Avis de Soutenance

Madame Zeinab HAMZE

Biologie-Santé - Spécialité Génétique

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Mécanismes physiopathologiques et thérapies dans deux formes de neuropathies périphériques héréditaires dues à des mutations dans VRK1 et PDXK.

dirigés par Madame Valérie DELAGUE

Soutenance prévue le ***mercredi 03 avril 2024*** à 14h00
Lieu : Faculté de Medecine-Timone- 27 Bd Jean Moulin, 13385 CEDEX 5 Marseille
Salle : de visioconference

Composition du jury proposé

Mme Valérie DELAGUE	Aix Marseille university	Directrice de thèse
Mme Sophie BELIN	Dept. of Neuroscience & Experimental Therapeutics-Albany Medical College	Rapporteure
M. Cédric RAOUL	Paul Valery University (Montpellier III)	Rapporteur
Mme Tanya STOJKOVIC	G-H Pitié-Salpêtrière Institut de Myologie	Examinatrice
M. Andre MÉGARBANÉ	Lebanese American University	Examinateur
M. Patrice ROLL	Aix Marseille university	Président

Mots-clés : Charcot-Marie-Tooth,neuropathie périphérique héréditaire,MEA (MultiElectrode Array),cellules souches pluripotentes induites,VRK1,PDXK

Résumé :

Les neuropathies périphériques héréditaires constituent l'une des causes les plus fréquentes de maladies neurologiques héréditaires. Parmi elles, la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT), constitue le groupe le plus large. Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de deux formes de CMT : i) Une forme motrice à transmission autosomique récessive, associée à une atteinte des motoneurones supérieurs (dHMN-VRK1), due à des mutations dans VRK1, une kinase nucléaire à expression ubiquitaire, et ii) une forme mixte, causée par une mutation dans le gène PDXK, codant une kinase impliquée dans la conversion des précurseurs de la Vitamine B6 en sa forme active. Pour la forme dHMN-VRK1, mes travaux se sont orientés selon deux axes : i) étude des mécanismes physio-pathologiques, et ii) développement préclinique d'une stratégie de thérapie génique dans un modèle in vitro à base de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC). Dans le premier axe, j'ai réalisé un séquençage à haut-débit de l'ARN dans les motoneurones dérivés d'hiPSC (hiPSC-MN) d'un patient déjà décrit par l'équipe (El.Bazzal et al. 2019) qui m'a permis de mettre en évidence des nouvelles voies dérégulées. J'ai également caractérisé une deuxième lignée hiPSC d'un patient

porteur de deux nouvelles mutations dans VRK1. Dans le deuxième axe, j'ai testé, in vitro, une stratégie de thérapie génique par remplacement de gène consistant à surexprimer la forme sauvage de VRK1 dans les hiPSC-MNs du patient décrit dans El-Bazzal et al 2019. J'ai pu montrer que la réexpression de la forme sauvage de VRK1, dans les hiPSC-MNs du patient, permet de rétablir des valeurs normales pour la taille des Corps de Cajal et la longueur du segment initial de l'Axone, tous deux diminués chez le patient. D'autre part, j'ai pu démontrer : i) que la mesure de l'activité électrique globale par la technique de MultiElectrode Array (MEA), permet bien de détecter les anomalies des hiPSC-MNs précédemment décrites par une technique de patch-clamp et ii) évaluer, grâce au MEA, les effets du traitement sur les amplitudes des potentiel d'action et l'activité générale des hiPSC-MNs. Pour la forme mixte de CMT due à des mutations dans PDXK, j'ai étudié quatre patients, issus de deux familles consanguines, non apparentées, originaires du Moyen-Orient, porteurs d'une mutation homozygote dans PDXK. D'une manière intéressante, nos patients sont porteurs de la même mutation décrite précédemment par Chelban et al en 2019. Ces patients présentent une forme axonale de CMT associée à une atrophie optique, tandis que nos patients sont atteints d'une forme mixte sévère de CMT. Mes travaux de recherche visaient à étudier les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent cette mutation. Pour cela, j'ai réalisé des analyses fonctionnelles dans deux types de cellules de patients : des lignées lymphoblastoides immortalisées (EBV) et des hiPSC. Dans les EBVs, et les stades précoces de différentiation des hiPSCs en motoneurones, j'ai démontré une diminution des taux protéiques de PDXK due à des modifications post-traductionnelles. De manière intéressante, dans les hiPSC-MNS plus matures, qui ne se divisent plus, les taux de PDXK sont comparables au contrôle. Enfin, la mesure de l'activité électrique par MEA a permis de démontrer un état d'hyperexcitabilité dans les hiPSC-MNs d'une des deux patientes.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

Les neuropathies périphériques héréditaires constituent l'une des causes les plus fréquentes de maladies neurologiques héréditaires. Parmi elles, la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT), constitue le groupe le plus large. Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de deux formes de CMT : **i)** Une forme motrice à transmission autosomique récessive, associée à une atteinte des motoneurones supérieurs (dHMN-VRK1), due à des mutations dans *VRK1*, une kinase nucléaire à expression ubiquitaire, et **ii)** une forme mixte, causée par une mutation dans le gène *PDXK*, codant une kinase impliquée dans la conversion des précurseurs de la Vitamine B6 en sa forme active.

