celle décrite chez l'humain, quand la mutation est présente à l'état homozygote. De plus, une collaboration avec le Jackson Laboratory de Bar Harbor (USA) a été créée, dans le but d'obtenir un modèle de souris KI pour *GDAP1*. La création de ce modèle est actuellement en cours.

Ces deux modèles animaux de souris, avec des mutations non-sens sur le gène *GDAP-1* et *SH3TC2* très proches de celles de nos modèles cellulaires seront importés au sein du laboratoire dans les mois à venir. Il sera donc intéressant de caractériser ces modèles et de les traiter par les molécules de translecture et/ou inhibiteur du NMD que nous aurons sélectionnées, telle que l'amlexanox, dans l'espoir d'observer une réduction ou une correction du phénotype responsable de la CMT du point de vue moteur ou sensitif.

## Conclusion

---

La présence de mutations non-sens peut être responsable des neuropathies périphériques, telle que la maladie de Charcot-Marie-Tooth. La conséquence de telles mutations dans un gène est la production de protéines tronquées, non ou dys-fonctionnelles. Une stratégie de « correction » de ces mutations est la translecture, qui permet d'insérer un acide aminé au niveau du PTC, pour pouvoir continuer la traduction jusqu'au codon stop naturel. La translecture seule n'est pas efficace si l'ARNm portant le PTC est trop dégradé par le système NMD. En inhibant ce système et en l'association à des molécules de translecture, la protéine d'intérêt pourrait être exprimée de façon plus abondante et à une taille normale.

Jusqu'à ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible pour les patients CMT présentant des mutations non-sens. Chez les patients CMT, les cellules phénotypiquement touchées sont les cellules du nerf périphérique. Les modèles cellulaires précédemment utilisés par les différents groupes internationaux n'étaient souvent pas assez proches de la réalité et il était ainsi difficile d'étudier la physiopathologie de la CMT et notamment celle provoquée par des mutations non-sens sur le gène *GDAP1*. La génération d'iPSC à partir de cellules somatiques d'un patient CMT-*GDAP1* et de contrôles a ainsi permis de recréer, au sein de notre laboratoire, des progéniteurs neuronaux et des motoneurons. Grâce à ces modèles, nous avons pu montrer le rôle de *GDAP1* dans le stress oxydant et dans la fonction mitochondriale. Nous avons également initié des approches thérapeutiques, en montrant notamment que la molécule amlexanox pouvait avoir un effet positif de translecture et d'inhibiteur du NMD dans notre modèle. Les résultats obtenus lors de cette thèse sont extrêmement encourageants. Des études complémentaires seront réalisées sur des modèles cellulaires additionnels (SH3TC2) et de nouvelles molécules pourront continuer à être testées sur nos différents modèles. Ce travail de thèse a permis d'effectuer la preuve du concept que des molécules de translecture et inhibiteurs du système NMD peuvent être utilisées sur des cellules du système périphérique. L'étape

suiivante consistera à tester ces molécules sur les modèles murins qui arriveront prochainement au laboratoire, pour *in fine*, à plus long terme, pouvoir proposer un traitement aux patients CMT porteurs de mutations non-sens. En cas de succès, de nombreuses autres neuropathies d'origine génétique pourraient potentiellement bénéficier de tels traitements, et plus largement de nombreuses autres maladies d'origine génétique provoquées par des mutations non-sens.



## Références bibliographiques

---

- Alvarez-Garcia, I., Miska, E.A., 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 132, 4653–4662. <https://doi.org/10.1242/dev.02073>
- Amantana, A., Iversen, P.L., 2005. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 550–555. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.07.001>
- Antonellis, A., Ellsworth, R.E., Sambuughin, N., Puls, I., Abel, A., Lee-Lin, S.Q., 2003. Glycyl tRNA Synthetase Mutations in Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2D and Distal Spinal Muscular Atrophy Type V. *Am J Hum Genet* 72, 1293–9.
- Aoyama, T., Hata, S., Nakao, T., Tanigawa, Y., Oka, C., Kawaichi, M., 2009. Cayman ataxia protein caytaxin is transported by kinesin along neurites through binding to kinesin light chains. *J. Cell Sci.* 122, 4177–4185. <https://doi.org/10.1242/jcs.048579>
- Atanasova, V.S., Jiang, Q., Prisco, M., Gruber, C., Hofbauer, J.P., Chen, M., Has, C., Bruckner-Tuderman, L., McGrath, J.A., Uitto, J., South, A.P., 2017. Amlexanox enhances premature termination codon read-through in COL7A1 and expression of full length type VII collagen: potential therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 137, 1842–1849. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.05.011>
- Attarian, S., Vallat, J.-M., Magy, L., Funalot, B., Gonnaud, P.-M., Lacour, A., Péréon, Y., Dubourg, O., Pouget, J., Micallef, J., Franques, J., Lefebvre, M.-N., Ghorab, K., Al-Moussawi, M., Tiffreau, V., Preudhomme, M., Magot, A., Leclair-Visonneau, L., Stojkovic, T., Bossi, L., Lehert, P., Gilbert, W., Bertrand, V., Mandel, J., Milet, A., Hajj, R., Boudiaf, L., Scart-Grès, C., Nabirotkin, S., Guedj, M., Chumakov, I., Cohen, D., 2016. Erratum to: An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Orphanet J. Rare Dis.* 11, 92. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0463-6>
- Bakeeva, L.E., null, C.Y., Skulachev, V.P., 1978. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim Biophys Acta* 501, 349–69.
- Bansagi, B., Griffin, H., Whittaker, R.G., Antoniadi, T., Evangelista, T., Miller, J., Greenslade, M., Forester, N., Duff, J., Bradshaw, A., Kleinle, S., Boczonadi, V., Steele, H., Ramesh, V., Franko, E., Pyle, A., Lochmüller, H., Chinnery, P.F., Horvath, R., 2017. Genetic heterogeneity of motor neuropathies. *Neurology* 88, 1226–1234. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003772>
- Barneo-Muñoz, M., Juárez, P., Civera-Tregón, A., Yndriago, L., Pla-Martin, D., Zenker, J., 2015. Lack of GDAP1 Induces Neuronal Calcium and Mitochondrial Defects in a Knockout Mouse Model of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. *PLoS Genet* 10 Avr 11.
- Barohn, R.J., Amato, A.A., 2013. Pattern-recognition approach to neuropathy and neuronopathy. *Neurol. Clin.* 31, 343–361. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2013.02.001>
- Barreto, L.C.L.S., Oliveira, F.S., Nunes, P.S., França Costa, I.M.P., Garcez, C.A., Goes, G.M., 2016. Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology* 46, 157–65.
- Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., 2002. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* Janv 30, 21–2.
- Ben Othmane, K., Hentati, F., Lennon, F., Ben Hamida, C., Blel, S., Roses, A., 1993. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum Mol Genet* Oct 2, 1625–8.

