



HAL
open science

Étude de l'implication potentielle des marqueurs du striatum dans la maladie de Huntington

Laurie Galvan

► **To cite this version:**

Laurie Galvan. Étude de l'implication potentielle des marqueurs du striatum dans la maladie de Huntington. Neurosciences. Université Paris Sud 11, 2011. Français. NNT: 2011PA11T024 . tel-04092110

HAL Id: tel-04092110

<https://hal.science/tel-04092110>

Submitted on 9 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

UNIVERSITÉ PARIS SUD XI

ÉCOLE DOCTORALE SIGNALISATION ET RÉSEAUX INTÉGRATIFS

Thèse pour l'obtention du grade de **Docteur en Neurosciences**

GALVAN Laurie

"Étude de l'implication potentielle des marqueurs du striatum dans la maladie de Huntington "

Soutenance le 15 Juin 2011

Jury

Président	Pr Hervé DANIEL
Rapporteur	Dr David BLUM
Rapporteur	Dr Anselme PERRIER
Examineur	Dr Jocelyne CABOCHE
Examineur	Dr Ruth LUTHI-CARTER
Directeur de Thèse	Dr Emmanuel BROUILLET

" Il faut toujours viser la lune, car même en cas d'échec, on atterrit dans les étoiles."

Oscar Wilde

REMERCIEMENTS

Je remercie les Dr David Blum, Anselme Perrier, Jocelyne Caboche, Ruth Luthi-Carter et le Pr Hervé Daniel d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse et plus particulièrement les Dr David Blum, et Anselme Perrier pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie le Neuropôle Francilien (Nerf) et la Fondation pour la recherche médicale pour avoir cru dans ce projet et avoir permis mon financement.

Je tiens à remercier les Dr.Philippe Hantraye et Nicole Déglon d'avoir accepté que je puisse réaliser ma thèse au sein de MIRGen. Je vous remercie d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Je remercie Jean Marc Elalouf pour m'avoir permis de réaliser le début de ce projet dans son équipe et pour son accueil chaleureux. Merci à Michel de Chaldée d'avoir partagé son savoir et ses compétences. Vous avez été d'une aide inestimable tout au long de ce projet.

Merci à Sandrine Humbert, Frédéric Saudou, Géraldine Liot et leurs équipes à l'institut Curie d'Orsay pour avoir toujours accepté de partager leur savoir faire et leurs compétences scientifiques et humaines avec moi.

Je remercie chaleureusement le Dr Gilles Bonvento et le Dr Carole Escartin pour leur soutien, leurs précieux conseils et leur implication constante dans la formation des étudiants.

Un grand merci à l'ensemble des animaliers, techniciens et ingénieurs de MIRGen sans qui ce travail n'aurait pas été réalisable. Je tiens à saluer leur professionnalisme et leurs compétences dans leurs domaines respectifs qui a contribué à la bonne réalisation de ce travail de thèse. Je n'aurais pas pu faire cette thèse sans la bonne humeur et l'amitié de nombreux d'entre vous.

Merci aux filles de l'expérimentation animale qui m'ont aidé pour l'ensemble des expériences *in vivo*. Merci à Martine, Marion, Charlène et Diane pour leur bonne humeur et leur expérience sans qui les nombreuses heures passées dans le A2/A3 auraient pu avoir raison de ma santé mentale !

Merci à Marie Claude pour m'avoir formé, aidé et encouragé à pénétrer dans le monde mystérieux de la biologie moléculaire. Je remercie Gwen et Noëlle pour avoir produit « frauduleusement » tous mes virus...tous ! Merci à Karine, Raymonde, Caroline et Yohann pour leur bonne humeur et leurs conseils.

Merci à Carole, Fanny et Caroline pour avoir partagé leurs nombreuses qualités avec moi et m'avoir assisté dans mes expériences souvent même avant que je ne leur demande !

Merci à Lucile et Laetitia pour leur aide sur Dclk3 et Bonne chance pour la suite.

Je tiens à remercier les autres étudiants en thèse (Aurélié, Audrey, Lydie), post-doctorants (Elsa, Anne et Marta) ainsi que Carole et Fanny pour leur soutien dans les moments difficiles et leur capacité à faire relativiser les événements qui vous arrivent autour d'un verre....ou deux ! Le MPTP vaincra.

Merci à Romina pour tes conseils et pour nos entretiens de fins de semaines qui ont des vertus insoupçonnées ;-)

J'ai une pensée toute particulière pour tous les ex-Mircen-iennes (Mathilde, Valérie, Sabrina et Latifa) pour leur accueil quand je suis arrivée, leurs précieux conseils sur la vie au laboratoire et leur amitié.

A la minorité visible de MIRcen à savoir les hommes, Matthieu Santin, Emmanuel Bourrin, Leopold et Yann pour leur participation aux pauses « café » et leur aptitude à me faire éclater de rire en parlant de sujets divers et variés souvent inspirés par Audrey..... Merci

Je tiens à remercier mon directeur de Thèse, Emmanuel Brouillet pour m'avoir formé, soutenu et encouragé tout au long de ces 4 ans et demi. Malgré ton emploi du temps surchargé, tu as toujours pris le temps de m'écouter et de me pousser à aller toujours plus loin dans mes raisonnements et mes ambitions.

Je remercie mes amis (es) intimes (Fabrice, Laura, Virgine, Eric, Camille, Sébastien, Jennifer, Maxime, Johanne, Guillaume, Adeline, Guilhem) pour me soutenir depuis de nombreuses années voire depuis toujours pour certains dans cette folie qu'est la thèse : ça y est ! Je ne suis plus étudiante ! Fêtons ça ;-)

Je tiens à remercier mon futur mari pour m'avoir encouragé quand je ralentissais, soutenu quand je trébuchais, et aimé quand j'étais insupportable ! Je n'y serais pas arrivé sans toi et sans tes macarons !

Il n'y a pas de terme assez fort pour remercier mes parents, ma grand-mère, ma sœur et mon beau-frère pour leur soutien inconditionnel malgré mon fichu caractère, et leur patience quant au choix du métier que je voulais faire : avocat, historien, archéologue et paléontologue. Il fallait bien tout ça pour finir chercheur en neuroscience....

RESUMÉ

Étude de l'implication potentielle des marqueurs du striatum dans la maladie de Huntington.

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire, incurable. Elle est due à une mutation dans le gène *HD* codant l'huntingtine (*htt*). Cette mutation se traduit dans la protéine par une augmentation de l'expansion polyglutamine (polyGln) qui la rend toxique. Bien que la *htt* soit ubiquitaire dans le système nerveux central, la dégénérescence touche préférentiellement le striatum. Un patron d'expression de gènes spécifiques du striatum pourrait expliquer cette vulnérabilité préférentielle. Nous avons étudié les effets "modificateurs" de 5 gènes préférentiellement exprimés dans le striatum vis-à-vis de la toxicité de la *htt* mutée par une approche lentivirale chez la souris. Nous avons caractérisé les effets de ces marqueurs striataux sur la toxicité induite par la *htt* mutée par différentes approches histologiques. Les "modificateurs" de la MH ont été étudiés plus en détail. Nous avons examiné leur localisation et les mécanismes sous-jacents à leurs effets neuroprotecteurs. Outre une meilleure compréhension du striatum, cette étude a permis la découverte de candidat neuroprotecteur qui pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies.

Mots clés : Maladie de Huntington, striatum, neuroprotection, vecteur lentiviral

Study of Potential involvement of striatal markers in Huntington's disease

Huntington's disease (HD) is an incurable inherited neurodegenerative disease. HD is caused by a mutation in the HD gene coding huntingtin (*htt*). This mutation leads to an expanded polyglutamine tract (polyQ) in the protein which is toxic to neurons. Although the *htt* is ubiquitously expressed in the central nervous system, the first area which degenerates is the striatum. A pattern of genes selectively expressed into the striatum may confer its vulnerability to mutated *htt*. We have studied the modifying effects of five newly identified striatal markers against the toxicity induced by mutated *htt* using lentiviral strategy in mice and histological approaches. For one of these markers, Double Cortin Kinase Like 3 (DCLK3), we have further determined their cellular localization and the potential mechanisms underlying their neuroprotector effects. The present work led to a better understanding of the function of the newly identified markers in the striatum and their potential roles in the preferential vulnerability of the striatum in HD.

Keywords: Huntington's disease, striatum, neuroprotection, lentiviral vector



URA CEA-CNRS 2210

“Laboratoire des Maladies Neurodégénératives”



**Molecular Imaging Research Center
Institut d’Imagerie BioMédicale (I²BM)
Direction des Sciences du Vivant
CEA, Fontenay aux Roses**

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
RESUMÉ	9
TABLES DES MATIERES	13
LISTE DES FIGURES	16
LISTE DES TABLES.....	17
ABRÉVIATIONS	18
INTRODUCTION	23
I. Le striatum	25
I.1 ANATOMIE	25
<i>I.1.1 Réseaux fonctionnels des ganglions de la base</i>	<i>26</i>
<i>I.1.2 Populations cellulaires du striatum</i>	<i>27</i>
II. La maladie de Huntington	29
II.1 HISTORIQUE	29
II.2 DESCRIPTION CLINIQUE	29
<i>II.2.1 Symptômes /Étiologie</i>	<i>29</i>
<i>II.2.2 Observations neuro-pathologiques.....</i>	<i>30</i>
<i>II.3 Thérapie.....</i>	<i>31</i>
II.4 GENETIQUE DE LA MH.....	32
III. La huntingtine sauvage	35
III.1 STRUCTURE DE LA PROTEINE	35
III.2 ROLE	36
<i>III.2.1 Embryogenèse et développement.....</i>	<i>36</i>
<i>III.2.2 Transcription.....</i>	<i>37</i>
<i>III.2.3 Rôle pro survie</i>	<i>38</i>
<i>III.2.4 Transport</i>	<i>40</i>
<i>III.2.5 Endocytose.....</i>	<i>41</i>
IV. La huntingtine mutée.....	43
IV.1 CONCEPT GAIN /PERTE DE FONCTION.....	43
IV.2 NEUROGENESE.....	43
IV.3 TRANSCRIPTION.....	43

IV.4	CLIVAGE DE LA HTT-M.....	45
IV.5	LES AGREGATS	46
IV.6	TRANSPORT	49
IV.7	DEREGULATION DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE : L'HYPOTHESE DE « L'EXCITOTOXICITE »	51
IV.7.1	<i>Excitotoxicité directe</i>	51
IV.7.2	<i>Excitotoxicité indirecte</i>	54
	<i>La mitochondrie</i>	54
IV.8	DEGRADATION ET MORT CELLULAIRE	57
IV.8.1	<i>Le système ubiquitine protéasome (UPS)</i>	57
IV.8.2	<i>Autophagie</i>	58
IV.8.3	<i>Apoptose</i>	59
V.	Modélisation de la MH.....	61
V.1	LA SOURIS BACHD	61
V.2	TRANSFERT DE GENES	62
VI.	Vulnérabilité du striatum.....	67
VI.1	DOPAMINE.....	67
VI.2	LE RECEPTEUR A L'ADENOSINE DE SOUS TYPE A2A	68
VI.3	LE RECEPTEUR AUX CANNABINOÏDES DE TYPE 1 (CB1)	69
VI.4	RAS HOMOLOG ENRICHED IN STRIATUM (RHES)	69
V.	Objectifs des études.....	73
VII.1	ST102 (2010001M06RIK OU WBSR26)	73
VII.2	CRYSTALLINE μ (CRYM).....	73
VII.3	G COUPLED RECEPTOR 88 PROTEIN (GPR88)	74
VII.4	CAPUCINE (TMEM90A)	75
VII.5	DOUBLE CORTIN LIKE KINASE 3 (DCLK3).....	75
VII.6	PARADIGME EXPERIMENTAL	75
	ARTICLES	79
	In vivo assessment of Capucin as a potential modifier of mutant Huntingtin toxicity	81
	Potential role of Double cortin like kinase 3 (Dclk3) in selective striatal vulnerability in Huntington's disease	109

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES	139
Gpr88 module l'expression de DARPP-32 en présence de la huntingtine mutée	141
LA CRYSTALLINE MU (CRYM) EST UN FACTEUR PRO-TOXIQUE DANS LA MALADIE DE HUNTINGTON.....	151
2010001M06RIK (ST102) DIMINUE LA SENSIBILITE DU STRIATUM VIS-A-VIS DE LA HUNTINGTINE MUTEE	161
DISCUSSION	169
PERSPECTIVES	185
ANNEXES	187
ANNEXE I :REVUE "MITOCHONDRIA IN HD"	188
ANNEXE II : TABLEAU RECAPITULATIF DES MODELES MURINS DE LA MH	199
ANNEXE III : REVUE SUR RHES	200
ANNEXE IV : METHODE SAGE	206
ANNEXE V : Vecteurs lentiviraux	207
ANNEXE VI : Matériels et Méthodes	209
ANNEXE VII : Clivage de Dclk3.....	216
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	217

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHEMA DES GANGLIONS DE LA BASE.....	25
FIGURE 2: SCHEMA REPRESENTANT LES VOIES DIRECTES ET INDIRECTES DES GANGLIONS DE LA BASE.....	27
FIGURE 3: REPRESENTATION DE LA PROTEINE HTT	35
FIGURE 4: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L' APOPTOSE.	39
FIGURE 5: TRANSPORT AXONAL NEURONAL	40
FIGURE 6: ENDOCYTOSE CLATHRINE DEPENDANTE.....	42
FIGURE 7 : PHOTOGRAPHIE D'AGREGATS DANS LE CERVEAU DE PATIENTS DE LA MH	47
FIGURE 8: VOIE HYPOTHETIQUE DE LA FORMATION DES AGREGATS MEDIEE PAR LES POLYGLN. L	48
FIGURE 9: FONCTION DE LA HUNTINGTINE DANS LE TRANSPORT DU BDNF	50
FIGURE 10 : RECEPTEURS GLUTAMATERGIQUES.....	52
FIGURE 11: STRUCTURES CHIMIQUES DU GLUTAMATE ET DE SES ANALOGUES	53
FIGURE 12: SOURIS TRANSGENIQUE BACHD.....	62
FIGURE 13 : RECAPITULATIF DE L'EVOLUTION DE LA NEUROPATHOLOGIE EN FONCTION DES DIFFERENTES CONSTRUCTIONS DE HTT-M UTILISES.....	65
FIGURE 14: SEQUENCE D'UN VECTEUR LENTIVIRAL INACTIVE UTILISE DANS NOTRE ETUDE..	66
FIGURE 15: DIMINUTION DES TRANSCRITS DES MARQUEURS SELECTIONNES DANS LE STRIATUM DE SOURIS BACHD AGEES DE 6 MOIS.....	76
FIGURE 16 : DECOURS D'EXPRESSION TEMPOREL DES ARNm DES MARQUEURS DU STRIATUM <i>IN VIVO</i> CHEZ LE RAT.	77
FIGURE 17 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL DU MODELE LENTIVIRAL DE LA MH.	78
FIGURE 18 : EFFICACITE DES VECTEURS LV-GPR88 ET LV-SHGPR88 <i>IN VIVO</i>	142
FIGURE 19 : EXPRESSION DE GPR88 SUR LA TOXICITE DE LA HTT-M.	144
FIGURE 20 : LA CO-IMMUNOPRECIPITATION DE GPR88-HA ET HA-GPR88	146
FIGURE 21 : FRACTIONNEMENT LIPIDIQUE DES MEMBRANES.....	147
FIGURE 22 : EFFICACITE DES LV CRYM ET SHCRYM <i>IN VIVO</i>	152
FIGURE 23 : EFFET DE LA CRYM SUR LA HTT-M <i>IN VIVO</i>	155
FIGURE 24: PRESENCE DE LA CRYSTALLINE μ DANS LE CYTOSOL REVELEE PAR FRACTIONNEMENT CELLULAIRE PAR ULTRACENTRIFUGATION.	
FIGURE 25 : EFFICACITE DES VECTEURS	162

FIGURE 26: EFFET DE LA SUREXPRESSION DE ST102 SUR LA TOXICITE DU FRAGMENT HTT171-82Q.....	164
FIGURE 27: EFFET DE L'INVALIDATION DE ST102 SUR LA TOXICITE DU FRAGMENT HTT171- 82Q.....	165
FIGURE 28: MODE D'ACTION POTENTIEL DE ST102 DANS LA MH.	168
FIGURE 29: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES EFFETS MODULATEURS DES MARQUEURS STRIATAUX ETUDIES SUR LA TOXICITE INDUITE PAR LA HTT-M.	172
FIGURE 30 : HYPOTHESE D'ACTIVATION DE DCLK3.....	184

LISTE DES TABLES

Table 1: Maladie à polyglutamines.....	31
Table 2 : Principaux virus utilisés dans le transfert de gènes dans la MH.....	61
Table 3 : Récapitulatif des clivages protéiques observés de Dclk3.....	72

ABRÉVIATIONS

3NP	acide 3 nitropropionique
A2a	Récepteur à l'adénosine de sous-type 2a
AAV	Adeno associated virus
AchE	Achetylcholine Esterase
Akt	serine/threonine kinase
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5methyl-4-isox-asole propionique
AMPC	Adenosine monophosphate cyclic
AP2	Adaptor Protein 2
APP	Amyloid precursor protein
ARN	Acide ribonucléique
ARNnc	Acide ribonucléique non codant
ATP	Adenosine-triphosphate
BAC	Bacterial artificial chromosome
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
CA150	Coactivateur de 150Kda
CAA	triplet cytosine adenine adenine
CAG	triplet cytosine adenine guanosine
CALB 28K	Calbindine de 28KDa
CB1	Cannabinoïd Receptor 1
CBP	CREB binding protein
CDK5	Cyclin-dependent kinase 5
ChAT	Choline acetyltransferase
CMV	Cytomegalovirus
COX	Cytochrome c oxydase
Co-REST	REST corepressor
CRE	cyclic AMP response element
CREB	Cyclic-AMP response element binding protein
Crym	Crystaline μ
CtBP	C-terminal Binding Protein
D1	Dopamine receptor subtype 1
D2	Dopamine receptor subtype 2
DARPP-32	Dopamine-and cAMPRegulated PhosphoProtein 32
DAT	Dopamine transporter
DCLK3	Double Cortin Like kinase 3

DRP1	Dynamin-related protein 1
DRPLA	Atrophie dentarubral pallidolusienne
ENK	Enképhaline
FAT	Fast axonal transport
FDG	Fluorodeoxyglucose
FIS1	Mitochondrial Fission 1
Fp	FAD
GABA	Acide α -amino-butyrique
GFP	Green fluorescent protein
GLAST	Glial high affinity glutamate transporter
GLT-1	Glutamate transporter 1
Gpe / Gpi	Globus pallidus externe / interne
GPR88	G coupled receptor 88 protein
GRP78	Glucose-regulated protein 78kD
HAP1	Htt associated protein 0
HAT	Histones AcetylTransférases
HC-ad	High Capacity Adenoviral vector
HDAC	Histones Déacétylases
HIP1	Htt interacting protein 1
HIPPI	Protein interactor of HIP1
htt	Huntingtine
IHC	ImmunoHistoChimie
IGF-1	Insulin growth factor
InsP3R1	Récepteur au (1,4,5) triphosphate inositol de type 1
Ip	Iron sulfur protein
JNK	c jun N terminal kinase
KO	Knock out
KI	Knock in
LV	Vecteur lentiviral
MFN	MitoFusin
MH	Maladie de Huntington
MMP	Métalloprotéase
MSN	Medium spiny neuron
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NAPDH	Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate

N-CoR	Nuclear receptor corepressor
NES	Nuclear Export Signal
NeuN	Neuronal Nuclei
NII	Neuronal intranuclear inclusion
NLS	Nuclear Localization Signal
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
PACSIN1	Protein kinase C and casein substrate in neurons protein 1
NO	Oxyde nitrique
NOS	nitric Oxide synthase
OPA-1	Optic atrophy protein 1
PGC-1 ALPHA	Peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α
PET	Tomographie par emission de positons
PGK	Phosphoglycerate kinase
PI3K	Phosphotidylinositol 3 kinase
PSD-95	Post synaptic density protein 95KDa
QA	Quinolate
RE	Réticulum endoplasmique
RE1	Repressor element 1
REST	RE1-silencing transcription factor
Rhes	Ras homolog enriched in striatum
RILP	Rab interacting lysosomal protein
SAGE	Serial analysis of gene expression
SBMA	Atrophie musculaire spinobulbaire
SCA	Ataxies spinocerebelleuses
SDH	Succinate déshydrogénase
SIN3a	SIN3 homologue A
SGK	Serum and glucocorticoid-induced kinase
SNc	Substance noire compacte
SNr	Substance noire réticulée
SP	Substance P
SP1	Specificity protein 1
STAT-1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
STN	Noyau sous thalamique
St102	2010001M06rik
TAF4	TBP associated factor 130

TG	Transglutaminase
TMEM90a	Transmembrane 90 a protein / Capucine
TRP	Transient Receptor Pore
UPS	Ubiquitin proteasome system
VSV-G	Protéine G du virus de la somatite vésiculeuse
WT	Wild type
YAC	Yeast artificial chromosome

INTRODUCTION

I. Le striatum

I.1 Anatomie

Le striatum est une structure cérébrale sous corticale faisant partie du télencéphale. Le striatum est connecté à un ensemble de noyaux formant « les ganglions de la base » (Figure1). Les ganglions de la base sont composés du striatum, du pallidum et du noyau sous thalamique. La substance noire n'en fait pas proprement partie, mais ses connexions privilégiées la rendent fonctionnellement associée aux ganglions de la base. Le striatum est divisé en deux structures chez le primate, le noyau caudé et le putamen, séparées physiquement par la capsule interne. Le pallidum est composé du globus pallidus interne et externe, localisé à la limite télencéphale - diencéphale. Le noyau sous-thalamique est situé sous le thalamus. La Substance Noire (SN), mésencéphalique, peut être fonctionnellement subdivisée en *pars compacta* (SNc) et *pars reticulata* (SNr).

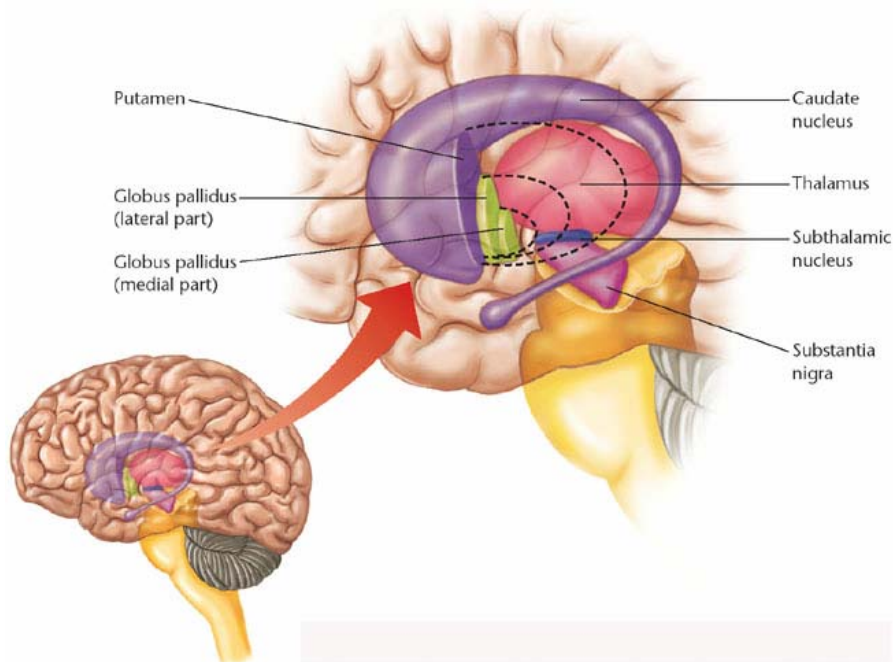


Figure 1 : Schéma des ganglions de la base

Représentation des ganglions de la base du cerveau humain. Les structures composant ce réseau sont indiquées (issue du livre "Neuroanatomie" de A. R. Crossman, D. Neary).

1.1.1 Réseaux fonctionnels des ganglions de la base

Les ganglions de la base permettent la régulation des ordres moteurs volontaires et l'initiation de ces mouvements. Albin et collaborateurs ont proposé un modèle dans les années 80 de fonctionnement de ce réseau en boucle régulatrice (Figure 2) (Albin et al., 1989). Le striatum est considéré comme le centre intégrateur des ganglions de la base, car il est la porte d'entrée des afférences. Elles sont glutamatergiques lorsqu'elles proviennent du cortex, et dopaminergiques lorsqu'elles sont en provenance de la SNc. La SNc a un rôle modulateur du striatum. Elle a soit une action excitatrice *via* les récepteurs dopaminergiques de type 1 (D1) soit inhibitrice *via* ses récepteurs dopaminergiques de type 2 (D2). Le striatum intègre les informations reçues et émet ses efférences inhibitrices GABAergiques sur le pallidum *via* deux voies, la voie directe et la voie indirecte. La voie directe correspond à la projection du striatum sur le globus pallidus interne (GPI). Cette action va permettre de lever l'inhibition du GPI sur le thalamus et par conséquent d'augmenter sa décharge au cortex. Cette voie permet l'accroissement de l'excitation des neurones moteurs corticaux. La voie indirecte est la projection du striatum sur le globus pallidus externe (GPe). Cette action va diminuer la décharge des neurones GABAergiques en direction du noyau sous-thalamique. Cela va participer à la levée de l'inhibition du noyau sous-thalamique et par conséquent inhiber le thalamus. La voie indirecte contribue à l'inhibition des neurones moteurs corticaux.

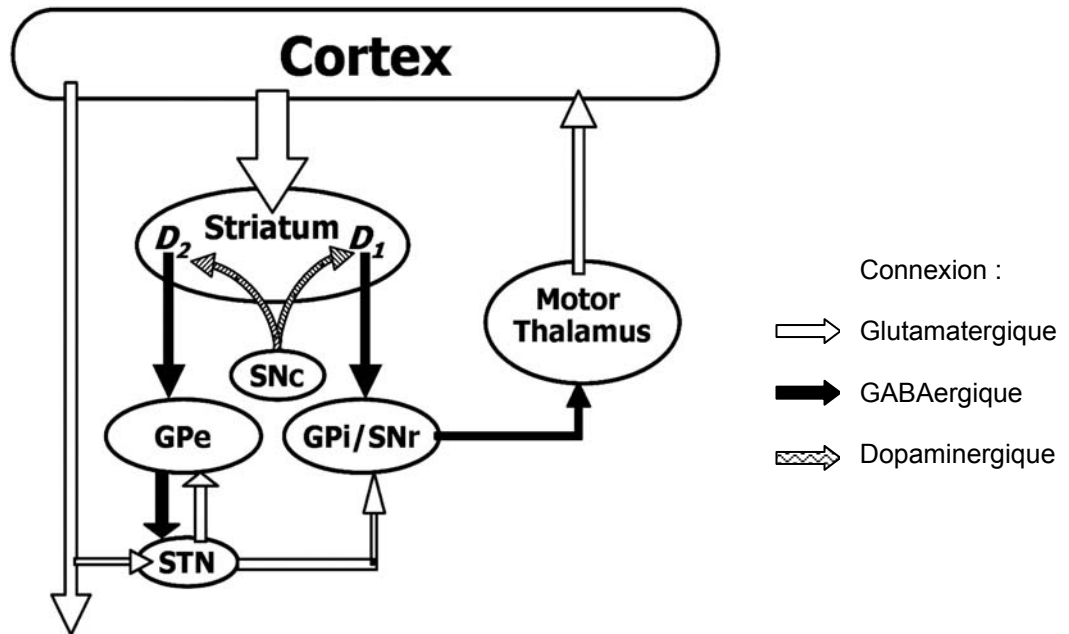


Figure 2: Schéma représentant les voies directes et indirectes des ganglions de la base. Les flèches noires représentent les connexions inhibitrices GABAergiques. Les flèches blanches correspondent aux connexions excitatrices glutamatergiques. Les flèches rayées représentent l'innervation dopaminergique. L'activation corticale via la voie directe (striatum–GPi–thalamus) facilite le mouvement en protégeant le thalamus moteur de l'inhibition du GPi ce qui permet l'excitation des aires motrices corticales. L'activation de la voie indirecte (striatum–GPe–STN–GPi–thalamus) a les effets opposés (Figure extraite de (Rubchinsky et al., 2003)).

1.1.2 Populations cellulaires du striatum

Les neurones de projection sont les neurones épineux de taille moyenne (Medium Spiny Neurons, MSN). Les MSN représentent 90% des neurones striataux chez le rat (Graveland and DiFiglia, 1985). Ils présentent de nombreuses épines dendritiques et leur soma a un diamètre de 12-20µM. Ils ont comme neurotransmetteur principal l'acide-gamma-amino-butyrique (GABA). Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur majoritaire du cerveau. Les MSN peuvent être divisés en deux sous-populations. La première comprend les MSN GABAergiques qui co-expriment l'enképhaline (ENK) et projettent sur le GPe. Ces MSN expriment les récepteurs D₂ ainsi que les récepteurs à l'adénosine de sous type 2a (A_{2a}). La deuxième comprend les MSN qui co-localisent avec la substance P (SP), les récepteurs D₁, la dynorphine et le récepteur cholinergique muscarinique M₄. Ils projettent sur la SNr et le GPi. Les MSN expriment des protéines sélectives dont

l'activité et l'expression reflètent l'état des neurones du striatum. C'est le cas des protéines DARPP-32 (Dopamine-and cAMP Regulated PhosphoProtein, 32 KDa) et Calbindine (CalbD28K).

Les interneurones, qui par définition ne projettent pas hors du striatum, représentent environ 10% de la population neuronale du striatum. Il existe deux grands types d'interneurones classés en fonction de leur taille et de leur composition neurochimique (Kawaguchi et al., 1995). (1) Les larges interneurones cholinergiques ont un soma de 20-50µM et ont une arborisation dendritique étendue. Ils expriment la choline acétyltransférase (ChAT) et l'acétylcholinestérase (AChE). (2) Les interneurones non épineux de taille moyenne ont un soma de taille équivalente à celui des MSN. Ils sont GABAergiques divisés en quatre sous-populations que l'on discrimine en fonction des peptides : la paralbumine, la calrétinine, la NADPH diaphorase, la somatostatine, le Neuropeptide Y et la Nitrique oxyde synthétase (NOS).

Les pathologies affectant le striatum peuvent être regroupées en plusieurs groupes: les maladies touchant le métabolisme, les intoxications, et les empoisonnements et les maladies génétiques. La maladie de Huntington (MH) est la maladie génétique la plus répandue des pathologies associées à la dégénérescence du striatum.

II. La maladie de Huntington

II.1 Historique

Les premières données concernant la maladie de Huntington remontent au XIVe siècle. Elle est alors connue sous le nom de « chorée de Saint Guy ». C'est en 1872 que George Huntington décrit les premières caractéristiques de cette maladie : « *sa nature héréditaire, sa tendance à la folie et au suicide, et sa gravité lorsqu'elle survient chez un adulte.* » Un siècle plus tard (1993) le gène de la maladie de Huntington est séquencé : « *IT15* » pour "Interesting Target 15" (The HD collaborative group, 1993) et depuis nommé "*HD*".

II.2 Description clinique

La prévalence de cette pathologie varie en fonction de la population. Elle est de 5-7/100 000 en Europe et aux Etats-Unis. Cette prévalence est fortement réduite en Afrique et en Asie (0.5/100 000) (Walker, 2007). Elle se déclare chez l'adulte entre 30 - 40 ans. Elle affecte de la même manière les hommes et les femmes. Dans de rares cas, elle peut se déclarer dans la petite enfance. La MH se caractérise par une triade de symptômes : moteurs, cognitifs et psychiatriques.

II.2.1 Symptômes /Étiologie

Les troubles moteurs

Le patient présente de nombreux et variables troubles moteurs. Ces troubles moteurs évoluent sur 10 à 15 ans en passant du stade de l'hyperkinésie au stade akinéto-rigide. Un des premiers symptômes est l'apparition de troubles oculomoteurs suivie d'une dyskinésie oro-faciale évoluant en chorée. La chorée est décrite comme étant un état où les mouvements sont excessifs, spontanés et irréguliers dans le temps. Les mouvements involontaires choréiformes sont les plus fréquents, ils sont d'abord de faible puis de large amplitude et sont souvent associés à des chutes. En parallèle de l'aggravation de la chorée, les mouvements volontaires ralentissent (bradykinésie). Le patient peut présenter une rigidité musculaire et des contractions

musculaires involontaires et intenses (dystonie). L'évolution de la maladie accroît les symptômes, on constate alors dans les stades avancés de la MH, des troubles de la parole (dysarthrie) et des troubles de déglutition.

Les troubles cognitifs et psychiques

Les patients développent une démence de type sous-corticale. Le degré est variable d'un individu à l'autre. Elle se définit par des changements de personnalité (irritabilité, agressivité) et des troubles cognitifs (déclin intellectuel, problèmes de mémoire, d'attention et de planification) (Harper, 1992; Anderson and Marshall, 2005). Le malade perd sa capacité à s'adapter face à un changement. Ils démontrent un caractère persévérant et stéréotypé. Le langage quant à lui est relativement bien préservé dans les premiers stades de la maladie. Les personnes atteintes de la MH développent majoritairement des troubles psychiques tels que la dépression, des syndromes psychotiques, une désinhibition et une tendance plus élevée au suicide (Schoenfeld et al., 1984; Paulsen and Conybeare, 2005).

II.2.2 Observations neuro-pathologiques

Analyse *in vivo*

L'apparition des symptômes intervient après une perte massive des neurones du striatum qui présente alors une atrophie. Une atrophie d'environ 30% du striatum (noyau caudé et putamen) est détectable par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) chez des patients pré-symptomatiques (Aylward et al., 2004) et chez des patients ayant déclaré la maladie depuis peu de temps (Simmons et al., 1986; Aylward et al., 1997). L'imagerie fonctionnelle par le [¹⁸F] fluorodéoxyglucose (¹⁸F-FDG) en Tomographie par Émission de Positons (TEP) a permis de détecter chez les patients ne présentant pas encore d'atrophie striatale, une diminution de consommation de glucose dans cette région reflétant une diminution significative d'activité précoce (Kuhl et al., 1982; Hayden et al., 1986).

Analyse *post-mortem*

Le niveau d'atrophie du striatum analysé *post-mortem* est corrélé avec le niveau de gravité de la maladie (Vonsattel et al., 1985; Myers et al., 1988). La MH est une

maladie évolutive dont chaque stade a été bien défini par Vonsattel et collaborateurs (Vonsattel et al., 1985). Ils définissent 5 grades. Le grade 0 correspond à l'apparition des premiers symptômes en l'absence d'anomalies neuropathologiques. Le grade 1 correspond à la perte de la moitié des neurones du noyau caudé et le début d'une astroglie. Dans le grade 2, le noyau caudé est atrophié. Dans le grade 3, la capsule interne a perdu la moitié de son épaisseur, et le putamen a subi une perte neuronale massive. Enfin dans le grade 4, le putamen est atrophié et a subi une forte astroglie.

Le striatum contient plusieurs types de populations cellulaires qui ne sont pas toutes affectés de la même façon par la maladie. La MH touche principalement les MSN en épargnant relativement les autres populations cellulaires (Ferrante et al., 1985; Brouillet et al., 1999). Dans la MH, les MSN présentent une augmentation du nombre de connexions de leurs épines dendritiques, ainsi que des segments recourbés anormaux au niveau distal. À cela fait suite une phase « dégénérative » où les neurones perdent leurs épines au niveau proximal et le nombre de segments recourbés s'accroît (Ferrante et al., 1991). Les neurones non épineux de taille moyenne (calrétinine), les larges cholinergiques et les interneurons NADPH diaphorase et somatostatine-positifs sont préservés (Ferrante et al., 1985; Cicchetti et al., 1996). Cette dégénérescence se traduit par la perte de marqueurs striaux (DARPP-32, CALB 28K) (Ferrante et al., 1991). Bien que cette dégénérescence se caractérise par une atrophie préférentielle du striatum, elle atteint tardivement le cortex cérébral, la substance blanche sous corticale et le thalamus (Petersen et al., 1999).

II.3 Thérapie

Il n'existe aucune thérapie à ce jour qui permettrait de ralentir la dégénérescence ou de diminuer fortement les symptômes chez les patients. L'issue de la maladie est fatale. Après l'apparition des premiers symptômes, l'espérance de vie des patients est d'une quinzaine d'années. La chorée est améliorée de façon symptomatique par l'utilisation de neuroleptiques. Les troubles comportementaux et psychiatriques sont corrigés par des traitements spécifiques (benzodiazépines, neuroleptiques, antidépresseurs, carbamazépine).

En absence de traitement contrecarrant la dégénérescence des neurones, la thérapie "réparatrice" de remplacement de cellule par la greffe de neurones est celle qui génère le plus d'espoir. Elle consiste en l'injection de neurones issus de tissu foetal dans la zone de dégénérescence. Le but est à terme de recréer les circuits de projection des neurones perdus. L'enjeu majeur réside dans le contrôle de la différenciation des cellules souches embryonniques en neurones spécifiques de la région où ils devront être injectés. La greffe de tissu foetal chez des patients de la MH a démontré la capacité du greffon à survivre et à se différencier dans la région d'intérêt. Les patients greffés ont présenté une amélioration du phénotype cognitif et moteur (Bachoud-Levi et al., 2000).

II.4 Génétique de la MH

La maladie de Huntington est une maladie génétique héréditaire, autosomale dominante, qui se caractérise par une mutation dans l'exon 1 du gène *HD* localisé sur le chromosome 4 et loci 4p16.3. Cette mutation se traduit par une expansion de la répétition d'un triplet CAA/CAG en 5' de la région codante du gène. Cette mutation se traduit par une expansion de la répétition de polyglutamines (polyGln) dans la partie N-terminale de la protéine « huntingtine » (htt). La MH fait partie de la famille des maladies à polyGln regroupant neuf autres maladies dont les ataxies spinocérébelleuses (SCA) de types 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, l'atrophie musculaire spinobulbaire (SBMA) et l'atrophie dentarubral pallidolusienne (DRPLA) (Table1). Ces différentes maladies génétiques se caractérisent par l'atteinte de gènes différents. Cependant, elles partagent des caractéristiques communes dont la sélectivité de dégénérescence évolutive d'une région cérébrale, l'apparition des symptômes à l'âge adulte et la présence d'agrégats des protéines mutées.

Disease	Protein	Repeat	Normal repeat length	Pathogenic repeat length	Inclusions	Brain regions most affected
<i>Typical polyglutamine diseases (gain of function)</i>						
HD	Huntingtin	CAG	6–34	36–121	Nucleus and cytoplasm	Striatum, cerebral cortex
SBMA	Androgen receptor	CAG	9–36	38–62	Nucleus and cytoplasm	Anterior horn and bulbar neurons, dorsal root ganglia
DRPLA	Atrophin 1	CAG	7–34	49–88	Nucleus	Cerebellum, cerebral cortex, basal ganglia, Luys body
SCA1	Ataxin 1	CAG	6–39	40–82	Nucleus	Cerebellar Purkinje cells, dentate nucleus, brainstem
SCA2	Ataxin 2	CAG	15–24	32–200	Nucleus	Cerebellar Purkinje cells, brain stem, frontotemporal lobes
SCA3	Ataxin 3	CAG	13–36	61–84	Nucleus	Cerebellar dentate neurons, basal ganglia, brain stem, spinal cord
SCA7	Ataxin 7	CAG	4–35	37–306	Nucleus	Cerebellum, brain stem, macula, visual cortex
SCA17	TATA box binding protein	CAG	25–42	47–63	Nucleus	Cerebellar Purkinje cells, inferior olive
<i>Atypical polyglutamine disease (mimicked by missense mutation)</i>						
SCA6	α 1a voltage-dependent calcium channel subunit	CAG	4–20	20–29	Cytoplasm	Cerebellar Purkinje cells, dentate nucleus, inferior olive
<i>Atypical polyglutamine disease (reverse transcription of CTG repeats)</i>						
SCA8	Unknown	CTG	16–34	>74	Nucleus	Cerebellar Purkinje cells, granule cells, inferior olive

Table 1: Maladies à polyglutamines

Description succincte des maladies à polyGlutamines. D'après (Shao and Diamond, 2007)

Anticipation et Seuil

Chez les sujets sains, le nombre de répétitions du triplet CAA/CAG est d'environ 20. Au-delà du seuil de 36 glutamines, la probabilité de déclarer la pathologie est élevée. Entre 27 et 35 triplets, il existe une instabilité chez le porteur qui ne développe pas la MH. Par contre, ses descendants ont un risque élevé de développer la maladie par un phénomène dit d'anticipation. L'anticipation correspond à l'augmentation du nombre de répétitions d'une génération à l'autre du fait de l'instabilité méiotique de la transmission maternelle et paternelle. La transmission maternelle donne le même nombre de CAG voir moins ou tout au plus 3 CAG. La transmission paternelle accentue le nombre de CAG responsable des formes juvéniles de la maladie (Myers 2004).