Pour la forme dHMN-VRK1, mes travaux se sont orientés selon deux axes : **i)** étude des mécanismes physio-pathologiques, et **ii)** développement préclinique d'une stratégie de thérapie génique dans un modèle *in vitro* à base de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC). Dans le premier axe, j'ai réalisé un séquençage à haut-débit de l'ARN dans les motoneurones dérivés d'hiPSC (hiPSC-MN) d'un patient déjà décrit par l'équipe (El.Bazzal et al. 2019) qui m'a permis de mettre en évidence des nouvelles voies dérégulées. J'ai également caractérisé une deuxième lignée hiPSC d'un patient porteur de deux nouvelles mutations dans *VRK1*. Dans le deuxième axe, j'ai testé, *in vitro*, une stratégie de thérapie génique par remplacement de gène consistant à surexprimer la forme sauvage de VRK1 dans les hiPSC-MNs du patient décrit dans El-Bazzal et al., 2019. J'ai pu montrer que la réexpression de la forme sauvage de VRK1, dans les hiPSC-MNs du patient, permet de rétablir des valeurs normales pour la taille des Corps de Cajal et la longueur du segment initial de l'Axone, tous deux diminués chez le patient. D'autre part, j'ai pu démontrer : **i)** que la mesure de l'activité électrique globale par la technique de MultiElectrode Array (MEA), permet bien de détecter les anomalies des hiPSC-MNs précédemment décrites par une technique de patch-clamp et **ii)** évaluer, grâce au MEA, les effets du traitement sur les amplitudes des potentiel d'action et l'activité générale des hiPSC-MNs.

Pour la forme mixte de CMT due à des mutations dans *PDXK*, j'ai étudié quatre patients, issus de deux familles consanguines, non apparentées, originaires du Moyen-Orient, porteurs d'une mutation homozygote dans *PDXK*. D'une manière intéressante, nos patients sont porteurs de la même mutation décrite précédemment par Chelban et al., en 2019. Ces patients présentent une forme axonale de CMT associée à une atrophie optique, tandis que nos patients sont atteints d'une forme mixte sévère de CMT. Mes travaux de recherche visaient à étudier les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent cette mutation. Pour cela, j'ai réalisé des analyses fonctionnelles dans deux types de cellules de patients : des lignées lymphoblastoïdes immortalisées (EBV) et des hiPSC. Dans les EBVs, et les stades précoces de différentiation des hiPSCs en motoneurones, j'ai démontré une diminution des taux protéiques de PDXK due à des modifications post-traductionnelles. De manière intéressante, dans les hiPSC-MNS plus matures, qui ne se divisent plus, les taux de PDXK sont comparables au contrôle. Enfin, la mesure de l'activité électrique par MEA a permis de démontrer un état d'hyperexcitabilité dans les hiPSC-MNs d'une des deux patientes.

Mots clés : VRK1, PDXK, cellules pluripotentes, motoneurones, MEA, thérapie génique.

Abstract

Inherited peripheral neuropathies are one of the most common causes of hereditary neurological disease. Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is the largest among them. My thesis work focused on the study of two forms of CMT: **i)** an autosomal recessive pure motor form (dHMN), associated with upper motor neuron impairment and due to mutations in *VRK1* (dHMN-VRK1), a ubiquitously expressed nuclear kinase, and **ii)** a mixed (axonal/demyelinating) subtype, caused by a mutation in the *PDXK* gene, encoding a kinase involved in the conversion of Vitamin B6 precursors into its active form.

For dHMN-VRK1, my work was focused on two main axes: **i)** study of the physio-pathological mechanisms, and **ii)** preclinical development of a gene therapy strategy based on an induced pluripotent stem cells (hiPSC) *in vitro* model. In the first axis, I have performed a high-throughput RNA sequencing in hiPSC-derived motor neurons (hiPSC-MN) from a patient previously described by the team (El. Bazzal et al. 2019), which allowed me to reveal novel deregulated pathways. I have also characterized a second hiPSC line from a patient carrying two new mutations in *VRK1*. In the second axis, I have tested, *in vitro*, a gene replacement therapy consisting on overexpressing the wild type VRK1 protein in the patient's hiPSC-MNs described in El-Bazzal et al 2019. I was able to show that the re-expression of wild-type VRK1 in the patient's hiPSC-MNs restored normal values for Cajal bodies' size and initial Axon segment length, both parameters which were altered in the patient's hiPSC-MNs. In addition, I was able to demonstrate: **i)** that the measurement of global electrical activity using the MultiElectrode Array (MEA) technology does, indeed, detect the abnormalities in hiPSC-MNs previously described using a patch-clamp technique, and **ii)** to assess, using MEA, the effects of treatment on action potential amplitudes and the general activity of hiPSC-MNs.

For the mixed form of CMT due to mutations in *PDXK*, I have studied four patients, from two consanguineous, unrelated, families, originating from the Middle East, carrying a homozygous mutation in PDXK. Interestingly, our patients are homozygous for the same mutation than the one previously described by Chelban et al in 2019. However, their patients present an axonal form of CMT associated with optic atrophy, whereas our patients, show a severe, mixed form of CMT. The aim of my research was to investigate the pathophysiological mechanisms underlying this mutation. To this end, I have carried out functional analyses in two types of patients' cells: immortalized lymphoblastoid cell lines (EBVs) and hiPSC-MNs. In EBVs, and at early stages of hiPSC differentiation into motor neurons, I demonstrated a decrease in PDXK protein levels due to post-translational modifications. Interestingly, in more mature hiPSC-MNs, that no longer divide, PDXK levels are comparable to control. Finally, and very interestingly, the measurement of electrical activity by MEA demonstrated a state of hyperexcitability in the hiPSC-MNs of one of the two patients.

Keywords: VRK1, PDXK, human induced pluripotent Stem Cells, motor neurons, MEA, gene replacement therapy.