- Benhabiles, H., Gonzalez-Hilarion, S., Amand, S., Bailly, C., Prévotat, A., Reix, P., Hubert, D., Adriaenssens, E., Rebuffat, S., Tulasne, D., Lejeune, F., 2017. Optimized approach for the identification of highly efficient correctors of nonsense mutations in human diseases. *PLOS ONE* 12, e0187930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187930>
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., 1993. Connexin Mutations in X-Linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *Science* 262, 2039–42.
- Binięda, K., Rzepnikowska, W., Kolakowski, D., Kaminska, J., Szczepankiewicz, A.A., Nieznańska, H., 2021. Mutations in GDAP1 Influence Structure and Function of the Trans-Golgi Network. *Int J Mol Sci Janv* 22.
- Binięda, Katarzyna, Rzepnikowska, W., Kolakowski, D., Kaminska, J., Szczepankiewicz, A.A., Nieznańska, H., Kocharński, A., Kabzińska, D., 2021. Mutations in GDAP1 Influence Structure and Function of the Trans-Golgi Network. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 914. <https://doi.org/10.3390/ijms22020914>
- Blair, I.P., Nash, J., Gordon, M.J., Nicholson, G.A., 1996. Prevalence and origin of de novo duplications in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: first report of a de novo duplication with a maternal origin. *Am J Hum Genet Mars* 58, 472–6.
- Boutary, S., Caillaud, M., El Madani, M., Vallat, J.-M., Loisel-Duwattez, J., Rouyer, A., Richard, L., Gracia, C., Urbinati, G., Desmaële, D., Echaniz-Laguna, A., Adams, D., Couvreur, P., Schumacher, M., Massaad, C., Massaad-Massade, L., 2021. Squalenoyl siRNA PMP22 nanoparticles are effective in treating mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease type 1 A. *Commun. Biol.* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01839-2>
- Brieger, K., Schiavone, S., Jr, FJM, K., K.H., 2012. Reactive oxygen species: from health to disease.
- Brillo, V., Chierigato, L., Leanza, L., Muccioli, S., Costa, R., 2021. Mitochondrial Dynamics, ROS, and Cell Signaling: A Blended Overview. *Life* 11.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., Carafoli, E., 2014. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 71, 2787–814.
- Bucci, C., Bakke, O., Progida, C., 2012. Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic. *Prog Neurobiol Déc* 99, 191–225.
- Buvoli, M., Buvoli, A., Leinwand, L.A., 2000. Suppression of Nonsense Mutations in Cell Culture and Mice by Multimerized Suppressor tRNA Genes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3116–3124.
- Caillaud, M., Msheik, Z., Ndong-Ntoutoume, G.M.-A., Vignaud, L., Richard, L., Favreau, F., Faye, P.-A., Sturtz, F., Granet, R., Vallat, J.-M., Sol, V., Desmoulière, A., Billet, F., 2020. Curcumin-cyclodextrin/cellulose nanocrystals improve the phenotype of Charcot-Marie-Tooth-1A transgenic rats through the reduction of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 161, 246–262. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.019>
- Cantarero, L., Juárez-Escoto, E., Civera-Tregón, A., Rodríguez-Sanz, M., Roldán, M., Benítez, R., 2020. Mitochondria-lysosome membrane contacts are defective in GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet* 29, 3589–605.
- Capponi, S., Geroldi, A., Fossa, P., Grandis, M., Ciotti, P., Gulli, R., 2011. HSPB1 and HSPB8 in inherited neuropathies: study of an Italian cohort of dHMN and CMT2 patients. *J Peripher Nerv Syst Déc* 16, 287–94.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Bonneau, D., Verny, C., Procaccio, V., Reynier, P., Ferré, M., 2011. A locus-specific database for mutations in GDAP1 allows analysis of genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth diseases type 4A and 2K. *Orphanet J. Rare Dis.* 6, 87. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-87>

- Cassereau, J., Chevrollier, A., Codron, P., Goizet, C., Gueguen, N., Verny, C., Reynier, P., Bonneau, D., Lenaers, G., Procaccio, V., 2020. Oxidative stress contributes differentially to the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2K. *Exp. Neurol.* 323, 113069. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113069>
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Malinge, M.-C., Letournel, F., Nicolas, G., Richard, L., Ferre, M., Verny, C., Dubas, F., Procaccio, V., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., 2009. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 10, 145–150. <https://doi.org/10.1007/s10048-008-0166-9>
- Chahbouni, M., López, M. del S., Molina-Carballo, A., de Haro, T., Muñoz-Hoyos, A., Fernández-Ortiz, M., Guerra-Librero, A., Acuña-Castroviejo, D., 2017. Melatonin Treatment Reduces Oxidative Damage and Normalizes Plasma Pro-Inflammatory Cytokines in Patients Suffering from Charcot-Marie-Tooth Neuropathy: A Pilot Study in Three Children. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 22, 1728. <https://doi.org/10.3390/molecules22101728>
- Chan, J.R., Cosgaya, J.M., Wu, Y.J., Shooter, E.M., 2001. Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14661–14668. <https://doi.org/10.1073/pnas.251543398>
- Chandhok, G., Lazarou, M., Neumann, B., 2018. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biol Rev Camb Philos Soc* 93, 933–49.
- Chaudhry, M.A., Vitalis, T.Z., Bowen, B.D., Piret, J.M., 2008. Basal medium composition and serum or serum replacement concentration influences on the maintenance of murine embryonic stem cells. *Cytotechnology* 58, 173–179. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9177-5>
- Chumakov, I., Milet, A., Cholet, N., Primas, G., Boucard, A., Pereira, Y., Graudens, E., Mandel, J., Laffaire, J., Fouquier, J., Glibert, F., Bertrand, V., Nave, K.-A., Sereda, M.W., Vial, E., Guedj, M., Hajj, R., Nabirotkin, S., Cohen, D., 2014. Polytherapy with a combination of three repurposed drugs (PXT3003) down-regulates Pmp22 over-expression and improves myelination, axonal and functional parameters in models of CMT1A neuropathy. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 201. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0201-x>
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48, 749–62.
- Civera-Tregón, A., Domínguez, L., Martínez-Valero, P., Serrano, C., Vallmitjana, A., Benítez, R., 2021. Mitochondria and calcium defects correlate with axonal dysfunction in GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth mouse model. *Neurobiol Dis.*
- Claramunt, R., Pedrola, L., Sevilla, T., López de Munain, A., Berciano, J., Cuesta, A., Sánchez-Navarro, B., Millán, J.M., Saifi, G.M., Lupski, J.R., Vílchez, J.J., Espinós, C., Palau, F., 2005. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J. Med. Genet.* 42, 358–365. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.022178>
- Colina-Tenorio, L., Horten, P., Pfanner, N., Rampelt, H., 2020. Shaping the mitochondrial inner membrane in health and disease. *J Intern Med* 287, 645–64.
- Correia, S.C., Perry, G., Moreira, P.I., 2016. Mitochondrial traffic jams in Alzheimer's disease - pinpointing the roadblocks. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1862, 1909–17.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., García-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., 2002. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* Janv 30, 22–5.