Il existe une corrélation inverse entre l'âge de déclaration de la MH et le nombre de répétitions polyGln. En théorie plus le nombre de répétitions est élevé et plus le patient développera la maladie jeune.

III. La huntingtine sauvage

III.1 Structure de la protéine

La htt sauvage est une protéine de haut poids moléculaire de 348KDa. Le gène HD a une expression ubiquitaire avec un niveau d'expression plus élevé dans le cerveau que dans les organes périphériques. Dans le cerveau, son expression est plus forte dans les neurones que dans les cellules gliales (DiFiglia et al., 1995). Les domaines qui composent la htt sont relativement bien connus (Figure3).

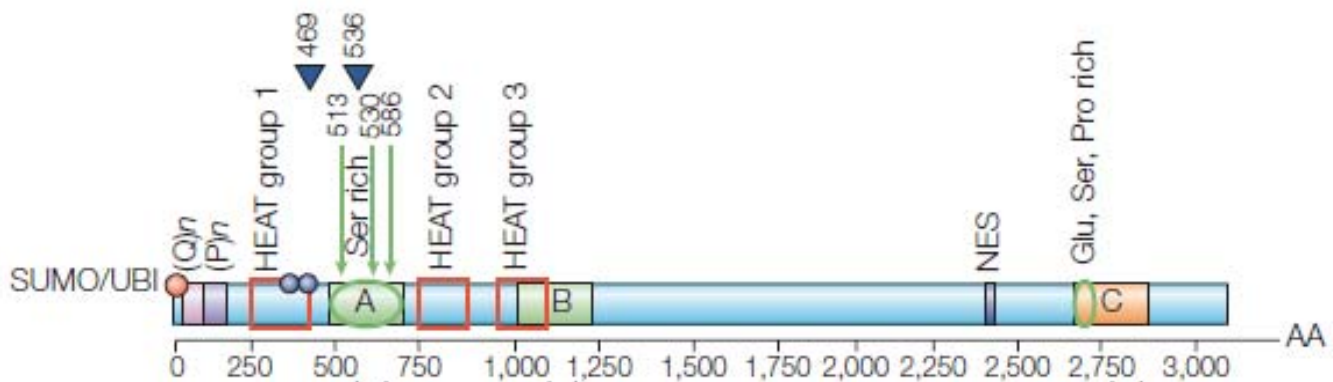


Figure 3: Représentation de la protéine Htt

Les flèches indiquent les sites de clivage des caspases. Les têtes de flèches bleues indiquent le site de clivage calpaïne. « B » représente les sites préférentiellement clivés dans le cortex cérébral. « C » ceux du striatum et « A » les sites communs. Les cercles indiquent les modifications post traductionnelles : l'ubiquitination (UBI) et/ou la sumoylation (SUMO) (rouge), et les phosphorylations sur la serine 421 et 434 (bleu). La région polyglutaminique ((Q) n) est rose, la région riche en proline ((P) n) est violette. La région riche en sérine est verte (Cattaneo et al., 2005).

Le domaine NT17 se situe dans les 17 premiers acides aminés de la partie N-terminale de la protéine. Il est hautement conservé pendant l'évolution et de nombreuses fonctions ont été récemment identifiées. Il permettrait la liaison de la htt aux membranes périphériques (Atwal et al., 2007; Rockabrand et al., 2007). Ce domaine interagit avec les protéines du pore nucléaire TPR (Transient Potential Receptor) qui exportent les protéines du noyau au cytoplasme (Cornett et al., 2005). Le domaine polyGln (Q(n)) commence aux dix-huitièmes acides aminés, il permet l'interaction avec de nombreuses protéines. Chez les vertébrés, il est suivi de

domaine polyProline (P(n)) qui jouerait un rôle dans la solubilité de la htt. Le nombre de répétitions dans les domaines polyGln et polyP nécessaires au bon fonctionnement de la protéine est dépendant de l'espèce où elle est exprimée (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004). Les 3 domaines HEAT (Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR) sont longs d'environ quarante acides aminés, chacun de ces domaines sont organisés en clusters. Ils sont structurés en deux hélices alpha anti-parallèles disposées autour d'un même axe. La signature du motif HEAT est la présence d'Aspartate et d'Arginine en position respective 19 et 25. On retrouve ce domaine dans des protéines dites "cargos" liées au transport (exportine, importine) et à la ségrégation des chromosomes. Le domaine NES (Nuclear export signal) pourrait indiquer l'implication de la htt dans l'exportation de protéine du noyau au cytoplasme (Xia et al., 2003). La htt a été aussi trouvée dans le noyau, elle possède donc un domaine NLS qui semblerait peu actif.

La htt a été la première protéine neuronale découverte comme substrat des caspases (Goldberg et al., 1996). Elle présente des sites de clivage pour la caspase 3 en 513 et 552, pour la caspase 2 en 552 et pour la caspase 6 en 586 (Wellington et al., 1998; Wellington and Hayden, 2000; Graham et al., 2010). La htt est aussi clivée par la calpaïne en 469 et 536 (Gafni and Ellerby, 2002). La htt peut subir des modifications post-traductionnelles. Les lysines (K6, K9, K15) de son domaine NT17 peuvent être soit SUMOylées (Steffan et al., 2004) soit ubiquitinilées. La htt est phosphorylée sur la sérine 421 (Zala et al., 2008) et sur la sérine 434. Elle peut aussi être palmitoylée par la protéine HIP 14 (Huntingtin-Interacting Protein 14) (Huang et al., 2008).

III.2 Rôle

III.2.1 Embryogenèse et développement

La htt est indispensable pendant l'embryogenèse. La délétion de la htt dans les souris (*hdh^{-/-}*) a pour conséquence une létalité *in utero* entre E8.5-E10.5 (Nasir et al., 1995). À E6.5 les embryons de ces souris KO ne présentent pas de différence avec des embryons de souris WT du même âge. À E7.5, ils présentent un retard et une désorganisation cellulaire ce qui ne les empêche pas d'entrer dans la phase de gastrulation. L'épiblaste présente alors un accroissement du phénomène d'apoptose

(Zeitlin et al., 1995). L'injection de cellules ES Hdh^{-}/Hdh^{-} dans des souris sauvages au stade blastocyste (E4) permet une embryogenèse normale et une survie des souris au-delà de la naissance (Dragatsis et al., 1998). La htt est donc indispensable dans la partie très précoce de l'embryogenèse. Récemment, il a été montré que la htt possède un rôle déterminant dans la formation des faisceaux microtubulaires. La htt interagit avec le complexe dynactine/dynéine pendant la mitose permettant la bonne ségrégation des chromosomes. Elle participerait aussi à l'orientation de la cellule embryonnaire et à la neurogénèse (Godin et al., 2010). Les cellules souches embryonnaires de souris KO pour la htt présentent un défaut de localisation des organelles (mitochondrie, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi (Hilditch-Maguire et al., 2000)).

III.2.2 Transcription

La htt interagit avec de nombreux facteurs de transcription dont CREB (cAMP response element) (McCampbell et al., 2000; Steffan et al., 2000), p53 (McCampbell et al., 2000; Steffan et al., 2000), le co-activateur CA150 (Holbert et al., 2001) et le co-répresseur CtBP (Kegel et al., 2002).

La protéine "RE1-silencing transcription factor" (REST) est cytoplasmique. Lorsqu'elle migre au noyau, elle a la capacité de se lier à des facteurs de transcription (sin3A, coREST, HDAC) afin de créer un complexe capable de se fixer sur la séquence "Repressor Element 1" (RE1) présent sur de nombreux gènes et ainsi inhiber leur transcription. La htt sauvage a la capacité de se lier à REST dans le cytoplasme. Cette liaison va empêcher sa translocation au noyau et son interaction à RE1 (Zuccato et al., 2003). Cet événement a pour conséquence de promouvoir la transcription des gènes régulés par RE1 tels que le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF). La liaison de la htt à REST serait indirecte *via* ses interactions avec la "Htt Associated Protein 1" (HAP1) et la "Rab Interacting Lysosomal Protein" (RILP) (Shimojo, 2008). Le complexe répresseur N-cor et Sin3A réprime la transcription en se liant à des récepteurs nucléaires afin d'empêcher leur ligand de s'y fixer. La htt se fixe à ces protéines et lève l'inhibition (Boutell et al., 1999). La "Specificity Protein 1" (SP1) est un activateur transcriptionnel dont la principale fonction est le recrutement du facteur de transcription "TBP Associated Factor 130" (TAF4) à l'ADN pour activer la transcription de certains gènes. La htt jouerait le rôle de protéine de plateforme en

permettant à Sp1 et à TAF4 de se fixer et ainsi d'agir positivement sur la régulation des gènes (Dunah et al., 2002; Li et al., 2002).

III.2.3 Rôle pro survie

Des expériences de transgénèse sur des souris ont permis de démontrer *in vivo* la capacité de la htt à favoriser la survie. Des souris modèles de la MH (YAC) « Know out » (KO) pour la htt sauvage présentent des anomalies liées à la reproduction (infertilité, apoptose testiculaire massive suivie d'une atrophie). La recouvrance du gène htt dans les générations suivantes diminue la gravité du phénotype observé. La réexpression de la htt à l'âge adulte module négativement l'apoptose dans les cellules testiculaires (Leavitt et al., 2001).

L'apoptose est un processus de mort cellulaire génétiquement programmée qui intervient dans le développement. Après ce stade, elle est activée en réponse à des stimuli extérieurs toxiques. Les acteurs de l'apoptose sont principalement des protéases et plus particulièrement des caspases. Les caspases initiatrices (2, 8, 9,10) permettent l'initiation de la cascade apoptotique réalisée par les caspases exécutrices (Figure 4)

La htt est probablement impliquée dans l'apoptose post-développementale. La surexpression de la htt sauvage *in vitro* prévient la mort cellulaire des neurones du striatum. Ces derniers soumis à des stimuli apoptotiques présentent une inhibition du clivage de la pro-caspase 9 en caspase active ce qui empêche l'activation de la caspase 3 et bloque la cascade apoptotique (Rigamonti et al., 2000; Rigamonti et al., 2001). Le complexe "Htt interacting protein1" (HIP1) – "Htt interacting protein1" (HIPPI) est capable d'activer la caspase 8. La htt en interagissant avec HIP1 réduit la formation du complexe et l'activation de la voie apoptotique (Gervais et al., 2002).

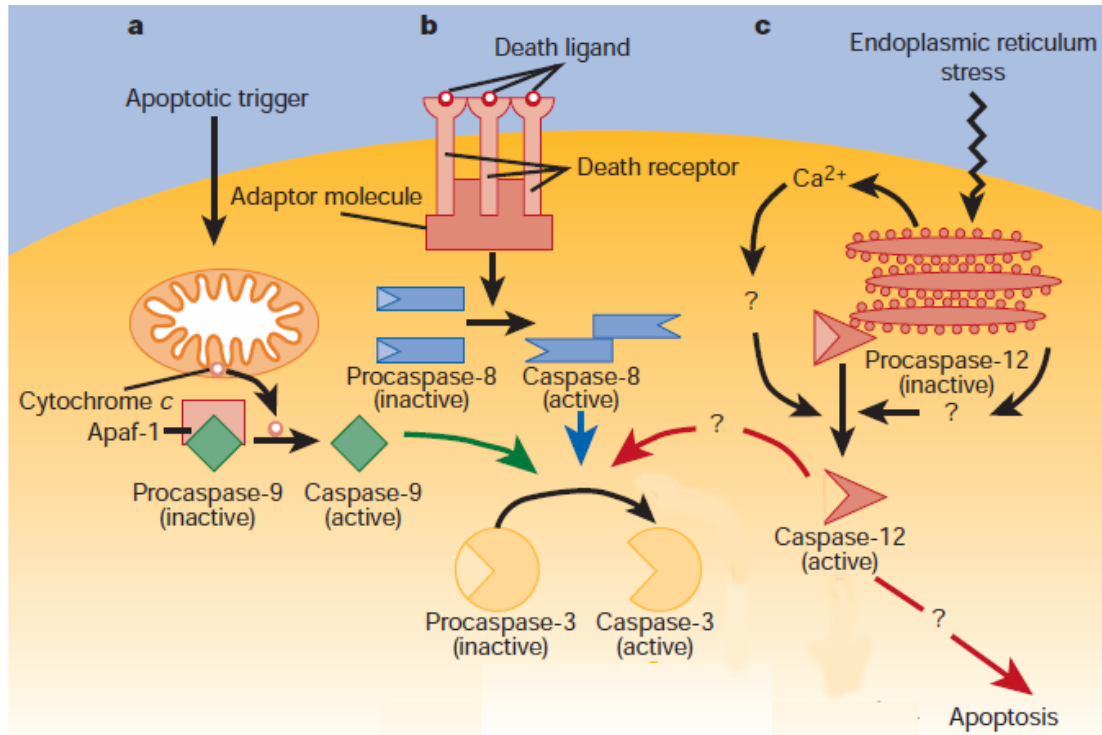


Figure 4: Représentation schématique de l'apoptose.

Il existe 3 voies de signalisation conduisant à l'apoptose. (a) Quand la mitochondrie reçoit des stimuli apoptotiques, des molécules comme le cytochrome c sont libérées dans le cytosol. Le cytochrome c forme un complexe avec Apaf-1 afin de cliver la procaspase 9 en une caspase 9 active. (b) L'oligomérisation des récepteurs de « mort » permet le recrutement de molécules adaptatrices impliquées dans l'activation de la caspase 8. La caspase 8 active est le résultat de la dimérisation des procaspases 8. (c) Un stress au RE permet la libération de Ca²⁺ et active la caspase 12. Les caspases initiatrices (9, 8,12) permettent l'activation des caspases exécutrices, dont la caspase 3 (Mehmet, 2000).

La htt est le substrat d'Akt (serine/thréonine kinase) et de la "Serum and Glucocorticoid-induced Kinase" (SGK). Akt et SGK sont des acteurs majeurs dans les voies de signalisation pro-survie (Rangone et al., 2004) ce qui sous-entend sa participation dans ces voies de signalisation. Le BDNF est un puissant facteur de survie cellulaire. Il est synthétisé au niveau du cortex puis transporté jusqu'au striatum *via* les afférences corticales. La htt régule positivement la transcription du BDNF dans les couches pyramidales du cortex (Zuccato et al., 2001) et augmente son transport le long des microtubules à destination du striatum (Saudou et al.,

1998). La htt par sa double action sur le BDNF participe à la survie des neurones du striatum.

III.2.4 Transport

Le transport actif le long des microtubules des axones est déterminant pour la survie des neurones. Le transport antérograde, assuré par la kinésine, assure l'acheminement de protéines, de lipides nouvellement synthétisés et des organelles vers les synapses. Le transport rétrograde, assuré par la dynéine (souris) / dynactine (homme), permet le rapatriement au cytosol des protéines dégradées et des organelles endommagées afin d'être prises en charge par le protéasome (Figure5).

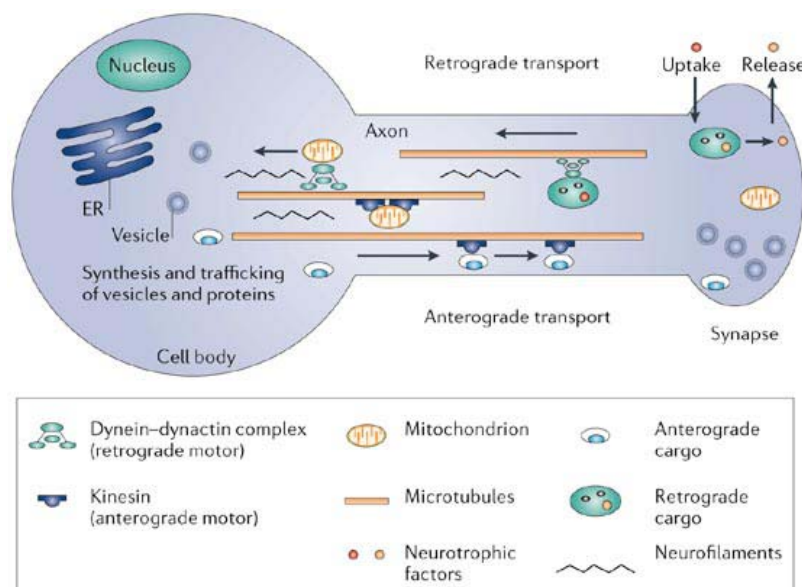


Figure 5: Transport axonal neuronal

Les moteurs du transport rapide axonal (FAT) sont la kinésine et la dynactine. Le transport dans l'axone se fait le long des microtubules du soma de la cellule à ses terminaisons (Pasinelli and Brown, 2006).

La htt interagit avec la protéine "Huntingtin Associated Protein 1" (HAP1) connue pour son implication dans le transport vésiculaire. En effet HAP1 co-immunoprécipite avec la kinésine (McGuire et al., 2006) et la dynéine (Deacon et al., 2003). HAP1 se lie aussi à la sous unité p150 de la dynactine/dynéine. La co-immunoprécipitation de la dynéine à partir d'extrait de cerveaux montre la présence d'un complexe macromoléculaire comprenant la dynéine/dynactine, la kinésine, la htt et HAP1 (Caviston et al., 2007). De par sa liaison avec ces protéines, la htt pourrait moduler la fonction du transport. La surexpression de la htt permet d'augmenter le

transport vésiculaire antérograde et rétrograde du BDNF de manière HAP1-dépendante (Gauthier et al., 2004). Colin et collaborateurs ont démontré que la phosphorylation de la htt sur la sérine 421 (S421) permettrait de modifier la direction (antérograde, rétrograde) du transport des vésicules sur les microtubules (Colin et al., 2008). Cette modification a été observée pour les vésicules du BDNF, les vésicules synaptiques et la protéine "Amyloid Precursor Protein" (APP). L'état de phosphorylation S421 de la htt a été mimé par la protéine chimérique htt-Ser421D. Sa surexpression stabilise l'interaction entre la kinésine et la dynactine (Colin et al., 2008).

La htt peut aussi se lier au cytosquelette d'actine *via* «l'optineurin » (Hattula and Peranen, 2000). L'optineurin permet la régulation du transport post-golgien des protéines sur les filaments d'actine. La htt permettrait la bonne localisation à la membrane golgienne de l'optineurin (del Toro et al., 2009).

III.2.5 Endocytose

L'endocytose est un processus de transport intracellulaire qui est présent chez toutes les cellules eucaryotes. Il existe plusieurs types d'endocytose correspondant à différentes molécules « cargo » à transporter. Je ne développerai que « l'endocytose clathrine dépendante ». L'endocytose clathrine dépendante permet le recyclage et le renouvellement des récepteurs à la membrane synaptique de la cellule. Les récepteurs sont transportés par le complexe adaptateur de la clathrine, "l'Adaptor Protein 2" (AP2). La clathrine forme une structure en « triskélion » qui se lie à l'AP2. La membrane s'invagine alors jusqu'à fusion des 2 extrémités par l'action de la dynamine créant une vésicule intracellulaire. Le récepteur internalisé sera alors soit dégradé soit recyclé à la membrane (Figure 6).

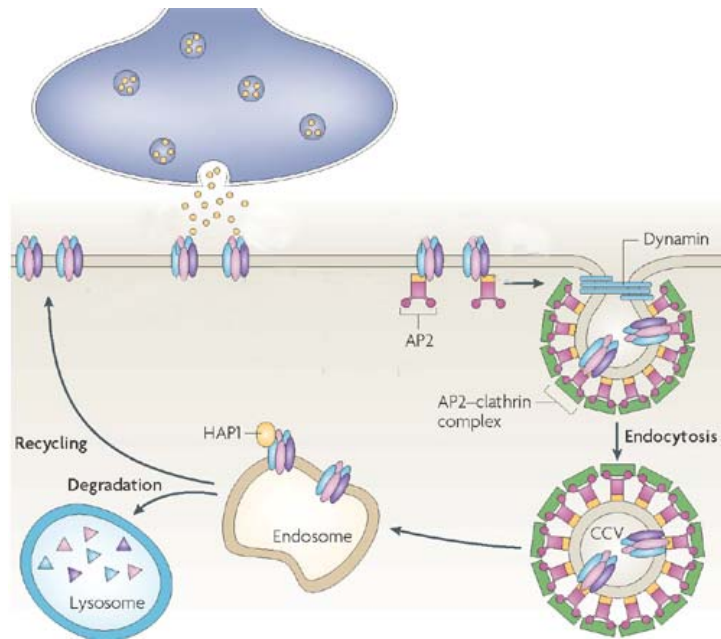


Figure 6: Endocytose clathrine dépendante

Le récepteur interagit avec le complexe adaptateur de la clathrine AP2 (rose et jaune). La clathrine (vert) se fixe sur le complexe. La membrane s'invagine. La dynamine (bleue) permet la fusion des membranes et la libération de la vésicule. Le récepteur est internalisé dans la vésicule CCV (Clathrin coated vesicles). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) peut interagir avec le récepteur et permettre son recyclage à la membrane (Jacob et al., 2008).

La htt interagit avec HIP-1 (Wanker et al., 1997) et avec la sous-unité adaptatrice de l'AP2, l' α -adaptine (Metzler et al., 2001). La htt pourrait participer à la mise en place de la clathrine à la membrane. La htt pourrait réguler le détachement des vésicules de par sa liaison avec la " protein kinase C and casein kinase substrate in neuron 1" (PACSIN1) (Modregger et al., 2002). En effet, PACSIN1 est liée au recrutement des vésicules pendant l'endocytose ainsi qu'à l'induction de la nucléation de l'actine.

IV. La huntingtine mutée

IV.1 Concept gain /perte de fonction

La mutation de la htt entraîne à la fois une perte partielle des fonctions de la protéine sauvage et un gain de fonction toxique pour la htt-m. Son expansion de polyGln modifie les interactions protéiques et perturbe la protéolyse de la protéine ainsi que de nombreuses fonctions cellulaires qui sont développées ci-dessous dont la transcription et le transport.

IV.2 Neurogénèse

La htt-m, tout comme la forme sauvage, est indispensable au bon développement et à la viabilité de l'embryon (Dragatsis et al., 1998). La perte de fonction de la htt sauvage engendre des modifications du réseau microtubulaire lors de la mise en place de la polarité dans le néocortex (Godin et al., 2010). Les souris modèles de la MH (R6/1, R6/2) présentent un défaut de neurogénèse au niveau du gyrus denté, du bulbe olfactif et de l'hippocampe sans affecter le striatum (Gil et al., 2005; Lazic et al., 2006).

IV.3 Transcription

L'expansion polyGln de la htt-m modifie sa liaison avec ses partenaires protéiques en perturbant l'affinité d'interaction.

De nombreux facteurs de transcription (Sp1, p53, TBP, TAF4, CBP) ayant une affinité accrue pour la htt-m due à son expansion polyGln, se retrouvent séquestrés dans les inclusions intranucléaires formées par la htt-m, les empêchant ainsi de jouer leur rôle dans la transcription (Dunah et al., 2002; Li et al., 2002; Sugars and Rubinsztein, 2003). De cette manière, la htt-m diminue le pool de facteurs de transcription disponible et réprime ainsi la transcription. L'association Sp1/TAF4 est

très fortement diminuée dans les extraits de cerveaux de patients symptomatiques et asymptomatiques comparés à des sujets sains (Dunah et al., 2002).

La htt-m interagit avec la protéine CBP (CREB binding protein) *via* son domaine acétyltransférase et polyGln. L'expansion de son domaine polyGln augmente son affinité pour CBP. CBP, liée à la htt-m, ne peut alors plus jouer son rôle ce qui a pour conséquence de réprimer la transcription liée à CRE et médiée par CBP (Nucifora 2001). L'expression des gènes liés à la régulation de la séquence CRE est diminuée dans la MH chez l'Homme (Glass et al., 2000).

Des travaux récents présentent des résultats opposés chez la souris double transgénique pour la htt-m et la CRE- β galactosidase (Obrietan and Hoyt, 2004). Les niveaux de CREB phosphorylé et des gènes régulés par CREB sont élevés ce qui suggère que la htt-m faciliterait la transcription CRE dépendante.

L'expansion polyGln diminue l'interaction de la htt-m avec REST. REST est alors libre de migrer au noyau où il s'accumule et exerce sa fonction d'extinction de gènes neuronaux, dont celui du BDNF (Zuccato et al., 2003).

La transcription est également perturbée par la modification du "modelage" de la chromatine. Les histones sont acétylées par des Histones AcétylTransférases (HAT) ce qui permet une conformation ouverte de la chromatine qui devient accessible aux facteurs de transcription. Elles peuvent aussi être déacétylées par des Histones Déacétylases (HDAC) qui favorisent une compaction de la chromatine réprimant ainsi la transcription. Les HAT et les HDAC ont aussi pour substrat des protéines non histones telles que la tubuline, p53, Sp1 et STAT1 (pour revue (Langley et al., 2005). Dans le contexte de la MH, l'acétylation des histones est diminuée alors que le phénomène de méthylation est accru favorisant ainsi la déacétylation des histones et la repression de la transcription. L'utilisation d'inhibiteurs des HDAC améliore les symptômes moteurs observés dans des modèles de la MH: chez la drosophile (htt x 1p) (Steffan et al., 2001; Pallos et al., 2008) et chez les rongeurs (R/2 et N171-82Q) (Hockly et al., 2003). Ils permettent un recouvrement de la transcription, une amélioration du phénotype moteur et une augmentation du transport microtubulaire en particulier celui du BDNF (Dompiere et al., 2007) et un gain pour la survie.

IV.4 Clivage de la htt-m

L'expansion polygGln modifie la protéolyse de la htt-m. DiFiglia et collaborateurs ont découvert dans les extraits de cerveaux de patients des fragments de htt-m de différentes tailles (DiFiglia et al., 1997). Le clivage de la htt-m est dû à l'action de plusieurs protéases. Les caspases 3 et 6 seraient responsables de son clivage dans sa partie N-terminale et génèreraient des fragments de 70,75 et 80 KDa (Wellington and Hayden, 2000; Graham et al., 2006). Seuls les fragments issus du clivage par la caspase 3 ont été observés dans les cerveaux des patients de la MH (Goldberg et al., 1996; Wellington et al., 1998).

Les calpaïnes sont des cystéines protéases dépendantes du calcium et sont enrichies dans les neurones. Il existe 2 isoformes majoritaires dans le cerveau : la m-calpaïne et la μ -calpaïne. Les calpaïnes μ et m peuvent cliver la htt-m (Kim et al., 2001) aux résidus 469 et 536 (Gafni et al., 2004). La calpaïne μ est responsable des fragments les plus petits observés (40-60kda) (Mende-Mueller et al., 2001). L'expression de la calpaïne μ est induite fortement dans les souris transgéniques de la maladie (YAC128) (Cowan et al., 2008) et dans le noyau caudé de patient (Gafni and Ellerby, 2002). Dans un modèle pharmacologique de la pathologie utilisant l'acide 3 nitropropionique (3NP), le niveau de la calpaïne μ activée est élevé dans le striatum de rats et est corrélé à une amplification de la mort cellulaire (Bizat et al., 2003). De plus, l'inhibition pharmacologique de la calpaïne a un effet neuroprotecteur sur le striatum (Bizat et al., 2003). Il existe une corrélation entre la longueur de l'expansion glutamine et le niveau de protéolyse de la htt-m *in vitro* par les protéases (Cammarata et al., 1993).

Des fragments de la htt-m observés dans des lignées cellulaires exprimant la htt-m, ne correspondent pas à l'action de protéases connues. C'est le cas des fragments « cp-a » et « cp-b » générés par la coupure de la htt respectivement entre 104 -144 aminés et 146 -214 acides aminés (Lunkes et al., 2002).

Les métalloprotéases (MMP) sont des endopeptidases dépendantes du Zinc. La htt-m est clivée par la MMP-10 en position 402. Le niveau de MMP10 activée est fortement accru dans les souris modèles de la MH (YAC128, R6/2) (Miller et al., 2010). L'augmentation d'activité de la MMP10 observée est positivement

proportionnelle à l'âge des souris (Miller et al., 2010) et donc évolue avec l'avancée de la pathologie.

Ces fragments de htt-m clivés N-terminaux sont toxiques et conduiraient à la mort cellulaire (Cooper et al., 1998; Martindale et al., 1998). Les fragments Nterm correspondants à l'exon 1 sont plus toxiques que la forme entière dans les expériences *in vitro*, les modèles animaux et chez les patients (DiFiglia et al., 1997; Lunkes et al., 1998; Saudou et al., 1998; Li et al., 2000). L'invalidation des sites de clivage des 5 caspases (caspase 1, 3, 6, 7, 8) sur la htt-m diminue la mortalité cellulaire observée *in vitro* (Wellington and Hayden, 2000). L'inhibition du site de coupure de la caspase 6 sur la htt-m ralentit la pathogénicité de la protéine *in vivo* (Graham et al., 2006). L'inhibition de MMP-10 diminue la mort neuronale dans la lignée murine Hdh^{111Q/111Q} et diminue les déficits moteurs des drosophiles exprimant la Htt336-128Q (Miller et al., 2010).

Les mécanismes par lesquels la htt-m clivée nuit à la viabilité de la cellule restent mal compris. Les fragments N-terminaux clivés peuvent se transloquer dans le noyau. C'est le cas des fragments « cp-a » que l'on retrouve majoritairement dans le noyau sous forme d'inclusions (Lunkes et al., 2002). La translocation de la htt-m clivée est régulée par le niveau de phosphorylation des fragments. La phosphorylation de la htt-m sur la sérine 13 et de manière déterminante sur la sérine 16 augmente la quantité de fragments dans le noyau (Gu et al., 2009; Havel et al., 2011). La phosphorylation sur la sérine 16 diminue fortement l'interaction de la htt-m avec la protéine TPR impliquée dans l'export de protéine du noyau au cytoplasme (Cornett et al., 2005). Ces deux phénomènes concomitants permettraient l'accumulation des fragments N-terminaux de la htt-m au noyau qui est une étape clé pour la mort neuronale dans la MH (Saudou et al., 1998).

IV.5 Les agrégats

Les agrégats ou « inclusions » ont été mis en évidence par l'immunoréaction contre l'ubiquitine et la htt-m dans l'étude de souris transgéniques (R6/2) modèles de la maladie (Mangiarini et al., 1996; Davies et al., 1997) et dans l'étude *post-mortem* de cerveaux de patients (Roizin, 1979; DiFiglia et al., 1997) (Figure 7). Leur rôle dans la physiopathologie est toujours discuté, mais ils restent une signature de la MH. La protéolyse de la htt-m génère des fragments N-terminaux capables de s'accumuler et

de former des agrégats. Ils contiennent un grand nombre d'autres protéines en particulier l'ubiquitine. Le nombre d'agrégats augmente avec la progression de la maladie.

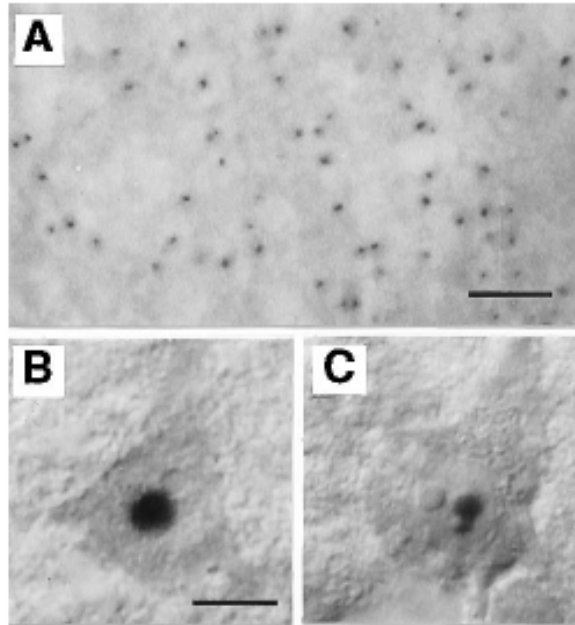


Figure 7 : Photographie d'agrégats dans le cerveau de patients de la MH

(A) Cortex présentant principalement des inclusions intranucléaires (NII). (B et C) Neurones corticaux pyramidaux contenant 1 (B) et 2(C) NII. Échelle, A, 10 mm; B-C, 2 mm (Roizin, 1979; DiFiglia et al., 1997).

Le domaine NT17 de la htt-m et le domaine polyGln peuvent interagir entre eux ce qui pourrait accélérer l'agrégation (Thakur et al., 2009). Les fragments de polyGln de la htt-m adoptent une structure β en feuillet capable de s'assembler entre eux pour créer des formes globulaires (Poirier et al., 2002). Ces feuillets β peuvent être anti-parallèles (polar zipper) (Perutz, 1995) ou parallèles et former des structures en épingles à cheveux (hairpin). L'assemblage de plusieurs β monomères forme une unité de protofibrille dégradable dans le SDS. Une fibre mature peut ainsi résulter de 2 protofibrilles ou 1 protofibrille combinée avec des oligomères. Les fibres matures créent un agrégat insoluble (Figure 8).

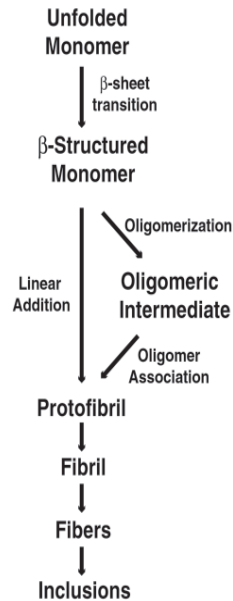


Figure 8: Voie hypothétique de la formation des agrégats médiée par les polyGln. Les monomères polyGln non structurés subissent une conversion en feuillet β résultant de la formation de protofibrilles intermédiaires. L'assemblage de protofibrille est suivi de la formation de fibrille et d'inclusions observables dans les maladies à polyGln (Poirier et al., 2002).

Les agrégats sont présents dans l'ensemble de la cellule : le cytoplasme, le noyau et dans les prolongements du neurone. On les appellera inclusions intranucléaires (NII) lorsqu'ils sont retrouvés dans le noyau. L'apparition des agrégats dépend du nombre de répétitions polyGln (Scherzinger et al., 1997; Martindale et al., 1998; Li et al., 1999; Yang et al., 2002)). Les fragments « cp-a » se retrouvent dans les NII. Les agrégats cytoplasmiques seraient composés d'un mélange de « cp-a » et de « cp-b » (Lunkes et al., 2002). Le rôle toxique des agrégats dans la physiopathologie de la MH est toujours discuté.

On attribue un rôle toxique aux agrégats *via* 2 mécanismes différents. En s'agrégeant, les fragments de la htt-m piègent avec eux de nombreuses protéines nécessaires au fonctionnement de la cellule (facteurs de transcriptions, protéines chaperonnes, protéines impliquées dans le transport, l'autophagie...) (Karlin and Burge, 1996). Ces inclusions sont majoritairement ubiquitinilées et seraient dégradées par le système ubiquitine-protéasome (UPS). Ceci aurait pour effet de "dépleter" le neurone en protéines nécessaires à son bon fonctionnement ce qui le fragiliserait. La seconde hypothèse est basée sur le fait que cette augmentation du nombre d'agrégats génère un encombrement spatial. Cet encombrement bloquerait

physiquement les fonctions cellulaires, dont la transcription, lorsqu'il s'agit des NII (Cornett et al., 2005) et le transport du BDNF dans les axones (Gauthier et al., 2004). Il n'existe pas de corrélation entre les NII et la mort neuronale. Les régions contenant le plus de cellules avec des NII sont celles qui ne dégèrent pas (Gutekunst et al., 1999). *In vitro*, les neurones exprimant les inclusions survivent plus longtemps que ceux sans agrégat (Arrasate et al., 2004). A contrario, l'inhibition de formation des agrégats dans les neurones exacerbe la mortalité (Saudou et al., 1998; Steffan et al., 2004).

De nombreux traitements "anti-agrégats" ont été identifiés comme des benzothiazoles (Heiser et al., 2002), le rouge Congo (Sanchez et al., 2003). Le tréhalose est un disaccharide capable d'inhiber la formation d'agrégat. Cette inhibition permet une amélioration du phénotype moteur chez les souris R6/2 (Tanaka et al., 2004). Il est difficile de savoir à quel niveau de la genèse des agrégats ces composés agissent.

Les transglutaminases (TG) sont des enzymes dépendantes du calcium ayant pour substrat des séquences polyGln. Les TG réalisent la transamination, l'incorporation de polyamine et la désamination de glutamines. La TG2 est la plus abondante dans le cerveau humain et se localise dans de nombreux compartiments cellulaires notamment dans le noyau (Battaglia et al., 2007). L'expression de la TG2 est fortement augmentée dans le cerveau de patient (Lesort et al., 2000; Karpuj et al., 2002; Lesort et al., 2002). Elle co-localise avec les NII présents au noyau (Zainelli et al., 2003). Chez les souris YAC128, l'inhibition de l'activité de la TG par la cystéamine, son inhibiteur compétitif, diminue le nombre de NII (Van Raamsdonk et al., 2005). Les TG ne favoriseraient donc non pas la formation de NII, mais leur stabilité et leur non-dégradation par le système ubiquitine protéasome.

IV.6 Transport

Le transport dans la MH est altéré. Le phénomène par lequel ce processus est compromis n'est pas totalement élucidé. Deux hypothèses sont avancées. 1) La htt-m s'agrègerait dans les segments terminaux des axones (Schilling et al., 1999) et bloquerait physiquement le transport des vésicules (Gunawardena et al., 2003) aussi

bien rétrograde qu'antérograde (Szebenyi et al., 2003). L'altération du transport par un gain de fonction toxique de la htt-m est également suggérée (revue).

On estime que 40% des protéines piégées dans les agrégats de la htt-m présents dans le cerveau de patients interviennent dans la machinerie du transport axonal (Trushina et al., 2004) affaiblissant ainsi cette fonction.

L'expansion polyGln diminue l'interaction de la htt-m avec HAP1 qui conduit au détachement des moteurs moléculaires aux microtubules entraînant inévitablement une diminution du transport des vésicules (Gauthier et al., 2004)(Figure 9). La htt-m active la protéine c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) spécifiquement exprimée dans les neurones. JNK3 activée va aller phosphoryler la kinésine 1 et l'empêcher ainsi de s'attacher aux microtubules. Ce gain de fonction va entraîner l'inhibition du transport rapide axonal (FAT) (Morfini et al., 2009). Le FAT permet l'approvisionnement rapide des neurites en facteurs et organelles nécessaires à la survie. L'inhibition du FAT entraîne la fragilité de certains domaines neuronaux qui seraient ainsi susceptibles de dégénérer les premiers (Morfini et al., 2009).

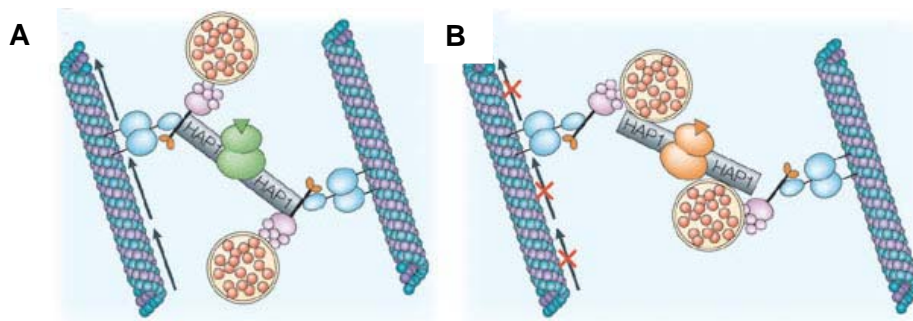


Figure 9: Fonction de la huntingtine dans le transport du BDNF

A- La htt sauvage (verte) se lie à HAP1 (gris) et régule indirectement l'assemblage de p150 avec la dynéine (bleu) et le complexe de la dynactine (rose) qui contrôle le transport des vésicules de BDNF (jaune). Les flèches indiquent le mouvement des vésicules. **B-** La htt-m (orange) a une affinité accrue pour HAP1 qui réduit le transport des vésicules du BDNF (Cattaneo et al., 2005).

IV.7 Dérégulation de l'homéostasie calcique : l'hypothèse de « l'excitotoxicité »

La cellule eucaryote nécessite la présence de calcium pour de nombreuses fonctions biologiques, dont la neurotransmission synaptique des neurones. Le calcium extracellulaire est en concentration millimolaire alors que la concentration intracellulaire est de l'ordre du nanomolaire. Ce gradient est maintenu par l'activité des pompes ATPases à la membrane. La concentration de calcium est très régulée dans l'espace et le temps. Le calcium cytoplasmique et nucléaire n'est pas sous forme libre mais lié à des protéines tampons (Calcium binding proteins, CBP) ou stocké dans des réserves dans la cellule. Différentes régions du cytoplasme permettent le stockage du calcium sous forme de vésicules (microsomes) et dans différentes organelles (réticulum endoplasmique (RE), Golgi, mitochondrie).

La dérégulation du calcium intracellulaire associée à l'activation excessive des récepteurs au glutamate conduisent une réaction en chaîne et entraînent la mort neuronale est appelée « excitotoxicité ». Si cette élévation est due à une augmentation extracellulaire de glutamate, on parle d'excitotoxicité directe. Dans le cas où cette élévation calcique est un événement secondaire dû à un dysfonctionnement métabolique ou énergétique, on parlera alors d'excitotoxicité indirecte (pour revue(Greene and Greenamyre, 1996; Damiano et al., 2009).

IV.7.1 Excitotoxicité directe

Le glutamate agit *via* 3 types de récepteurs: les récepteurs métabotropiques, les récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) et les récepteurs non-NMDA : AMPA (Acide α -amino-3-hydroxy-5méthyl-4-isox-asole propionique) et Kaïnate (Figure 10). L'activation des récepteurs kaïnate et AMPA permettent une sortie de potassium de la cellule et une entrée de sodium engendrant une dépolarisation de la membrane post-synaptique. Quand la dépolarisation est importante, le potentiel de membrane est suffisant pour permettre l'extrusion de l'ion magnésium bloquant jusqu'alors les récepteurs NMDA. Les récepteurs NMDA ainsi activés permettent une entrée massive de calcium dans la cellule.

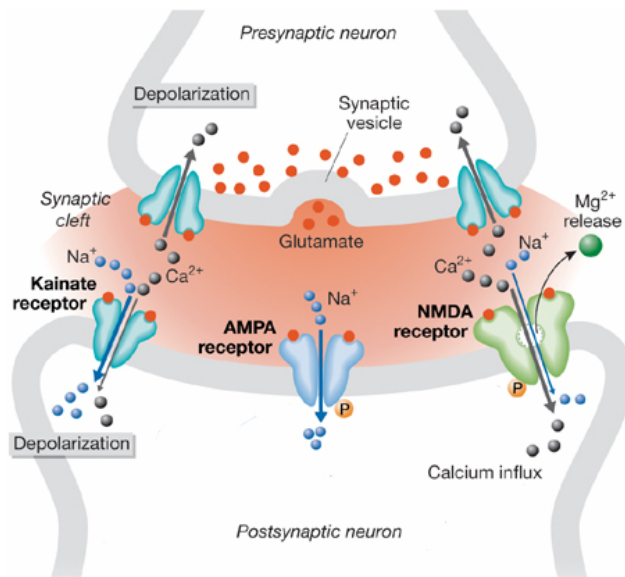


Figure 10 : Récepteurs glutamatergiques

Le glutamate présent dans la fente synaptique se lie à ses récepteurs post-synaptiques. Les récepteurs AMPA et kainate permettent l'entrée de sodium et initie la dépolarisation du neurone post-synaptique. Le potentiel de la membrane modifié par la dépolarisation permet l'extrusion de l'ion magnésium qui bloquait le canal du récepteur NMDA. Le glutamate peut alors activer les récepteurs NMDA et permettre une entrée massive de calcium dans la cellule (D'après (Vogliss and Tavernarakis, 2006)).

La concentration extracellulaire de glutamate est très régulée notamment dans le striatum. Le neurotransmetteur est recapté de la fente synaptique principalement *via* les canaux GLAST (Glial high affinity glutamate transporter) et GLT-1 (Glutamate transporter 1). Le glutamate est alors métabolisé en glutamine dans les astrocytes puis relâché dans le milieu extracellulaire afin d'être recapté par les neurones et reconverti en glutamate. La défaillance d'un de ces événements provoque une élévation de glutamate qui engendre une dérégulation du calcium conduisant à l'excitotoxicité directe. Elle peut être induite artificiellement par des analogues du glutamate tels que l'acide kaïnique, et l'acide quinolinique (QA) (Figure 11).

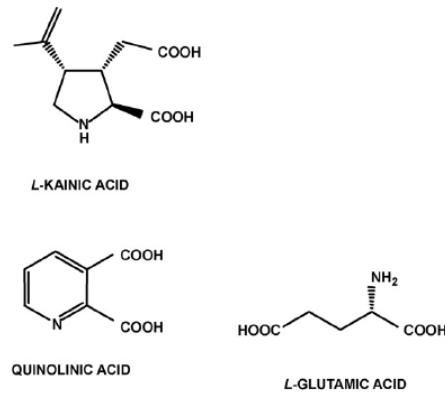


Figure 11: Structures chimiques du glutamate et de ses analogues

L'injection par stéréotaxie d'acide kaïnique dans le striatum de rat produit une lésion affectant les neurones de projections et les interneurons (McGeer and McGeer, 1976). L'injection de QA reproduit mieux les modifications physiologiques de la MH. Le QA induit une dégénérescence préférentielle des neurones GABAergiques en préservant les interneurons et les afférences dopaminergiques chez le rat (Beal et al., 1986) L'injection intrastriatale de QA chez le primate non humain présente les mêmes caractéristiques physio-anatomiques (Hantraye et al., 1990; Schumacher et al., 1992; Ferrante et al., 1993)

Ces études ont permis de pointer le système glutamatergique comme un facteur important dans la MH. Des extraits *post-mortem* de putamen de patients de la MH (pré-symptomatiques et symptomatiques) montrent une diminution de la densité des récepteurs NMDA (Young et al., 1988; Albin et al., 1990).

Les neurones épineux de taille moyenne du striatum expriment majoritairement les récepteurs NMDA de sous type NR1/NR2B (Cepeda et al., 2007). NR1 est le site de fixation de la glycine et NR2B est le site de fixation du glutamate. Le niveau d'expression des transcrits de NR1 et NR2B dans le striatum de modèles animaux de la MH procurent des données contradictoires selon le modèle étudié. Dans les souris R6/2 (Cepeda et al., 2001; Luthi-Carter et al., 2003; Ali and Levine, 2006) et YAC 72 (Li et al., 2003) il n'y a pas de baisse d'expression de NR2B spécifique au striatum alors qu'elle est décrite dans les souris YAC128 (Fan et al., 2007) Les souris transgéniques de la MH (R6/2 et HD100) présentent une modification de la réponse au glutamate et une modification d'activation des récepteurs NMDA (Laforet et al., 2001). Les récepteurs NMDA (NR1/NR2B) dans le contexte de la MH présentent une hyperactivation conduisant à une augmentation

des courants corrélée à une augmentation de la mort cellulaire des neurones du striatum chez la souris YAC72 (Zeron et al., 2001; Zeron et al., 2002). La toxicité observée *via* les récepteurs n'est sans doute pas liée à un défaut de transcription, mais plus vraisemblablement à des modifications d'activité.

Les récepteurs NMDA interagissent avec la protéine de plateforme PSD95 (post-synaptic density protein 95 KDa) qui elle-même interagit avec la htt. PSD95 régule le pool de récepteurs NMDA actifs à la membrane plasmique et le pool de ceux stockés en cluster. L'expansion polyGln de la htt-m diminue son interaction avec PSD95 et accroît celle avec les récepteurs NMDA. Cette modification d'affinité a pour conséquence une recrudescence du nombre de récepteurs à la membrane et donc d'une entrée massive de calcium dans la cellule ce qui augmenterait la mort cellulaire (Sun et al., 2001). Par ailleurs, la phosphorylation du récepteur NMDA qui module la fonction des récepteurs, est régulée par la htt-m (Song et al., 2003).

IV.7.2 Excitotoxicité indirecte

Les patients de la MH présentent dans un stade précoce et pré-symptomatique des défauts métaboliques détectables en TEP imagée en ¹⁸F-FDG. En effet, les patients ont une diminution de la capture de glucose dans le striatum et le cortex qui suggère une baisse d'activité dans ces zones (Garnett et al., 1984; Ciarmiello et al., 2006). À l'opposé, chez les patients non symptomatiques, la concentration de lactate observée par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (NMR) dans le cortex et le striatum semble augmentée avant la dégénérescence (Jenkins et al., 1993). Cette augmentation de lactate est corrélée avec le nombre de CAG du patient (Jenkins et al., 1998).

L'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte repose sur l'action synergique de défauts métaboliques et d'une élévation massive du calcium sur la mort cellulaire dans le striatum.

La mitochondrie

Des analyses *post-mortem* du noyau caudé et du putamen de patients ont démontré des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale avec de sévères diminutions d'activité des complexes II, III et IV. Les sous unités du complexe II, Fp (FAD) et Iron sulfur (Ip), sont fortement diminués *in vitro* et chez les patients

(Benchoua et al., 2006). Les patients symptomatiques présentent une importante diminution de l'activité aconitase dans le noyau caudé et le putamen et une perte du complexe pyruvate déshydrogénase. Ces évidences ont pointé du doigt un désordre métabolique de la mitochondrie dans la MH. De plus, un des modèles de la maladie est l'utilisation de l'acide 3 nitropropionique (3NP), une toxine mitochondriale, bloquant la succinate déshydrogénase (SDH), l'enzyme du complexe II de la chaîne respiratoire responsable de l'oxydation du succinate en fumarate. Le 3NP bloque *in fine* la synthèse d'ATP et par voie de conséquence diminue le potentiel de membrane. L'intoxication chez l'homme par le 3NP produit une nécrose du putamen et crée des dyskinésies (F. He, 1995; Ludolph, 1991). L'administration de 3NP chez le rongeur (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 1995) et le primate non humain (Brouillet et al., 1995) provoque des manifestations cliniques se rapprochant fortement des patients atteints de la MH. La htt-m déprimerait la mitochondrie en énergie et conduirait à sa défaillance.

Le potentiel mitochondrial est négativement modulé par la htt-m. En effet, les mitochondries des souris YAC 72 présentent une perméabilité modifiée au calcium que l'on retrouve aussi dans les lymphoblastes de patients dans la MH (Panov et al., 2002). Les mitochondries de neurones striataux issus des souris Knock In (KI) avec 111 glutamines (Q) présentent une plus grande fréquence d'ouverture des pores augmentant la perméabilité au calcium (Choo et al., 2004) que chez les témoins. Cette sensibilité est aussi observée chez les rats transgéniques de la MH (Pour revue Damiano et al., 2010, Annexe I). La htt-m conduirait la mitochondrie à une mauvaise gestion du calcium.

Une autre voie par laquelle la htt-m pourrait nuire à la fonction mitochondriale est celle *via* PGC-1 α (Peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 α). PGC-1 α est un coactivateur de la transcription, dont les principales cibles sont des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial : le glucose-6-phosphatase (G6Pase), le cytochrome C (Cyt C), l'acyl coenzyme A oxydase (AOX) et l'adénine nucleotide translocator 2 (ANT2). Le PGC-1 α est diminué fortement dans les souris KI109 de la maladie et de 30% dans des extraits *post-mortem* de striatum de patients pré-symptomatiques de la MH (Cui et al., 2006). Cette baisse d'expression dans les souris KI est spécifique des MSN du striatum (Cui et al., 2006). La htt-m pourrait réprimer la transcription de PGC-1 α par son action sur la transcription médiée par CRE.

Des cycles de fusion et fission de mitochondries sont nécessaires pour préserver l'intégrité de la cellule en renouvellement du stock de mitochondries saines. Les protéines régulatrices de ces cycles sont des GTPases appartenant à la famille de la dynamine. Les protéines régulant la fusion chez les mammaliens sont MFN1 (mitofusine 1), MFN2 (mitofusine 2) et OPA1 (optic atrophy protein 1) et les protéines régulant la fission sont DRP1 (dynamin-related protein 1), FIS1 (mitochondrial fission 1) (pour revue (Westermann, 2010)).

Les patients de la MH présentent une perte du nombre de mitochondries. Une diminution de 35 % et 66% de mitochondries est observée respectivement dans le grade 2 et le grade 4 (Kim et al., 2010). Les fibroblastes de patients de la MH présentent un taux élevé de mitochondries fragmentées suggérant une augmentation du processus de fission (Song et al., 2011). Les niveaux d'expression de DRP1 sont considérablement élevés dans le striatum de patients de la MH avec l'avancée de la maladie (Kim et al., 2010). La htt interagit avec DRP1 avec une affinité plus forte en présence de la htt-m. Cette interaction modifie la structure de DRP1 et accroît son activité enzymatique résultant d'une élévation du taux de fission des mitochondries (Song et al., 2011). En parallèle, le processus de fusion est inhibé par une diminution de 70% d'expression de la protéine MFN1 (Kim et al., 2010). La conséquence de ce déséquilibre dans les cycles fusion/fission serait un ralentissement du renouvellement des mitochondries qui déprimerait le neurone en énergie.

Le Récepteur au (1, 4, 5) triphosphate inositol de type 1 (InsP3R1)

Le récepteur au (1, 4, 5) triphosphate inositol de type 1 (InsP3R1) est un canal présent à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) activé par l'inositol trisphosphate (IP3) et libérant du calcium dans la cellule. InsP3R1 est le canal majoritairement présent dans les neurones. L'activité de l'InsP3R1 est diminuée dans les neurones issus de souris modèle de la MH (YAC128 et R6/2) (Tang et al., 2009; Higo et al., 2010). La htt-m est capable de se lier à la partie C-terminale du récepteur (domaine IC10) et facilite son activation (Tang et al., 2003). La surexpression du peptide IC10 dans le striatum de souris YAC128 protège les MSN de l'apoptose induite par un stress glutamatergique en stabilisant la concentration intracellulaire de calcium (Tang et al., 2009). Les souris exprimant ce peptide améliorent leur phénotype moteur et présentent une meilleure survie des neurones (Tang et al., 2009). GRP78 est une protéine présente dans la lumière du RE dont la fonction

pourrait consister à maintenir les sous-unités de l'InsP3R1 ensembles. L'interaction du récepteur avec GRP78 est diminuée dans les souris R6/2. Tang et ses collaborateurs ont montré que la htt-m active directement l'InsP3R1, et que la force d'interaction, et d'activation du canal est dépendante de la présence de HAP1 (Tang et al., 2003). Le déficit fonctionnel de l'InsP3R1 faciliterait la mort cellulaire dépendante de la mitochondrie en modifiant le potentiel membranaire et la gestion du calcium (Higo et al., 2010).

Les défauts mitochondriaux pourraient donc contribuer à la vulnérabilité des neurones du striatum dans la MH.

IV.8 Dégradation et mort cellulaire

IV.8.1 Le système ubiquitine protéasome (UPS)

C'est le principal système de dégradation des protéines chez les eucaryotes. Il permet un contrôle "qualité" des protéines en assurant leur renouvellement et leur dégradation lorsqu'elles présentent un défaut de repliement. La dégradation des polyGln de la htt-m par le protéasome est sujette à controverse. Le domaine polyGln ne pourrait subir qu'un seul clivage après les deux premières glutamines successives (Venkatraman et al., 2004) et ne pourrait donc pas être dégradé. Une autre hypothèse consiste dans le fait qu'un clivage toutes les 10 glutamines est possible permettant ainsi à l'ensemble du domaine d'être entièrement dégradé (Pratt and Rechsteiner, 2008).

L'activité de l'UPS est diminuée dans le cortex, le cervelet, la substance noire, le noyau caudé et le putamen chez les patients de la MH du grade 0 au grade 4 (Seo et al., 2004). Cette observation n'est pas retrouvée dans les modèles murins de la MH (R6/2 et HD94) où le système UPS ne semble pas être modifié (Bett et al., 2006; Diaz-Hernandez et al., 2006). Une première étude de Bence et al., en 2001 suggère que la capacité de la htt-m à s'agréger entraîne l'utilisation du stock d'ubiquitine libre et de protéine chaperonne. De ce fait, la htt-m saturerait le système de dégradation et provoquerait son inhibition (Bence et al., 2001). Pourtant aucune corrélation entre l'agrégation de la htt-m *in vivo* et l'inhibition de l'activité UPS n'a été démontrée. L'action de la htt-m sur le protéasome serait donc une conséquence indirecte de son

gain de fonction toxique en inhibant certaines branches du fonctionnement du système UPS (Bett et al., 2009). La relation entre le protéasome et la htt-m semble être plus complexe que les modèles préétablis.

IV.8.2 Autophagie

L'autophagie regroupe 3 grandes voies de dégradation. La micro-autophagie, l'autophagie par des protéines chaperonnes et la macro-autophagie. La macro-autophagie est couramment appelée autophagie. Elle est la voie majeure de dégradation vacuolaire des macromolécules et des organites des cellules par le lysosome.

mTOR (mammalian target of rapamycin) est une kinase dont l'activité inhibe, de la levure à l'homme, l'autophagie. La rapamycine est un antibiotique qui inhibe de manière spécifique mTOR et promeut l'autophagie. La rapamycine a un effet neuroprotecteur *in vitro* et *in vivo* dans les modèles transgéniques de la MH (Ravikumar et al., 2002; Ravikumar et al., 2004). Le nombre d'agrégats de htt-m est fortement diminué par la rapamycine *in vitro* et chez les drosophiles modèles de la maladie (Ravikumar et al., 2004). Cet effet protecteur de la rapamycine est attribué à l'augmentation de la dégradation de la htt-m par l'UPS. Beclin-1 est une protéine essentielle pour la formation d'autophagosomes et de vacuoles. Son expression est essentielle pour le bon déroulement du processus autophagique. Beclin-1 est séquestrée dans les agrégats de htt-m dans le striatum de patients de la MH (Shibata et al., 2006). Avec l'évolution de la maladie et l'accumulation d'agrégats, la perte de Beclin-1 participerait au dysfonctionnement de l'autophagie.

La htt-m résiste à la dégradation enzymatique par la cathepsine D. Une élévation de l'activité de la cathepsine D a été démontrée dans les patients atteints par la MH (Mantle et al., 1995). À des stades précoces, les autophagosomes arrivent si ce n'est à dégrader, à séquestrer la htt-m. Cela a pour effet de ralentir la formation d'agrégats. Cette hyperactivité des phagolysosomes aurait pour conséquence une libération des protéases lysosomales dans le milieu intracellulaire. Ces protéases endommageraient en partie les organelles (lysosomes, mitochondries) ce qui conduirait à l'activation de l'apoptose et à la mort de la cellule.

IV.8.3 Apoptose

La htt-m subit une protéolyse dans son domaine N-terminal par notamment les caspases, principales protéines effectrices de l'apoptose. Chez les patients atteints de la MH, on note une élévation des niveaux de la caspase 1 (Ona et al., 1999), la caspase 8 (Sanchez et al., 1999) et la caspase 6 (Graham et al., 2010). En effet, le niveau de la caspase 6 activée est très élevé dans les extraits de striatum de patients en stade précoce et pré-symptomatique de la MH et en l'absence d'activation de la caspase 3 (Graham et al., 2010). Le niveau d'activation de la caspase 6 dans le striatum est corrélé avec le nombre de CAG porté par les patients de la MH (Graham et al., 2010). La caspase 6 active serait à l'origine d'un fragment de 586 acides aminés de la htt-m qui pourrait concourir à l'amplification de la cascade d'activation apoptotique. De plus, l'inhibition d'activation des caspases 6 et 3 dans les MSN de souris modèles de la MH (YAC128) diminue la mortalité observée suite à un stress excitotoxique (Graham et al., 2010). La caspase 6 bien que décrite comme une caspase effectrice serait impliquée précocement dans la MH alors que la caspase 3 le serait dans des stades avancés de la maladie (Hermel et al., 2004).

Les mécanismes par lesquels la htt-m peut déclencher l'apoptose sont peu connus. L'état de phosphorylation de la htt-m apparaît être un élément clé de cette régulation. L'Insulin Growth Factor 1 (IGF-1) est un facteur de croissance permettant la prolifération cellulaire. IGF-1 a un effet neuroprotecteur vis-à-vis du striatum dans le modèle excitotoxique du QA de la MH (Alexi et al., 1999; Escartin et al., 2007). Cette protection serait due à l'action d'IGF-1 sur la voie PI3K/Akt. IGF-1 activerait Akt qui irait alors phosphoryler la htt-m sur la sérine 421. Cette phosphorylation diminuerait la capacité de la htt-m à déclencher la caspase apoptotique (Humbert et al., 2002).

V. Modélisation de la MH

Depuis la découverte de la mutation du gène responsable de la MH en 1993, de nombreux modèles génétiques ont été générés à différents niveaux de complexité de *Caenorhabditis elegans* au primate non humain. Les modèles murins sont les plus nombreux et les plus utilisés pour comprendre la physiopathologie de la MH. Chaque modèle développé reproduit en partie les symptômes moteurs, cognitifs et anatomopathologiques de la maladie sans jamais la reproduire exactement. Parmi les très nombreux modèles animaux murins (Annexe II, pour revue (Menalled and Chesselet, 2002), je me focaliserai sur la description du modèle de la souris transgénique BACHD et sur les modèles viraux utilisés dans ce travail de thèse.

V.1 La souris BACHD

La lignée des BACHD exprime le chromosome artificiel bactérien (BAC) contenant la totalité de la htt humaine sous contrôle du promoteur humain de la htt avec des séquences flanquantes d'ADN génomique en 5' et 3' (20kb et 50kb respectivement). L'exon 1 sauvage a été remplacé par l'exon 1 muté contenant 97 CAA-CAG (Gray et al., 2008). La souris BACHD exprime deux allèles murins et un allèle humain de la htt. Deux sites LoxP ont été introduits dans la partie 5' non traduite et dans l'intron 1 en aval de l'exon 1. Ainsi en présence de la recombinaison Cre, l'exon 1 pourra être excisé. Les souris BACHD pourront ainsi être utilisées comme un modèle d'inactivation conditionnelle de la htt (Figure 12).

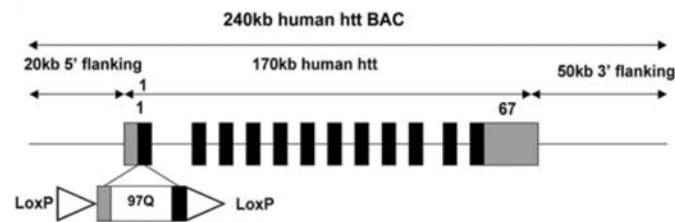


Figure 12: Souris transgénique BACHD

Représentation schématique du chromosome bactérien contenant la forme génomique de la htt humaine. L'exon 1 sauvage a été remplacé par l'exon 1 humain codant une htt-m contenant 97Gln (CAA-CAG). Deux sites LoxP sont positionnés autour de l'exon 1 de la htt-m afin d'être potentiellement excisé par l'action d'une recombinase Cre (Gray et al., 2008).

La répétition des codons CAA-CAG conduit à l'expression d'une série de glutamines (Q) « pure » (Kazantsev et al., 1999) permettant une plus grande stabilité *in vivo*. L'expression de la htt-m dans ces souris est environ 2 fois plus importante que l'expression de la htt sauvage murine. Les souris BACHD présentent dès 2 mois des déficits moteurs (rotarod) s'accroissant avec l'âge. Elles développent entre 6 et 12 mois une atrophie d'environ 30% du striatum et du cortex. Elles développent peu d'agrégats localisés majoritairement dans le neuropile. Les htt-m et sauvage sont peu présentes dans le noyau sous-entendant une transcription peu altérée.

V.2 Transfert de gènes

Généralités

Le transfert de gènes a pour but de faire exprimer une protéine exogène à une cellule pour en comprendre sa fonction ou à des fins thérapeutiques. Les outils à notre disposition pour réaliser un transfert de gènes sont les vecteurs non viraux (cellules souches) et les vecteurs viraux (pour revue). Nous nous intéresserons à la deuxième catégorie. Il existe plusieurs types de vecteurs viraux (Table 2). Le choix du vecteur viral est basé sur la taille du gène à cloner, sur le pouvoir infectieux du vecteur viral, sur le tropisme des cellules infectées et sur sa capacité de diffusion. Les vecteurs viraux utilisés ont subi des modifications génétiques les empêchant de se répliquer (Self inactivating, SIN).

		Spécificité Cellule	Localisation	Taille de clonage	Réponse immunitaire	Dispersion
Lentivirus <i>Famille des Rétrovirus</i>	Virus à ARN Simple brin Avec enveloppe	mitotique et post mitotique	Intégration aléatoire	9 kb	Faible	Faible
Adénovirus <i>Famille des Adénovirus</i>	Virus à ADN Double brin Sans enveloppe	mitotique et post mitotique	Pas d'intégration (épisode)	28 kb	Forte	Forte
AAV (Adeno Associated Viruses) <i>Famille des Parvovirus</i>	Virus à ADN Simple brin Sans enveloppe	mitotique et post mitotique	Intégration sur 1 site	4.7 kb	Faible	Forte

Table 2 : Principaux virus utilisés dans le transfert de gènes dans la MH

D'après "Génétique moléculaire Humaine" de Jack J. Pasternak

Modélisation de la MH

Senut et collaborateurs (Senut et al., 2000) ont réussi à recréer un phénotype proche de la MH par le transfert de gènes en utilisant un virus adéno-associé (AAV) de sérotype 2. L'AAV codant pour l'exon 1 de la htt avec 97Q et la GFP a été injecté dans le striatum de rat. Le transgène est exprimé dès 5 jours post-infection principalement dans les neurones. Un phénomène apoptotique a été observé. La htt-m s'est agrégée sous forme d'inclusions nucléaires et cytoplasmiques visibles dès 12 jours post-infection. Cette étude bien qu'établissant la preuve de concept, n'a pas

permis l'établissement d'un modèle la MH. Un autre modèle de la MH a permis l'insertion de la htt des 400 premiers acides aminés dans un AAV mosaïque 1/8 avec 18Q (htt sauvage) ou 100Q (htt-m) dans le striatum de souris (DiFiglia et al., 2007). Deux semaines après infection, la zone infectée par la forme htt-100Q présentait une dégénérescence correspondante aux neurones du striatum dorsal et des couches 5 et 6 du cortex. Les agrégats de la htt-m ont été détectés dans les noyaux (DiFiglia et al., 2007). D'autres études montrent que l'infection de striatum de rat avec un AAV de sérotype 1/2 contenant l'exon 1 de la htt avec 70Q produit en deux semaines les mêmes caractéristiques observées chez la souris (Franich et al., 2008). Cependant, une dégénérescence atypique du GP et de la SNr ont été observées dans ce modèle (Franich et al., 2008) du fait de la grande capacité de diffusion des AAV.

C'est en 2002 que le transfert de gènes avec des vecteurs lentiviraux exprimant la htt-m a été mis au point (de Almeida et al., 2002). Des fragments codant différentes tailles de la htt-m ont été insérés (171, 853, 1520 acides aminés) associées à différents nombres de glutamines (19, 44, 66, 82 Q) ont été examinés. Deux promoteurs ont été utilisés pour contrôler le niveau d'expression du transgène, à savoir le promoteur de la PhosphoGlycerate Kinase 1 (PGK) de souris et celui du CytoMegalovirus (CMV). Ces vecteurs ont été injectés dans le striatum de rat. Le suivi de l'infection s'est fait sur 24 semaines. La sévérité du phénotype et le début des symptômes sont liés à la taille de la htt clonée et de son nombre de polyGln associée (Figure 13). La htt-m induit une pathologie caractérisée par l'apparition rapide d'agrégats ubiquitinilés dans les prolongements et dans le noyau des neurones. Une perte du marquage DARPP-32 suggère que les neurones GABAergiques deviennent dysfonctionnels puis meurent (perte du marquage NeuN). Les interneurons sont relativement épargnés par le processus dégénératif (Li et al., 2000).

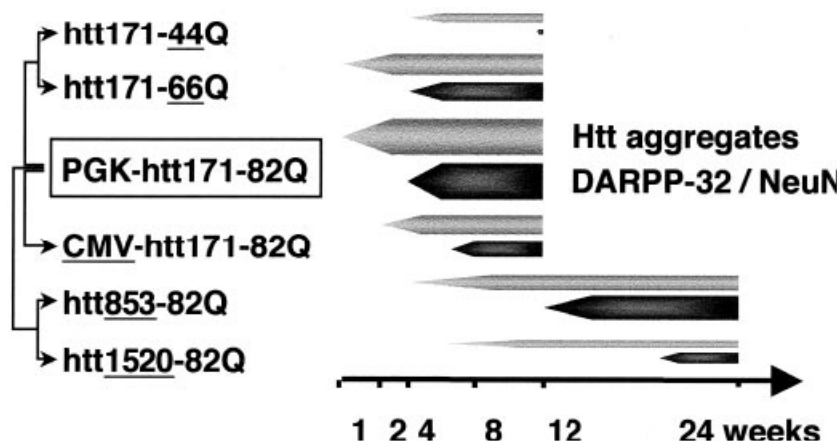


Figure 13 : Récapitulatif de l'évolution de la neuropathologie en fonction des différentes constructions de htt-m utilisés. Les flèches indiquent le début et l'évolution de la pathologie évaluée par le marquage de DARPP-32, de NeuN et de la htt agrégée. L'épaisseur de la flèche indique la sévérité du phénotype observé (de Almeida et al., 2002)

Les caractéristiques de la MH sont observées chez ce modèle lentiviral. La forme PGK-Htt171-82Q conduit au développement rapide et robuste de la maladie. Ce vecteur a depuis été utilisé dans de nombreuses études de la MH (Perrin et al., 2007; Diguët et al., 2009; Perrin et al., 2009; Faideau et al., 2010).

Les vecteurs adénoviraux n'ont été que peu utilisés du fait de leur tendance à déclencher des réactions inflammatoires. La modification de leur génome a permis de les rendre moins immunogènes et d'augmenter leur capacité de clonage. Ces nouveaux adénovirus sont appelés « HC-Ad » pour « High Capacity Adenoviral vector ». La htt pleine longueur a été clonée dans un HC-Ad et injectée dans le striatum de souris (Huang et al., 2008). Seule l'apparition des agrégats a été caractérisée. Deux mois après infection, les cellules infectées présentent des inclusions cytoplasmiques et intranucléaires (Huang et al., 2008).

Les vecteurs lentiviraux

La famille des rétrovirus dont font parti les lentivirus possèdent trois classes de gènes : 1) « gag » code les protéines de structure (matrice, capsid, nucléocapsid); 2) « pol » code les enzymes virales telles que la rétro-transcriptase et l'intégrase; 3) « env » code la glycoprotéine d'enveloppe.

Leur génome contient des séquences *cis*-régulatrices (situées dans le *long terminal repeat*, LTR) nécessaires à son encapsidation (séquence Ψ) et, après infection de la cellule cible, à son intégration dans le génome de l'hôte, à sa rétro-transcription, et à l'expression des trois classes de gènes viraux (*gag*, *pol*, *env*).

Pour ce travail, nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux (LV), c'est-à-dire des lentivirus non-réplicatifs. Plus précisément, nous avons utilisé des vecteurs SIN (*self-inactivating*) qui comportent une délétion du promoteur viral située dans la région 3'LTR (U3). Cette délétion possède un double avantage: 1) elle élimine les éléments transcriptionnels viraux qui risquent d'interférer soit avec le promoteur du transgène, soit avec les gènes voisins du site d'intégration ; 2) elle limite les risques de recombinaison avec un virus sauvage.

Le tropisme des lentivirus est déterminé par la glycoprotéine d'enveloppe, qui se lie aux récepteurs de la cellule cible. Il est possible de modifier le gène « *env* » par le gène d'enveloppe d'un autre virus : on parle de pseudotypage. Pour ce travail, les vecteurs lentiviraux ont été pseudotypés avec la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) qui confère aux vecteurs un fort tropisme neuronal dans le SNC (pour revue (Kafri, 2004)).



Figure 14: Séquence d'un vecteur lentiviral inactivé utilisé dans notre étude

Le site « Att » permet l'intégration du virus dans le génome de l'hôte. La séquence « ψ » est nécessaire à l'encapsidation de l'ARN viral. La séquence RRE (Rev Responsive Element) favorise le transport dans le cytoplasme de l'ARN. Un domaine riche en purine (cPPT, Central polypurine tract) est ajouté pour augmenter la transduction du transgène. Le promoteur ici PGK et le transgène d'intérêt sont insérés. La séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus) est un élément de régulation post-transcriptionnelle qui favorise l'expression du transgène. Pour des raisons de sécurité, la séquence *gag* est délétée ainsi qu'une partie de la séquence 3'LTR (SIN, self inactivating) contenant le promoteur viral pour empêcher sa réplication dans l'hôte.

VI. Vulnérabilité du striatum

Les cellules du striatum expriment de nombreux gènes communs à toutes les cellules du cerveau afin d'assurer leurs différentes fonctions nécessaires à la survie. Cependant de par sa fonction dans les ganglions de la base, le striatum exprime un "pattern" de gènes qui lui est propre. De nombreux transcrits sélectivement exprimés dans le striatum pourraient modifier sa sensibilité vis-à-vis de la htt-m.

VI.1 Dopamine

Le striatum est soumis à un gradient dorso-ventral de concentration de dopamine en provenance de la voie nigro-striatale correspondant au gradient de dégénérescence du striatum observée chez les patients (Vonsattel et al., 1985; Cass, 1997; Vonsattel and DiFiglia, 1998). L'hyperactivation du système dopaminergique induit une perte neuronale dans le striatum (Ricaurte et al., 1982; McLaughlin et al., 1998). Une augmentation de la concentration de dopamine endogène dans les souris KO pour le transporteur à la dopamine (KO^{DAT-/DAT-}) produit une mort cellulaire très élevée dans le striatum de souris transgéniques (Cyr et al., 2006). L'application de dopamine sur des neurones en culture exprimant la htt-m accroît significativement la mort cellulaire et accroît la formation d'agrégats de la htt-m (Charvin et al., 2005; Benchoua et al., 2008)

Les récepteurs D2 sont abondamment présents dans le striatum. La toxicité de la dopamine serait médiée par l'activation des récepteurs D2. L'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs diminue la mort cellulaire observée *in vitro* (Charvin et al., 2005; Charvin et al., 2008). L'activation des D2 par la dopamine conduit à une augmentation de la signalisation JNK/c-jun d'une part (Charvin et al., 2005; Charvin et al., 2008) et d'autre part à une baisse d'expression du complexe II mitochondrial qui potentialise la toxicité de la htt-m (Benchoua et al., 2008).

Les récepteurs D1 participent aussi à la vulnérabilité du striatum. L'activation des D1 par son agoniste (SKF-38393) dans les neuroblastomes humains surexprimant la htt-m (130Q) augmente le nombre d'inclusions intranucléaires et diminue les agrégats cytoplasmiques (Robinson et al., 2008). Les récepteurs D1

semblent être un point de rencontre de la voie dopaminergique et glutamatergique. En effet, les récepteurs D1 sont impliqués dans la toxicité induite par le glutamate chez les neurones en culture issus des souris transgéniques de la MH (YAC128) (Tang et al., 2007). L'utilisation d'agonistes des récepteurs D1 sur les neurones surexprimant la htt-m issus des souris KI "HdhQ111" induit une mortalité qui est plus forte que dans les souris témoins (HdhQ7) (Paoletti et al., 2008). Cette toxicité est amplifiée par l'activation des récepteurs NMDA médiée par la kinase Cdk5 (Paoletti et al., 2008).

VI.2 Le récepteur à l'adénosine de sous type A2A

L'adénosine est une purine. Elle est produite soit par la cellule puis libérée dans la fente synaptique par des canaux spécifiques soit elle résulte de la dégradation de l'ATP. L'adénosine agit *via* les récepteurs purinergiques de type P1 (adénosine) présents sur la membrane extracellulaire. Il existe des sous-types de récepteur P1 l'adénosine : A1, A2A, A2B et les A3. Le récepteur à l'adénosine A2A post-synaptique est fortement exprimé dans le striatum et plus particulièrement dans les MSN (GABA, ENK).

Le récepteur A2A pré-synaptique est exprimé par les projections glutamatergiques corticales projetant au striatum. Ce récepteur est activé par de fortes concentrations extracellulaires d'adénosine. Dans les souris transgéniques de la MH, l'expression du récepteur A2A est fortement diminuée avant l'apparition des symptômes moteurs (Menalled et al., 2000). L'effet protecteur de ce récepteur est observé au niveau pré-synaptique. En effet, le blocage de ces récepteurs diminue la toxicité observée dans les lésions induites par le QA (Popoli et al., 2002) et le 3NP (Blum et al., 2003).

Les récepteurs A2A en position post-synaptique sont liés à un phénomène pro-toxique dans la MH (Pour revue(Popoli et al., 2007)). Les souris transgéniques N171-82Q, dont le gène pour les récepteurs A2A a été invalidé (HD A2A^{-/-}), montrent une légère diminution de leur espérance de vie (-15%), de la taille du striatum (-7%) et une légère aggravation du déficit moteur (Mievis et al., 2011a). Les récepteurs A2A quelque soit leur expression (pré/post-synaptique) pourraient concourir à la toxicité induite par la htt-m dans la MH.

VI.3 Le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1)

Le système endocannabinoïde (ligand, récepteur, enzyme de synthèse) est très exprimé dans différentes régions du cerveau contrôlant l'humeur, la mémoire, la cognition et la coordination motrice. On les retrouve présents dans les ganglions de la base. Le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1) est le principal récepteur aux cannabinoïdes. Les récepteurs CB1 sont particulièrement exprimés en position pré-synaptique des terminaisons des MSN du striatum (Mailleux and Vanderhaeghen, 1992) qui projettent au GP et à la SN. Les CB1 sont aussi présents sur les terminaisons pré-synaptiques des neurones de la voie cortico-striatale. Les récepteurs CB1 modulent la transmission des ganglions de la base en agissant sur la transmission glutamatergique, GABAergique et dopaminergique. Les animaux modèles de la MH (R6/1, R6/2 et HD94), en absence de perte cellulaire et à des étapes pré-symptomatiques de la pathologie, présentent une perte de l'expression des récepteurs CB1 et une perte de fonction des récepteurs restants. Ces phénomènes ont aussi été observés dans des échantillons *post-mortem* de patients à des stades précoces de la maladie (Glass et al., 2000). L'administration d'agonistes des récepteurs CB1 *in vitro* induit une protection vis-à-vis des effets toxiques de la htt-m (Scotter et al., 2010). Les souris transgéniques HD CB1^{-/-} issue de la lignée des souris N171-82Q dont le gène pour les récepteurs CB1 a été invalidé présentent une aggravation du phénotype moteur sans modification anatomique (Mievis et al., 2011b). Une intoxication chronique au 3NP chez les souris HD CB1^{-/-} résulte d'une augmentation de la taille de la lésion et de la sévérité du déficit moteur indépendamment d'une modification différentielle de la SDH (Mievis et al., 2011b). Ces événements précoces dans le développement de la pathologie et en amont de la perte neuronale participeraient à la vulnérabilité des ganglions de la base et plus particulièrement du striatum (Pour revue (Fernandez-Ruiz, 2009).

VI.4 Ras homolog enriched in striatum (Rhes)

Ras homolog enriched in striatum (Rhes) est une petite protéine G enrichie dans le striatum (Vargiu et al., 2001). Elle est ancrée à la membrane plasmique par

farnésylation. Rhes serait localisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Subramaniam et al., 2010). Rhes est un partenaire protéique de la htt. Son affinité pour la htt-m est plus forte que pour la htt sauvage. La surexpression de Rhes diminue le nombre d'agrégats, augmente la quantité de htt-m soluble et la mort cellulaire. Cette toxicité est due à l'activité E3 ligase de Rhes qui est capable d'induire la SUMOylation de la htt-m et ainsi d'en diminuer sa dégradation (Subramaniam et al., 2009). Rhes interagit avec la protéine de l'autophagie, mTOR (Subramaniam et al., 2010). Rhes pourrait être capable de moduler la signalisation dopaminergique (Errico et al., 2008). En effet, il semblerait qu'elle puisse exacerber les effets des agonistes sur les récepteurs D1 en agissant avec AGS1/Dexas1 sur l'AMPC (Harrison and He, 2010). Rhes serait un facteur pro-toxique pour le striatum dans la MH (pour revue Galvan et al; 2010, AnnexIII).