- Derouault, P., Chauzeix, J., Rizzo, D., Miressi, F., Magdelaine, C., Bourthoumieu, S., 2020. CovCopCan: An efficient tool to detect Copy Number Variation from amplicon sequencing data in inherited diseases and cancer. *PLoS Comput Biol* Févr 16.
- Désarnaud, F., Do Thi, A.N., Brown, A.M., Lemke, G., Suter, U., Baulieu, E.E., Schumacher, M., 1998. Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *J. Neurochem.* 71, 1765–1768. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71041765.x>
- Detmer, S.A., Chan, D.C., 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 870–9.
- DiVincenzo, C., Elzinga, C.D., Medeiros, A.C., Karbassi, I., Jones, E., JR, M.C., 2014. The allelic spectrum of Charcot–Marie–Tooth disease in over 17,000 individuals with neuropathy. *Mol Genet Genomic Med* 2, 522–9.
- Duchesne, M., Mathis, S., Richard, L., Magdelaine, C., Corcia, P., Nouioua, S., 2018. Nerve Biopsy Is Still Useful in Some Inherited Neuropathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 77, 88–99.
- Eijkenboom, I., Vanoevelen, J.M., Hoeijmakers, J.G.J., Wijnen, I., Gerards, M., Faber, C.G., 2019. A zebrafish model to study small-fiber neuropathy reveals a potential role for GDAP1. *Mitochondrion* Juill 47, 273–81.
- Estela, A., Pla-Martín, D., Sánchez-Piris, M., Sesaki, H., Palau, F., 2011. Charcot-Marie-Tooth-related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in *Saccharomyces cerevisiae* fis1 gene-defective cells. *J. Biol. Chem.* 286, 36777–36786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260042>
- Evans, R.D., Heather, L.C., 2016. Metabolic pathways and abnormalities. *Surg Oxf* Juin 34, 266–72.
- Faye, P.-A., Vedrenne, N., Miressi, F., Rassat, M., Romanenko, S., Richard, L., Bourthoumieu, S., Funalot, B., Sturtz, F., Favreau, F., Lia, A.-S., 2020. Optimized Protocol to Generate Spinal Motor Neuron Cells from Induced Pluripotent Stem Cells from Charcot Marie Tooth Patients. *Brain Sci.* 10, E407. <https://doi.org/10.3390/brainsci10070407>
- Fernandez-Lizarbe, S., Civera-Tregón, A., Cantarero, L., Herrer, I., Juarez, P., Hoenicka, J., Palau, F., 2019. Neuroinflammation in the pathogenesis of axonal Charcot-Marie-Tooth disease caused by lack of GDAP1. *Exp. Neurol.* 320, 113004. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113004>
- Fledrich, R., Akkermann, D., Schütza, V., Abdelaal, T.A., Hermes, D., Schäffner, E., Soto-Bernardini, M.C., Götze, T., Klink, A., Kusch, K., Krueger, M., Kungl, T., Frydrychowicz, C., Möbius, W., Brück, W., Mueller, W.C., Bechmann, I., Sereda, M.W., Schwab, M.H., Nave, K.-A., Stassart, R.M., 2019. NRG1 type I dependent autocrine stimulation of Schwann cells in onion bulbs of peripheral neuropathies. *Nat. Commun.* 10, 1467. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09385-6>
- Fledrich, R., Stassart, R.M., Klink, A., Rasch, L.M., Prukop, T., Haag, L., Czesnik, D., Kungl, T., Abdelaal, T.A.M., Keric, N., Stadelmann, C., Brück, W., Nave, K.-A., Sereda, M.W., 2014. Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nat. Med.* 20, 1055–1061. <https://doi.org/10.1038/nm.3664>
- Friedman, L., JR, LL, W., M, D., JR, Nunnari, J., Voeltz, G.K., 2011. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334, 358–62.
- Fundu, T.M., Kapepula, P.M., Esimo, J.M., Remacle, J., Ngombe, N.K., 2019. Subcellular Localization of Glutathione Peroxidase, Change in Glutathione System during Ageing and Effects on Cardiometabolic Risks and Associated Diseases [Internet. IntechOpen.

- Gautier, B., Hajjar, H., Soares, S., Berthelot, J., Deck, M., Abbou, S., Campbell, G., Ceprian, M., Gonzalez, S., Fovet, C.-M., Schütza, V., Jouvenel, A., Rivat, C., Zerah, M., François, V., Le Guiner, C., Aubourg, P., Fledrich, R., Tricaud, N., 2021. AAV2/9-mediated silencing of PMP22 prevents the development of pathological features in a rat model of Charcot-Marie-Tooth disease 1 A. *Nat. Commun.* 12, 2356. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22593-3>
- Gess, B., Baets, J., De Jonghe, P., Reilly, M.M., Pareyson, D., Young, P., 2015. Ascorbic acid for the treatment of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD011952. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011952>
- Ginzburg, L., Kacher, Y., Futerman, A.H., 2004. The pathogenesis of glycosphingolipid storage disorders. *Semin Cell Dev Biol* Août 15, 417–31.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* Mai 221, 3–12.
- Gonzalez-Hilarion, S., Beghyn, T., Jia, J., Debreuck, N., Berte, G., Mamchaoui, K., Mouly, V., Gruenert, D.C., Déprez, B., Lejeune, F., 2012. Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 58. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-58>
- González-Sánchez, P., Pla-Martín, D., Martínez-Valero, P., Rueda, C.B., Calpena, E., Del Arco, A., Palau, F., Satrustegui, J., 2017. CMT-linked loss-of-function mutations in GDAP1 impair store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-stimulated respiration. *Sci. Rep.* 7, 42993. <https://doi.org/10.1038/srep42993>
- Googins, M.R., Woghiren-Afegbua, A.O., Calderon, M., St Croix, C.M., Kiselyov, K.I., VanDemark, A.P., 2020. Structural and functional divergence of GDAP1 from the glutathione S-transferase superfamily. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 34, 7192–7207. <https://doi.org/10.1096/fj.202000110R>
- Grimm, A., Eckert, A., 2017. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J Neurochem* Nov 143, 418–31.
- Hanemann, C.O., D'Urso, D., Gabreëls-Festen, A.A., Müller, H.W., 2000. Mutation-dependent alteration in cellular distribution of peripheral myelin protein 22 in nerve biopsies from Charcot-Marie-Tooth type 1A. *Brain J Neurol* Mai 123.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 51–88.
- Hu, B., Wang, M., Castoro, R., Simmons, M., Dortch, R., Yawn, R., 2017. A Novel Missense Mutation in AIFM1 Results in Axonal Polyneuropathy and Misassembly of OXPHOS Complexes. *Eur J Neurol* Déc 24, 1499–506.
- Huber, N., Bieniossek, C., Wagner, K.M., Elsässer, H.-P., Suter, U., Berger, I., 2016. Glutathione-conjugating and membrane-remodeling activity of GDAP1 relies on amphipathic C-terminal domain. *Sci Rep* Déc 6.
- Huber, N., Guimaraes, S., Schrader, M., Suter, U., Niemann, A., 2013. Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO Rep* Juin 14, 545–52.
- Huff, T.C., Sant, D.W., Camarena, V., Van Booven, D., Andrade, N.S., Mustafi, S., Monje, P.V., Wang, G., 2021. Vitamin C regulates Schwann cell myelination by promoting DNA demethylation of pro-myelinating genes. *J. Neurochem.* 157, 1759–1773. <https://doi.org/10.1111/jnc.15015>
- Inoue, K., Khajavi, M., Ohyama, T., Hirabayashi, S., Wilson, J., Reggin, J.D., Mancias, P., Butler, I.J., Wilkinson, M.F., Wegner, M., Lupski, J.R., 2004. Molecular mechanism for

- distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat. Genet.* 36, 361–369. <https://doi.org/10.1038/ng1322>
- Inoue, K., Ohyama, T., Sakuragi, Y., Yamamoto, R., Inoue, N.A., Li-Hua, Y., Goto, Y., Wegner, M., Lupski, J.R., 2007. Translation of SOX10 3' untranslated region causes a complex severe neurocristopathy by generation of a deleterious functional domain. *Hum. Mol. Genet.* 16, 3037–3046. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm262>
- Ishii, A., Furusho, M., Bansal, R., 2021. Mek/ERK1/2-MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling plays both independent and cooperative roles in Schwann cell differentiation, myelination and dysmyelination. *Glia* 69, 2429–2446. <https://doi.org/10.1002/glia.24049>
- Jafari-Schluep, H.F., Khoris, J., Mayeux-Portas, V., Hand, C., Rouleau, G., Camu, W., 2004. Les anomalies du gène superoxyde dismutase 1 dans la sclérose latérale amyotrophique familiale : corrélations phénotype/génotype et implications pratiques. L'expérience française et revue de la littérature. *Rev Neurol Paris* 160, 44–50.
- Jerath, N., 2015. CMT X in Women: Electrodiagnostic Findings (S42.003). *Neurol. Internet.*
- Jerath, N.U., Shy, M.E., 2015. Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1852, 667–78.
- Kabel, A., 2014. Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *World J Nutr Health* 2, 35–8.
- Kagiava, A., Karaiskos, C., Richter, J., Tryfonos, C., Jennings, M.J., Heslegrave, A.J., Sargiannidou, I., Stavrou, M., Zetterberg, H., Reilly, M.M., Christodoulou, C., Horvath, R., Kleopa, K.A., 2021. AAV9-mediated Schwann cell-targeted gene therapy rescues a model of demyelinating neuropathy. *Gene Ther.* 28, 659–675. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00250-0>
- Kagiava, A., Richter, J., Tryfonos, C., Karaiskos, C., Heslegrave, A.J., Sargiannidou, I., Rossor, A.M., Zetterberg, H., Reilly, M.M., Christodoulou, C., Kleopa, K.A., 2019. Gene replacement therapy after neuropathy onset provides therapeutic benefit in a model of CMT1X. *Hum. Mol. Genet.* 28, 3528–3542. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz199>
- Karbowski, M., Youle, R.J., 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 870–80.
- Kaya, F., Belin, S., Diamantidis, G., Fontes, M., 2008. Ascorbic acid is a regulator of the intracellular cAMP concentration: old molecule, new functions? *FEBS Lett.* 582, 3614–3618. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.040>
- Keeling, K.M., Du, M., Bedwell, D.M., 2013. *Therapies of Nonsense-Associated Diseases.* Landes Bioscience.
- Khajavi, M., Inoue, K., Wiszniewski, W., Ohyama, T., Snipes, G.J., Lupski, J., 2005. Curcumin Treatment Abrogates Endoplasmic Reticulum Retention and Aggregation-Induced Apoptosis Associated with Neuropathy-Causing Myelin Protein Zero-Truncating Mutants. *Am J Hum Genet* Nov 77, 841–50.
- Kiselev, A.V., Ostapenko, O.V., Rogozhkina, E.V., Kholod, N.S., Seit Nebi, A.S., Baranov, A.N., Lesina, E.A., Ivashchenko, T.E., Sabetskiï, V.A., Shavlovskiï, M.M., Rechinskiï, V.O., Kiselev, L.L., Baranov, V.C., 2002. [Suppression of nonsense mutations in the Dystrophin gene by a suppressor tRNA gene]. *Mol. Biol. (Mosk.)* 36, 43–47.
- Kleopa, K.A., Abrams, C.K., Scherer, S.S., 2012. How do mutations in GJB1 cause X-linked Charcot–Marie–Tooth disease? *Brain Res* 1487, 198–205.



- Kobayashi, M., Sugiyama, H., Wang, D.H., Toda, N., Maeshima, Y., Yamasaki, Y., 2005. Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. *Kidney Int Sept* 68, 1018–31.
- Kubli, D.A., Gustafsson, Å.B., 2012. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 111, 1208–21.
- Kühlbrandt, W., 2015. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 13.
- Kukat, C., Wurm, C.A., Spåhr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.G., Jakobs, S., 2011. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U A* 108, 13534–9.
- Lee, C., Jo, D.H., Hwang, G.-H., Yu, J., Kim, Jin Hyung, Park, S., Kim, J.-S., Kim, Jeong Hun, Bae, S., 2019. CRISPR-pass: Gene rescue of nonsense mutations using adenine base editors. *bioRxiv* 545723. <https://doi.org/10.1101/545723>
- Lee, H., SR, J., 2017. Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 1–15.
- Lee, J.-S., Chang, E.H., Koo, O.J., Jwa, D.H., Mo, W.M., Kwak, G., Moon, H.W., Park, H.T., Hong, Y.B., Choi, B.-O., 2017. Pmp22 mutant allele-specific siRNA alleviates demyelinating neuropathic phenotype in vivo. *Neurobiol. Dis.* 100, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.01.006>
- Lee, J.-S., Kwak, G., Kim, H.J., Park, H.-T., Choi, B.-O., Hong, Y.B., 2019. miR-381 Attenuates Peripheral Neuropathic Phenotype Caused by Overexpression of PMP22. *Exp. Neurobiol.* 28, 279–288. <https://doi.org/10.5607/en.2019.28.2.279>
- Lee, J.-S., Lee, J.Y., Song, D.W., Bae, H.S., Doo, H.M., Yu, H.S., Lee, K.J., Kim, H.K., Hwang, H., Kwak, G., Kim, D., Kim, S., Hong, Y.B., Lee, J.M., Choi, B.-O., 2020. Targeted PMP22 TATA-box editing by CRISPR/Cas9 reduces demyelinating neuropathy of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A in mice. *Nucleic Acids Res.* 48, 130–140. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1070>
- Lerat, J., Magdelaine, C., Lunati, A., Dzugan, H., Dejoie, C., Rego, M., Beze Beyrie, P., Bieth, E., Calvas, P., Cintas, P., Delaubrier, A., Demurger, F., Gilbert-Dussardier, B., Goizet, C., Journal, H., Laffargue, F., Magy, L., Taithe, F., Toutain, A., Urtizberea, J.A., Sturtz, F., Lia, A.S., 2019. Implication of the SH3TC2 gene in Charcot-Marie-Tooth disease associated with deafness and/or scoliosis: Illustration with four new pathogenic variants. *J. Neurol. Sci.* 406, 116376. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.06.027>
- Levine, T.D., 2018. Small Fiber Neuropathy: Disease Classification Beyond Pain and Burning. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* 10, 1179573518771703. <https://doi.org/10.1177/1179573518771703>
- Lewis, J.H., Cottu, P.H., Lehr, M., Dick, E., Shearer, T., Rencher, W., Bexon, A.S., Campone, M., Varga, A., Italiano, A., 2020. Onapristone Extended Release: Safety Evaluation from Phase I–II Studies with an Emphasis on Hepatotoxicity. *Drug Saf.* 43, 1045–1055. <https://doi.org/10.1007/s40264-020-00964-x>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E.T., Wang, H., feng, Y.X., 2013. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* 6.
- Lin, M.-Y., Sheng, Z.-H., 2015. Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Exp. Cell Res., Invited Reviews: Molecular Motors* 334, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.01.004>