VII. Objectifs des études

Bien que l'expression de la htt-m soit ubiquitaire, le striatum est la première zone affectée dans la MH. L'expression d'un pattern de gènes qui lui est propre pourrait être à l'origine de sa vulnérabilité vis-à-vis de la htt-m. L'identification de ces "marqueurs" du striatum, c'est-à-dire des gènes sélectivement exprimés dans la structure, a été le premier pas pour bien cerner la physiologie du striatum en condition pathologique.

Une étude génomique des différentes régions du cerveau de souris, et validée chez l'homme, a permis d'établir une librairie de gènes particulièrement exprimés dans chaque région par la méthode de Serial Analysis Gene Expression (SAGE) (AnnexeIV). SAGE permet le séquençage de la signature de chaque ARN messager (ARNm) avec une queue de polyadénylation (polyA) et ainsi d'en déterminer son abondance. SAGE est une méthode semi-quantitative, le nombre de fois où la signature de l'ARNm est séquencée dans une région est représentatif de sa « densité » tissulaire. Dans les études sur lesquelles nous nous sommes basés pour ce travail, un gène est considéré comme un « marqueur » d'une région si son expression en SAGE dans cette région est au moins cinq fois plus importante que dans six autres régions du cerveau (de Chaldee et al., 2003; Brochier et al., 2008). La librairie du striatum comprend une centaine de marqueurs parmi lesquels nous en avons sélectionné cinq (Table 3) : 2010001M06rik (St102), μ Crystallin (Crym), Coupled receptor 88 protein (Gpr88), Tmem90a (Capucine) et Dclk3 (de Chaldee et al., 2003; Brochier et al., 2008). Ces cinq transcrits ont un enrichissement striatal (noyau caudé / putamen) conservé chez l'homme. La nature des protéines codées par ces gènes est à inclure comme paramètre du crible afin d'explorer plusieurs fonctions biologiques, et composants cellulaires. Leur fonction de ces transcrits n'est pas à ce jour connue. De plus, leur expression est fortement diminuée dans les modèles de la MH et/ou chez les patients.

Gene symbol	Gene name	Tag sequence	Tag count											Reference	
			Whole brain	Orbital cortex	Prelimbic cortex	Cingulate cortex	Motor cortex	Somato-sensory cortex	Ento-rhinal cortex	Caudate-putamen	Nucleus accumbens	Thalamus	Substantia nigra		Ventral tegmental area
Pde1b (DARPP-32)	phosphodiesterase 1B, Ca ²⁺ -calmodulin dependent	AATAAAGAAG	24	15	9	8	10	13	34	153	64	38	13	6	PMID: 1332068
Penk1	preproenkephalin 1	TGCTGAAAGA	16	6	2	1	1	4	7	122	81	1	0	6	PMID: 6100182
Gpr88	G-protein coupled receptor 88	CCAGTGGAGA	1	0	1	1	1	2	1	53	14	4	0	0	PMID: 11056049
Tmem90a	transmembrane protein 90a	AAGAACTGG	5	0	0	0	0	2	0	26	4	0	1	1	PMID: 16359841
Drd2	dopamine receptor 2	AGTGTGTAGA	0	0	0	0	0	2	0	18	5	0	0	6	PMID: 1833602
Dclk3	doublecortin-like kinase 3	TGAGACTTTG	1	0	0	1	1	5	0	8	5	0	0	1	PMID: 17151600
2010001M06RIK (SH02)	RIKEN cDNA 2010001M06 gene	CAGGGCTTAA	1	0	1	0	0	0	0	5	3	0	0	0	unpublished
Crym	crystallin, mu	TTACTAGTCT	10	5	19	16	3	4	22	26	46	0	0	1	PMID: 12840043

Table 3 : Quantification de l'abondance des transcrits enrichis dans le striatum dans le cerveau de souris. Dans chaque colonne se trouve le nombre de fois où l'étiquette (TAG) du transcrit a été détectée dans la région d'intérêt par la méthode SAGE. DARPP-32, Penk1 et D2R ont été insérés pour relativiser le niveau d'expression (D'après (Brochier et al., 2008)).

VII.1 St102 (2010001M06rik ou Wbscr26)

St102 possède une séquence d'ADN pour laquelle on ne peut pas différencier les introns des exons. Les différentes prédictions de traduction suggèrent que St102 est un ARN non codant. St102 dispose d'une queue de polyadénylation indiquant que c'est un ARN mature. Sa fonction est inconnue. Le gène de St102 se localise dans la région chromosomale 7q11 (Micale et al., 2008). La délétion de cette région est responsable d'une maladie du développement, la maladie de Williams-Beuren. Du fait que St102 soit positionnée aux abords d'une région chromosomique instable, il n'est pas exclu qu'elle puisse être impliquée dans cette pathologie (Micale et al., 2008). St102 est sélectivement exprimée dans le striatum (de Chaldee et al., 2003). Son expression est fortement diminuée (-70%) dans le striatum de souris R6/2 (Brochier et al., 2008).

VII.2 Crystalline μ (Crym)

Crym est une protéine cytosolique qui se lie à une hormone thyroïdienne, la 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T3) de manière dépendante du NADPH. La Crym se dimérise afin de pouvoir fixer deux molécules de NADPH qui permettent l'ouverture du site de capture de la T3 (Suzuki et al., 2007). L'expression stable de la Crym dans une lignée de cellule dérivée de la glande pituitaire (GH3) montre qu'elle permet à la fois d'augmenter de l'influx de la T3 dans les cellules et de diminuer son efflux. La Crym faciliterait donc l'entrée et le transit cytoplasmique de la T3 jusqu'au noyau où la T3 peut agir comme facteur de transactivation. Les souris KO pour la Crym ne présentent pas de modifications significatives de la gestion de la T3 (Suzuki et al., 2007). Les mutations de la Crym, que l'on retrouve chez l'homme, ont pour conséquence une surdité non syndromique (Abe et al., 2003; Oshima et al., 2006). Il s'avère que la Crym est très exprimée dans les fibroblastes de l'oreille interne (Abe et al., 2003; Oshima et al., 2006). Dans le cerveau de rat adulte, Crym est particulièrement exprimée dans le noyau accumbens et le striatum alors que son expression dans la glande pituitaire est modérée (de chaldée 2003). Le noyau accumbens est aussi désigné sous le terme de «striatum ventral ». Il fait partie du système de récompense impliquée notamment dans l'addiction aux drogues.

Crym est une protéine du cristallin, son expression a donc aussi été vérifiée dans la rétine. Son expression dans la rétine est sélective aux cellules en bâtons du segment externe (Segovia et al., 1997). Crym pourrait être impliquée dans la dégénérescence maculaire chez le primate non humain (Umeda et al., 2005).

Il semble cohérent que les fonctions régulées par le NADPH et /ou par la T3 soient affectées par une modification de l'expression de Crym. Le transcrit de Crym est fortement diminuée dans les échantillons de thalamus provenant de patients schizophrènes (Martins-De-Souza et al., 2010). L'expression de la Crym dans les thalamus médiadorsal de patients schizophrènes est négativement corrélée à la durée des traitements médicamenteux et à l'évolution de la maladie. L'expression de Crym est aussi diminuée de 50% dans les souris R6/2 (Brochier et al., 2008) et chez les patients atteints de la MH (Hodges et al., 2006).

VII.3 G coupled receptor 88 protein (Gpr88)

Gpr88 est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à la protéine G (GPCR). Son ligand est inconnu. Gpr88 est sélectivement exprimé dans le striatum (Mizushima et al., 2000; de Chaldee et al., 2003; Lein et al., 2007; Mazarei et al., 2009). La protéine Gpr88 s'exprime suivant un gradient débutant en position dorsolatérale jusqu'en position ventromédiane (Massart et al., 2009). Gpr88 est très fortement exprimé dans les neurones et plus particulièrement dans les MSN exprimant l'enképhaline et la substance P (Cahoy et al., 2008; Massart et al., 2009) et sublocalisé dans les compartiments somatodendritiques (Massart et al., 2009).

Il existe une relation fonctionnelle entre Gpr88 et la voie dopaminergique. La lésion unilatérale des neurones dopaminergiques par la 6-OHDA induit une diminution d'expression de Gpr88 dans les MSN exprimant l'ENK et une augmentation dans les MSN exprimant la SP. L'utilisation d'agonistes des récepteurs D1 et D2 conduit à la modification d'expression de Gpr88 ce qui laisse à penser que la régulation génique de Gpr88 soit sous le contrôle du système (Massart et al., 2009). Les souris KO pour Gpr88 présentent une plus grande sensibilité suite à une activation pharmacologique activant la voie dopaminergique. Ceci serait possiblement dû à une hypersensibilité des récepteurs post-synaptiques D2 (Logue et al., 2009). L'expression de Gpr88 est diminuée dans les souris R6/1 modèle de la MH (Desplats et al., 2006) et chez les patients de la MH (Hodges et al., 2006).

VII.4 Capucine (Tmem90a)

Capucine est une protéine de 237 acides aminés de fonction inconnue. Elle possède 2 domaines transmembranaires. Capucine est très enrichie dans le striatum de souris et de l'homme (de Chaldee et al., 2003; Mazarei et al., 2009). Sa localisation est *cis* - golgienne (de Chaldee et al., 2006). Sa fonction est inconnue. L'expression de Capucine est fortement diminuée dans les cultures de neurones exprimant la htt-m (de Chaldee et al., 2006) et dans les modèles transgéniques de la MH : R6/1 (Desplats et al., 2006) et R6/2 (de Chaldee et al., 2006).

VII.5 Double Cortin Like Kinase 3 (Dclk3)

Dclk3 fait partie de la famille des "Double Cortin Like Kinase" (Ohmae et al., 2006). Les membres de cette famille (Dclk1, 2 et 3) expriment avec plus ou moins d'homologie de séquence, deux domaines spécifiques. 1) Un domaine « Double Cortin » (DC) dans leur partie N-terminale qui leur permettrait leur accrochage aux microtubules. 2) Un domaine kinase dans leur partie C-terminale similaire à la Ca²⁺/calmodulin kinase I/IV (CaMK I/IV). Dclk3 a la plus faible homologie pour le domaine DC. Dclk3 est une protéine de fonction inconnue. Dclk3 est préférentiellement exprimée dans le striatum (de Chaldee et al., 2003; Lein et al., 2007)

La déafférentation dopaminergique par le MPTP chez les souris conduit à une induction de son expression (Brochier et al., 2008). Son expression a tendance à être diminuée dans les souris R6/2 (Brochier et al., 2008).

VII.6 Paradigme expérimental

BACHD

L'expression des ARNm des marqueurs striataux choisis a été vérifiée par qPCR chez des souris BACHD âgées de 6 mois. L'expression d'autres marqueurs striataux tels que la préproenképhaline (penk1) est fortement réprimée alors que celle de la « Purkinje cell protein 4 » (Pcp4) n'est pas modifiée. L'expression des marqueurs choisis est significativement diminuée (résultats non publiés) à l'exception de Dclk3 et St102 dès 6 mois (Figure 15).

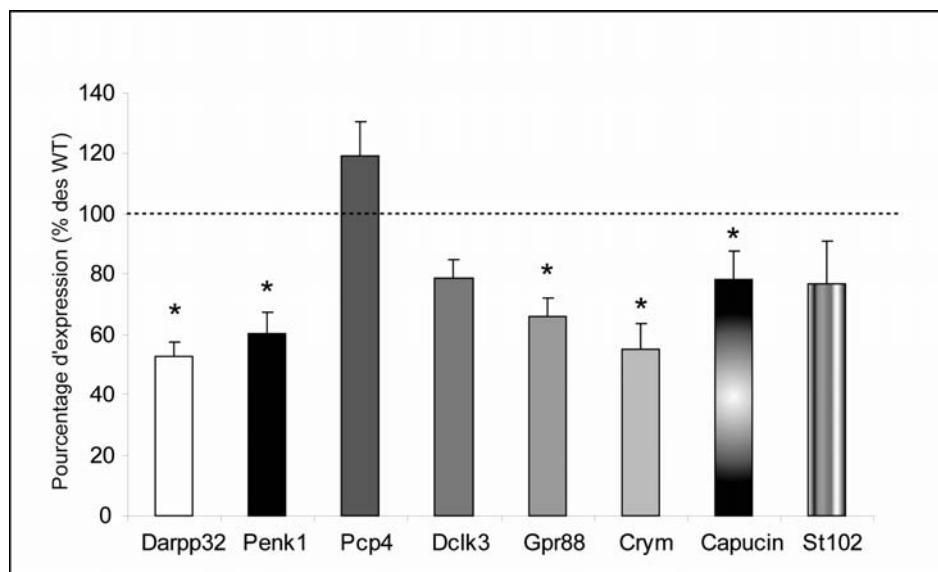


Figure 15: Diminution des transcrits des marqueurs sélectionnés dans le striatum de souris BACHD âgées de 6 mois. L'expression des marqueurs dans les

BACHD (n=5) est exprimée en pourcentage de leur niveau d'expression dans le striatum de souris non transgéniques témoins du même âge (n=5). Des marqueurs connus du striatum comme DARPP-32 et Penk-1 sont réprimés tandis que Pcp4 n'est pas modifié. Gpr88, Crym et Capucine sont significativement diminués. Dclk3 et St102 ont tendance à être réprimés. * Student t test, $P < 0.005$.

Marqueur du striatum adulte

Les transcrits de Capucin, Crym, Dclk3, Gpr88 et St102 ont été identifiés dans le striatum adulte de souris. Nous avons vérifié leur expression dans les neurones du striatum en culture issus d'embryons de rat (E14.5). Ces gènes n'ont pas été détectés dans les extraits de neurones issus de culture de DIV 7 à DIV 28 (résultats non montrés). Le traitement des cultures par des facteurs de différenciation neuronale tels que BDNF (50ng/ml), IGF-1 (50ng/ml) et CNTF (50ng/ml) n'a pas permis d'induire l'expression des marqueurs évaluée par qPCR. Ces gènes pourraient n'être exprimés que dans le striatum en développement ou adulte. Nous avons étudié l'expression des marqueurs choisis dans le striatum de rat Wistar de la naissance (P1) au jeune adulte (P35) en PCRq (résultats obtenus en Master). Les décours temporels montrent que l'expression des marqueurs à l'exception de St102, augmente *in vivo*, après la naissance pour atteindre un maximum à l'âge adulte. St102 est détectable dès P1. Son induction semble se situer entre E14.5 et P1

(Figure16). L'ensemble des marqueurs présente un pic d'expression à P28 qui se situe dans la période du sevrage.

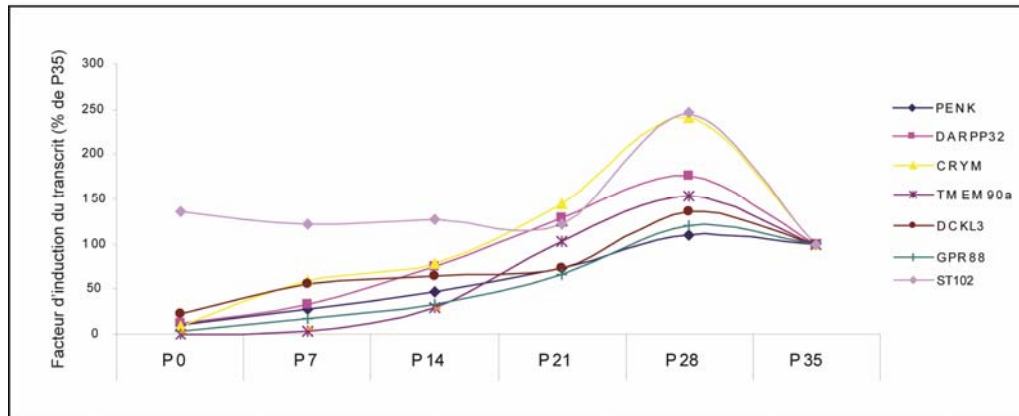


Figure 16 : Décours d'expression temporel des ARNm des marqueurs du striatum *in vivo* chez le rat. Les extraits de striatum des ratons de P0 (jour de la naissance) à P35 (J35) ont été analysés par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont exprimés en fonction de l'âge des animaux (en jour) et du facteur d'induction (%). Le facteur d'induction est le pourcentage d'augmentation d'expression d'un gène normalisé par PPIA (peptidylprolyl isomerase A) dans une condition par rapport à son taux d'expression contrôle chez l'adulte P35 (100%).

Suite à ces observations, nous avons privilégié l'étude des cinq marqueurs du striatum dans le contexte de la MH chez l'animal adulte.

Modèle lentiviral de la MH

Les marqueurs ont été clonés et insérés dans des vecteurs lentiviraux sous promoteur PGK afin d'être surexprimés. Des shRNA dirigés contre chaque marqueur ont été conçus et insérés dans des vecteurs lentiviraux sous le promoteur PGK (Annexe V). L'efficacité et la validité de ces constructions ont été testées et validées *in vivo*. Le vecteur témoin pour les expériences de surexpression est le vecteur codant pour la β galactosidase (LV-LacZ) et celui pour les expériences d'inactivation est le vecteur codant pour le shRNA dirigée contre la luciférase (LV-shLuc), une protéine non exprimée chez les mammifères. Nous avons injecté par stéréotaxie

dans le striatum de souris C57Bl6 des combinaisons de vecteurs suivant le protocole expérimental décrit en Figure 17. La toxicité intrinsèque des vecteurs lentiviraux codant les protéines étudiées (Crym, St102, Dclk3, Capucine et Gpr88) ou les shRNA correspondant a été étudiée après l'injection des différents vecteurs (100ng de P24/ μ L). Les effets modificateurs de ces protéines vis-à-vis de la toxicité de la htt-m ont été évalués en les injectant avec le LV-Htt171-82Q (Htt82Q). Les vecteurs permettant la surexpression ou l'inactivation de ces marqueurs ont été comparés aux effets du vecteur contrôle codant soit la β galactosidase (LacZ) (témoin de surexpression) soit le shRNA contre la luciférase (Luc) (témoin d'inactivation).

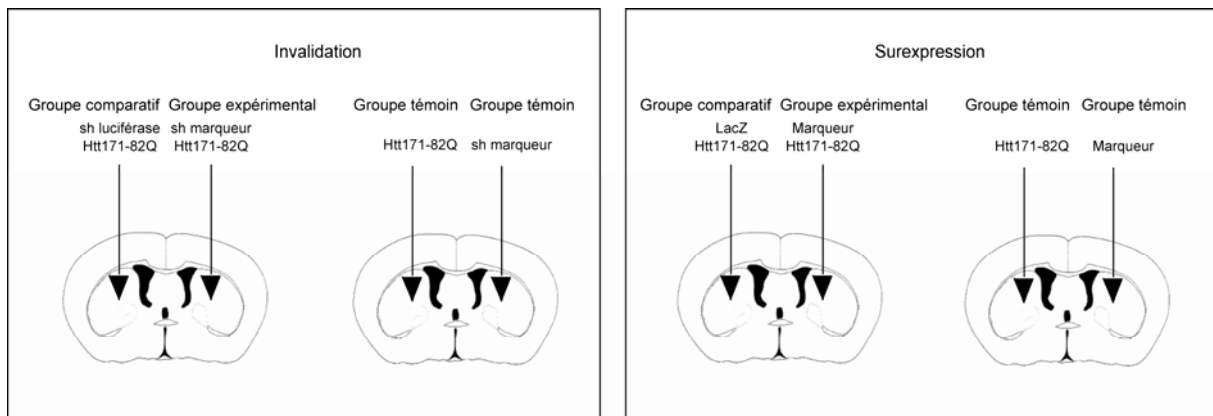


Figure 17 : Protocole expérimental du modèle lentiviral de la MH.

Un délai de six semaines post infection a été respecté afin de permettre une bonne expression des transgènes. Dans tous les cas, les quantités totales de particules virales sont similaires (total de 250ng de 24/ μ L, 2 μ L). À l'issue des 6 semaines, les cerveaux ont été analysés par histochimie de la COX et en ICH pour NeuN, DARPP-32 et ubiquitine.

ARTICLES

In vivo assessment of Capucin as a potential modifier of mutant Huntingtin toxicity

Laurie Galvan^{1,2}, Naďa Lepejov³, Marie-Claude Gaillard^{1,2}, Carole Malgorn^{1,2}, Martine Guillermier^{1,2}, Diane Houitte^{1,2}, Fanny Petit^{1,2}, Noëlle Dufour^{1,2}, Patrick H ry³, Matthieu G rard³, Jean-Marc Elalouf³, Nicole D glon^{1,2}, Emmanuel Brouillet^{1,2} and Michel de Chald e³

¹CEA, DSV, I²BM, Molecular Imaging Research Center (MIRCen), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France ²CNRS CEA URA 2210, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

³CEA, iBiTecS, Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire (SBIGeM), F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Correspondence should be addressed to E.B. (emmanuel.brouillet@cea.fr) or M.d.C. (michel.de.chaldee@cea.fr).

E.B. and M.d.C. were co-PIs for this work.

Correspondence: Emmanuel Brouillet, URA CEA-CNRS 2210, MIRCen, I²BM, CEA, 18 route du Panorama, BP 6, 92265 Fontenay-aux-Roses, France. Telephone: +33 1 4654 9622. Fax: +33 1 4654 9116. E-mail: emmanuel.brouillet@cea.fr; Michel de Chaldée, iBiTecS, SBIGeM, Btiment 144, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France. Telephone: +33 1 6908 8865. Fax: +33 1 6908 4712. E-mail: michel.de.chaldee@cea.fr

Short title: Influence of Capucin on mutant Huntingtin toxicity

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is caused by a mutation in the ubiquitously expressed Huntingtin gene. The mechanisms underlying the preferential vulnerability of striatal neurons to mutant Huntingtin (mHtt) are unknown. One hypothesis is that genes selectively expressed in the striatum may be involved. We have previously shown that the expression of the Capucin (or Tmem90a) gene, which encodes a protein of unknown function, is enriched in the striatum and downregulated in HD models. Here, we investigated whether perturbations of Capucin expression in the mouse striatum could modify the neurotoxicity induced by intrastriatal injection of a lentiviral vector encoding a short N-terminal fragment of mHtt. To this end, we engineered a Capucin knockout mouse line and developed a lentiviral vector for the intrastriatal shRNA-mediated knockdown of Capucin expression. Constitutive Capucin deficiency in knockout mice did not induce major anatomical abnormalities in the striatum or significantly modify the toxicity of the mHtt fragment *in vivo*. In contrast, shRNA-knockdown of Capucin expression in the adult wild-type striatum significantly enhanced vulnerability to the mHtt fragment. Lentiviral expression of recombinant Capucin in the adult wild-type striatum had no marked effects. These results suggest that striatal expression levels of Capucin have a limited impact on mHtt toxicity.

Keywords: Huntington's disease, basal ganglia, Capucin, striatal marker, neurodegeneration, lentiviral vector, KO mice.

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is a fatal neurodegenerative disorder with no effective treatment. It is caused by the expansion of a polyglutamine-encoding CAG repeat in the Huntingtin (Htt) gene (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Polyglutamine expansion confers toxicity on Htt, leading to a severe disturbance of major cellular functions, including transcription, protein degradation, mitochondrial energy production, calcium homeostasis and neurotransmission (Gil and Rego, 2008). The resulting mutant Huntingtin (mHtt) can aggregate, forming Ubiquitin-positive intranuclear inclusions in affected neurons (DiFiglia et al., 1997). Although mHtt is ubiquitously expressed in the brain, the most prominent neuronal loss occurs in the striatum, a structure that plays a key role in movement initiation and cognitive functions (Vonsattel et al., 1985). This particular vulnerability may be conferred by factors that are enriched in the striatum, such as the GTP-binding protein Rhes, which has been shown to bind to mHtt and promote its cytotoxicity (Subramaniam et al., 2009), and D2 dopamine receptors, whose stimulation has been reported to increase neuronal sensitivity to mHtt by downregulating mitochondrial complex II expression (Charvin et al., 2005; Benchoua et al., 2008).

Other factors that are enriched in the striatum may also modulate the sensitivity of striatal neurons to mHtt and thereby provide novel perspectives for HD therapy. Recently, we compared the transcriptomes of 11 regions of the mouse brain and found ~100 genes that are preferentially expressed in the striatum (Brochier et al., 2008). Among them, the expression of the Capucin gene (also referred to as *Tmem90a*) is highly enriched in the striatum. Capucin is a 237-amino-acid protein of unknown function, with no recognizable motif other than two predicted carboxy-terminal transmembrane domains. The heterologous expression of the tagged protein in cultured cells indicates a *cis*-Golgi localization, irrespective of the cell line, the tag or its position relative to the protein. Notably, lower Capucin mRNA levels have been detected in the R6/2 transgenic mouse model of HD and in primary cultures of rat striatal neurons expressing a mutant fragment of human Htt than in the corresponding controls (de Chaldée et al., 2006). The same observation has been

made in the R6/1 transgenic mouse model (Desplats et al., 2006), suggesting a possible contribution of Capucin downregulation to the pathogenesis of HD.

In the present study, we examined whether perturbations in Capucin expression could modify striatal vulnerability to mHtt in mice. For this purpose, we used a model of mHtt toxicity originally developed in rats (de Almeida et al., 2002), in which a lentiviral vector encoding a short N-terminal fragment of human Htt containing either 82 (mutant) or 18 (wild-type) glutamine residues is injected into the striatum of mice (Faideau et al., 2010). Different approaches were used to disturb Capucin expression: knockout in mice, lentivirus-mediated intrastriatal shRNA-knockdown and lentivirus-mediated intrastriatal expression. To achieve a Capucin knockout, we engineered a novel mouse line that is described in the present paper. For each approach, striatal vulnerability was assessed by histological evaluation: both the volume of the lesion induced by the mHtt fragment and the density of Ubiquitin-positive inclusions were quantified.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male C57BL/6J mice (25 g each; Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) and adult male Capucin knockout mice (generated as described below) were used for lentiviral infections. Animals were housed in a temperature-controlled room maintained on a 12 hr light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. All experiments on mice were supervised by an investigator licensed by the Ministère de l'Agriculture, in conformity with French regulations and in strict accordance with the recommendations of the European Commission (86/609/EEC) concerning the care and use of laboratory animals.

Generation and genotyping of Capucin knockout mice

A 2,820-bp-long genomic fragment (nucleotides 86,018,915 to 86,021,734 on mouse chromosome 12) encompassing the entire Capucin coding region was replaced by a cassette containing the beta-galactosidase reporter gene (**Fig. 1a**) through homologous recombination in AT1 ES cells (Buchou et al., 2003), according to established procedures (Tessarollo et al., 2001). Homozygous knockout mice and wild-type littermates were obtained on a mixed (25 % 129, 75 % C57BL/6N) background. Expression of the reporter gene was visualized by X-Gal staining according to standard protocols.

For genotyping, we developed a fast and convenient multiplex PCR assay using three primers (forward: 5' CCTGCCTGCGGAACCAT 3'; knockout reverse: 5' TGGGTAACGCCAGGGTTTT 3'; wild-type reverse: 5' GGCAGCAGTGGGTTCTGT 3') and two TaqMan probes (Life Technologies, Carlsbad, CA) labeled with distinct dyes (knockout probe: VIC-ATCCCGTCGTTTTACAACG-MGBNFQ; wild-type probe: 6FAM-AGAGCCTGAGTGAAC-MGBNFQ). Amplification occurs from the forward and knockout reverse primers for the knockout allele, and from the forward and wild-type reverse primers for the wild-type allele, yielding, respectively, a 68-bp-long product detected by the knockout probe and a 53-bp-long product detected by the wild-type

probe. PCR was performed in a volume of 20 μ l containing 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies), 500 nM forward primer, 400 nM knockout reverse primer, 400 nM wild-type reverse primer, 200 nM knockout probe, 200 nM wild-type probe and 30-40 ng of tail genomic DNA. Fluorescence was directly detected by an ABI prism 7300 or 7000 thermal cycler (Life Technologies) programmed for an initial incubation at 50 °C for 2 min, followed by 95 °C for 10 min, and 35 amplification cycles (95 °C for 15 sec; 60 °C for 1 min). Each individual was genotyped in duplicate.

Lentiviral vector construction, production and infection

DNA sequences coding for GFP and for C-terminal HA-tagged mouse Capucin were cloned into the SIN-W-PGK lentiviral vector (de Almeida et al., 2002) to generate LV-GFP and LV-Capucin-HA, respectively. A Capucin-directed shRNA (target sequence: 5' GAGAGCCTGAGTGA ACTA 3') and a Luciferase-targeted shRNA (target sequence: 5' CGTACGCGGAATACTTCGA 3') were cloned into a bicistronic lentiviral vector (Drouet et al., 2009), in such a way that the infected cells expressed the reporter protein GFP. The resulting constructs were designated as LV-Capucin-shRNA and LV-Luc-shRNA, respectively. LV-Htt171-82Q, LV-Htt171-18Q (Faideau et al., 2010) and the lentiviral vector expressing beta-galactosidase (LV- β gal) (Diguët et al., 2009) have been described previously. Viral particles were produced as described elsewhere (Hottinger et al., 2000). The particle content of the viral batches was determined by ELISA for the p24 antigen (Gentaur, Paris, France). LV-Htt171-82Q and LV-Htt171-18Q were used at a concentration of 150 ng/ μ l of p24, LV-Capucin-HA, LV-Capucin-shRNA, LV-Luc-shRNA and LV- β gal at a concentration of 100 ng/ μ l of p24, and LV-GFP at a concentration of 50 ng/ μ l of p24. A total volume of 2 μ l of lentiviral suspension was injected into the mouse striatum as previously reported (Faideau et al., 2010), using the following stereotaxic coordinates: 1.0 mm anterior and 2.0 mm lateral to the bregma, at a depth of 2.7 mm from the dura, with the tooth bar set at 0.0 mm.

Histological analyses

After deep anesthesia by intraperitoneal injection of a sodium pentobarbital solution (50 µg per gram of body weight), mice were transcardially perfused with 100 ml of phosphate buffer containing 4 % paraformaldehyde at 8 ml/min. The brains were removed, post-fixed overnight in the same solution, then cryoprotected by immersion in a 15 % sucrose solution for 24 hours followed by immersion in a 30 % sucrose solution for another 24 hours. Free-floating 30-µm-thick serial coronal sections throughout the striatum were collected using a freezing sliding microtome (SM2400; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

For immunohistochemistry, sections were treated with 0.3 % hydrogen peroxide for one hour, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), blocked in PBS containing 4.5 % normal goat serum for one hour, then incubated overnight at 4°C in PBS containing 3 % normal goat serum and one of the following antibodies: rabbit anti-DARPP-32 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:1000), mouse anti-NeuN (Millipore, Molsheim, France; 1:200), rabbit anti-Ubiquitin (Wako Chemicals, Neuss, Germany; 1:1000), or mouse anti-HA (Covance, Princeton, NJ; 1:500). Sections were rinsed three times in PBS before incubation with the appropriate anti-IgG biotinylated antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) at a 1:5000 dilution for one hour. Staining was visualized by the addition of avidin-biotinylated peroxidase (Vector Laboratories) and incubation with DAB or VIP substrate (Vector Laboratories) for one minute. For NeuN immunostaining, we used the M.O.M. immunodetection kit (Vector Laboratories). Stained sections were mounted on microscopic slides.

The area of the striatal lesions resulting from LV-Htt171-82Q infection was delineated manually by identifying the border of the lesion on each coronal brain section. The corresponding surface was calculated using the MCID image analysis software (InterFocus Imaging, Cambridge, UK). The volume of the striatal lesion was determined using the Cavalieri method (Diguët et al., 2009). The number of Ubiquitin-positive inclusions was quantified as previously described (Diguët et al., 2009) with the following modifications: the inter-section distance was 210 µm (i.e. one in every seven sections was used) and observations were performed using a 10X objective on

an Axioplan 2 Imaging microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). With this set-up, objects with an apparent cross-sectional area of over $5\ \mu\text{m}^2$ could be reliably detected.

For GFP fluorescence analysis, equidistant 30- μm -thick coronal brain sections (intersection distance: 210 μm) were randomly sampled throughout the striatum. Observations were performed using a 10X objective on a motorized Axioplan 2 Imaging microscope (Carl Zeiss) equipped with an X-Cite 120PC Q fluorescence excitation system (Lumen Dynamics, Mississauga, Canada) allowing controlled excitation intensity and homogeneity throughout the field of view. Images were automatically acquired and analyzed using Fluo'Up and Mercator softwares (Explora Nova, La Rochelle, France). Care was taken to optimize image acquisition and avoid image saturation. On each section, the fluorescence level of each LV-GFP-infected striatum was determined by subtracting the background fluorescence level measured outside the infection site from the mean fluorescence level within the infected area. A mean fluorescence level was then calculated across sections for each striatum.

qRT-PCR and Northern blot analysis

Adult mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of a sodium pentobarbital solution (50 μg per gram of body weight) before decapitation. The brains were immediately removed and positioned in a coronal brain matrix (Ted Pella, Redding, CA). For Capucin mRNA level measurements in knockdown experiments, 1-mm-thick brain sections were examined under a fluorescence microscope (DM6000 M; Leica Microsystems) and the striatal area expressing the GFP reporter protein was sampled using a 1.5-mm-diameter punch (Ted Pella). For the quantification of Tmem90b mRNA levels in knockout mice, the striatum was dissected out using a scalpel from 1-mm-thick brain sections. Total RNA extraction and qRT-PCR were carried out according to standard procedures, using the primers 5' GAGGAGGAGAGCGATGGG 3' and 5' CAGGGTGAGGAAGGCGTC 3' for Capucin, and 5' GTTGCCCTCATTGCCTACCT 3' and 5' TGTCTCTTCTCTGCCCTCGTACA 3' for Tmem90b. For Northern blot analysis, a 5-mm-thick block containing the entire striatum (between grooves 3 and 8 of the matrix, groove 1 being the most anterior (Brochier et al., 2008) was removed from

each brain and processed for mRNA extraction. Twenty-five-microgram total RNA samples were denatured in a glyoxal-dimethylsulfoxide solution, electrophoresed on a 1 % agarose gel, and then transferred onto a Hybond-XL nylon membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Hybridization was carried out at 65°C in Rapid-Hyb buffer (GE Healthcare) using an [α -³²P]dCTP random prime-labeled (Prime-It II; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 706-bp-long *Nco* I fragment of the Capucin transcribed DNA sequence as a probe (**Fig. 1a**). An [α -³²P]dCTP random prime-labeled 554-bp-long *Nco* I fragment of the striatally enriched Phactr1 transcribed DNA sequence (de Chaldée et al.,2006, Allen et al.,2004) was used to control for RNA input.

RESULTS

Development of a Capucin knockout mouse line

To create a new resource for studying Capucin function, we developed a Capucin knockout mouse line. Homozygous knockout mice were obtained at a similar ratio to homozygous wild-type littermates (of the 715 mice genotyped so far 159 were homozygous knockout mice, 171 were homozygous wild-type mice and 385 were heterozygous mice). Knockout mice are apparently healthy and their behavior is normal at the gross level. Both males and females are fertile. The brain shows no overt anatomical abnormalities. In particular, morphometric analysis indicates a striatal volume similar to that of wild-type littermates ($6.152 \pm 0.310 \text{ mm}^3$ in knockout mice, $6.413 \pm 0.334 \text{ mm}^3$ in wild-type littermates; $n = 10$ knockout and 10 wild-type adult mice). Knockout mice lack the entire coding region of the Capucin gene (**Fig. 1a**). The absence of transcripts containing even a part of the Capucin coding region in the striatum of knockout mice was confirmed by Northern blot analysis using the coding sequence as a probe (**Fig. 1b**). To assess whether the lack of a conspicuous phenotype could be attributable to sequence redundancy, we measured striatal mRNA levels of Tmem90b, the closest paralog of Capucin (45 % amino-acid identity) (de Chaldée et al., 2006), using real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). No significant difference was observed between genotypes (Tmem90b mRNA levels in Capucin-knockout striata were 88.1 ± 10.7 % of those in wild-type samples; $P = 0.209$, unpaired Student's *t*-test, $n = 7$ knockout and 7 wild-type mice), arguing against functional compensation of Capucin deficiency by Tmem90b overexpression.

We took advantage of the beta-galactosidase transgene to investigate the spatiotemporal pattern of expression driven by the Capucin gene promoter. As expected, X-Gal staining was intense in the striatum of adult knockout animals (**Fig. 1c**). During development, X-Gal staining was first observed in the medulla oblongata of 15.5 dpc (days post-coitum) embryos, and in the olfactory bulbs and discrete regions of the diencephalon, mesencephalon and rhombencephalon of 16.5 dpc embryos, predicting Capucin gene expression in nuclei of the adult thalamus, midbrain and hindbrain, in particular in the trigeminal, facial and hypoglossal nuclei (de Chaldée et al., 2006; Lein et al., 2007). Staining in the striatum was first clearly

detected five days after birth. We also examined adult peripheral tissues and observed stained patches in the pancreas. We therefore measured serum concentrations of glucose in adult knockout mice (n = 22) and wild-type littermates (n = 24) after a six-hour fast but found no difference between genotypes (1.38 ± 0.09 g/l in knockout mice, 1.41 ± 0.10 g/l in wild-type littermates), arguing against a major role of Capucin in the endocrine function of the pancreas.

Effect of Capucin knockout on striatal vulnerability to a mutant Htt fragment *in vivo*

Adult Capucin knockout mice and wild-type littermates were intrastrially injected with a mixed suspension of lentiviral vectors encoding a wild-type or mutant Htt fragment (LV-Htt171-18Q or LV-Htt171-82Q, respectively) and green fluorescent protein (GFP; LV-GFP). GFP fluorescence was used to monitor neuronal survival, as loss of fluorescence has been shown to be correlated with neuronal death (Arrasate and Finkbeiner, 2005). Histological evaluation was performed six weeks post-infection. At this time point, GFP fluorescence was much fainter in LV-Htt171-82Q- than in LV-Htt171-18Q-infected striata (**Fig. 2a**), consistent with the expected toxicity of the mHtt fragment. Immunostaining for DARPP-32, a well-known marker of striatal neurons, and for NeuN, a widely used neuronal marker, revealed the presence of a lesion around the injection site in LV-Htt171-82Q- but not in LV-Htt171-18Q-infected striata (**Figs. 2b,c; 4a,b and 5b,c**). Brain sections were also examined for Ubiquitin-positive inclusions. They were detected in LV-Htt171-82Q- but not in LV-Htt171-18Q-infected striata (**Figs. 2d, 4c and 5d**).

Comparison between knockout and wild-type LV-Htt171-82Q-infected striata indicated a trend towards a more severe loss of fluorescence in knockout striata, although this difference did not reach statistical significance (**Fig. 2a**). In line with this observation, the lesion volume, as determined by DARPP-32 (**Fig. 2b**) and NeuN (**Fig. 2c**) immunostaining, was not significantly different between knockout and wild-type striata. No significant difference in the density of Ubiquitin-positive inclusions was detected between genotypes (**Fig. 2d**). To test whether the re-expression of Capucin in knockout striata could modify vulnerability to mHtt, we injected a mixed suspension of LV-Htt171-82Q and a lentiviral vector encoding hemagglutinin-tagged

Capucin (LV-Capucin-HA) into the striata of knockout mice. Six weeks after infection, recombinant Capucin expression was verified in all LV-Capucin-HA-infected striata using anti-HA immunohistochemistry (**Fig. 3a**). DARPP-32 (**Fig. 3b**) and NeuN (**Fig. 3c**) immunostaining revealed no significant difference in lesion volumes between LV-Capucin-HA- and LV-GFP-infected knockout striata. No difference in the density of Ubiquitin-positive inclusions could be detected either (**Fig. 3d**).

Effect of lentivirus-mediated Capucin shRNA-knockdown on striatal vulnerability to a mutant Htt fragment *in vivo*

Since non-significant trends in Capucin knockout mice could result from compensatory mechanisms during brain development and maturation, we investigated the effect of a Capucin knockdown in the adult striatum on vulnerability to a mutant Htt fragment. The knockdown of Capucin expression in mouse striata was achieved by stereotaxic injection of a lentiviral vector expressing a Capucin-targeted shRNA (LV-Capucin-shRNA). Knockdown efficiency was measured six weeks post-infection by qRT-PCR. The results show that endogenous Capucin mRNA levels in extracts from LV-Capucin-shRNA-infected striata ($n = 5$) are 9.2 ± 2.0 % of those in extracts from striata infected with a lentiviral vector expressing a Luciferase-targeted shRNA (LV-Luc-shRNA; $n = 5$). This difference is statistically significant ($P = 0.017$, unpaired Student's *t*-test).

A mixed suspension of LV-Capucin-shRNA and LV-Htt171-82Q was injected into the striatum of wild-type mice. Histological evaluation performed six weeks post-infection revealed that the lesion volume, as estimated by DARPP-32 immunostaining, was significantly larger in striata infected with LV-Capucin-shRNA than in striata infected with LV-Luc-shRNA (**Fig. 4a**), suggesting that the Capucin knockdown may exacerbate the striatal dysfunction or degeneration induced by the mHtt fragment. However, NeuN immunostaining showed no significant difference in lesion volumes between LV-Capucin-shRNA- and LV-Luc-shRNA-infected striata (**Fig. 4b**), indicating that the Capucin knockdown had no effect on actual cell death. Despite a trend towards a higher density of Ubiquitin-positive inclusions in LV-Capucin-shRNA-infected striata as compared to LV-Luc-shRNA-infected controls, this difference did not reach statistical significance (**Fig. 4c**).

Effect of lentivirus-mediated Capucin expression on striatal vulnerability to a mutant Htt fragment *in vivo*

We next delivered a mixture of LV-Htt171-82Q and LV-Capucin-HA into the striatum of wild-type mice. Expression of recombinant Capucin in the striatum of infected mice was checked six weeks post-infection by anti-HA immunohistochemistry (**Fig. 5a**). At this time point, neither DARPP-32 (**Fig. 5b**) nor NeuN (**Fig. 5c**) immunostaining revealed any significant change in lesion volume in LV-HA-Capucin-infected striata as compared to striata infected with a beta-galactosidase-encoding lentiviral vector (LV- β gal). Notably though, the density of Ubiquitin-positive inclusions was significantly lower in LV-Capucin-HA-infected striata (**Fig. 5d**), suggesting that enhanced Capucin expression may promote the elimination of the mHtt fragment or mitigate its accumulation.

DISCUSSION

The mechanisms underlying the preferential degeneration of the striatum in HD remain unknown. Using a combination of *in vivo* approaches (knockout mice; intrastriatal shRNA-mediated knockdown or expression using lentiviral vectors), we tested the hypothesis that the Capucin gene, whose expression is highly enriched in the striatum and downregulated in transgenic HD models (de Chaldée et al., 2006), may play a role in the striatal sensitivity to mHtt.

Our results suggest that the shRNA-mediated knockdown of Capucin expression in the adult mouse striatum can exacerbate the lesion induced by a mutant Htt fragment, as indicated by DARPP-32 but not NeuN immunostaining. A trend towards a higher density of Ubiquitin-containing inclusions, although not significant, was also observed. The differential effect of the Capucin knockdown on DARPP-32 and NeuN staining may reflect the involvement of these markers at different levels of neuronal physiology. Whereas most post-mitotic neurons express the nuclear marker NeuN (Mullen et al., 1992), recently identified as the alternative pre-mRNA splicing regulator Fox-3 (Kim et al., 2009), DARPP-32 is specifically enriched in striatal projection neurons (Ouimet et al., 1984), where it acts as a

downstream effector of dopamine signaling (Nishi et al., 1997). It is therefore likely that DARPP-32 expression is more sensitive to striatal dysfunction than NeuN expression. Interestingly, a similar differential effect on DARPP-32 and NeuN expression has been reported in an HD model in which the intrastriatal injection of a lentiviral vector encoding a large fragment of mHtt causes a decrease in DARPP-32 but not NeuN staining (Régulier et al., 2003).

Consistent with knockdown experiments, the lentivirus-mediated expression of Capucin in the mouse striatum resulted in a significantly lower density of mHtt-fragment-induced Ubiquitin-positive inclusions. However, no significant changes in lesion volume could be observed using either DARPP-32 or NeuN immunostaining. This limited impact of recombinant Capucin expression in the striatum may be due to the already high levels of endogenous Capucin mRNA. Capucin mRNAs are among the most abundant transcripts expressed preferentially in the striatum, with levels similar to that of DARPP-32 transcripts in the mouse (Brochier et al., 2008). It may therefore be difficult to achieve an effective overexpression of Capucin in this region.

The intrastriatal shRNA-mediated knockdown approach was developed as a complement to initial experiments performed on the novel Capucin knockout mouse line described in the present paper. Being fertile and apparently healthy, Capucin knockout mice can be conveniently used in a variety of behavioral tests, including in late adulthood, and can be crossed with other mouse lines. The absence of the entire Capucin coding sequence in knockout mice was ascertained at both the genomic and transcript levels. Although non-significant, a trend towards more severe fluorescence loss in knockout striata co-expressing GFP and a mutant Htt fragment than in wild-type controls suggested that striatal vulnerability to mHtt was increased in the absence of Capucin. However, no statistically significant difference in either the lesion volume or the density of Ubiquitin-positive inclusions could be established between genotypes. The re-expression of Capucin in knockout striata did not result in a significant change in vulnerability to the mHtt fragment. The discrepancies between the knockdown and knockout results may be attributed to the difference between acute depletion in adulthood versus constitutive deficiency. Knockdown was achieved by the intrastriatal delivery of a lentiviral vector expressing a Capucin-targeted shRNA, resulting in an acute and profound depletion of Capucin transcripts

(9.2 % residual expression). In this case, the adult brain may not have had the capacity to compensate for Capucin deficiency. In contrast, the effects of the Capucin knockout could be attenuated by developmental plasticity. Reporter gene expression analysis suggested that Capucin expression in the striatum was not required before birth, allowing for compensatory mechanisms to develop. Although we verified that Capucin knockout was not compensated for by the overexpression of its closest paralog, *Tmem90b*, functional compensation by proteins with unrelated sequences cannot be ruled out. Milder phenotypes with gene knockouts than knockdowns have been reported in a variety of cases. For instance, the knockdown of the glutamate transporter EAAC1 by the intraventricular administration of antisense oligonucleotides in rats causes staring-freezing episodes associated with epileptiform electrographic recordings (Sepkuty et al., 2002), while EAAC1-null mice exhibit only a decrease in spontaneous locomotor activity in an open field test (Pegnini et al., 1997).

Altogether, our data suggest that Capucin may be modestly neuroprotective against mHtt toxicity. The function of Capucin is unknown. At the transcriptional level, its expression is strongly downregulated in HD models (de Chaldée et al., 2006; Desplats et al., 2006). The downregulation of a number of striatally enriched transcripts has been reported in both HD models (Brochier et al., 2008; Desplats et al., 2006) and patients (Hodges et al., 2006), and may result from the functional disruption of striatum-specific transcriptional activators such as *Bcl11b* (Desplats et al., 2008). Depending on the transcript, this phenomenon could be either protective or detrimental to striatal neurons. For instance, the downregulation of the signaling protein *CalDag-GEFI* has been shown to be neuroprotective (Crittenden et al., 2010), while the downregulation of the sodium channel subunit *beta-4*, which can promote neurite outgrowth in cultured cells (Oyama et al., 2006), is expected to increase neuronal vulnerability. Similarly, the downregulation of Capucin expression may contribute to the disease process through a mechanism that remains to be elucidated.

CONCLUSION

In the present work we used a combination of *in vivo* approaches to provide an extensive investigation of the possible involvement of Capucin in the striatal sensitivity to mHtt. Our results suggest that Capucin expression levels have a limited impact on mHtt toxicity, and that the downregulation of Capucin expression in HD may exacerbate striatal vulnerability to mHtt.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Nicolas Caudy (CEA, iBiTecS, SPI), Hélène Humbertclaude (CEA, iBiTecS, SBIGeM) and Sylvie Jounier (CEA, iBiTecS, SBIGeM) for technical assistance. They are grateful to Muriel Vernet (CEA, iRCM, SCSR) for providing AT1 ES cells and to Catherine Bourcier (CEA, DSM Saclay, UPSE, LABM) for supervising glycemia analysis.

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement no. HEALTH-F5-2008-222925. L.G. was supported by the Neurop ole de Recherche Francilien and the Fondation pour la Recherche Médicale. N.L. was the recipient of a Ph.D. fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie. We also received financial support from the IMAGEN European integrated project (EUR617037286).

The authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- Allen PB, Greenfield AT, Svenningsson P, Haspeslagh DC, Greengard P (2004). Phactrs 1-4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **101**: 7187-7192.
- Arrasate M, Finkbeiner S (2005). Automated microscope system for determining factors that predict neuronal fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102**: 3840-3845.
- Benchoua A, Trioulier Y, Diguët E, Malgorn C, Gaillard MC, Dufour N, et al., (2008). Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum Mol Genet*; **17**: 1446-1456.
- Brochier C, Gaillard MC, Diguët E, Caudy N, Dossat C, Ségurens B, et al., (2008). Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in human and affected in disease models. *Physiol Genomics*; **33**: 170-179.
- Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, et al., (2003). Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol*; **23**: 908-915.
- Charvin D, Vanhoutte P, Pagès C, Borrelli E, Caboche J (2005). Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **102**: 12218-12223.
- Crittenden JR, Dunn DE, Merali FI, Woodman B, Yim M, Borkowska AE, et al., (2010). CalDAG-GEFI down-regulation in the striatum as a neuroprotective change in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*; **19**: 1756-1765.
- de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Déglon N (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci*; **22**: 3473-3483.
- de Chaldée M, Brochier C, Van de Vel A, Caudy N, Luthi-Carter R, Gaillard MC, et al., (2006). Capucin: a novel striatal marker down-regulated in rodent models of Huntington disease. *Genomics*; **87**: 200-207.
- Desplats PA, Kass KE, Gilmartin T, Stanwood GD, Woodward EL, Head SR, et al., (2006). Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *J Neurochem*; **96**: 743-757.

Desplats PA, Lambert JR, Thomas EA (2008). Functional roles for the striatal-enriched transcription factor, Bcl11b, in the control of striatal gene expression and transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*; **31**: 298-308.

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, et al., (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*; **277**: 1990-1993.

Diguet E, Petit F, Escartin C, Cambon K, Bizat N, Dufour N, et al., (2009). Normal aging modulates the neurotoxicity of mutant huntingtin. *PLoS One*; **4**: e4637.

Drouet V, Perrin V, Hassig R, Dufour N, Auregan G, Alves S, et al., (2009). Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann Neurol*; **65**: 276-285.

Faideau M, Kim J, Cormier K, Gilmore R, Welch M, Auregan G, et al., (2010). *In vivo* expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Hum Mol Genet*; **19**: 3053-3067.

Gil JM, Rego AC (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci*; **27**: 2803-2820.

Hottinger AF, Azzouz M, Déglon N, Aebischer P, Zurn AD (2000). Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci*; **20**: 5587-5593

Hodges A, Strand AD, Aragaki AK, Kuhn A, Sengstag T, Hughes G, et al., (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet*; **15**: 965-977.

Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S (2009). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*; **284**: 31052-31061.

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, et al., (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*; **445**: 168-176.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*; **116**: 201-211.

Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997). Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci*; **17**: 8147-8155.

Ouimet CC, Miller PE, Hemmings HC Jr, Walaas SI, Greengard P (1984). DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J Neurosci*; **4**: 111-124.

Oyama F, Miyazaki H, Sakamoto N, Becquet C, Machida Y, Kaneko K, et al., (2006). Sodium channel beta4 subunit: down-regulation and possible involvement in neuritic degeneration in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem*; **98**: 518-529.

Peghini P, Janzen J, Stoffel W (1997). Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J*; **16**: 3822-3832.

Régulier E, Trottier Y, Perrin V, Aebischer P, Déglon N (2003). Early and reversible neuropathology induced by tetracycline-regulated lentiviral overexpression of mutant huntingtin in rat striatum. *Hum Mol Genet*; **12**: 2827-2836.

Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, Rafiq A, Behar K, Ganel R, et al., (2002). A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J Neurosci*; **22**: 6372-6379.

Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH (2009). Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science*; **324**: 1327-1330.

Tessarollo L (2001). Manipulating mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*; **158**: 47-63.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*; **72**: 971-983.

Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*; **44**: 559-577.

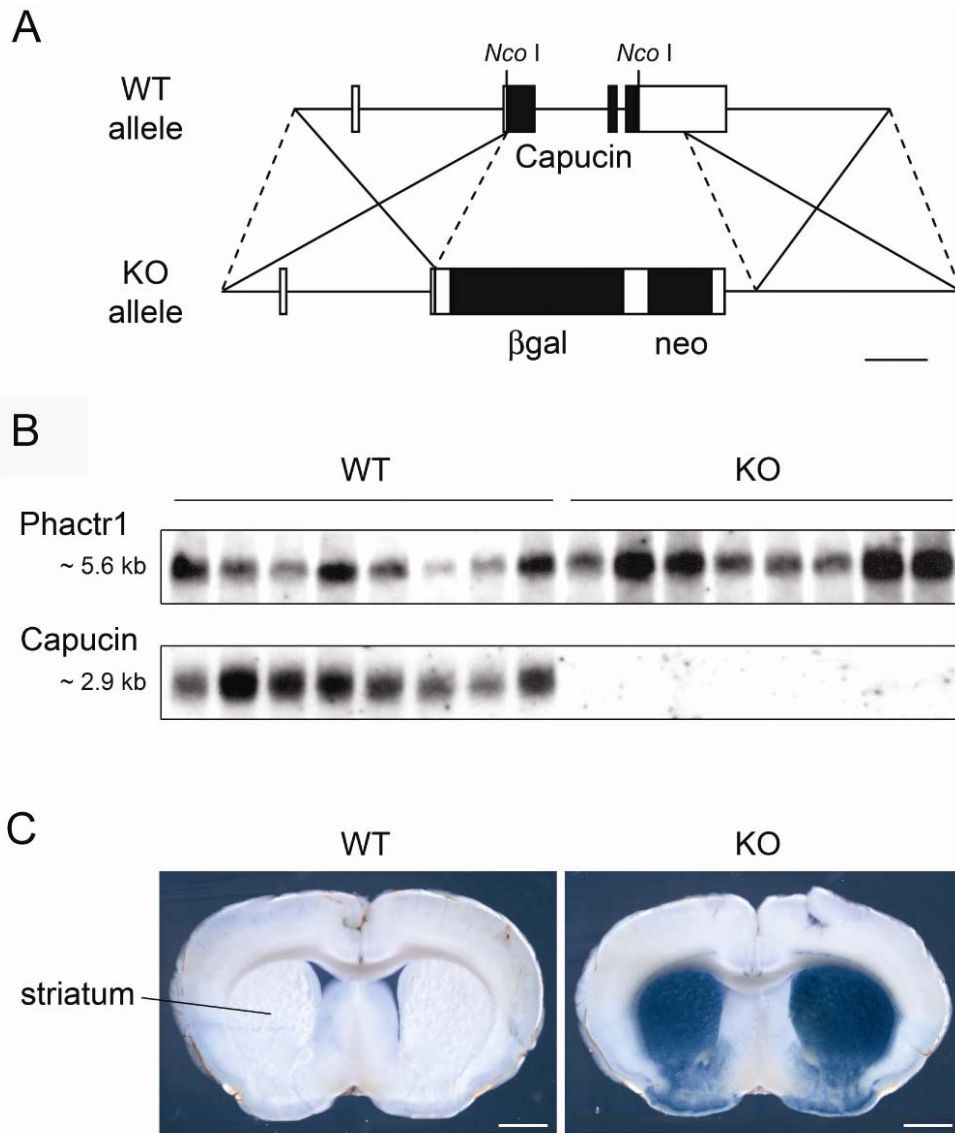


Figure 1

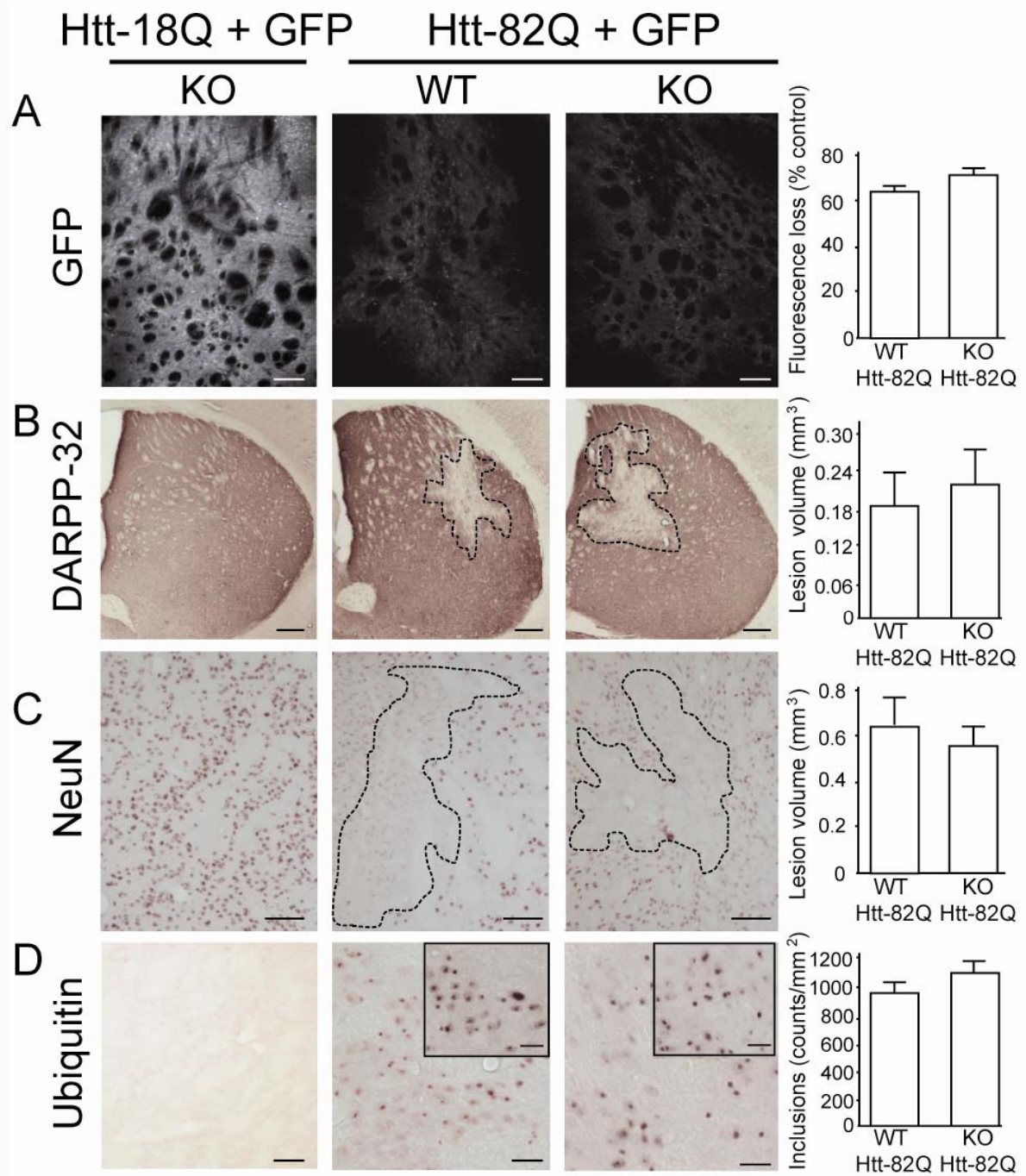


Figure 2

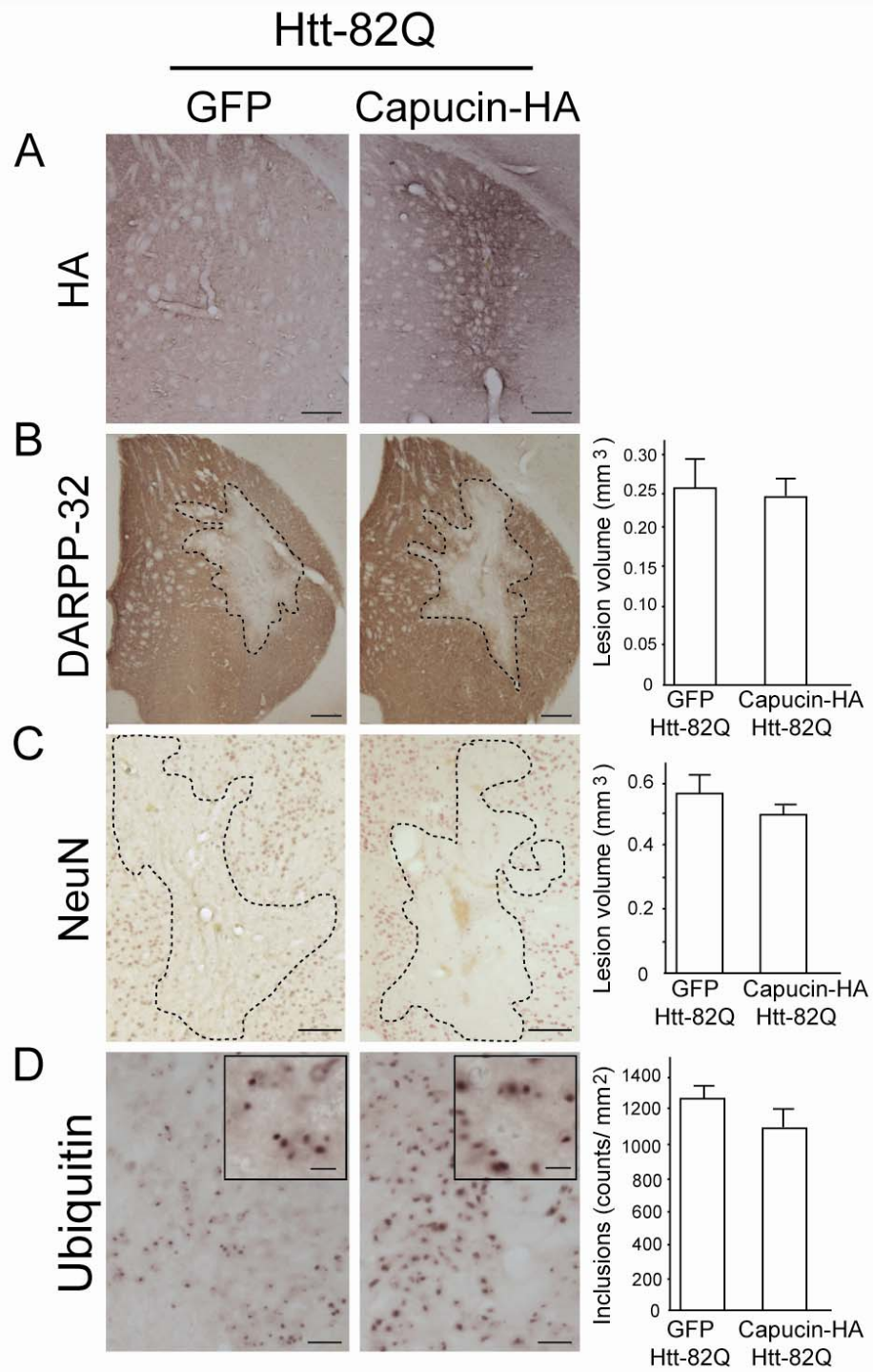


Figure 3

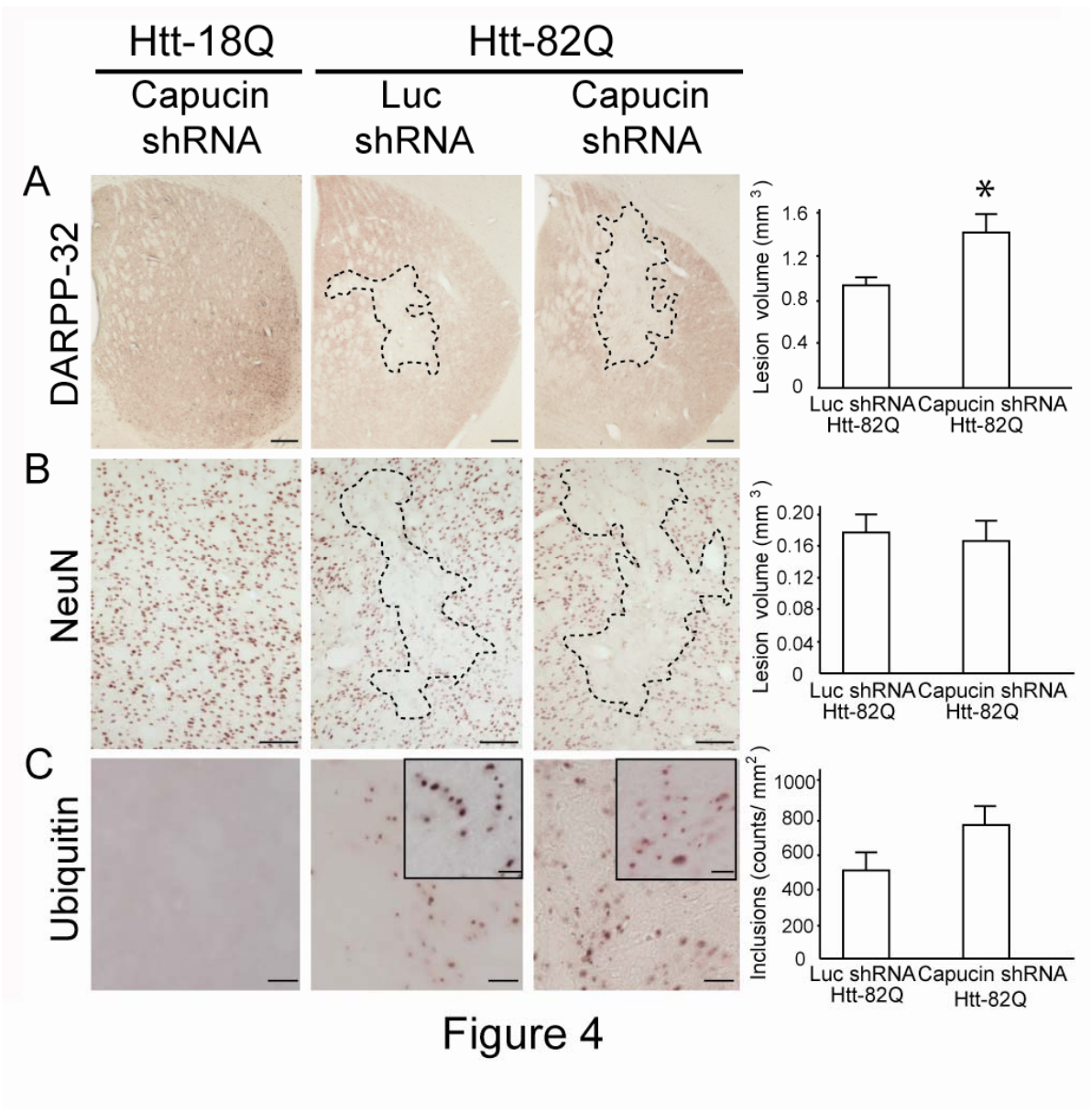


Figure 4

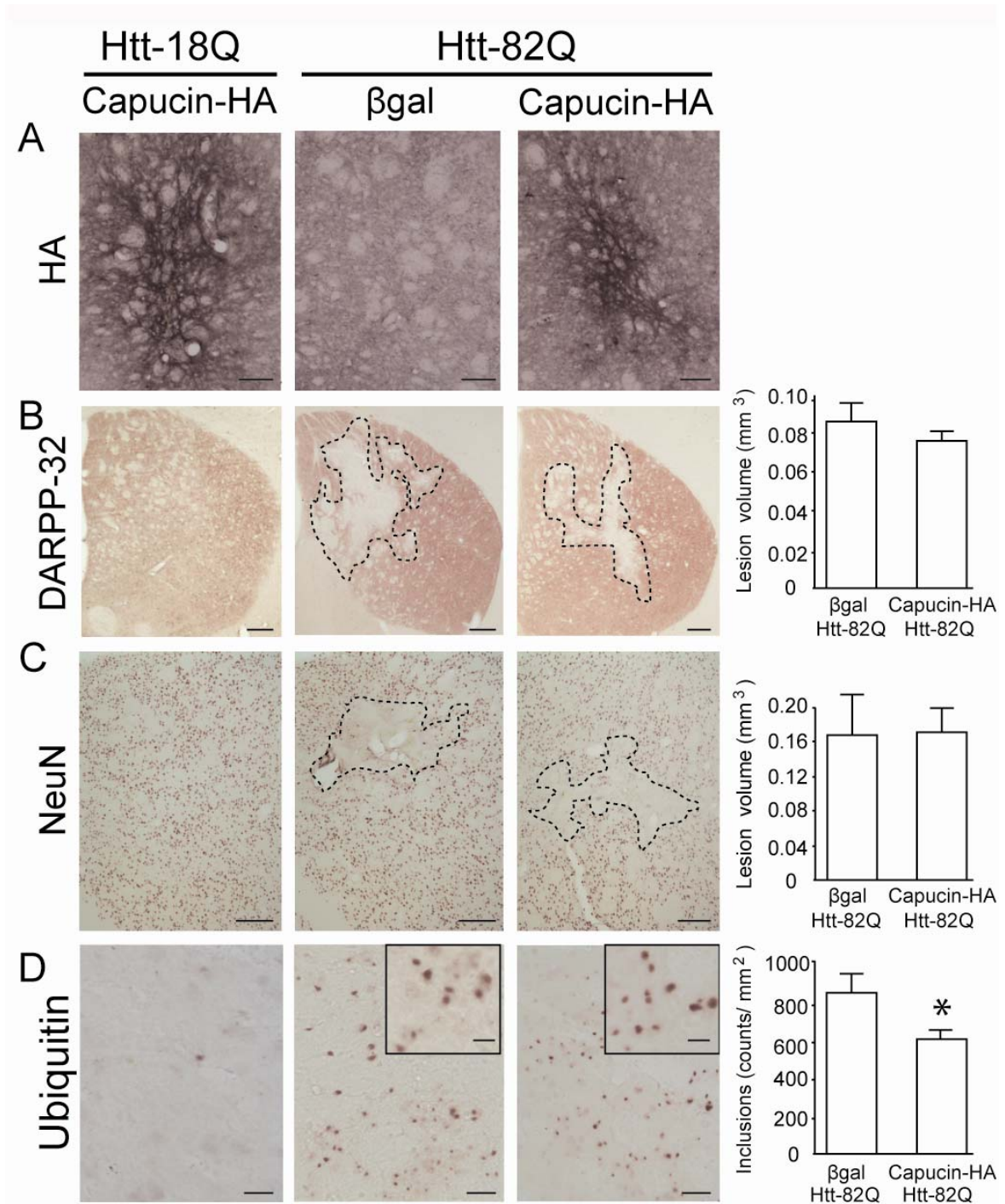


Figure 5

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Molecular characterization of Capucin knockout mice

(a) Wild-type (WT) and knockout (KO) Capucin alleles. Transcribed sequences are depicted by boxes and coding sequences are shown in black. Homologous strands are delimited by dotted lines and recombination events are represented by crossed lines. β gal: beta-galactosidase reporter gene; neo: neomycin selection gene. Scale bar = 1 kb. (b) Northern blot analysis of forebrain total RNA samples from eight wild-type (WT) mice and eight Capucin knockout (KO) littermates. The membrane was sequentially hybridized with two probes: a *Nco* I fragment of the Capucin transcribed DNA sequence (a) and a probe for the striatally enriched Phactr1 transcript. Hybridization with the Capucin probe revealed no signal of any size with the samples from the knockout mice. (c) X-Gal staining of 300- μ m-thick coronal brain sections from adult wild-type (WT) mice and Capucin knockout (KO) littermates at the level of the striatum. Scale bar = 1 mm.

Figure 2 Effect of Capucin knockout on striatal vulnerability to a mutant Htt fragment

Adult male Capucin knockout (KO) mice (n = 10) and wild-type (WT) littermates (n = 10) received a bilateral intrastriatal injection of LV-GFP. LV-Htt171-18Q was co-injected into the left striatum and LV-Htt171-82Q into the right striatum of each mouse. Six weeks after infection, brains were processed for GFP fluorescence analysis (a) and DARPP-32 (b), NeuN (c) and Ubiquitin (d) immunostaining. The loss of GFP fluorescence (a) was expressed as the difference in fluorescence levels between LV-Htt171-18Q- and LV-Htt171-82Q-infected striata divided by the fluorescence level of the LV-Htt171-18Q-infected striatum. The loss of GFP fluorescence (a), the volume of the lesion (dotted line), as determined by DARPP-32 (b) and NeuN (c) immunostaining, and the density of Ubiquitin-positive inclusions (d) are displayed as means \pm SEM. Differences between LV-Htt171-82Q-infected knockout and wild-type striata were assessed by an unpaired Student's *t*-test. Scale bars = 0.2 mm (a), 0.5 mm (b), 0.1 mm (c), 0.05 mm (d), 0.01 mm (d, insets).

Figure 3 Effect of Capucin re-expression in knockout striata on vulnerability to a mutant Htt fragment

Adult male Capucin knockout mice (n = 14) received a bilateral intrastriatal injection of LV-Htt171-82Q. LV-GFP was co-injected into the left striatum and LV-Capucin-HA into the right striatum of each mouse. Six weeks after infection, brains were processed for HA (a), DARPP-32 (b), NeuN (c) and Ubiquitin (d) immunostaining. The volume of the lesion (dotted line), as determined by DARPP-32 (b) and NeuN (c) immunostaining, and the density of Ubiquitin-positive inclusions (d) are displayed as means \pm SEM. Differences between striata co-infected with LV-Capucin-HA and LV-Htt171-82Q and striata co-infected with LV-GFP and LV-Htt171-82Q were assessed by a paired Student's *t*-test. Scale bars = 0.2 mm (a), 0.5 mm (b), 0.1 mm (c), 0.05 mm (d), 0.01 mm (d, insets).

Figure 4 Effect of Capucin shRNA-knockdown on striatal vulnerability to a mutant Htt fragment

Adult male C57BL/6J mice received a bilateral intrastriatal injection of either LV-Capucin-shRNA (n = 10) or LV-Luc-shRNA (n = 10). LV-Htt171-18Q was co-injected into the left striatum and LV-Htt171-82Q into the right striatum of each mouse. Six weeks after infection, brains were processed for DARPP-32 (a), NeuN (b) and Ubiquitin (c) immunostaining. The volume of the lesion (dotted line), as determined by DARPP-32 (a) and NeuN (b) immunostaining, and the density of Ubiquitin-positive inclusions (c) are displayed as means \pm SEM. Differences between striata co-infected with LV-Capucin-shRNA and LV-Htt171-82Q and striata co-infected with LV-Luc-shRNA and LV-Htt171-82Q were assessed by an unpaired Student's *t*-test (**P* = 0.025). Scale bars = 0.5 mm (a), 0.1 mm (b), 0.05 mm (c), 0.01 mm (c, insets).

Figure 5 Effect of recombinant Capucin expression on striatal vulnerability to a mutant Htt fragment

Adult male C57BL/6J mice received a bilateral intrastriatal injection of either LV-Capucin-HA (n = 10) or LV- β gal (n = 10). LV-Htt171-18Q was co-injected into the left striatum and LV-Htt171-82Q into the right striatum of each mouse. Six weeks after

infection, brains were processed for HA (**a**), DARPP-32 (**b**), NeuN (**c**) and Ubiquitin (**d**) immunostaining. The volume of the lesion (dotted line), as determined by DARPP-32 (**b**) and NeuN (**c**) immunostaining, and the density of Ubiquitin-positive inclusions (**d**) are displayed as means \pm SEM. Differences between striata co-infected with LV-Capucin-HA and LV-Htt171-82Q and striata co-infected with LV- β gal and LV-Htt171-82Q were assessed by an unpaired Student's *t*-test (**P* = 0.042). Scale bars = 0.2 mm (**a**), 0.5 mm (**b**), 0.1 mm (**c**), 0.05 mm (**d**), 0.01 mm (**d**, insets).

Potential role of Double cortin like kinase 3 (Dclk3) in selective striatal vulnerability in Huntington's disease

Laurie Galvan^{1,2}, Marie-Claude Gaillard^{1,2}, Géraldine Liot^{4,5,6}, Michel de Chaldée³, Laetitia Francelle^{1,2}, Martine Guillermier^{1,2}, Diane Houitte^{1,2}, Marion Chaigneau^{1,2}, Charlène Joséphine^{1,2}, Gilles Bonvento^{1,2}, Carole Malgorn^{1,2}, Fanny Petit^{1,2}, Caroline Jan^{1,2}, Noëlle Dufour^{1,2}, Jean-Marc Elalouf³, Sandrine Humbert^{4,5,6}, Frédéric Saudou^{4,5,6}, Nicole Déglon^{1,2}, Emmanuel Brouillet^{1,2}

¹ CEA, DSV, I²BM, Molecular Imaging Research Center (MIRCen), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

² CNRS, CEA URA 2210, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

³ Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut de Biologie et de Technologies de Saclay (iBiTec-S), Service de Biologie Intégrative et Génétique Moléculaire (SBIGeM), F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

⁴ Institut Curie, Orsay F-91405, France

⁵ CNRS UMR 3306, Orsay F-91405, France

⁶ INSERM U1005, Orsay F-91405, France

Abstract (210):

Double Cortin Like Kinase 3 (Dclk3) is a protein of unknown function which is preferentially expressed in the striatum as compared to other brain regions. Dclk3 expression being reduced in transgenic mouse models of Huntington's disease (HD), we hypothesized that the loss of Dclk3 may render striatal neurons highly vulnerable. Here we showed that Dclk3 exists mainly as a long form (L-Dclk3) and as a shorter form (S-Dclk3) with lower expression. Expressing recombinant Dclk3s *in vivo* using lentiviral vectors was neuroprotective against the toxicity of a mutant Htt fragment (Htt171-82Q) whereas ShRNA-mediated knockdown of Dclk3 was pro-toxic (shDclk3). Truncated Dclk3 expressing only the kinase domain (Kin-Dclk3) also reduced mutant Htt toxicity *in vivo*. The neuroprotective effect of Dclk3 was lost by substituting its putative autophosphorylation site, the Threonine 457 into Alanine. We found that L-Dclk3-HA and S-Dclk3-HA in infected neurons could associate with biochemical preparations of microtubules. A smaller 43 kDa break down product of S-Dclk3 containing the C-terminal kinase domain devoid of the putative double cortin like domain also associated with microtubules. Kin-Dclk3-HA was also found localized to microtubules, suggesting that the putative double cortin-like domain is not prerequisite for microtubule localization. Confocal microscopy imaging showed that S-DCLK3 co-localized with MAP2 in neurons. These novel findings suggest that Dclk3 may play important roles in the normal and HD striatum at least in part through regulation of its kinase activity in vicinity of the cytoskeleton.

Introduction

The striatum which plays a key role in movement initiation and cognitive functions often degenerates in pathological conditions associated with energy compromise such as poisoning with mitochondrial toxins and genetic mitochondriopathies (Damiano et al., 2009). It is also preferentially affected in Huntington's disease (HD), a neurodegenerative disorder caused by an abnormal CAG repeat expansion in the huntingtin (*htt*) gene (review recent Bates?). Defects in many cellular functions and pathways have been suggested to play a role in HD pathogenesis. These include anomalies in energy production, Ca²⁺ deregulation, abnormal trophic factor expression and release, alterations of cytoskeleton-mediated transport machinery and defects in signaling pathways involved in cell survival (pour revue(Milnerwood and Raymond, 2010; Ross and Tabrizi, 2010)). None of these mechanisms can explain the preferential vulnerability of the striatum in HD. One hypothesis is that some factors, selectively expressed in the striatum may confer to striatal GABAergic projection neurons their particular sensitivity to degeneration (Brouillet et al., 2005; Han et al., 2010). In support of this, dopamine and its subtype 2 membrane receptors (D2R) which are preferentially expressed in the striatum render striatal neurons highly vulnerable to mutant Htt and the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (Charvin et al., 2005; Benchoua et al., 2008; Charvin et al., 2008). The small GTPase Rhes which displays selective striatal expression has also recently been found to be a major determinant of the vulnerability of striatal neurons to mutant Htt (Subramaniam et al., 2009). Since other "striatal markers" could play a similar role in modulating striatal neuron sensitivity to degeneration, we recently examined the transcriptome of 11 regions in the mouse brain using SAGE and

identified approximately 120 genes which expression is selective of the striatum compared to other brain regions (de Chaldee et al., 2003; Brochier et al., 2008).

In the present study, we have studied one of these recently identified striatal markers, the Double Cortin Like Kinase 3 (Dclk3) which biological function is totally unknown. Dclk3 is a third member of a new family of kinases named "Double Cortin like Kinase" (Ohmae et al., 2006). Dclk1 and Dclk2 members of this new kinase family have a N-terminal "Double Cortin" (DC) domain anchoring Dclk proteins to microtubules and a highly conserved C-terminal "serine/threonine kinase" domain similar to Ca²⁺/calmodulin kinase IV (CaMKIV). Although no biochemical evidence has been reported, *in silico* analysis indicate that the kinase is highly conserved in Dclk3. In contrast the N-terminal part of Dclk3 has only poorly conserved DCX domain, questioning its possible interaction with microtubules.