- Liu, H., Nakagawa, T., Kanematsu, T., Uchida, T., Tsuji, S., 1999. Isolation of 10 Differentially Expressed cDNAs in Differentiated Neuro2a Cells Induced Through Controlled Expression of the GD3 Synthase Gene. *J Neurochem* 72, 1781–90.
- López Del Amo, V., Palomino-Schätzlein, M., Seco-Cervera, M., García-Giménez, J.L., Pallardó, F.V., Pineda-Lucena, A., Galindo, M.I., 2017. A *Drosophila* model of GDAP1 function reveals the involvement of insulin signalling in the mitochondria-dependent neuromuscular degeneration. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863, 801–809. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.003>
- López Del Amo, V., Seco-Cervera, M., García-Giménez, J.L., Whitworth, A.J., Pallardó, F.V., Galindo, M.I., 2015. Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of *Drosophila* Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum. Mol. Genet.* 24, 21–36. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu416>
- Lovas, J.R., Wang, X., 2013. The meaning of mitochondrial movement to a neuron's life. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.007>
- Lueck, J.D., Yoon, J.S., Perales-Puchalt, A., Mackey, A.L., Infield, D.T., Behlke, M.A., Pope, M.R., Weiner, D.B., Skach, W.R., McCray, P.B., Ahern, C.A., 2019. Engineered transfer RNAs for suppression of premature termination codons. *Nat. Commun.* 10, 822. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08329-4>
- Magy, L., Mathis, S., Le Masson, G., Goizet, C., Tazir, M., Vallat, J.M., 2018. Updating the classification of inherited neuropathies: Results of an international survey. *Neurology* 90.
- Magy, L., Vallat, J.-M., 2009. [Peripheral neuropathies]. *Rev. Prat.* 59, 839–840.
- Magyar, J.P., Martini, R., Ruelicke, T., Aguzzi, A., Adlkofer, K., Dombic, Z., 1996. Impaired Differentiation of Schwann Cells in Transgenic Mice with Increased PMP22 Gene Dosage. *J Neurosci* 16, 5351–60.
- Manuvakhova, M., Keeling, K., Bedwell, D.M., 2000. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA N. Y. N* 6, 1044–1055. <https://doi.org/10.1017/s1355838200000716>
- Marco, A., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., Marín, I., 2004. Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 176–187. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh013>
- Margulis, L., 1996. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1071–6.
- Martí, S., León, M., Orellana, C., Prieto, J., Ponsoda, X., López-García, C., Vílchez, J.J., Sevilla, T., Torres, J., 2017. Generation of a disease-specific iPSC cell line derived from a patient with Charcot-Marie-Tooth type 2K lacking functional GDAP1 gene. *Stem Cell Res.* 18, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.11.017>
- Mathis, S., Goizet, C., Tazir, M., Magdelaine, C., Lia, A.-S., Magy, L., Vallat, J.-M., 2015. Charcot-Marie-Tooth diseases: an update and some new proposals for the classification. *J. Med. Genet.* 52, 681–690. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103272>
- Mensch, S., Baraban, M., Almeida, R., Czopka, T., Ausborn, J., El Manira, A., 2015. Synaptic vesicle release regulates the number of myelin sheaths made by individual oligodendrocytes in vivo. *Nat Neurosci* 18, 628–30.
- Michaels, W.E., Pena-Rasgado, C., Kotaria, R., Bridges, R.J., Hastings, M.L., 2022. Open reading frame correction using splice-switching antisense oligonucleotides for the

- treatment of cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119, e2114886119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2114886119>
- Michalska, B., Duszyński, J., Szymański, J., 2016. Mechanism of mitochondrial fission - structure and function of Drp1 protein. *Postepy Biochem* 62, 127–37.
- Miressi, F., Benslimane, N., Favreau, F., Rassat, M., Richard, L., Bourthoumieu, S., Laroche, C., Magy, L., Magdelaine, C., Sturtz, F., Lia, A.-S., Faye, P.-A., 2021. GDAP1 Involvement in Mitochondrial Function and Oxidative Stress, Investigated in a Charcot-Marie-Tooth Model of hiPSCs-Derived Motor Neurons. *Biomedicines* 9, 945. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080945>
- Misquitta, C.M., Mack, D.P., Grover, A.K., 1999. Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium Avr* 25, 277–90.
- Morena, J., Gupta, A., Hoyle, J.C., 2019. Charcot-Marie-Tooth: From Molecules to Therapy. *Int J Mol Sci* 20.
- Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D.N., Chuzhanova, N.A., 2008. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum. Mutat.* 29, 1037–1047. <https://doi.org/10.1002/humu.20763>
- Moskovitz, J., 2005. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* 1703, 213–9.
- Mustonen, E.-K., Palomäki, T., Pasanen, M., 2017. Oligonucleotide-based pharmaceuticals: Non-clinical and clinical safety signals and non-clinical testing strategies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 90, 328–341. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.09.028>
- Nahacka, Z., Zobalova, R., Dubisova, M., Rohlena, J., Neuzil, J., 2021. Miro proteins connect mitochondrial function and intercellular transport. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 56, 401–25.
- Neil, E.E., Bisaccia, E.K., 2019. Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther. JPPT Off. J. PPAG* 24, 194–203. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-24.3.194>
- Niemann, A., Huber, N., Wagner, K.M., Somandin, C., Horn, M., Lebrun-Julien, F., 2014. The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to Charcot–Marie–Tooth disease. *Brain Mars* 137, 668–82.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., Suter, U., 2005. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.* 170, 1067–1078. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507087>
- Niemann, A., Wagner, K.M., Ruegg, M., Suter, U., 2009. GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol* 1 Déc 36, 509–20.
- Noack, R., Frede, S., Albrecht, P., Henke, N., Pfeiffer, A., Knoll, K., 2012. Charcot–Marie–Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum Mol Genet* 21, 150–62.
- Osaki, T., Chow, S.Y.A., Nakanishi, Y., Hernández, J., Kawada, J., Fujii, T., Ikeuchi, Y., 2020. Three-Dimensional Motor Nerve Organoid Generation. *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/61544>
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchen, M.R., 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pr. Res Clin Endocrinol Metab* Déc 26, 711–23.