Here, we have studied the function of Dclk3 in striatal neurons using various approaches in the normal and HD striatum. We found that the major form of Dclk3 mRNA species in the striatum and cerebral cortex correspond to the first 5' putative ORF in the gene. We studied Dclk3 behavior *in vivo*, using lentiviral vectors overexpressing Dclk3 with a hemagglutinin (HA) tag or ShRNA to knock down expression. Experiments *in vivo* in mice and in primary culture of striatal neurons demonstrated that the Dclk3 overexpression was neuroprotective against mutant Htt while knocking down exacerbates mutant Htt toxicity. We also studied the role of the kinase domain of Dclk3 in its neuroprotective effects and its ability to interact with the cytoskeleton. We studied recombinant Dclk3 expression in the BACHD transgenic mouse model of HD (Gray et al., 2008) and found that the post-transcriptional processing of the protein in these mice was markedly disturbed.

Results

Characterization of Dclk3 isoforms in the striatum

Since there is two possible ORF in the Dclk3 gene, we performed Northern blot analysis of mRNA species in the mouse striatum and cerebral cortex. Northern blot analysis showed that the most prominent form of Dclk3 mRNA corresponded to the first ORF (2370 base mRNA) (Fig.1). The expected apparent molecular weight of this long Dclk3 (L-Dclk3; 790 aa) form is ~90 kDa. The less expressed and shorter form (S-Dclk3; 619 aa) has a theoretical molecular weight of 75 kDa.

Dclk3 overexpression reduces vulnerability of striatal neurons to mutant Htt in vivo

We next cloned L-Dclk3-HA and S-Dclk3-HA in lentiviral vectors to study the protein *in vivo* (Fig. S1). Mice were injected in the striatum with lenti-L-Dclk3-HA or lenti-S-Dclk3-HA (mixed with lentiviral vector coding for GFP). Six weeks later mice were processed for the analysis of the striatum. Analysis of the infected region using qRT-PCR revealed that level of expression using viral vector was approximately 10 times that of the endogenous mRNA (Fig.2). Histological evaluation using HA tag detection showed that S-Dclk3-HA and L-Dclk3-HA were expressed in a large proportion of the striatum (Fig.3).

We studied the effects of the expression of S-Dclk3 and L-Dclk3 against mutant Htt using lenti-S-Dclk3-HA and lenti-L-Dclk3-HA respectively. For this purpose, a mixed suspension of lenti-Htt171-82Q and lenti-L-Dclk3-HA or lenti-S-Dclk3-HA was delivered into the mouse striatum. A lenti- β gal was used to control for viral particle load. At 6 weeks post surgery, infection of the striatum with lenti-Htt171-82Q and lenti- β gal produced, in vicinity of the injection site, a loss of the

immunohistochemical labelling obtained using antibodies against DARPP-32 and NeuN, two well known neuronal markers (Fig.3) as previously described in rat (Almeida et al., 2002; Drouet et al., 2008; Diguet et al., 2009) and mice (Faideau et al., 2010). Similar striatal lesions were found using cytochrome oxidase (COX) histochemistry another marker of neuronal integrity. The volume of the striatum showing mutant Htt-induced loss of DARPP-32 immunohistochemistry was not significantly changed by co-infection with lenti-S-Dclk3-HA and lenti-L-Dclk3-HA compared to lenti- β gal-infected controls (Fig.3). However, the quantitative analyses of brain sections processed for NeuN-immunohistochemistry and COX histochemistry showed that Htt171-82Q-induced striatal lesions produced in mice co-infected with lenti-S-Dclk3-HA and L-Dclk3-HA were significantly smaller than lesions found in mice co-infected with the lenti- β Gal control. The number of ubiquitin-positive nuclear inclusions was not significantly changed in lenti-S-Dclk3-HA and L-Dclk3-HA infected striata compared to control (Fig.3), suggesting that Dclk3 did not directly interfere with mutant Htt level/processing. Thus these results showed that Dclk3 reduced the toxicity of Htt171-82Q *in vivo*, suggesting a neuroprotective effect of the protein in the striatum.

Dclk3 shRNA-mediated knockdown increases mutant Htt toxicity in vivo

We studied whether knocking down Dclk3, in contrary to increased expression, could produce a "pro-toxic" effect with mutant Htt. We designed and produced a lenti-shDLCK3. Analysis of extracts from lenti-shDclk3 infected striata using qRT-PCR showed that levels of endogenous Dclk3 mRNA were significantly reduced by ~70% as compared to extracts from lenti-shLuc controls (Fig.2). Thus, lenti-shDclk3 was efficacious in reducing expression of Dclk3 in the mouse striatum

in vivo. This construct was bicistronic for shDclk3 and GFP. A lenti-shLuc also coding for GFP was used as a control for viral load. Mice infected with a similar amount of lenti-shDclk3 (100 ng p24 / μ L) and lenti-shLuc (100 ng p24 / μ L) displayed at 6 weeks post-infection the same level of expression of GFP as assessed by fluorescence microscopy (Fig.4). In these experiments GFP fluorescence levels were determined to assess neuron integrity when infected with m-htt. Injection of lenti-htt171-82Q with lenti-shDclk3 or lenti-shLuc produced a loss of fluorescence at 6 weeks post-infection as compared to control (lenti-htt171-18Q). However, the loss of fluorescence was significantly greater with shDclk3 as compared to shLuc, indicating a protoxic effect of the down regulation of DCLK3 expression (Fig.4). A similar experiment was replicated but in this case using immunohistochemical evaluation of the toxic effect of m-htt (Fig. 5). Lenti-shDclk3 alone produced no major changes in DARPP-32 labeling at 6 weeks post infection, suggesting no major toxicity of the partial knock down of Dclk3 produced by the shRNA. The striatal volume showing m-Htt-induced loss of DARPP-32 immunochemical labeling was significantly increased compared to controls (Fig.5). The number of ubiquitin-positive inclusions was significantly increased in the striatum infected with lenti-Htt171-82Q and lenti-shDclk3 compared to controls. These results suggested that shRNA-mediated knockdown of Dclk3 expression could precipitate neuronal dysfunction produced by m-Htt.

Kinase domain of Dclk3 is required for neuroprotection

Dclk3 function had never been studied. There potentially are two important functional domains in the protein: (i) a poorly conserved “double-cortin like domain” in the N-terminal part and (ii) a highly conserved domain reminiscent of Ca²⁺/calmodulin dependent kinase family in its C-terminal part. We hypothesized that the

neuroprotective effect of Dclk3 may involve the kinase domain. We cloned a region corresponding to this C-terminal domain with a HA tag (from Glu330 of L-Dclk3 , i.e. 52 kDa) into a lentiviral vector (lenti-Kin-Dclk3-HA). As in the experiments described above, mice were infected with a mixed suspension of lenti-Kin-Dclk3-HA and lenti-Htt171-82Q and 6 weeks later histological evaluation was performed. Kin-Dclk3 did not modify mutant Htt-induced striatal lesion as seen with DARPP-32 histochemistry. The number of ubiquitin-positive inclusions remained unchanged. In contrast, striatal lesions detected using NeuN immunohistochemistry and COX histochemistry were significantly reduced as compared to controls (Fig.6).

We asked whether the kinase activity could be related to the protective effect. To this purpose we generated mutated forms of Dclk3. Based on a strong homology with CaMKs, we hypothesized that Dclk3 could be activated like CaMKII. CaMKII requires an initial autophosphorylation of its threonine 286, for the activation of the kinase catalytic site. The threonine (286) of S-DCLK3 (i.e. Threonine 457 of L-Dclk3) is conserved relative to that of CaMKII. We used site directed mutagenesis to create the substitution Th286>Ala (T286A) to avoid possible phosphorylation. Overexpression of mutant Htt (CMV-Htt171-82Q) produced a rapid degeneration of transfected neurons as described elsewhere (Saudou et al., 1998). While wild type S-Dclk3 was neuroprotective against mutant Htt toxicity, the Dclk3 Th289>Ala mutant showed no protective effects (Fig.7). This experiment suggests that the kinase domain of DLK3 plays an important role in its protective effects against mutant Htt.

Dclk3 interacts with microtubules

In order to identify the cellular localization of Dclk3, we performed differential centrifugation of neurons infected with lenti-S-Dclk3 that indicated that the protein

and its breakdown products were mostly in the cytosol fraction (not shown). Because of the presence of a putative double-cortin like sequence in the N-terminal domain of the Dclk3 we tested whether the full length protein could bind to microtubules and whether kin-DLCK3-HA could lose this property (Fig.8). In absence of reliable commercial antibodies against Dclk3, we used HA tag for detection of Dclk3. Preparations enriched in microtubules were prepared from striatal neurons expressing recombinant S-Dclk3-HA, L-Dclk3-HA and kin-DLCK3-HA four weeks after lentiviral infection. Western blot analyses showed that whatever the recombinant form of Dclk3 expressed, the HA tag was found in the microtubule preparation (Fig.8). With S-Dclk3, three species were observed in the cytosol (75, 70 and 43 kDa). Mainly the 75 and 40 kDa forms bound to microtubules. With L-Dclk3, the cytosol displayed low level of expression of Dclk3, with only the 75 and 70 species detectable. Surprisingly, the full length form was mainly found with microtubules as well as the 75 kDa form. In this case, the 40kDa form was not detected. With Kin-Dclk3-HA, only the 50 kDa form was detected in the cytosol. Of interest, it was preferentially associated with microtubules.

Dclk3-HAco-localizes with MAP2 in neurons

In striatal neurons transfected with a plasmid coding S-Dclk3-HA, confocal microscopy analysis of the HA tag and MAP2 detected by immunofluorescence showed that the two protein were mostly co-localized, further suggesting that Dclk3 interacts preferentially with microtubules (Fig.9).

Thus these observations suggested that function of Dclk3 involves its interaction with microtubules likely through its kinase domain.

Discussion

The present study shows that a short and a long form of Dclk3 can be identified in the striatum, the long forms appearing to be the most prominent species represented based on mRNA detection. We cloned the two forms of Dclk3 that correspond to two ORF. The increased expression the Dclk3 forms using lentiviral vectors protects striatal neurons from the toxicity of a short N-terminal fragment of m-htt. Interestingly, overexpression of the kinase domain of Dclk3 seems sufficient to provide neuroprotective effects against m-htt and substitution of the putative Threonine (Th 457 of the long mouse form) involved in autophosphorylation into Alanine abrogates this protective effect. Finally we showed that Dclk3 is likely a MAP. While Dclk3 function has never been studied previously, and many questions remains to be answered regarding the mechanisms underlying this neuroprotective effects, our work suggests that the kinase might play a key role in striatum, especially in HD.

Potential mechanisms of protection produced by Dclk3

Primary sequence of Dclk3 indicates that the kinase has a poorly conserved DCX domain in its N-terminal domain (Ohmae et al., 2006). In comparison, the conservation of this domain is greater for DCLK1 and DCLK2 proteins. We examined if, despite this limited conservation, Dclk3 could interact with the cytoskeleton. This question was relevant to HD since, mutant Htt toxicity involves perturbation of the cytoskeleton, in particular the function of proteic complexes involved in retrograde and anterograde axonal transport. Htt associates with microtubule (Tukamoto et al., 1997) and is transported retrogradely and anterogradely in neurons (Block-Galarza et al., 1997). Htt interacts with HAP1 to modulate motor complex efficacy to move along microtubules. Alteration of the huntingtin/HAP1/p150 (Glued) complex correlates with

reduced association of motor proteins with microtubules, reducing transport of vesicles along the cytoskeleton (Gauthier et al., 2004). HAP1 interacts with kinesin light chain, a subunit of the kinesin motor complex that drives anterograde transport along microtubules in neuronal processes (McGuire et al., 2006). However, we performed co-immunoprecipitation of Dclk3 using the HA tag and could not find an interaction between Dclk3-HA and huntingtin (Fig.S3). Our immunofluorescence experiments showed co-localization of recombinant S-Dclk3 with the microtubule associated protein 2 (MAP2) in primary culture of striatal neurons. Biochemical experiments showed that full length S-Dclk3 and L-Dclk3 as well as smaller related peptides containing the C-terminal kinase domain preferentially segregate with preparations enriched in microtubules. The kinase domain seems to be able to interact with microtubules as well. The proteins involved in this interaction are yet unknown. Ongoing experiments will attempt to answer this key question. The biochemical experiments we performed show that lentiviral-mediated expression of Dclk3 leads to the expression of a full length protein (75 kDa and 90 kDa for Dclk3-S and Dclk3-L respectively) and also revealed the existence of Dclk3 break down products containing the C-terminal kinase domain of Dclk3 (70 and 43 kDa) that were detected in primary culture of striatal neurons. Biochemical experiments in culture of neurons showed that the 70 kDa and 40 kDa forms generated from Dclk3-S were associated with microtubules. Lentiviral mediated expression of the long form of Dclk3 lead to the appearance of molecular species of 90 kDa and 70 kDa as assessed by western blot. The 40 kDa c-terminal peptide we detect with S-Dclk3 is not seen with L-Dclk3. This indicates that the short and long forms of the protein have a different processing and possibly different functions, even if both are protective against mutant Htt. Surprisingly, the kinase domain of Dclk3 alone also segregates in

microtubule preparations. This does not rule out that the DC like domain can participate in the interaction with microtubules. However the present observations suggest that the DC-like domain is not prerequisite for the association with microtubule. It is possible that microtubule association involves a direct interaction between the kinase and one of its substrates. Identification of such a putative partner/substrate might be determinant to precisely understand the mechanism of protection of Dclk3 against m-Htt.

Dclk3 is highly reminiscent of CaMKIV and CaMKI. Activation of CaMKIV by phosphorylation mediated by CaMKK and Calmodulin binding to its C-terminal domain has been shown to activate CREB and CBP, leading to increased transcription. This mechanism is considered to be involved in dendritic spine regulation (pour revue (Wayman et al., 2008)). Since CREB and CBP are involved in HD pathogenesis (Brouillet et al., 2005), it is tempting to speculate that Dclk3 could similarly phosphorylate CREB and CBP to produce activation and eventually protection.

Little is known about the mechanism regulating Dclk3 expression and post-transcriptional processing. Of interest, we have found that dopaminergic deafferentation in mice after MPTP intoxication leads to increased levels of Dclk3 mRNA (Brochier et al., 2008). This suggests that complex regulations of Dclk3 likely occur, placing Dclk3 as an important protein of the striatum. At the post-transcriptional level, several putative mechanisms can be suggested to explain the existence of the different species of Dclk3-HA we observed in neurons based on the analysis of Dclk3 sequence and the similarities with Dclk1 and CaMKs. These include for example putative caspase 4 and calpain cleavage, and SUMOylation. Another putative mechanism of post-transcriptional regulation of Dclk3 might involve

phosphorylation especially by the upstream kinase CaMKK which regulates CaMKs (pour revue (Wayman et al., 2008)). These questions are the subject of ongoing experiments in the laboratory.

The present results indicate that increased expression of Dclk3 can produce a neuroprotective effect upon MSN that express mutant Htt. Dclk3 expression is reduced in the HD striatum, and in the R6/2 and KI mouse models HD (Kuhn et al., 2007). Thus a loss of function of Dclk3 could render MSN more fragile, and consequently could participate in the preferential and early vulnerability of the striatum in HD. Previous SAGE analyses of the mouse striatum showed that the level of expression of DCLKs is relatively low compared to other known striatal proteins such as preproenkephalin. Dclk3 expression is in the range of that measured for D1 receptor and A2A adenosine receptor two other well-know markers of the striatum. In addition to Dclk3, other gene products which are selectively expressed in the striatum have been shown to be involved in the selective degeneration of this structure in HD. For example, neurotransmitter receptors such as dopamine D2 receptors (Charvin et al., 2005; Benchoua et al., 2008; Charvin et al., 2008) and D1 receptors (Paoletti et al., 2008) which are highly expressed in the striatum compared to other brain regions could be involved in striatal vulnerability in HD. Receptors of neuromodulators such as adenosine A2 receptors show preferential expression in the striatum and could also play a role in the high sensitivity of striatal cells to mutant huntingtin (For review (Popoli et al., 2008). More recently, Subramaniam and collaborators showed that the toxicity of mutant Htt is greatly enhanced by the small GTPase Rhes, which has a preferential expression in the striatum (Subramaniam et al., 2009). Rhes increases the toxicity of mutant Htt in different cellular models. Rhes which is an E3 ligase interacts with mutant Htt and modifies it through SUMOylation. The Rhes-mediated

SUMOylation of mutant Htt eventually leads to reduced insoluble aggregates, and increased levels of the soluble form of mutant Htt, that is highly toxic to neurons. The striatal selective phosphodiesterase PDE10A could also participate in m-Htt toxicity as suggested by the neuroprotective effect of the PDE10A inhibitor TP10 (Giampa et al.). Altogether, this combination of gene products might play a role in striatal vulnerability in HD. Interestingly, it is however interesting to keep in mind that all gene products that have selective expression in the striatum do not modulate striatal vulnerability; For example, we found that the level of expression of the protein Capucin (Tmem90a) which is selectively and highly expressed in the striatum does not markedly modify the toxicity of m-Htt in mice (Galvan, et al; submitted).

Dclk3 regulations might occur at different levels and different possible strategies (using phosphatase inhibitors or allosteric synthetic activators) could be developed to stimulate its activity and produce neuroprotective effects in the HD context. Although the proof of concept for Dclk3 remains to be done, the present data suggest that Dclk3 is an interesting potential target to protect MSN neurons against mutant Htt in HD patients. Considering that the striatum is involved in many motor and cognitive processes, it is conceivable that Dclk3 function play a key role in some of these key functions. In addition beyond HD, Dclk3 might be involved in different types of diseases associated with striatal dysfunction such as striatal degeneration related to impairment in energy metabolism (see (Damiano et al., 2009) for review), Perry disease, a atypical parkinsonian-like disease linked to mutation in dynein heavy chain gene (Braunstein et al., 2010) and possibly psychiatric conditions such schizophrenia, depression, and addiction.

References

1. Damiano M, Galvan L, Deglon N, Brouillet E (2009). Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta* **1802**: 52-61.
2. Milnerwood AJ, Raymond LA (2010). Early synaptic pathophysiology in neurodegeneration: insights from Huntington's disease. *Trends Neurosci* **33**: 513-523.
3. Ross CA, Tabrizi SJ (2010). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* **10**: 83-98.
4. Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D (2005). 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* **95**: 1521-1540.
5. Han I, You Y, Kordower JH, Brady ST, Morfini GA (2010). Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. *J Neurochem* **113**: 1073-1091.
6. Benchoua A, et al. (2008). Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum Mol Genet* **17**: 1446-1456.
7. Charvin D, et al. (2008). Haloperidol protects striatal neurons from dysfunction induced by mutated huntingtin in vivo. *Neurobiol Dis* **29**: 22-29.
8. Charvin D, Vanhoutte P, Pages C, Borrelli E, Caboche J (2005). Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12218-12223.
9. Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH (2009). Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* **324**: 1327-1330.
10. Brochier C, et al. (2008). Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in human and affected in disease models. *Physiol Genomics* **33**: 170-179.
11. de Chaldee M, et al. (2003). Quantitative assessment of transcriptome differences between brain territories. *Genome Res* **13**: 1646-1653.
12. Ohmae S, et al. (2006). Molecular identification and characterization of a family of kinases with homology to Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases I/IV. *J Biol Chem* **281**: 20427-20439.
13. Gray M, et al. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci* **28**: 6182-6195.
14. Tukamoto T, Nukina N, Ide K, Kanazawa I (1997). Huntington's disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. *Brain Res Mol Brain Res* **51**: 8-14.
15. Block-Galarza J, et al. (1997). Fast transport and retrograde movement of huntingtin and HAP 1 in axons. *Neuroreport* **8**: 2247-2251.
16. Gauthier LR, et al. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**: 127-138.
17. McGuire JR, Rong J, Li SH, Li XJ (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem* **281**: 3552-3559.
18. Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR (2008). Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* **59**: 914-931.

19. Kuhn A, *et al.* (2007). Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet* **16**: 1845-1861.
20. Paoletti P, Vila I, Rife M, Lizcano JM, Alberch J, Gines S (2008). Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* **28**: 10090-10101.
21. Popoli P, Blum D, Domenici MR, Burnouf S, Chern Y (2008). A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease. *Curr Pharm Des* **14**: 1500-1511.
22. Giampa C, Laurenti D, Anzilotti S, Bernardi G, Menniti FS, Fusco FR. Inhibition of the striatal specific phosphodiesterase PDE10A ameliorates striatal and cortical pathology in R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* **5**: e13417.
23. Braunstein KE, *et al.* (2010). A point mutation in the dynein heavy chain gene leads to striatal atrophy and compromises neurite outgrowth of striatal neurons. *Hum Mol Genet* **19**: 4385-4398.
24. de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Deglon N (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* **22**: 3473-3483.
25. Drouet V, *et al.* (2009). Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann Neurol* **65**: 276-285.
26. Diguët E, *et al.* (2009). Normal aging modulates the neurotoxicity of mutant huntingtin. *PLoS One* **4**: e4637.
27. Faideau M, *et al.* (2010). In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Hum Mol Genet* **19**: 3053-3067.
28. Hottinger AF, Azzouz M, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD (2000). Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci* **20**: 5587-5593.

Materials and Methods

Animals

Adult male C57BL/6J mice (25 g each; Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) were used for lentiviral infections. Animals were housed in a temperature-controlled room maintained on a 12 hr light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. All experiments on mice were supervised by an investigator licensed by the Ministère de l'Agriculture, in conformity with French regulations and in

strict accordance with the recommendations of the European Commission (86/609/EEC) concerning the care and use of laboratory animals.

Lentiviral vector construction, production and infection

DNA sequences coding for green fluorescent protein (GFP) and for C-terminal hemagglutinin (HA)-tagged mouse short and long forms of Dclk3 were cloned into the SIN-W-PGK lentiviral vector (de Almeida et al., 2002) to generate lenti-GFP and lenti-S-Dclk3-HA and lenti-L-Dclk3-HA, respectively. The following probes were used to generate S-Dclk3-HA:

5' CACCATGGGCAAAGAGCCGCTGAC 3' et 5' CTAGGAGGCGTAGTCAGGCAC
GTCGTATGGGTAGGCACTGTTGGGGGACTCCTC 3'.

In addition the C-terminal domain of Dclk3 was also cloned (from aa 330 to the Cterm extremity) to only express the kinase domain. The vectors were designated as lenti-Kin-Dclk3-HA. The lenti-L-Dclk3-HA and lenti-Kin-Dclk3 have been cloned and produced by Genart followed RNA sequence provided in GENE database. An addition of Hemmagglutinin sequence has been added before STOP codon.

A Dclk3-directed shRNA (target sequence: 5' GAGAAGTGTAAGAGAGAAA 3') and a Luciferase-targeted shRNA (target sequence: 5' CGTACGCGGAATACTTCGA 3') were cloned into a bicistronic lentiviral vector (Drouet et al., 2009), in such a way that the infected cells expressed the reporter protein GFP. The resulting constructs were designated as lenti-Dclk3-shRNA and lenti-Luc-shRNA, respectively. The lentiviral vectors expressing a wild-type Htt fragment (lenti-Htt171-18Q), a mutant Htt fragment (lenti-Htt171-82Q) or beta-galactosidase (lenti- β gal) have been described previously (Digue et al., 2009; Faideau et al., 2010). Viral particles were produced as described elsewhere (Hottinger et al., 2000). The particle content of the viral batches was

determined by ELISA for the p24 antigen (Gentaur, Paris, France). Lenti-Htt171-18Q and lenti-Htt171-82Q were used at a concentration of 150 ng/μl of p24, lenti-Dclk3-HA, lenti-Dclk3-shRNA, lenti-Luc-shRNA and lenti-βgal at a concentration of 100 ng/μl of p24, and lenti-GFP at a concentration of 50 ng/μl of p24. A total volume of 2 μl of lentiviral suspension was injected into the mouse striatum as previously reported (Faideau et al., 2010), using the following stereotaxic coordinates: 1.0 mm anterior and 2.0 mm lateral to the bregma, at a depth of 2.7 mm from the dura, with the tooth bar set at 0.0 mm.

Directed Mutagenesis of Dclk3

S-Dclk3-HA has been mutated on the threonine (286) (i.e. Threonine 457 of L-Dclk3) into Alanine (T286A) and Aspartate (T286D) using the followed probes:

T286A : 5'CCACAGCTACCTAGAGCCCGAGGGGAGGAG 3'
5' CTCCTCCCCTCGGGCTCTAGGTAGCTGTGG 3'

T286D: 5' CCACAGCTACCTAGAGCCCGAGGGGAGGAG 3' and
5' CTCCTCCCCTCGGTCTCTTGGTAGCTGTGG 3'

Primary culture of neurons and transfection

The primary culture of striatal neurons has been performed as previously described (Benchoua et al., 2008). These neurons were electroporated with the mouse striatal neuron Nucleofector® kit according to the supplier's manual (Amaxa, Biosystem, Köln, Germany).

Histological analyses

After deep anesthesia by intraperitoneal injection of a sodium pentobarbital solution (50 μg per gram of body weight), mice were transcardially perfused with

100 ml of phosphate buffer containing 4 % paraformaldehyde at 8 ml/min. The brains were removed, post-fixed overnight in the same solution, then cryoprotected by immersion in a 15 % sucrose solution for 24 hours followed by immersion in a 30 % sucrose solution for another 24 hours. Free-floating 30- μ m-thick serial coronal sections throughout the striatum were collected using a freezing sliding microtome (SM2400; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

For immunohistochemistry, sections were treated with 0.3 % hydrogen peroxide for one hour, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), blocked in PBS containing 4.5 % normal goat serum for one hour, then incubated overnight at 4°C in PBS containing 3 % normal goat serum and one of the following antibodies: rabbit anti-DARPP-32 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:1000), mouse anti-NeuN (Millipore, Molsheim, France; 1:200), rabbit anti-Ubiquitin (Wako Chemicals, Neuss, Germany; 1:1000), or mouse anti-HA (Covance, Princeton, NJ; 1:500). Sections were rinsed three times in PBS before incubation with the appropriate anti-IgG biotinylated antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) at a 1:5000 dilution for one hour. Staining was visualized by the addition of avidin-biotinylated peroxidase and incubation with DAB or VIP substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for one minute. For NeuN immunostaining, we used the M.O.M. immunodetection kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Stained sections were mounted on microscopic slides.

The area of the striatal lesions resulting from lenti-Htt171-82Q infection was delineated manually by identifying the border of the lesion on each coronal brain section. The corresponding surface was calculated using the MCID image analysis software (InterFocus Imaging, Cambridge, UK). The volume of the striatal lesion was determined using the Cavalieri method (Diguët et al., 2009). The number of Ubiquitin-

positive inclusions was quantified as previously described (Diguët et al., 2009) with the following modifications: the inter-section distance was 210 μm (i.e. one in every seven sections was used) and observations were performed using a 10X objective on an Axioplan 2 Imaging microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). With this set-up, objects with an apparent cross-sectional area of over 5 μm^2 could be reliably detected.

For GFP fluorescence analysis, equidistant 30- μm -thick coronal brain sections (intersection distance: 210 μm) were randomly sampled throughout the striatum. Observations were performed using a 10X objective on a motorized Axioplan 2 Imaging microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) equipped with an X-Cite 120PC Q fluorescence excitation system (Lumen Dynamics, Mississauga, Canada) allowing controlled excitation intensity and homogeneity throughout the field of view. Images were automatically acquired and analyzed using Fluo'Up and Mercator softwares (Explora Nova, La Rochelle, France). Care was taken to optimize image acquisition and avoid image saturation. On each section, the fluorescence level of each lenti-GFP-infected striatum was determined by subtracting the background fluorescence level measured outside the infection site from the mean fluorescence level within the infected area. A mean fluorescence level was then calculated across sections for each striatum.

Real-time quantitative RT-PCR and Northern blot analysis

Adult mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of a sodium pentobarbital solution (50 μg per gram of body weight) before decapitation. The brains were immediately removed and positioned in a coronal brain matrix (Ted Pella, Redding, CA). For Dclk3 mRNA level measurements in knockdown experiments,

1-mm-thick brain sections were examined under a fluorescence microscope (DM6000 M; Leica Microsystems) and the striatal area expressing the GFP reporter protein was sampled using a 1.5-mm-diameter punch (Ted Pella, Redding, CA). For the quantification of *Dclk3* levels in mice, the striatum was dissected out using a scalpel from 1-mm-thick brain sections. Total RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) were carried out according to standard procedures, using the primers 5' TGGGCGGCAGGTGTGAT 3' and 5' GCTCGTCTTGGTCCCTCTCAG 3' for *Dclk3*.

For Northern blot analysis, a 5-mm-thick block containing the entire striatum (between grooves 3 and 8 of the matrix, groove 1 being the most anterior; Brochier et al., 2008) was removed from each brain and processed for mRNA extraction. Twenty-five-microgram total RNA samples were denatured in a glyoxal-dimethylsulfoxide solution, electrophoresed on a 1% agarose gel, and then transferred onto a Hybond-XL nylon membrane (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Hybridization was carried out at 65°C in Rapid-Hyb buffer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) using an [α -³²P]dCTP random prime-labeled (Prime-It II; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 788-bp-long *Pst* I fragment of the *Dclk3* transcribed DNA sequence as a probe (Fig. 1A)..

ACKNOWLEDGMENTS

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement no. HEALTH-F5-2008-222925. L.G. was supported by the Neuropôle de Recherche Francilien and the Fondation pour la Recherche Médicale.

Figure Legends

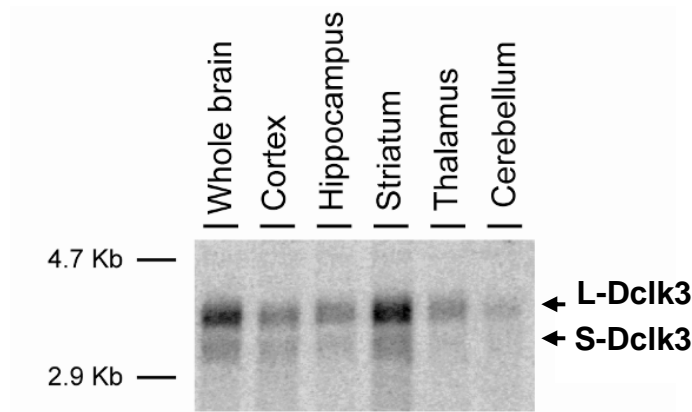


Figure 1: Expression of Dclk3 mRNAs in the brain.

Northern blot analysis was performed using forebrain total RNA samples from wild-type mice. The membrane was hybridized with a probe corresponding to a *Pst* I fragment of the Dclk3 transcribed DNA sequence. Note the preferential expression in the striatum and the presence of two mRNA species: the upper band corresponds to the long form of Dclk3 (L-Dclk3 mRNA), the lower and fainter band corresponds to the short form of Dclk3 (S-Dclk3 mRNA).

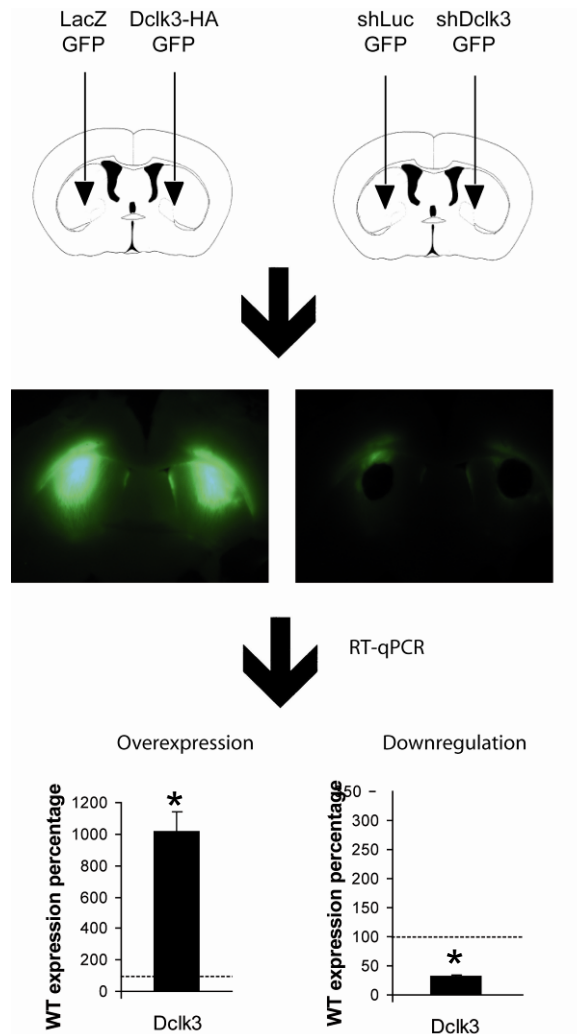


Figure 2: Efficiency of lentiviral vectors coding Dclk3-HA and its shRNA.

Mice were injected in the striatum with lenti-S-Dclk3-HA (mixed with lentiviral vector coding for GFP) or lenti-shDclk3 (biscistronic construct also coding GFP). Six weeks later the striatal region expressing GFP mice was dissected out and analyzed using qRT-PCR. Note that the level of expression using lenti-S-Dclk3-HA was approximately 10 times that of the endogenous mRNA. Similar results were obtained with L-Dclk3-HA. Lenti-shDclk3 produced a significant ~70% reduction of Dclk3 expression. Results are expressed as mean +/- standard error of the mean. *, p<0.01, Unpaired Student *t* test.

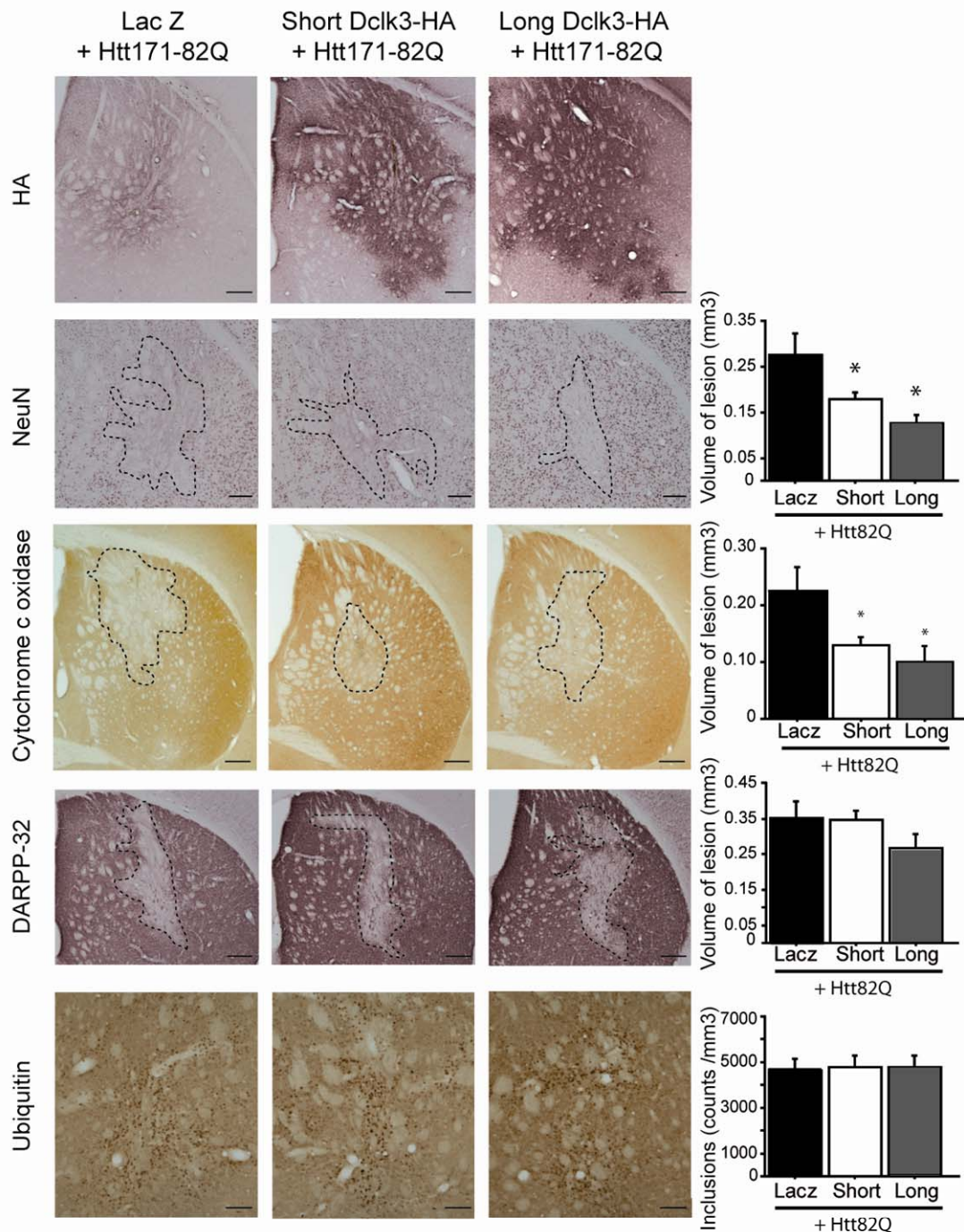


Figure 3: Effect of the overexpression of Dclk3-HA against toxicity induced by m-Htt. Adult male mice received a bilateral intrastratial injection of a mixture of two lentiviral vectors containing lenti-Htt171-82Q with either lenti-LacZ (control), lenti-S-Dclk3-HA or lenti-L-Dclk3-HA. Six weeks after infection, brains were processed for histological evaluation using DARPP-32-, NeuN-, Ubiquitin-immunostaining and COX histochemistry to detect Htt171-82Q toxicity. Left panel: typical coronal mouse brain sections display representative area with depleted staining in the different groups. Right panel: histograms representing quantitative determination of the volume of the striatum with depleted staining in the different groups. Immunohistochemical detection of HA-tag indicates the presence of recombinant Dclk3 proteins after infection with lenti-S-Dclk3-HA and lenti-L-Dclk3-HA. Note that the expression of Dclk3 proteins leads to a significant reduction of the lesions seen using NeuN and COX staining. The number of Ubiquitin-positive inclusions remains unchanged. Scale bars = 0.2 mm. Results are expressed as mean (n=7-10/group) +/- standard error of the mean. *, p<0.01, One way ANOVA and Fisher PLSD *post hoc* test. Scale bars: HA 0.2mm, NeuN 0.1mm, DARPP32 and Cox 0.5mm and ubiquitin 0.125mm.

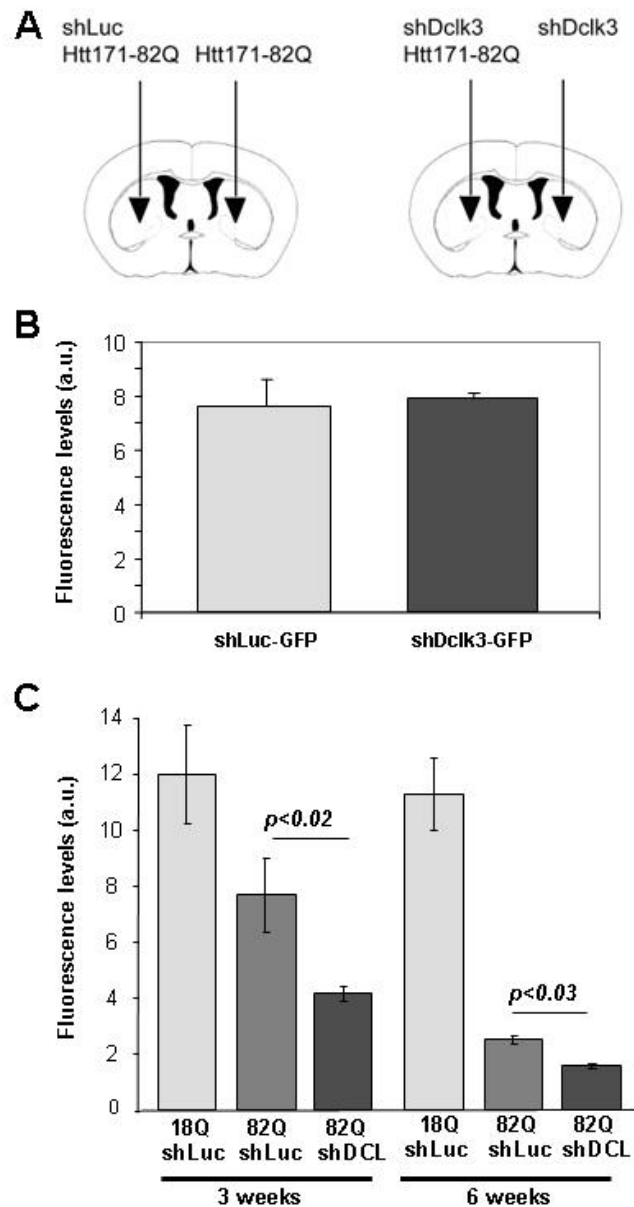


Figure 4 : Fluorescence detection of GFP shows that Dclk3 knock down increases toxicity of mutant Htt *in vivo*. In **A**, mice received lentiviral vectors coding a shRNA targeting either Dclk3 (shDCLK) or luciferase (shLuc) as control. The constructs coding shRNA also code for the GFP. Three weeks later brain were removed and processed for quantification of GFP fluorescence under microscope observation image analysis (**B**). Note that both vectors alone have similar transduction efficacy, expressing same levels of GFP. In **C**, mice were infected with lenti-Htt171-18Q mixed with lenti-shLuc (control levels of GFP) or lenti-Htt171-82Q mixed with lenti-shDLK3 or lenti-shLuc. Quantification of GFP levels was performed at 3 and 6 weeks after infection. Note the levels of GFP are reduced at both time points by lenti-Htt171-82Q when compared to Htt171-18Q, suggesting toxic effect of the mutant protein. Loss of GFP is exacerbated by lenti-shDclk3. Results are expressed as mean (n=7-10/group) +/- standard error of the mean. *, $p < 0.01$, One way ANOVA and Fisher PLSD *post hoc* test.