- Ozes, B., Myers, M., Moss, K., McKinney, J., Ridgley, A., Chen, L., Bai, S., Abrams, C.K., Freidin, M.M., Mendell, J.R., Sahenk, Z., 2022. AAV1.NT-3 gene therapy for X-linked Charcot–Marie–Tooth neuropathy type 1. *Gene Ther.* 29, 127–137. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00231-3>
- Pakhrin, P.S., Xie, Y., Hu, Z., Li, X., Liu, L., Huang, S., 2018. Genotype–phenotype correlation and frequency of distribution in a cohort of Chinese Charcot–Marie–Tooth patients associated with GDAP1 mutations. *J Neurol* 265, 637–46.
- Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N., 2018. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol* Sept 20, 1013–22.
- Pareyson, D., Reilly, M.M., Schenone, A., Fabrizi, G.M., Cavallaro, T., Santoro, L., Vita, G., Quattrone, A., Padua, L., Gemignani, F., Visioli, F., Laurà, M., Radice, D., Calabrese, D., Hughes, R.A.C., Solari, A., CMT-TRIAAL, CMT-TRAUK groups, 2011. Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol.* 10, 320–328. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70025-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70025-4)
- Pareyson, D., Saveri, P., Sagnelli, A., Piscosquito, G., 2015. Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neurosci Lett* 596, 66–77.
- Passage, E., Norreel, J.C., Noack-Fraissignes, P., Sanguedolce, V., Pizant, J., Thirion, X., Robaglia-Schlupp, A., Pellissier, J.F., Fontés, M., 2004. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Med.* 10, 396–401. <https://doi.org/10.1038/nm1023>
- Patzkó, Á., Bai, Y., Saporta, M.A., Katona, I., Wu, X., Vizzuso, D., Feltri, M.L., Wang, S., Dillon, L.M., Kamholz, J., Kirschner, D., Sarkar, F.H., Wrabetz, L., Shy, M.E., 2012. Curcumin derivatives promote Schwann cell differentiation and improve neuropathy in R98C CMT1B mice. *Brain* 135, 3551–3566. <https://doi.org/10.1093/brain/aws299>
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M.E., Palau, F., 2005. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1087–1094. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi121>
- Piguet, F., Alves, S., Cartier, N., 2017. Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Hum. Gene Ther.* 28, 988–1003. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.160>
- Pisciotta, C., Saveri, P., Pareyson, D., 2021. Challenges in Treating Charcot-Marie-Tooth Disease and Related Neuropathies: Current Management and Future Perspectives. *Brain Sci.* 11, 1447. <https://doi.org/10.3390/brainsci11111447>
- Pla-Martín, D., Rueda, C.B., Estela, A., Sánchez-Piris, M., González-Sánchez, P., Traba, J., 2013. Silencing of the Charcot–Marie–Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca<sup>2+</sup> homeostasis by reducing store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Neurobiol Dis* 55, 140–51.
- Previtali, S.C., Zhao, E., Lazarevic, D., Pipitone, G.B., Fabrizi, G.M., Manganelli, F., 2019. Expanding the spectrum of genes responsible for hereditary motor neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90, 1171–9.
- Prieto, J., León, M., Ponsoda, X., García-García, F., Bort, R., Serna, E., Barneo-Muñoz, M., Palau, F., Dopazo, J., López-García, C., Torres, J., 2016. Dysfunctional mitochondrial fission impairs cell reprogramming. *Cell Cycle Georget. Tex* 15, 3240–3250. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1241930>
- Prukop, T., Stenzel, J., Wernick, S., Kungl, T., Mroczek, M., Adam, J., Ewers, D., Nabirotkin, S., Nave, K.-A., Hagg, R., Cohen, D., Sereda, M.W., 2019. Early short-term PXT3003 combinational therapy delays disease onset in a transgenic rat model of Charcot-Marie-

Tooth disease 1A (CMT1A). PLoS ONE 14, e0209752.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209752>

- Pyromali, I., Perani, A., Nizou, A., Benslimane, N., Derouault, P., Bourthoumieu, S., 2021. New structural variations responsible for Charcot-Marie-Tooth disease: The first two large KIF5A deletions detected by CovCopCan software. *Comput Struct Biotechnol J* 30 Juill 19, 4265–72.
- Ramachandran, R., 2018. Mitochondrial dynamics: the dynamin superfamily and execution by collusion. *Semin Cell Dev Biol* Avr 76, 201–12.
- Reinhardt, P., Glatza, M., Hemmer, K., Tsytsyura, Y., Thiel, C.S., Höing, S., Moritz, S., Parga, J.A., Wagner, L., Bruder, J.M., Wu, G., Schmid, B., Röpke, A., Klingauf, J., Schwamborn, J.C., Gasser, T., Schöler, H.R., Sternecker, J., 2013. Derivation and Expansion Using Only Small Molecules of Human Neural Progenitors for Neurodegenerative Disease Modeling. *PLOS ONE* 8, e59252.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059252>
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbiah, C.C., Siedow, J.N., 2006. Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Contrib. Oxidative Stress Interorganellar Signal. Plant Physiol* Juin 141, 357–66.
- Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A., Kamikawa, R., 2017. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol* 27.
- Rossor, A.M., Polke, J.M., Houlden, H., Reilly, M.M., 2013. Clinical implications of genetic advances in Charcot–Marie–Tooth disease. *Nat Rev Neurol* Oct 9, 562–71.
- Rotthier, A., Baets, J., Timmerman, V., Janssens, K., 2012. Mechanisms of disease in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Nat. Rev. Neurol.* 8.  
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.227>
- Roy, B., Friesen, W.J., Tomizawa, Y., Leszyk, J.D., Zhuo, J., Johnson, B., Dakka, J., Trotta, C.R., Xue, X., Mutyam, V., Keeling, K.M., Mobley, J.A., Rowe, S.M., Bedwell, D.M., Welch, E.M., Jacobson, A., 2016. Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12508–12513. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605336113>
- Rudnik-Schöneborn, S., Auer-Grumbach, M., Senderek, J., 2020. Charcot-Marie-Tooth disease and hereditary motor neuropathies – Update 2020. *Med Genet* 32, 207–19.
- Rzepnikowska, W., Kaminska, J., Kabzińska, D., Binięda, K., Kochański, A., 2020. A Yeast-Based Model for Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: A Simple System for Complex, Heterogeneous Diseases. *Int J Mol Sci* Janv 21.
- Rzepnikowska, W., Kochański, A., 2018. A role for the GDAP1 gene in the molecular pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 78, 1–13.
- Sainio, M.T., Rasila, T., Molchanova, S.M., Järvillehto, J., Torregrosa-Muñumer, R., Harjuhahto, S., Pennonen, J., Huber, N., Herukka, S.-K., Haapasalo, A., Zetterberg, H., Taira, T., Palmio, J., Ylikallio, E., Tynismaa, H., 2022. Neurofilament Light Regulates Axon Caliber, Synaptic Activity, and Organelle Trafficking in Cultured Human Motor Neurons. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 820105.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.820105>
- Salzer, J.L., 2015. Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a020529.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020529>
- Sanderlin, E.J., Keenan, M.M., Mense, M., Revenko, A.S., Monia, B.P., Guo, S., Huang, L., 2022. CFTR mRNAs with nonsense codons are degraded by the SMG6-mediated