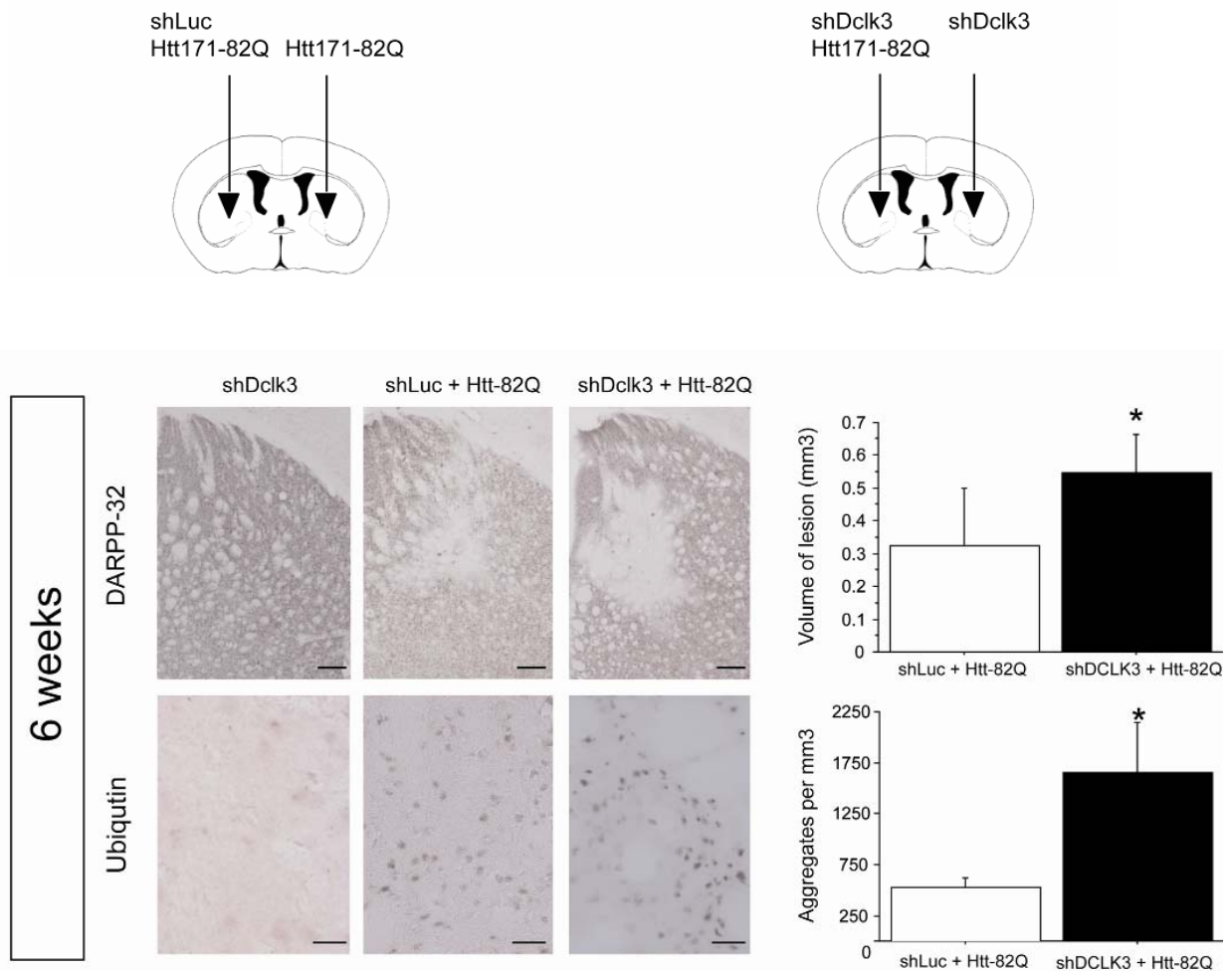


Figure 5: Effect of the Knock down of Dclk3 against toxicity induced by m-Htt. Adult male mice received a bilateral intrastriatal injection of lenti-Htt171-82Q mixed with either lenti-shLuc (control) or lenti-shDclk3. Mice were also infected with lenti-shDclk3 alone (lef images). Six weeks after infection, brains were processed for histological evaluation using DARPP-32 and Ubiquitin-immunostaining to detect Htt171-82Q toxicity. Left panel: typical coronal mouse brain sections where areas with depleted staining can be seen when Htt171-82Q is expressed. Note that expression of shDclk3 alone produces no change in staining. Right panel: histograms representing quantitative determination of the volume of the striatum with depleted staining in the different groups. Note that shDclk3 leads to a significant increase of the lesion volume determined using DARPP-32. The number of Ubiquitin-positive inclusions is significantly increased by the lenti-shDclk3 compared to control. Scale bars = 0.2 mm. Results are expressed as mean (n=7-10/group) +/- standard error of the mean. *, p<0.01, Paired Student t test. Scale bars: DARPP-32 0.5mm, ubiquitin 50µM.

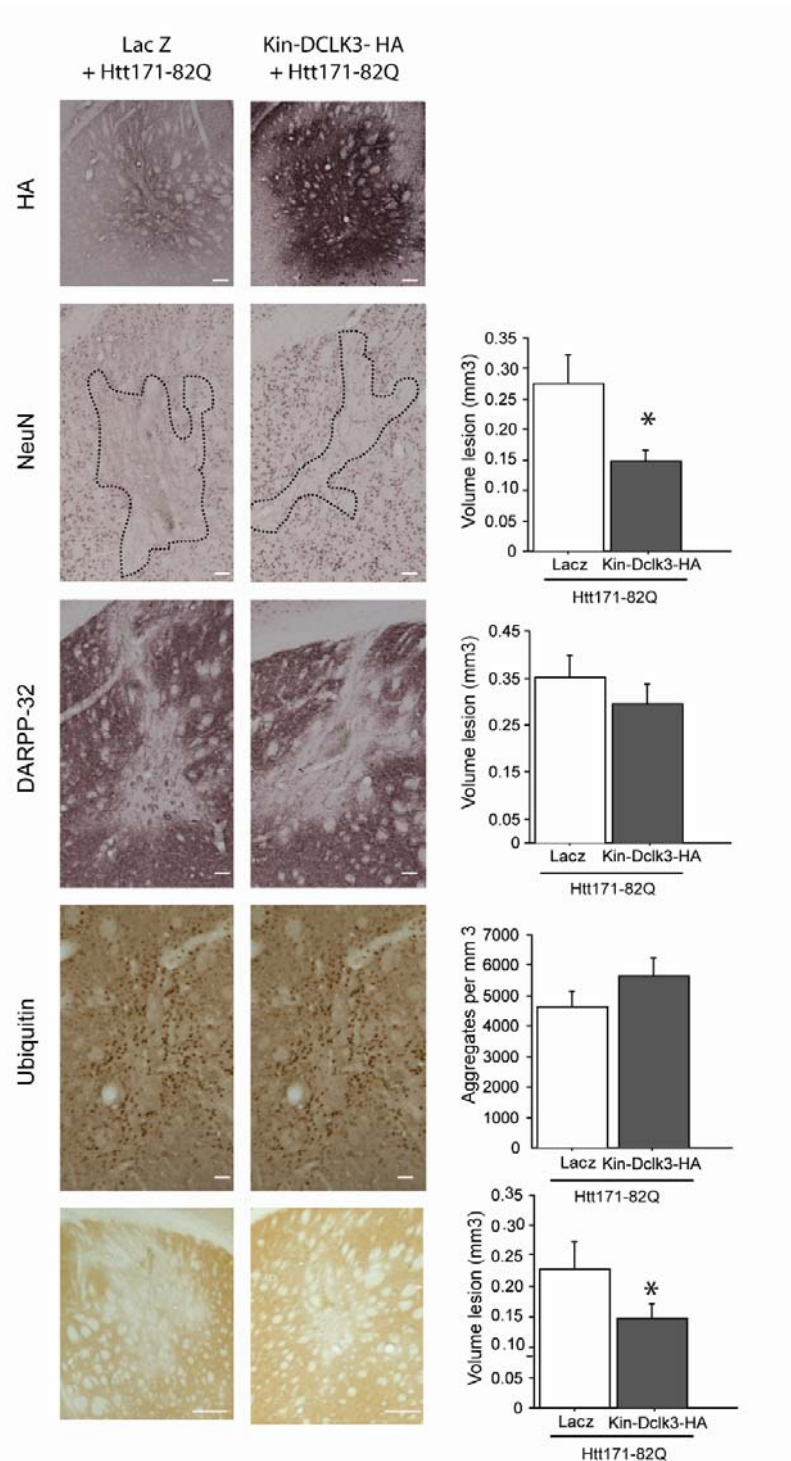


Figure 6: Overexpression of Kin-Dcl3-HA in HD context. Adult male mice received a bilateral intrastriatal injection of lenti-Htt171-82Q mixed with either lenti-Lacz (control) or a lentiviral vector coding for the kinase domain of Dcl3 (lenti-KinDcl3). Six weeks after infection, brains were processed for histological evaluation using NeuN, DARPP-32 and Ubiquitin-immunostaining and COX histochemistry to assess Htt171-82Q toxicity. Left panel: typical coronal mouse brain sections where areas with depleted staining can be seen. Right panel: histograms representing quantitative determination of the volume of the striatum with depleted staining in the different groups. Note that Kin-Dcl3 leads to a significant decrease of the lesion volume determined using NeuN and COX. The number of Ubiquitin-positive inclusions is not significantly changed by the lenti-Kin-Dcl3 compared to control. Scale bars = 0.2 mm. Results are expressed as mean (n=7-10/group) +/- standard error of the mean. *, p<0.01, Paired Student t test. Scale bars: HA 0.2mm, NeuN 0.1mm, DARPP32 and Cox 0.5mm and ubiquitin 0.125mm.

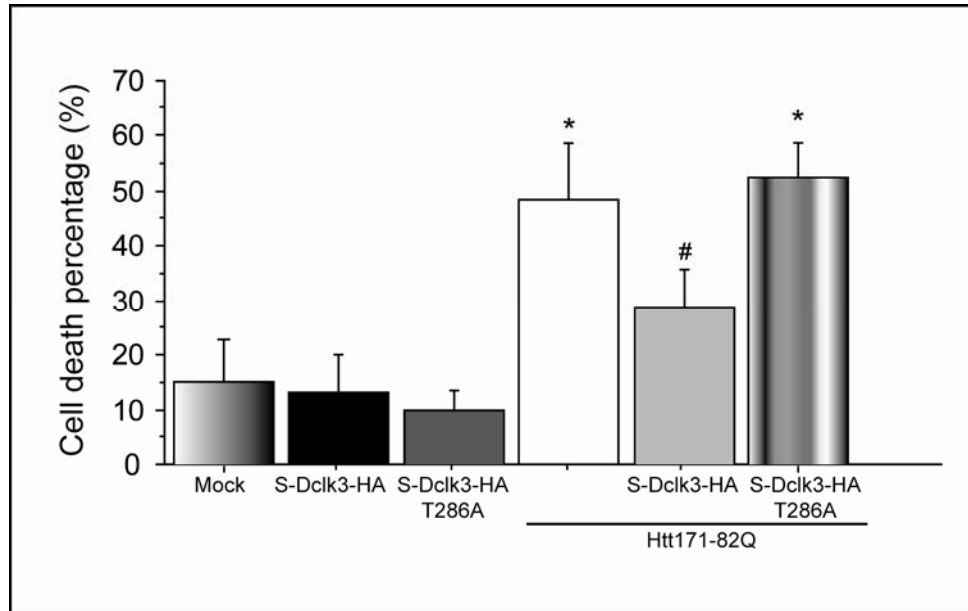


Figure 7: Mutation of S-Dclk3 abrogates neuroprotective effects against Htt171-82Q. Primary culture of striatal neurons were transfected by electroporation with plasmids coding wild type S-Dclk3-HA or S-Dclk3 with T286→ Ala substitution alone or in combination with a plasmid coding Htt171-82Q. Forty eight hours later, cells were fixed and transfected neurons displaying apoptotic nuclei were counted. Note that while S-Dclk3-HA reduced Htt171-82Q-induced cell death, the T286A mutant is ineffective. Results are expressed as mean +/- standard error of the mean and correspond to three independent experiments each including 3-4 slides per experimental group. *, $p < 0.01$ as compared to mock transfection, #, $p < 0.01$ compared to Htt171-82Q alone. One way ANOVA and Fisher's *post hoc* PLSD test.

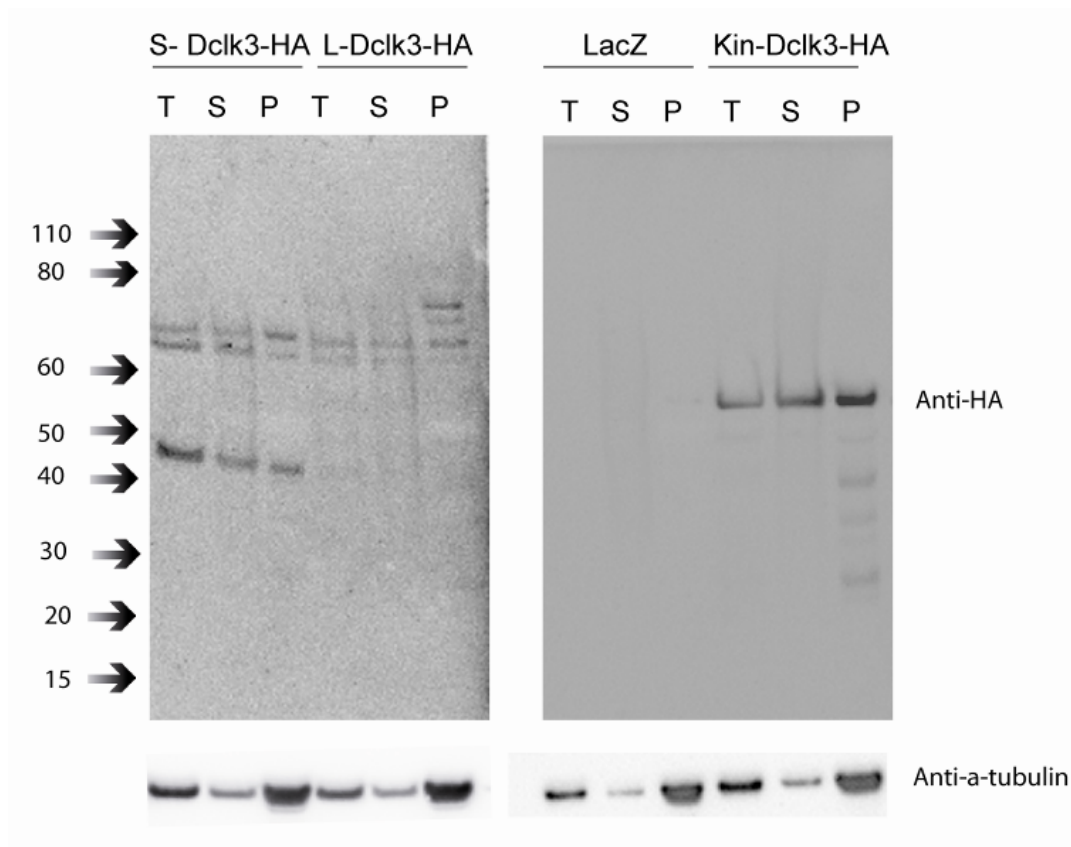


Figure 8: Dclk3-HA associates to microtubule preparations. Primary culture of striatal neurons were infected with lenti-Lacz (control), lenti-S-Dclk3-HA, lenti-L-Dclk3-HA and lenti-Kin-DLCK3-HA. Four weeks later, cells were collected and processed to prepare a fraction enriched in microtubules (see Materials and Methods for experimental details). Total cytosolic extracts (T), supernatant of microtubule preparation (S) and microtubule preparation found in the pellet (P) were analysed using western blot of the HA tag (upper images) and α -tubulin (lower images). Similar amount of total proteins were loaded in each lane. All microtubule preparations show preferential enrichment in α -tubulin. Note that the HA tag corresponding to full length and cleaved forms of S-Dclk3-HA and L-Dclk3-HA recombinant proteins are found associated with microtubules (P). The kinase domain of Dclk3 Kin-DLCK3 which migrates at its expected molecular weight (53 kDa) also associates with microtubules. This experiment has been repeated twice leading to similar results.

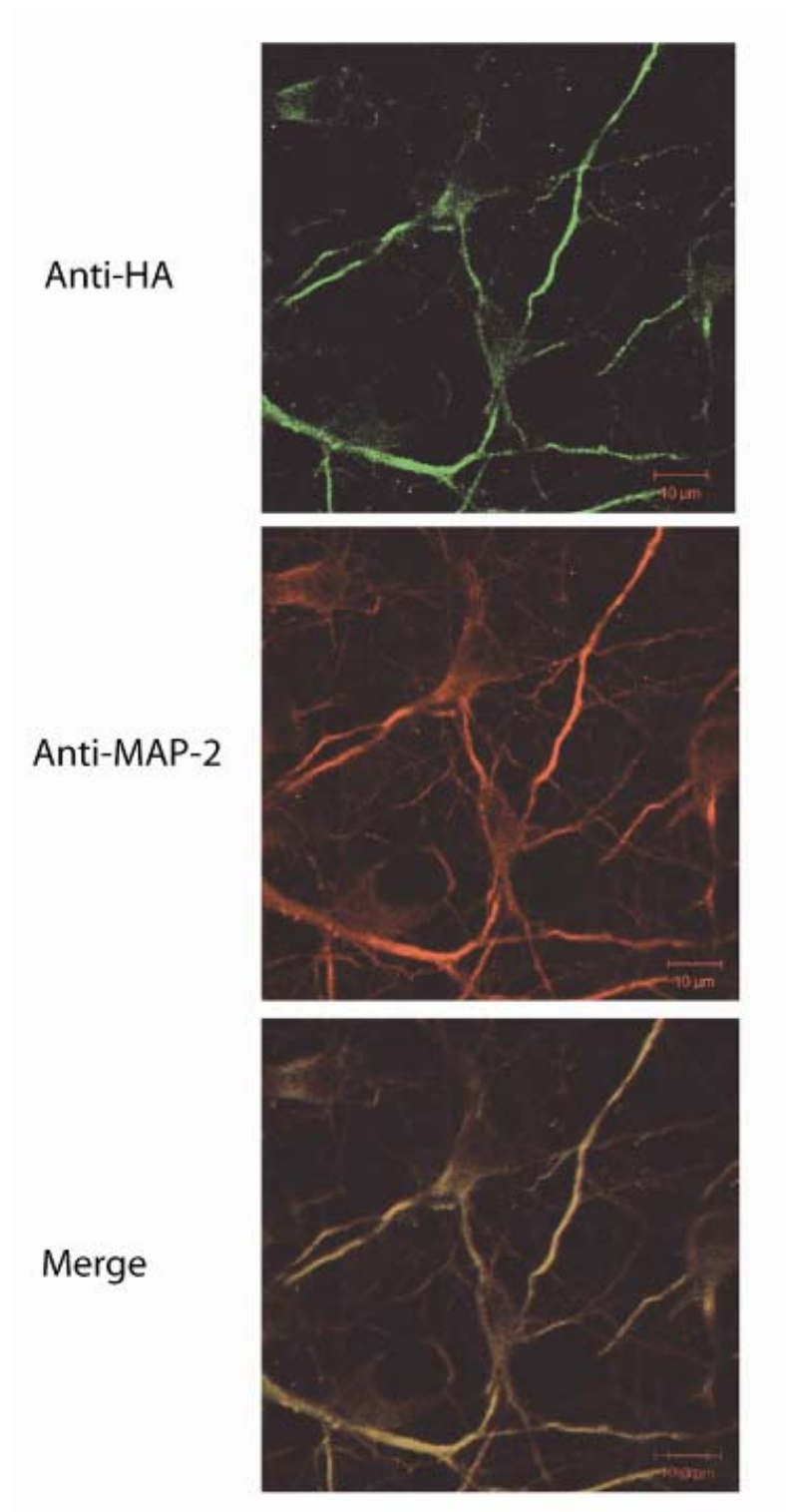


Figure 9: Dclk3-HA co-localizes with the microtubule associated protein 2 (MAP2). Primary culture of striatal neurons were transfected by electroporation with plasmids coding wild type S-Dclk3-HA. At 48h post transfection, culture were fixed, processed for immunofluorescence detection of the HA tag and MAP2 and examined using confocal microscopy. Note that the two proteins are mainly co-localized. Scale bar 10μm.

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Gpr88 module l'expression de DARPP-32 en présence de la huntingtine mutée

Introduction

Gpr88 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires lié à une protéine G (GPCR) dont le ligand et la fonction sont inconnus. Gpr88 est très exprimé dans le striatum et plus particulièrement dans les neurones (Cahoy et al., 2008). Il pourrait être impliqué dans la modulation du système dopaminergique. Les souris KO pour Gpr88 présentent une plus grande sensibilité à la dopamine potentiellement *via* une hypersensibilité post-synaptique des récepteurs dopaminergiques D2 (Logue et al; 2009). Nous avons démontré que l'expression de Gpr88 est significativement diminuée dans le modèle transgénique de la maladie de Huntington, les souris R6/2 (Brochier et al., 2008) suggérant son implication dans la physiopathologie de la MH. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de la surexpression et de l'inactivation de Gpr88 sur la toxicité de la htt mutée *in vivo* par l'utilisation de vecteurs lentiviraux.

Matériels et méthodes (Annexe VI)

Résultats

Étude de l'effet de la modification d'expression de Gpr88 sur la toxicité d'un fragment court de la htt-m

Des vecteurs lentiviraux (LV) codant pour Gpr88 (LV-Gpr88) et son shRNA (LV-shGpr88) spécifique ont été générés. Les modifications des niveaux d'expression par le LV-Gpr88 et le LV-shGpr88 ont été déterminées *in vivo* par leur injection dans le striatum de souris (n=5). Le groupe témoin a quant à lui été injecté avec le LV codant la β galactosidase (LV-LacZ) ou le shRNA ciblant la luciférase (LV-shLuc) (n=5). Les vecteurs ont été injectés avec le LV codant la Green Fluorescent Protein (LV-GFP). Six semaines après la chirurgie, la zone fluorescente due à l'expression de la GFP et correspondant à la dispersion des virus a été extraite et analysée en PCRq. Le LV-Gpr88 a permis une expression de Gpr88 deux fois plus

importante (Student t test apparié, * $p < 0.05$) que dans le groupe témoin exprimant le LV-LacZ. Le LV-shGpr88 a réprimé l'expression de Gpr88 endogène d'environ 80% (Student t test non apparié, * $p < 0.05$) par rapport au groupe contrôle exprimant le LV-shLuc. Le LV-Gpr88 et le LV-shGpr88 ne modifient ni le niveau d'expression de la htt endogène ni celui de DARPP-32 (Figure18).

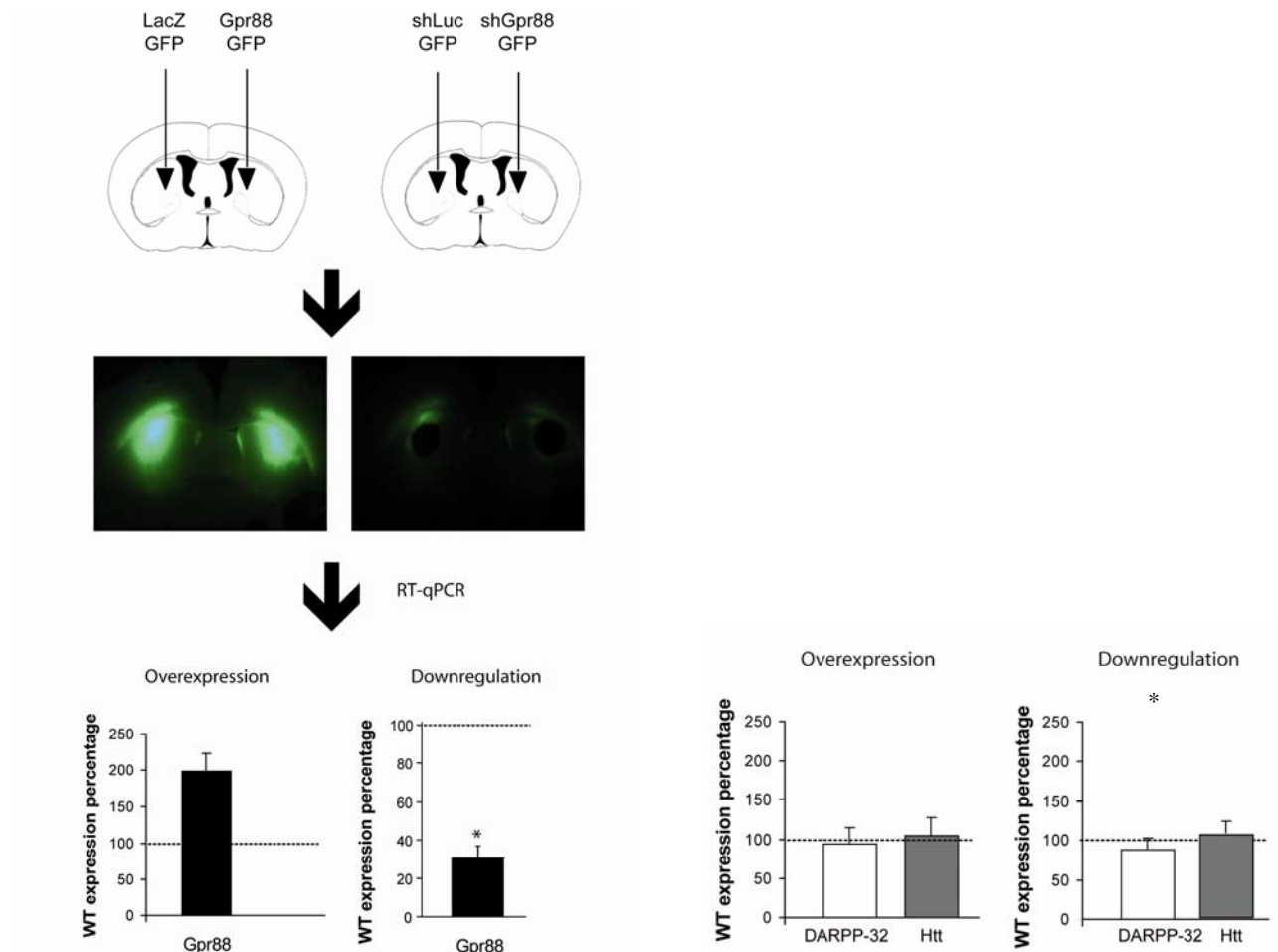


Figure 18 : Efficacité des vecteurs LV-Gpr88 et LV-shGpr88 *in vivo*

La détermination de la surexpression de Gpr88 a été réalisée en injectant le LV-Gpr88 et son contrôle le LV-LacZ. Les virus ont été injectés (100 ng P24/ μ L) avec un LV-GFP (50ng P24/ μ L) dans striatum de souris (n=5). L'évaluation du niveau d'inactivation par le shGpr88 a été étudiée par l'injection de LV-shGpr88 et son contrôle le LV-shLuc (100 ng P24/ μ L) avec un LV-GFP (50ng P24/ μ L) avec les mêmes doses virales que précédemment. La zone fluorescente a été extraite six semaines après l'infection afin d'extraire les ARN. Les échantillons ont été analysés par RT-qPCR pour déterminer le niveau d'expression de Gpr88, DARPP-32 et de la htt. Le LV-Gpr88 produit une surexpression significative (Student t test apparié, * $p < 0.05$) de Gpr88 sans modifier le niveau d'expression de DARPP-32 et de la htt. Le LV-shGpr88 produit une répression significative de Gpr88 (Student t test apparié, * $p < 0.05$) sans modifier le niveau d'expression de DARPP-32 et de la htt.

Nous avons vérifié que les volumes des lésions dans le groupe codant pour le LV-LacZ avec le LV-htt171-82Q n'étaient pas différents de ceux des lésions induites par l'injection du LV-htt-171-82Q seul.

Les LV-Gpr88 et LV-shGpr88 ont été injectés seuls dans le striatum de souris. La modification d'expression de Gpr88 n'a pas produit de perte du marquage neuronal (NeuN), du marqueur mitochondrial (COX) et du marqueur de la dysfonction striatale (DARPP-32). Ce résultat a suggéré que ces vecteurs n'ont pas engendré de toxicité intrinsèque. Nous avons évalué l'effet de l'expression et de l'inactivation de Gpr88 sur la toxicité de la htt-m. Une combinaison de vecteurs a été injectée dans le striatum des souris. Un groupe expérimental (n=10) a reçu l'injection du LV-Gpr88 ou du LV-shGpr88 avec le LV-htt171-82Q. Le groupe témoin (n=10) a été injecté avec le LV-LacZ mélangé avec le LV-htt171-82Q.

La surexpression de Gpr88 (Figure19-A) n'a pas modifié la taille de la lésion induite par la toxicité du LV-Htt171-82Q détectée par la perte localisée du marquage NeuN et COX comparée au groupe témoin (LV-LacZ + LV-Htt171-82Q). Le nombre d'agrégats positifs pour l'ubiquitine est similaire dans les deux groupes. De manière surprenante, le volume de la lésion détectée en DARPP-32 est significativement augmenté dans le groupe surexprimant Gpr88 en présence du LV-htt171-82Q (Student t test non apparié, * $p < 0.05$) comparé au groupe témoin.

L'inactivation de Gpr88 par le LV-shGpr88 (Figure19-B) en présence du LV-Htt171-82Q n'a pas changé le volume de lésion détecté en NeuN, en COX et en DARPP-32 comparé au groupe témoin exprimant le LV-shLuc et le LV-Htt171-82Q. Le nombre d'agrégats ubiquitine-positifs est inchangé entre les 2 groupes. L'inactivation de Gpr88 ne semble pas avoir d'effet majeur sur la toxicité de la htt-m mais pourrait indirectement amplifier la perte de DARPP-32 induite par la htt-m. Ce résultat pourrait être en accord avec l'hypothèse d'un rôle de Gpr88 dans la signalisation dopaminergique.

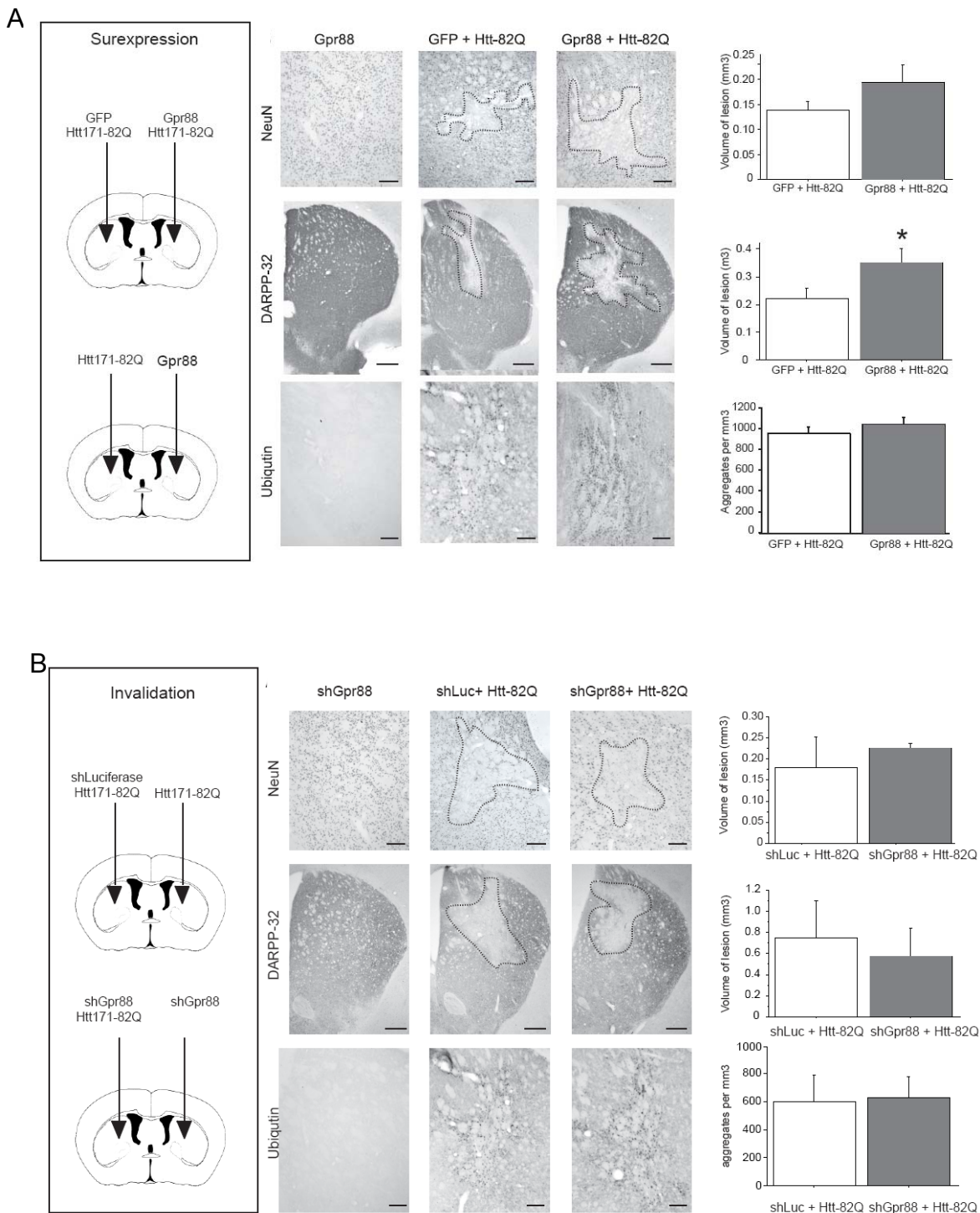


Figure 19 : Expression de Gpr88 sur la toxicité de la htt-m.

Le plan expérimental est présenté dans l'encart gauche. Six semaines après l'infection de striatum de souris (n=10/groupe), les cerveaux ont été analysés à l'aide des marquages NeuN, DARPP-32, et Ubiquitine. **A-** Effet de la surexpression de Gpr88 sur la toxicité de la htt-m. le volume de la lésion en DARPP-32 est significativement augmenté **B-** Effet de l'invalidation de Gpr88. La répression d'expression de Gpr88 ne modifie pas la toxicité de la htt-m. Scale Bars: NeuN 0.1mm, DARPP32 0.5mm, ubiquitine 0.125mm. * p<0.05 Student t test non apparié.

Étude d'un rôle potentiel dans la signalisation dopaminergique

Gpr88 est un récepteur à protéine G sélectivement exprimé dans les MSN (Massart et al., 2009). PSD-95 est une protéine post-synaptique particulièrement abondante dans les membranes des régions synaptiques et dans des compartiments spécifiques liés à la signalisation cellulaire. Nous avons étudié si l'action de Gpr88 sur l'expression de DARPP-32 pouvait mettre en jeu une interaction avec la htt-m et/ou PSD95.

Nous ne disposons pas d'anticorps commercial pour Gpr88. Nous avons cloné Gpr88 avec une étiquette HA soit dans sa partie C-terminale soit dans sa partie N-terminale. Des neurones striataux issus de la culture primaire ont été infectés avec le LV-HA-Gpr88 ou le LV-Gpr88-HA ou le LV-LacZ conjointement avec le LV-GFP à DIV7. À DIV28, nous avons extrait les protéines avec un tampon contenant du détergent afin de réaliser une co-immunoprécipitation par l'anticorps anti-HA (Figure 20). L'étiquette HA est détectée dans les extraits issus des neurones infectés avec le LV-Gpr88-HA et le LV-HA-Gpr88 au poids moléculaire de 65 KDa. DARPP-32 n'a ni été co-immunoprécipitée avec Gpr88-HA ni avec HA-Gpr88 (Figure20). PSD95 et la htt endogène ont été détectés dans les échantillons co- immunoprécipités par Gpr88-HA et HA-Gpr88. Une co-immunoprécipitation en utilisant la htt et PSD-95 comme hameçon, sont en cours afin de valider ces résultats. Gpr88 pourrait interagir avec la htt et PSD95. PSD95 est majoritairement localisée à la membrane synaptique. PSD95 est aussi présent dans des microdomaines de la membrane riches en cholestérol et en sphingolipides, les « rafts » (ou radeaux lipidiques). Les « rafts » sont des domaines dynamiques impliqués notamment dans la transduction du signal, le trafic membranaire et l'adhésion des cellules (pour revue (Suzuki, 2002)).

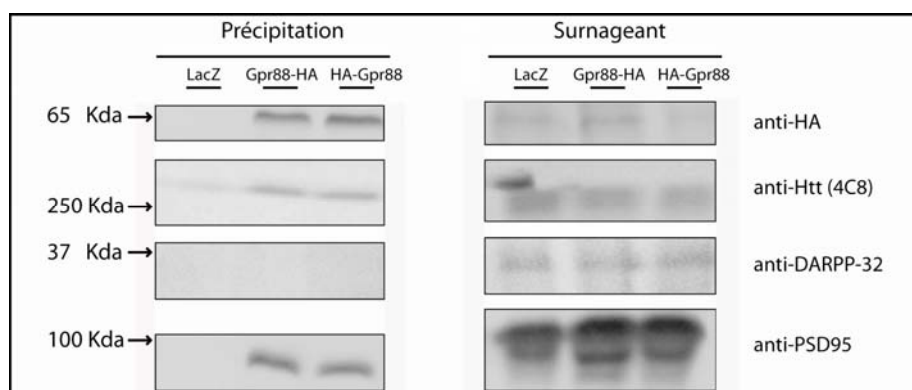


Figure 20 : La co-immunoprécipitation de Gpr88-HA et HA-Gpr88

Des cultures primaires de neurones striataux ont été infectées avec le LV-LacZ (témoin), le LV-Gpr88-HA ou le LV-HA-Gpr88 à DIV7. À DIV28, les neurones ont été collectés en présence de détergent. La co-immunoprécipitation a été réalisée en utilisant un anticorps contre l'étiquette HA. L'immunoprécipitation a été analysée en Western blot. La htt et PSD95 sont détectés dans les échantillons contenant Gpr88.

Nous avons essayé de déterminer si l'interaction de Gpr88-HA pour PSD95 pouvait avoir lieu dans les rafts. Nous avons conduit des expériences biochimiques consistant en l'isolation lipidique de la membrane (Figure21) (Butchbach et al., 2004). Le striatum de souris (n=6) a été injecté avec un mélange contenant le LV-Gpr88-HA (100ng de P24/ μ l) et le LV-GFP (50ng de P24/ μ l). Six semaines après infection, nous avons isolé les zones fluorescentes du striatum et réalisé un homogénat. Les membranes ont été traitées avec le détergent Brij25 1%. L'ensemble a été soumis à une ultracentrifugation en gradient de sucrose (40%, 30% et 5%) pour isoler les membranes résistantes au Brij25 en fonction de leur flottabilité.