- endonucleolytic decay pathway. *Nat. Commun.* 13, 2344. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29935-9>
- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, A., Aspenstrom, P., Rizzuto, R., Hajnóczky, G., 2008. Bidirectional Ca<sup>2+</sup>-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 20728–20733. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808953105>
- Saporta, M.A., Dang, V., Volfson, D., Zou, B., Xie, X.S., Adebola, A., Liem, R.K., Shy, M., Dimos, J.T., 2015. Axonal Charcot-Marie-Tooth disease patient-derived motor neurons demonstrate disease-specific phenotypes including abnormal electrophysiological properties. *Exp. Neurol.* 263, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.10.005>
- Sargiannidou, I., Kagiava, A., Bashiardes, S., Richter, J., Christodoulou, C., Scherer, S.S., Kleopa, K.A., 2015. Intraneural GJB1 gene delivery improves nerve pathology in a model of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann. Neurol.* 78, 303–316. <https://doi.org/10.1002/ana.24441>
- Schneider, A.-F.E., Aartsma-Rus, A., 2021. Developments in reading frame restoring therapy approaches for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 21, 343–359. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1832462>
- Schulz, A., Kyselyova, A., Baader, S.L., Jung, M.J., Zoch, A., Mautner, V.-F., Hagel, C., Morrison, H., 2014. Neuronal merlin influences ERBB2 receptor expression on Schwann cells through neuregulin 1 type III signalling. *Brain* 137, 420–432. <https://doi.org/10.1093/brain/awt327>
- Sebastián, D., Sorianello, E., Segalés, J., Irazoki, A., Ruiz-Bonilla, V., Sala, D., 2016. Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *EMBO J* 1 Août 35, 1677–93.
- Sereda, M.W., Meyer zu Hörste, G., Suter, U., Uzma, N., Nave, K.-A., 2003. Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A). *Nat. Med.* 9, 1533–1537. <https://doi.org/10.1038/nm957>
- Shield, A.J., Murray, T.P., Board, P.G., 2006. Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 859–66.
- Siao, P., Kaku, M., 2019. A Clinician's Approach to Peripheral Neuropathy. *Semin. Neurol.* 39, 519–530. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1694747>
- Sibley, D.R., Hanin, I., Kuhar, M., Skolnick, P., 2007. *Handbook of Contemporary Neuropharmacology*. 3e édition. Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J.
- Sivera, R., Espinós, C., Vílchez, J.J., Mas, F., Martínez-Rubio, D., Chumillas, M.J., 2010. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 15, 334–44.
- Sivera, R., Frasquet, M., Lupo, V., García-Sobrino, T., Blanco-Arias, P., Pardo, J., Fernández-Torrón, R., de Munain, A.L., Márquez-Infante, C., Villarreal, L., Carbonell, P., Rojas-García, R., Segovia, S., Illa, I., Frongia, A.L., Nascimento, A., Ortez, C., García-Romero, M. del M., Pascual, S.I., Pelayo-Negro, A.L., Berciano, J., Guerrero, A., Casanovas, C., Camacho, A., Esteban, J., Chumillas, M.J., Barreiro, M., Díaz, C., Palau, F., Vílchez, J.J., Espinós, C., Sevilla, T., 2017. Distribution and genotype-phenotype correlation of GDAP1 mutations in Spain. *Sci. Rep.* 7, 6677. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06894-6>
- Sreekumar, P.G., Ferrington, D.A., Kannan, R., 2021. Glutathione Metabolism and the Novel Role of Mitochondrial GSH in Retinal Degeneration. *Antioxid. Mai* 10.



- Srinivas, U.S., Tan, B.W.Q., Vellayappan, B.A., Jeyasekharan, A.D., 2019. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol* 25.
- Stavrou, M., Sargiannidou, I., Georgiou, E., Kagiava, A., Kleopa, K.A., 2021. Emerging Therapies for Charcot-Marie-Tooth Inherited Neuropathies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6048. <https://doi.org/10.3390/ijms22116048>
- Stifani, N., 2014. Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 293. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293>
- Taanman, J.W., 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1410, 103–23.
- Tai, H.C., Schuman, E.M., 2008. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* Nov 9, 826–38.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Temple, G.F., Dozy, A.M., Roy, K.L., Kan, Y.W., 1982. Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for beta-thalassaemia. *Nature* 296, 537–540. <https://doi.org/10.1038/296537a0>
- Thenmozhi, R., Lee, J.-S., Park, N.Y., Choi, B.-O., Hong, Y.B., 2020. Gene Therapy Options as New Treatment for Inherited Peripheral Neuropathy. *Exp. Neurobiol.* 29, 177–188. <https://doi.org/10.5607/en20004>
- Trzaska, C., Amand, S., Bailly, C., Leroy, C., Marchand, V., Duvernois-Berthet, E., Saliou, J.-M., Benhabiles, H., Werkmeister, E., Chassat, T., Guilbert, R., Hannebique, D., Mouray, A., Copin, M.-C., Moreau, P.-A., Adriaenssens, E., Kulozik, A., Westhof, E., Tulasne, D., Motorin, Y., Rebuffat, S., Lejeune, F., 2020. 2,6-Diaminopurine as a highly potent corrector of UGA nonsense mutations. *Nat. Commun.* 11, 1509. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15140-z>
- Vallat, J.M., Tazir, M., Magdelaine, C., Sturtz, F., Grid, D., 2005. Autosomal-Recessive Charcot-Marie-Tooth Diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 363–70.
- Velilla, J., Marchetti, M.M., Toth-Petroczy, A., Grosogeat, C., Bennett, A.H., Carmichael, N., 2019. Homozygous TRPV4 mutation causes congenital distal spinal muscular atrophy and arthrogyrosis. *Neurol Genet* 5.
- Wagner, K.M., Rüegg, M., Niemann, A., Suter, U., 2009. Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PloS One* 4, e5160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005160>
- Wang, J., Zhang, Y., Mendonca, C.A., Yukselen, O., Muneeruddin, K., Ren, L., Liang, J., Zhou, C., Xie, J., Li, J., Jiang, Z., Kucukural, A., Shaffer, S.A., Gao, G., Wang, D., 2022. AAV-delivered suppressor tRNA overcomes a nonsense mutation in mice. *Nature* 604, 343–348. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04533-3>
- Wanschers, B., van de Vorstenbosch, R., Wijers, M., Wieringa, B., King, S.M., Fransen, J., 2008. Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil. Cytoskeleton* 65, 183–196. <https://doi.org/10.1002/cm.20254>
- Warner, L.E., Hiltz, M.J., Appel, S.H., Killian, J.M., Kolodny, E.H., Karpati, G., Carpenter, S., Watters, G.V., Wheeler, C., Witt, D., Bodell, A., Nelis, E., Van Broeckhoven, C., Lupski, J.R., 1996. Clinical Phenotypes of Different MPZ (P0) Mutations May Include Charcot-Marie-Tooth Type 1B, Dejerine-Sottas, and Congenital Hypomyelination. *Neuron* 17, 451–460. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80177-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80177-4)

- Weedon, M.N., Hastings, R., Caswell, R., Xie, W., Paszkiewicz, K., Antoniadis, T., 2011. Exome Sequencing Identifies a DYNC1H1 Mutation in a Large Pedigree with Dominant Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease. *Am J Hum Genet* 89, 308–12.
- Wolf, C., Pouya, A., Bitar, S., Pfeiffer, A., Bueno, D., Rojas-Charry, L., Arndt, S., Gomez-Zepeda, D., Tenzer, S., Bello, F.D., Vianello, C., Ritz, S., Schwirz, J., Dobrindt, K., Peitz, M., Hanschmann, E.-M., Mencke, P., Boussaad, I., Silies, M., Brüstle, O., Giacomello, M., Krüger, R., Methner, A., 2022. GDAP1 loss of function inhibits the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex by altering the actin cytoskeleton. *Commun. Biol.* 5, 541. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03487-6>
- Woolf, T.M., Chase, J.M., Stinchcomb, D.T., 1995. Toward the therapeutic editing of mutated RNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8298–8302.
- Woolley, A.G., Tait, K.J., Hurren, B.J., Fisher, L., Sheard, P.W., Duxson, M.J., 2008. Developmental loss of NT-3 in vivo results in reduced levels of myelin-specific proteins, a reduced extent of myelination and increased apoptosis of Schwann cells. *Glia* 56, 306–317. <https://doi.org/10.1002/glia.20614>
- Xu, W., Shy, M., Kamholz, J., Elferink, L., Xu, G., Lilien, J., 2001. Mutations in the cytoplasmic domain of P0 reveal a role for PKC-mediated phosphorylation in adhesion and myelination. *J Cell Biol* 155, 439–46.
- Yu, J., Tang, B., He, X., Zou, P., Zeng, Z., Xiao, R., 2022. Nonsense Suppression Therapy: An Emerging Treatment for Hereditary Skin Diseases. *Acta Derm. Venereol.* 102, adv00658–adv00658. <https://doi.org/10.2340/actadv.v102.353>
- Zhao, H.T., Damle, S., Ikeda-Lee, K., Kuntz, S., Li, J., Mohan, A., Kim, A., Hung, G., Scheideler, M.A., Scherer, S.S., Svaren, J., Swayze, E.E., Kordasiewicz, H.B., n.d. PMP22 antisense oligonucleotides reverse Charcot-Marie-Tooth disease type 1A features in rodent models. *J. Clin. Invest.* 128, 359–368. <https://doi.org/10.1172/JCI96499>
- Zhou, Y., Carmona, S., Muhammad, A.K.M.G., Bell, S., Landeros, J., Vazquez, M., 2019. Restoring mitofusin balance prevents axonal degeneration in a Charcot-Marie-Tooth type 2A model. *J Clin Invest* 129, 1756–71.
- Züchner, S., Mersiyanova, M., IV, M, B.-T., N, R., J, D., E.L., 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36, 449–51.

## ***Caractérisation d'un modèle in vitro de cellules neuronales issues d'iPSc porteuses d'une mutation non-sens sur le gène GDAP1 responsable de la maladie de Charcot-Marie-Tooth et test d'approches thérapeutiques innovantes***

---

Les mutations non-sens générant un codon de terminaison prématuré (PTC) peuvent induire la production d'une protéine tronquée ou bien une dégradation prématurée de l'ARNm muté par le système NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay). Ces mutations non-sens sont la cause d'environ un tiers des maladies d'origine génétique et notamment de certaines neuropathies périphériques, dont la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Des mutations non-sens sur le gène *GDAP1* ont été associées à des formes sévères de CMT. Le rôle cellulaire de *GDAP1* reste encore mal défini. Au sein du laboratoire NeurIT, UR20218, de l'Université de Limoges, nous avons mis en place un modèle cellulaire de cellules neuronales (Progéniteurs neuronaux (PN) et Motoneurons (MN)) issues des cellules souches pluripotentes induites (iPSc) de contrôles et d'un patient CMT porteur de la mutation homozygote c.581C>G (p.Ser194\*) sur le gène *GDAP1*. Dans un premier temps, nous avons caractérisé ce modèle neuronal et mis en évidence un stress oxydant associé à un dysfonctionnement mitochondrial dans les MN issus d'iPSc du patient. Dans un deuxième temps, après avoir réalisé une revue de la littérature sur les molécules de translecture et les inhibiteurs du NMD, nous avons testé certaines de ces molécules sur nos modèles neuronaux, en collaboration avec l'Institut Pasteur de Lille. Nous avons pu démontrer que la molécule « Amlexanox » stabilisait l'ARNm *GDAP1* muté et activait l'expression protéique de *GDAP1* dans les PN et les MN. D'un point de vue fonctionnelle, nous avons observé que ce traitement permet de restaurer la morphologie des mitochondries des PN. Dans une dernière partie de cette thèse, nous présentons l'identification d'un codon non-sens et d'une délétion partielle du gène *SH3TC2*, l'un des principaux gènes mutés dans les formes autosomiques récessives démyélinisantes de CMT. L'établissement de modèles neuronaux sur ce gène sont une perspective de ce travail de thèse. Les molécules thérapeutiques identifiées lors de cette thèse pourront être testées sur ces prochains modèles. Ce travail de thèse montre l'importance des modèles cellulaires adaptés pour comprendre les voies physiopathologiques impliquées dans la CMT et montre des résultats prometteurs en termes d'approche thérapeutique.

---

Mots-clés : Charcot-Marie-Tooth (CMT), Mutation Non-Sens, Molécules de translecture, Inhibiteurs du Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD), cellules neuronales issues de cellules souches induites à la pluripotente (iPSc)

## ***Characterization of an in vitro neuronal model derived from iPSC carrying a non-sense mutation in GDAP1 responsible for Charcot-Marie-Tooth disease and testing of innovative therapeutic approaches***

---

Non-sense mutations generating a premature termination codon (PTC) can induce the production of a truncated protein or a premature degradation of the mutated mRNA by the NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay) system. These non-sense mutations are the cause of about one third of all genetic diseases, including some peripheral neuropathies, such as Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). Non-sense mutations in *GDAP1* have been associated with severe forms of CMT. The cellular role of *GDAP1* remains poorly defined. In the NeurIT laboratory, UR20218, of the University of Limoges, we have set up a cellular model of neuronal cells (Neural progenitors (NP) and Motoneurons (MN)) derived from induced pluripotent stem cells (iPSc) of controls and of a CMT patient carrying the homozygous mutation c.581C>G (p.Ser194\*) on *GDAP1*. First, we characterized this neuronal model and identified oxidative stress associated with mitochondrial dysfunction in the patient's iPSc-derived MNs. Then, after having reviewed the literature on readthrough molecules and NMD inhibitors, we tested some of these molecules on our neuronal models, in collaboration with the Pasteur Institute of Lille. We were able to demonstrate that the molecule "Amlexanox" stabilized the mutated *GDAP1* mRNA and activated the protein expression of *GDAP1* in NPs and MNs. From a functional point of view, we observed that this treatment restored the morphology of NP mitochondria. In the last part of this thesis, we present the identification of a non-sense codon and a partial deletion of *SH3TC2*, one of the main mutated genes in demyelinated autosomal recessive forms of CMT. The establishment of neuronal models on this gene are a perspective of this thesis. The therapeutic molecules identified during this thesis could be tested on these future models. This thesis showed the importance of adapted cellular models to understand the pathophysiological pathways involved in CMT and shows promising results in terms of therapeutic approach.

---

Key words : Charcot-Marie-Tooth (CMT), Nonsense Mutation, Readthrough molecules, Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD), Neuronal cells derived from induced pluripotent stem cells (iPS)