Douze fractions ont été récoltées en partant du haut du tube (haute flottabilité) et analysées en Western Blot. La fraction 1 correspond aux protéines associées aux membranes résistantes au détergent de haute flottabilité. Les rafts sont présents dans les fractions 3, 4 et 5 (Figure21). L'enrichissement dans ces régions de la protéine flotilin-1, marqueur de raft, et PSD 95 ont permis de valider le bon déroulement de l'expérience. La protéine Gpr88-HA est présente dans les fractions 10 et 11 qui correspondent à un enrichissement dans les domaines de la membrane plasmique totalement solubilisée par le détergent. La bande à ~40KDa

correspondrait à Gpr88 sous forme de monomères, la forme à ~80 KDa à la forme dimérique du récepteur et la bande à ~65 KDa pourrait correspondre au monomère de Gpr88 ayant subi une modification post-traductionnelle. En effet Gpr88 possède un site identifié de N-glycosylation ainsi que quatre sites de phosphorylation possible pour la PKC (Mizushima et al., 2000). Nos résultats indiquent que Gpr88 ne se localisait pas dans les radeaux lipidiques.

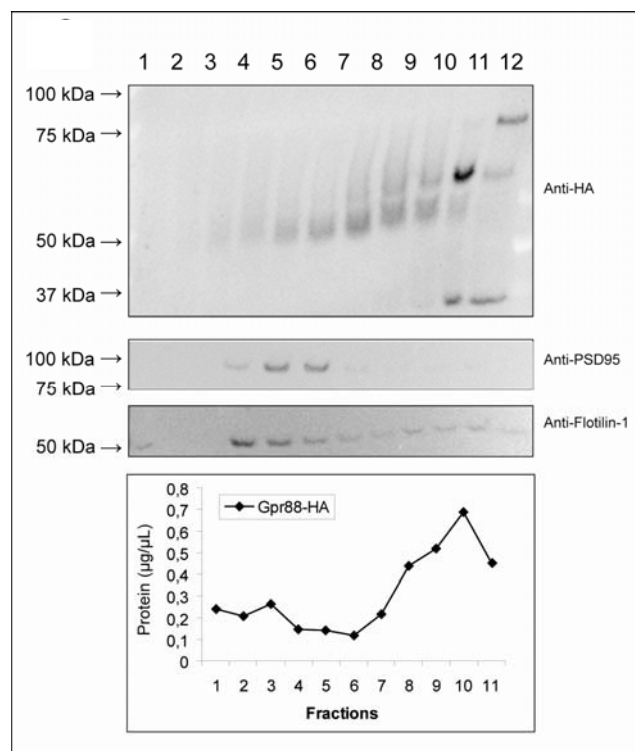


Figure 21 : Fractionnement lipidique des membranes.

Des cultures de neurones striataux ont été infectées avec le LV-Gpr88-HA à DIV7. À DIV28, les neurones ont été collectés afin de traiter les membranes en présence de détergent non ionique (Brij25) et soumis à une ultracentrifugation (135 700g, 4°C, 17H) en gradient de sucrose. Gpr88HA est détectée par son étiquette HA dans les fractions solubles 11 et 12. les rafts sont localisés dans les fractions 4 et 5 où la flotilin-1 et PSD95 peuvent être détectées.

Discussion

La modification d'expression de Gpr88 dans le contexte de la MH ne modifie ni la survie des neurones (NeuN et COX) ni le nombre d'agrégats à six semaines post-infection. De manière surprenante, Gpr88 en présence de la htt-m aggrave le volume du striatum présentant une perte du marquage DARPP-32.

Les résultats obtenus n'indiquent pas un effet majeur de Gpr88 sur la toxicité de la htt-m. Dans la MH et les modèles transgéniques, son expression est très diminuée. Nos résultats suggèrent que cette baisse ne contribuerait pas de façon majeure à la dégénérescence du striatum. Au contraire, la perte de DARPP-32, induit par la htt-m pourrait être ralenti par la baisse d'expression de Gpr88. Cependant dans nos expériences l'inactivation partielle de Gpr88 par la stratégie du shRNA ne semble pas changer significativement la baisse d'expression de DARPP-32 induit par le fragment court Htt171-82Q. La régulation de DARPP-32 ne semble pas "bidirectionnelle".

La surexpression de Gpr88 seul, ne modifie ni le niveau transcriptionnel de DARPP-32 détectée en PCRq ni le marquage de DARPP-32. La protéine DARPP-32 intervient dans la signalisation dopaminergique du striatum. Elle peut être phosphorylée sur les thréonines 34 et 75 de manière AMPc/PKA dépendante. La stimulation des récepteurs à la dopamine de type D1 conduit à l'élévation du niveau de l'AMPc qui active la PKA capable alors de phosphoryler DARPP-32 sur la Thréonine 34 (DARPP-32-Thr34). DARPP-32-Thr34 inhibe la protéine phosphatase 1 (PP1) et génère une cascade d'événements aboutissant à l'activation de la transcription de gènes tels que c-Fos. Lorsque les récepteurs à la dopamine de type D2 sont stimulés, la kinase Cdk5 (cycline dépendante kinase 5) phosphoryle DARPP-32 sur la thréonine 75 qui est alors en mesure d'inhiber la PKA. Le glutamate est aussi capable d'activer cette voie par la stimulation des récepteurs mGluR ce qui finalement conduit à l'activation de Cdk5 (Pour revue (Svenningsson et al., 2005). La htt-m modifie négativement l'expression de DARPP-32 (Bibb et al., 2000) ce qui reflète un état dysfonctionnel du neurone. Gpr88 potentialiserait l'effet répressur qu'à la htt-m sur DARPP-32. Nous avons vérifié que notre récepteur n'interagit pas avec directement avec DARPP-32 et qu'il n'était pas présent dans les rafts. Cependant, nos résultats préliminaires suggèrent que Gpr88 interagisse avec

la htt-m. La potentialisation de l'effet de la htt sur DARPP-32 par Gpr88 pourrait passer par cette interaction directe. L'affinité de Gpr88 pour les différentes formes de la htt (sauvage et mutée) et la mise en évidence de la localisation subcellulaire de cette interaction potentielle permettraient d'éclaircir ce mécanisme. Par ailleurs, Gpr88 pourrait par son interaction avec PSD95 dans les membranes, changer l'efficacité de la signalisation dopaminergique et modifier l'expression de la htt.

Gpr88 possède 27 % d'homologie avec le récepteur à la sérotonine de type 1D (5-HT1D) et 21 % d'homologie avec le récepteur adrénérgique β 3 (Mizushima et al., 2000). Le récepteur 5-HT1D est couplé à la protéine Gi/o qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase ce qui diminue la « décharge » des neurones (pour revue Gupta 2010). Le récepteur adrénérgique β 3 est lié à la protéine Gs qui active l'adénylate cyclase. Les données sur ces récepteurs ne permettent pas de transposer leur mode d'action à Gpr88 du fait de l'absence dans sa séquence primaire du motif DRY d'activation des récepteurs (Mizushima et al., 2000). Le motif DRY (Aspartate (D), arginine (R), tyrosine(Y)) permet la régulation de l'activité des récepteurs GPCR. Il est présent à la liaison du domaine transmembranaire III (TMIII) avec la boucle interne II. Il permettrait de maintenir l'état physiologique/fondamental du récepteur. La mutation de cette séquence engendre des modifications d'activité du récepteur (pour revue (Rovati et al., 2007)). Gpr88 possède un motif NRY présent de la souris à l'homme où l'Aspartate a été échangé par un acide aminé non chargé, l'Asparagine (N). Cette mutation pourrait être critique pour l'activité du récepteur (Mizushima et al., 2000) et pourrait rendre difficile son activation. Cette observation pourrait expliquer que la répression de Gpr88 par le shGpr88 ne produit pas d'effets observables. Il est possible que l'invalidation du récepteur Gpr88, naturellement peu actif, ne puisse pas modifier le phénotype induit par la htt-m.

L'effet de Gpr88 sur le striatum est limité et ne serait visible qu'en condition pathologique (maladie de Huntington, addiction, schizophrénie). Afin de déterminer l'impact de Gpr88 sur la physiologie du striatum, il serait intéressant de muter sa séquence NRY en une séquence DRY. Cette mutation permettrait de déterminer la fonction de Gpr88 dans son état d'activation maximal. Cet état amplifiait les effets de Gpr88 afin d'aborder la voie de signalisation qu'il pourrait réguler.

Conclusion

Nos résultats bien que préliminaires suggèrent que Gpr88 puisse accroître précocement la « dysfonction » des neurones indépendamment ou en amont du phénomène de dégénérescence dans la MH. Il est possible que les effets de Gpr88 sur DARPP-32 à six semaines soient un événement précurseur de l'impact faible du récepteur sur la dégénérescence induite par la htt-m. Il serait donc intéressant de réaliser une cinétique des effets de Gpr88 sur la toxicité induite par la htt-m.

La Crystalline mu (Crym) est un facteur pro-toxique dans la maladie de Huntington

Introduction

La Crystalline mu (Crym) est une protéine cytosolique capable de se lier à l'hormone thyroïdienne, la 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T3) de manière NADPH dépendante (Kobayashi et al., 1991; Suzuki et al., 2007). Crym pourrait être impliquée dans de nombreuses pathologies : la dégénérescence maculaire chez le primate non humain (Umeda et al., 2005), les cancers de la prostate (Malinowska et al., 2009). La mutation de Crym entraîne une surdité non syndromique (Abe et al., 2003; Oshima et al., 2006). Le niveau d'expression de Crym est diminué chez les patients schizophrènes (Martins-De-Souza et al., 2010). Cette diminution est corrélée négativement avec la durée des traitements médicamenteux et à l'évolution de la maladie (Martins-De-Souza et al., 2010).

Crym est particulièrement exprimée dans le noyau accumbens aussi désigné sous le terme de «striatum ventral » et dans le striatum chez la souris et chez l'homme (de Chaldee et al., 2003; Suzuki et al., 2007; Brochier et al., 2008). L'expression de Crym est diminuée de 50% dans les souris R6/2 (Brochier et al., 2008) et chez les patients de la MH (Hodges et al., 2006). Crym pourrait donc être impliquée dans la MH.

Matériels et méthodes (Annexe VI)

Résultats

Effets de la modification expérimentale de l'expression de Crym sur la toxicité de la huntingtin mutée

Des vecteurs lentiviraux codant pour la Crym-HA (LV-Crym-HA) et le shRNA dirigée contre la Crym (LV-shCrym) ont été générés. La détermination du niveau d'expression de Crym après infection par LV-Crym-HA et le LV-shCrym a été réalisée *in vivo*. Les vecteurs LV-Crym-HA et LV-shCrym ont été injectés avec le LV-

GFP dans le striatum de souris (n=5). L'infection du striatum par le lentivirus codant la β -galactosidase (LV-LacZ) ou le shRNA ciblant la luciférase (LV-shLuc) mélangés au LV-GFP (n=5) a constitué la condition témoin. Six semaines après injection, la zone d'infection détectée par la fluorescence de la GFP a été extraite et analysée en PCRq. Les résultats des analyses ont montré que le LV-Crym-HA a permis l'induction de l'expression de Crym à un niveau vingt fois supérieur à celui de la condition témoin. Le LV-shCrym a réduit l'expression de la Crym endogène de 50% par rapport au LV-shLuc. Par ailleurs nous avons déterminé que l'expression et l'inactivation de Crym ne modifiaient pas le niveau d'expression de la htt endogène (Fig. 22).

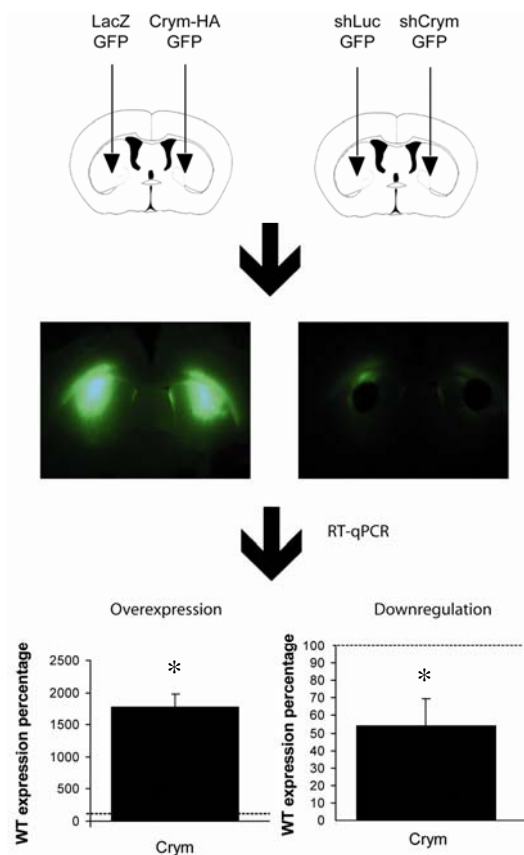


Figure 22 : Efficacité des LV Crym et shCrym *in vivo*

La surexpression de Crym a été étudiée en injectant le LV-Crym-HA et l'inactivation de Crym a été étudiée en injectant le LV-shCrym dans striatum de souris adultes (n=5/groupe). Les vecteurs témoins ont été respectivement le LV-LacZ et le LV-shLuc. Dans tous les cas la même quantité de particules virales a été injectée (1 μ L, 100 ng p24/ μ L) mélangé au LV-GFP (50ng P24/ μ L). La zone fluorescente a été extraite six semaines après l'infection afin d'extraire les ARN. Les échantillons ont été analysés par RT-qPCR pour déterminer le niveau d'expression endogène de Crym. Le LV-Crym-HA produit une surexpression significative (Student t test apparié, * p<0.05) de Crym. Le LV-shCrym produit une répression significative (Student t test apparié, * p<0.05) de Crym.

Nous avons ensuite évalué l'impact de la Crym sur la toxicité de la htt-m. Nous avons infecté le striatum de souris avec un mélange de LV-Crym-HA et de LV-Htt171-82Q (n=10) (groupe expérimental), ou un mélange des LV-LacZ et LV-Htt171-82Q (n=10) (groupe témoin). Le LV-Crym-HA a été injecté seul (n=5) pour mettre en évidence un effet potentiellement toxique (Figure 23-A). Les cerveaux des souris ont été analysés par histologie six semaines après l'infection. Le Crym-HA seul n'induit ni une perte de marquage immunohistochimique de DARPP-32 ni une perte de marquage histochimique de la COX. De plus, nous avons vérifié qu'il n'induisait pas l'accumulation d'inclusions ubiquitine-positives. Cependant, le LV-Crym-HA produit une lésion observable en marquage NeuN (~0.4mm³) suggérant que la surexpression de la Crym pourrait avoir certains effets toxiques vis-à-vis des neurones du striatum (Figure 23-A).

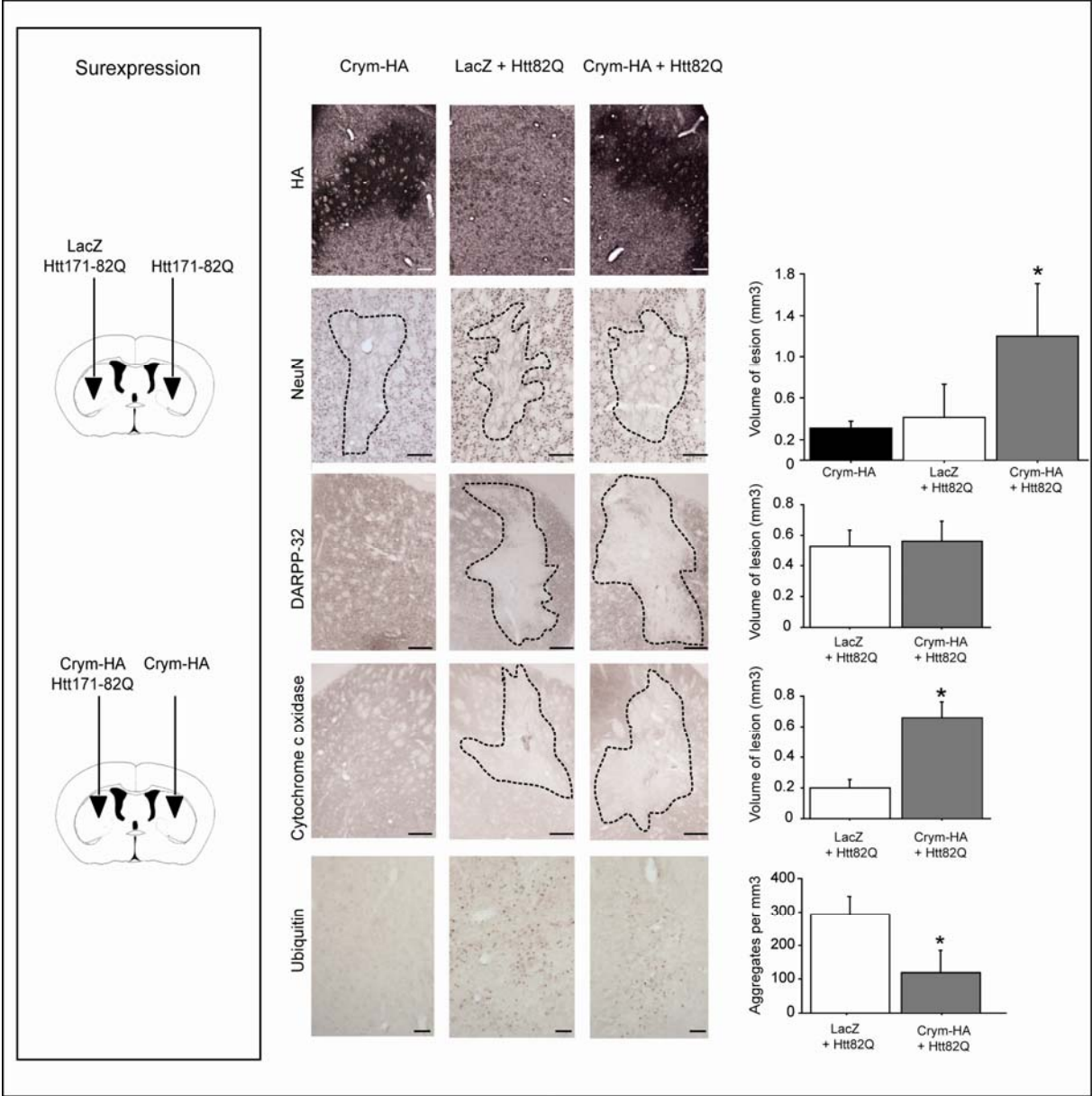
Comme attendu, une lésion a été détectée dans le groupe témoin (LV-Htt171-82Q+LV-LacZ) par la perte des marquages NeuN, COX et DARPP-32 (Figure 2A). Dans le groupe expérimental (LV-Crym-HA+LV-Htt171-82Q), le volume de la lésion a tendance à être augmenté en DARPP-32 par rapport au groupe témoin. Le volume de la lésion détectée en NeuN et COX est significativement augmenté. Dans le groupe expérimental, le nombre d'agrégats ubiquitine-positifs est largement diminué de manière statistiquement significative par l'expression du LV-Crym-HA par rapport au groupe témoin. Ces résultats suggèrent que la surexpression de Crym pourrait aggraver la toxicité du fragment Htt171-82Q, possiblement en modifiant le phénomène d'agrégation.

Pour déterminer l'impact d'une baisse d'expression de Crym sur la toxicité de la htt-m, nous avons injecté chez la souris adulte un mélange de LV-shCrym et de LV-Htt171-82Q (n=10) (groupe expérimental), ou un mélange de LV-shCrym et de LV-Htt171-82Q (n=10) (groupe témoin) (Figure 23-B). Le LV-shCrym a également été injecté seul (n=5) pour déterminer sa toxicité éventuelle.

L'analyse histologique a révélé que le LV-shCrym seul ne produit pas de modifications majeures des marquages DARPP-32, NeuN et COX, suggérant l'absence de toxicité de cette construction. La mesure des pertes de marquages DARPP32, NeuN et COX a indiqué que le LV-shCrym comparé au LV-shCrym n'a pas modifié le volume de la lésion induite par le LV-Htt171-82Q. Cependant, le nombre d'agrégats est significativement augmenté dans le groupe infecté par le LV-shCrym et LV-Htt171-82Q par rapport au groupe témoin. Ainsi l'inactivation de la

Crym augmente significativement le nombre d'agrégats contenant de l'ubiquitine sans modifier de manière significative la toxicité de la htt-m.

A-



B-

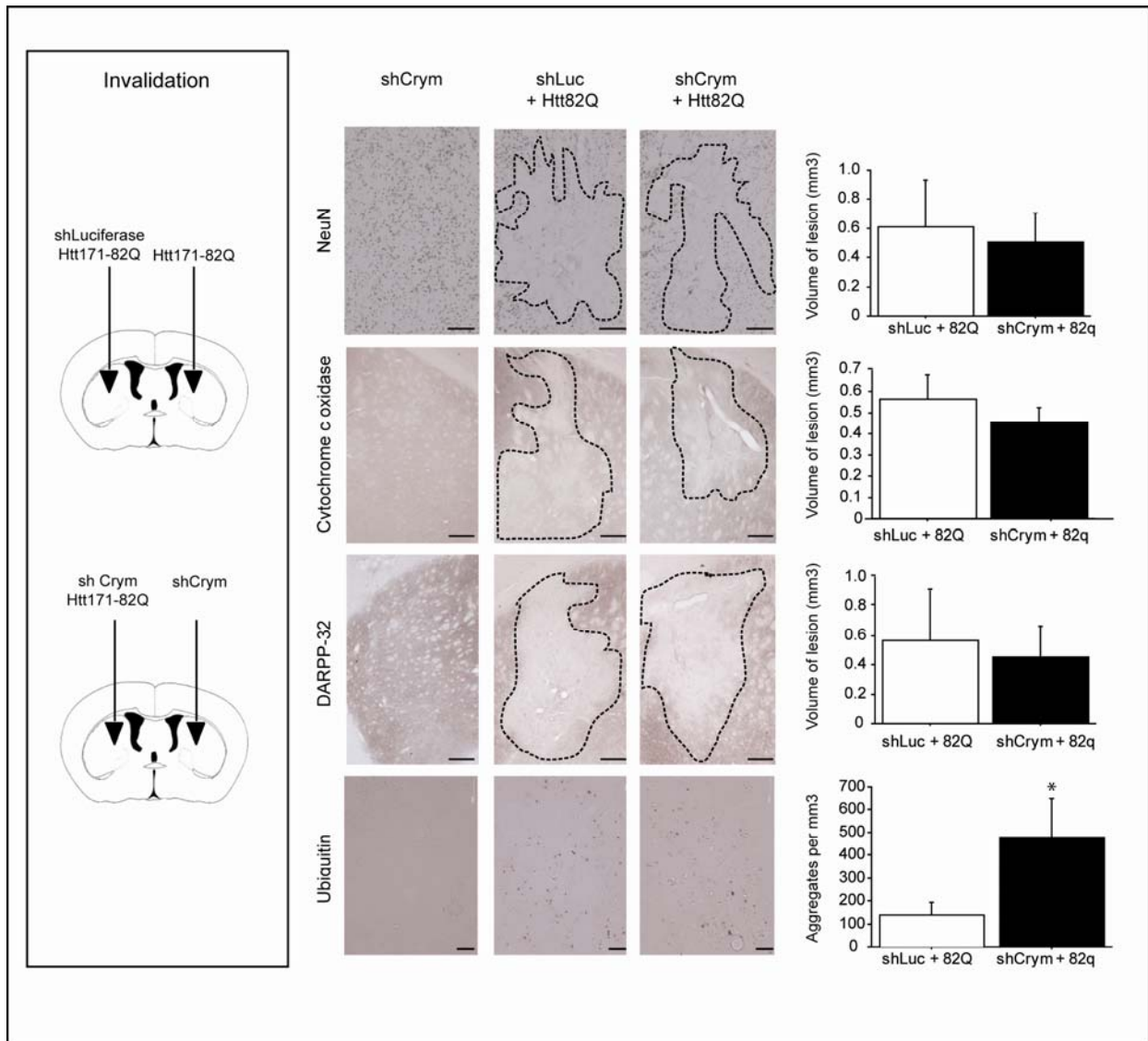


Figure 23 : Effet de la Crym sur la htt-m *in vivo*.

Le plan expérimental des expériences est présenté dans l'encart de gauche. Les animaux ont été infectés avec le LV-htt171-82Q mélangé soit au LV-Crym-Ha, soit au LV-shCrym ou leurs témoins (respectivement LV-LacZ et LV-shLuc). Six semaines après l'infection des striatum de souris (n=10/groupe), les cerveaux ont été analysés par immunohistochimie de l'étiquette HA, et des protéines NeuN, DARPP-32 et Ubiquitine. L'histochimie de la COX (utilisé comme marqueur d'intégrité neuronale) a également été effectuée. **A-** Effet de la surexpression de Crym sur la toxicité de la htt-m. Le volume de la lésion en NeuN et en COX est significativement augmenté alors que le nombre d'agrégats est diminué **B-** Effet de l'invalidation de Crym. Le nombre d'agrégats ubiquitine-positifs est augmenté par l'invalidation de Crym. *, p<0.05, Student t test, non apparié. Scale bars: HA 0.2mm, NeuN 0.1mm, DARPP-32 et Cox 0.25mm, ubiquitine 50µM.

La localisation de la Crym dans les neurones n'avait jamais été formellement déterminée. Nos expériences ont montré que l'expression du Tag HA dans le striatum de souris infectées par le LV-Crym est localisée dans le cytoplasme et le noyau également. La transfection de neurones en culture avec une construction GFP-Crym et l'analyse par microscopie confocale de la GFP avait montré une localisation de Crym dans l'ensemble de la cellule en incluant le noyau (résultat de Master 2, non montré). Pour mieux démontrer la localisation cytoplasmique de la Crym in vivo, nous avons également étudié la localisation cellulaire de la Crym endogène par ultracentrifugation différentielle à partir d'échantillons d'extraits de striatum et de cortex de souris. Pour ce faire, nous disposons d'un anticorps pour la Crym développé en collaboration avec le groupe de Michel de Chaldée (IBitecS, CEA, Saclay). Le résultat de ces centrifugations montre que la Crym est localisée principalement dans le cytosol (Figure24).

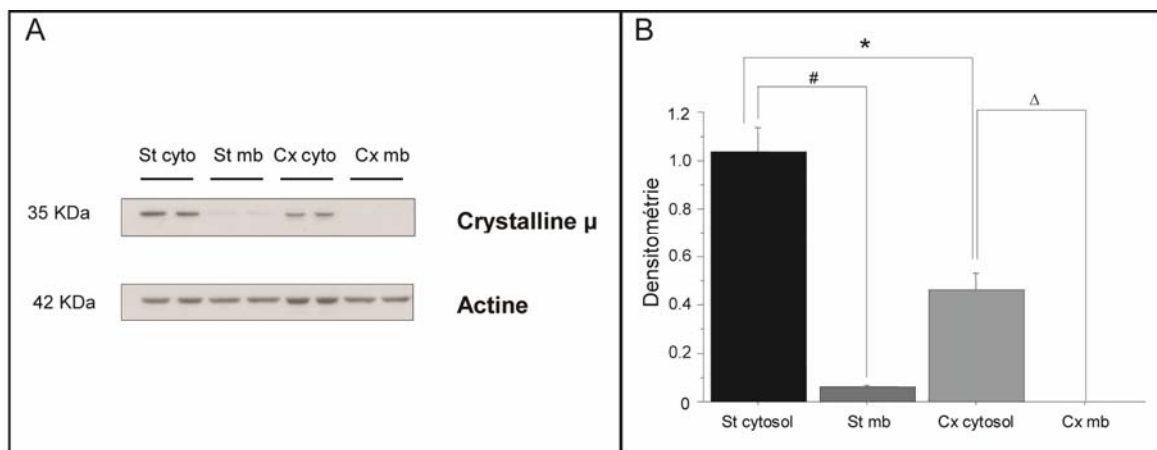


Figure 24: Présence de la Crystalline μ dans le cytosol révélée par fractionnement cellulaire par ultracentrifugation. A) Détermination de la localisation subcellulaire de la Crystalline μ par western blot après centrifugation différentielle. Le fractionnement cellulaire comprend le cytosol du striatum (St cyto) et du cortex (Cx cyto) ainsi que les membranes du striatum (St mb) et du cortex (Cx mb). Chaque échantillon a été testé en double afin de pouvoir réaliser une analyse statistique. B) Analyse semi quantitative de la localisation subcellulaire de la Crystalline μ . ANOVA et test post hoc PSLD Fisher # $p < 0.0004$, * $p < 0.003$, $\Delta p < 0.006$.

Discussion

Nos résultats montrent que la surexpression de la Crym provoque une toxicité intrinsèque sur les neurones du striatum. Néanmoins la toxicité n'est révélée que par la perte du marquage NeuN. Les marquages DARPP32 et COX restent intouchés. Ces modifications ne semblent pas révéler une réelle induction de la mort cellulaire, qui devrait se traduire par la perte concomitante de COX, NeuN et DARPP-32. Le niveau d'expression de Crym-HA après infection étant vingt fois supérieur au niveau de base, la signification biologique/physiologique de cette observation est questionnable. Néanmoins, il est possible que cette toxicité soit reliée à sa fonction biologique dans le striatum. Crym est une protéine de liaison à l'hormone T3. La T3 est capable de modifier d'une part certains aspects du métabolisme énergétique notamment via la biogenèse des mitochondries, et d'autre part peut induire la production d'oxydes nitriques (NO) *via* la voie des PI3 kinases (Yehuda-Shnaidman et al.; Liu et al., 2009), ce qui pourrait conduire à des phénomènes pro-toxiques. Crym pourrait se situer sur ces voies de signalisation. Dans le cas d'une surexpression, l'activation de ces voies pourrait engendrer une dysfonction cellulaire (perte de NeuN), sans pour autant aboutir à une réelle mort neuronale, en préservant la fonction mitochondriale (COX).

En accord avec l'effet pro-toxique de la surexpression de la Crym seule, nos résultats montrent que des niveaux accrus de Crym favorisent la toxicité de la htt-m, la perte de COX et NeuN étant nettement augmentée. Ce phénomène produit une perte neuronale plus sévère que celles observées dans le groupe contrôle. La préservation de la DARPP-32 dans les lésions NeuN et COX –négatives indique un phénomène de préservation relative des neurones au temps d'observation (6 semaines post infection). Il n'est pas exclu qu'en présence de htt-m la Crym puisse favoriser l'expression de DARPP-32 à des niveaux élevés, contrecarrant l'effet de la protéine mutée. L'invalidation partielle de la Crym par son shRNA montre seulement une tendance à la diminution du volume des lésions induit par le fragment Htt171-82Q, bien qu'un effet très significatif soit observé sur les inclusions. L'amplitude de l'invalidation (~50%) est possiblement insuffisant pour produire un effet majeur protecteur vis-à-vis de la htt-m. La stœchiométrie de l'effet de Crym sur la toxicité de la htt-m n'est possiblement pas un phénomène simple et linéaire. Il est possible que la présence de faibles concentrations de Crym soit capable d'exercer un effet pro-

toxique important. Une invalidation totale de Crym permettrait peut être de mettre nettement en évidence un effet protecteur vis-à-vis de la htt-m.

L'effet toxique de la htt-m implique possiblement des fonctions cellulaires où T3 (et donc possiblement la Crym) pourrait jouer un rôle. En effet, la htt-m est impliquée dans l'altération du fonctionnement de la mitochondrie (pour revue (Damiano et al., 2009), Annexe I). Le noyau caudé et le putamen de patients atteints de la MH présentent une diminution de l'activité des complexes mitochondriaux II, III et IV (Brennan et al., 1985; Brouillet et al., 1995). Chez la levure, l'expression de la htt-m est cytotoxique *via* l'altération de la fonction et de la quantité des complexes II et III (Solans et al., 2006). L'effet pro-toxique du stress oxydatif chez les souris et les patients atteints de la MH a été démontré (Stack et al., 2008). L'expression de la Crym dans les MSN pourrait favoriser la toxicité de la htt-m et ainsi participer à la vulnérabilité du striatum.

La diminution expérimentale de l'expression de la Crym par le LV-shCrym augmente statistiquement le nombre d'agrégats en présence du fragment Htt171-82Q alors que sa surexpression produit l'effet inverse. Dans nos expériences, il semble donc que la « protoxicité » de Crym soit associée à une baisse de la formation des inclusions. Le rôle des agrégats dans la MH est toujours discuté. Une des hypothèses sur le rôle des inclusions ubiquitine-positives principalement nucléaires, est que les inclusions soient protectrices pour la cellule en piégeant la htt-m soluble toxique. À l'inverse, la désagrégation libérerait dans la cellule une grande quantité de htt-m soluble capable d'exacerber la mortalité des neurones (Steffan et al., 2004). Rhes, une protéine striatale, favorise la SUMOylation de la htt-m. Cette action permet la désagrégation et l'augmentation de la fraction soluble de la htt-m conduisant à un phénomène de toxicité cellulaire (Subramaniam et al., 2009). La T3 est capable d'activer le système ubiquitine protéasome dans le muscle *via* l'activation des protéines ubiquitines ligases (atrogen-1, MuRF1) (O'Neal et al., 2009). Atrogen-1 et MuRF1 sont aussi exprimés dans le striatum (Allen Brain Atlas). La surexpression de Crym dans le striatum pourrait permettre une suractivation de la T3 comme facteur de transcription qui se traduirait par une augmentation des protéines « ubiquitines ligases » facilitant la dégradation des inclusions ou la diminution de leur formation. L'étude des effets de la Crym sur les protéines de régulation de la voie UPS permettrait une meilleure compréhension de son mécanisme d'action vis-à-vis de la htt-m.

Conclusion

Crym pourrait être un facteur aggravant dans la MH. Son expression exacerbe la toxicité de la htt-m en diminuant le nombre d'agrégats. De manière paradoxale, la répression partielle de Crym bien que permettant l'augmentation du nombre d'agrégats, ne change pas de manière marquée la toxicité de MH. Dans la MH, la présence de Crym dans les MSN, bien que diminuée par rapport à des sujets sains, pourrait contribuer à rendre ces neurones particulièrement sensibles au processus pathologique par rapport à des neurones d'autres régions cérébrales.

2010001M06rik (St102) diminue la sensibilité du striatum vis-à-vis de la huntingtine mutée

Introduction

2010001M06rik (St102) correspond à une séquence ADN où la détermination des introns et des exons est difficile. Les 2 sites d'initiation à la traduction (Open Reading Frame, ORF) possibles sont statistiquement trop petites (<400nt) pour permettre sa traduction en protéine (pour revue (Dinger et al., 2008)). En théorie, St102 est soit un gène polycistronique soit un ARN non codant. Le transcrit entier de St102 est sélectivement et fortement exprimé dans le striatum de souris (Brochier et al., 2008). Il se situe dans une région chromosomique (7q11) instable sensible à la délétion (Micale et al., 2008). St102 est fortement diminué dans les souris R6/2 modèle de la MH (Brochier et al., 2008). Nous avons voulu déterminer si l'ARN correspondant (et la protéine potentiellement codée) pouvait modifier la toxicité de la htt-m *in vivo*.

Matériels et méthodes (Annexe VI)

Résultats

Etude de l'effet d'une modification de St102 vis-à-vis de la toxicité de la htt-m

Des vecteurs lentiviraux (LV) codant pour St102 (séquence entière ; LV-St102) et son shRNA (LV-shSt102) ont été créés. La détermination du niveau d'expression de St102 après infection avec le LV-St102 et le LV-shSt102 a été évaluée *in vivo*. Ces vecteurs ont été injectés conjointement avec le LV-GFP dans le striatum de souris (n=5). Le groupe témoin a été injecté avec le LV-LacZ ou LV-shLuciférase (LV-shLuc) avec le LV-GFP (n=5) pour contrôler les effets de la charge virale. Six semaines après injection, la zone d'infection détectée par la fluorescence de la GFP a été extraite et analysée par PCRq. Le LV-St102 produit une légère surexpression (x1.5) du niveau d'expression de St102 endogène par rapport aux conditions témoins (Figure25). L'infection du striatum par le LV-shSt102 a permis une

diminution d'expression St102 de 76% par rapport au LV-shLuc (Fig.25). Par ailleurs l'analyse histologique des striata infectés par les différents vecteurs montrent que ni l'expression de St102, ni son invalidation (n=5/groupe) ne provoquent pas de perte des marquages NeuN, DARPP-32 et COX, suggérant l'absence de toxicité intrinsèque prononcée (Figure26 et Figure27).

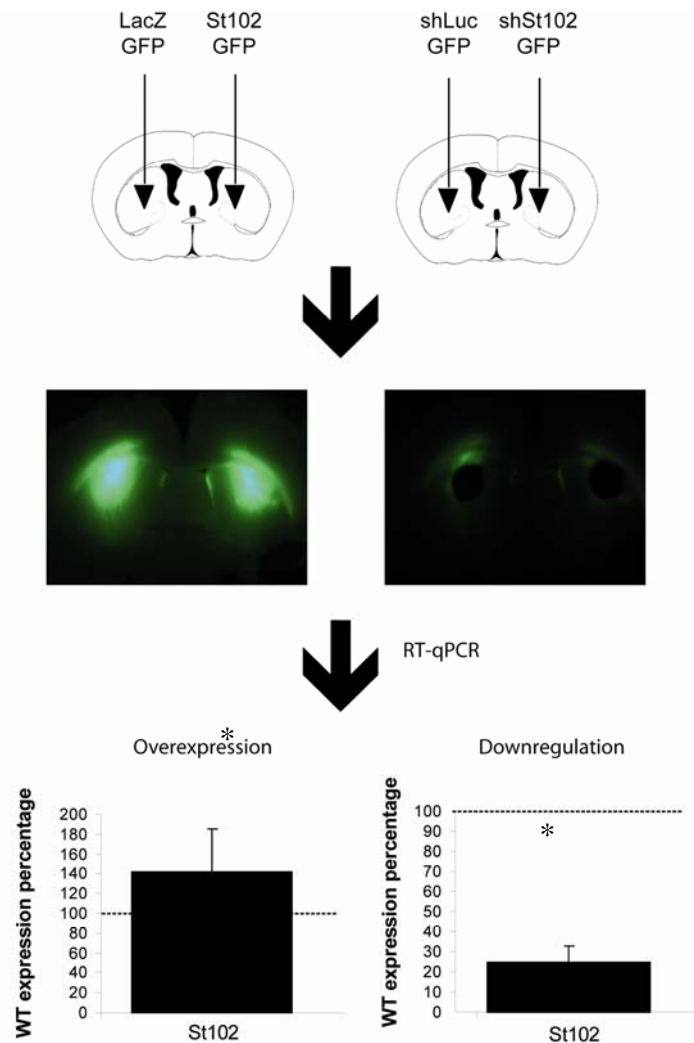


Figure 25 : Efficacité des vecteurs

La surexpression de St102 a été étudiée en injectant le LV-St102 et l'inactivation de St102 a été étudiée en injectant le LV-shSt102 dans striatum de souris adultes (n=5/groupe). Les vecteurs témoins ont été respectivement le LV-LacZ et le LV-shLuc. Dans tous les cas la même quantité de particules virales a été injectée (1 μ L, 100 ng p24/ μ L) mélangé au LV-GFP (50ng P24/ μ L). La zone fluorescente a été extraite six semaines après l'infection afin d'extraire les ARN. Les échantillons ont été analysés par RT-qPCR pour déterminer le niveau d'expression endogène de St102. Le LV-St102 produit une tendance à la surexpression non significative de St102. Le LV-shSt102 produit une diminution répression significative de l'expression de St102. * p<0.03, Student t test apparié.

Nous avons évalué l'effet de la surexpression de St102 sur la toxicité de la htt-m (Figure26). Nous avons injecté dans le striatum de souris, une combinaison de virus codant pour les LV-St102 et LV-Htt171-82Q (n=10) (groupe expérimental), et les LV-LacZ et LV-Htt171-82Q (n=10) (groupe témoin). Le groupe surexprimant St102 en présence de Htt171-82Q présente une diminution significative de la taille des lésions en NeuN et en COX par rapport au groupe témoin. La taille de la lésion détectée par la perte du marquage DARPP-32 montre une tendance à la diminution. Le nombre d'agrégats ubiquitine-positifs est similaire dans les deux groupes (Figure26).

Nous avons ensuite testé l'effet de l'inactivation de St102 (Figure27) sur la toxicité de la htt-m. Des souris ont été infectées avec un mélange de LV-shSt102 et le LV-Htt171-82Q (n=10) (groupe expérimental), et de LV-shLuc et de LV-Htt171-82Q (n=10) (groupe témoin). L'inactivation de St102 a accru statistiquement la taille de la lésion détectée en NeuN (Student *t* test apparié, * $p < 0.05$) et diminué significativement le nombre d'agrégats ubiquitine-positifs par rapport au groupe contrôle. La répression de St102 par le LV-shSt102 en présence de Htt-171-82Q ne modifie pas de manière significative la taille de la lésion détectée en COX et en DARPP-32.

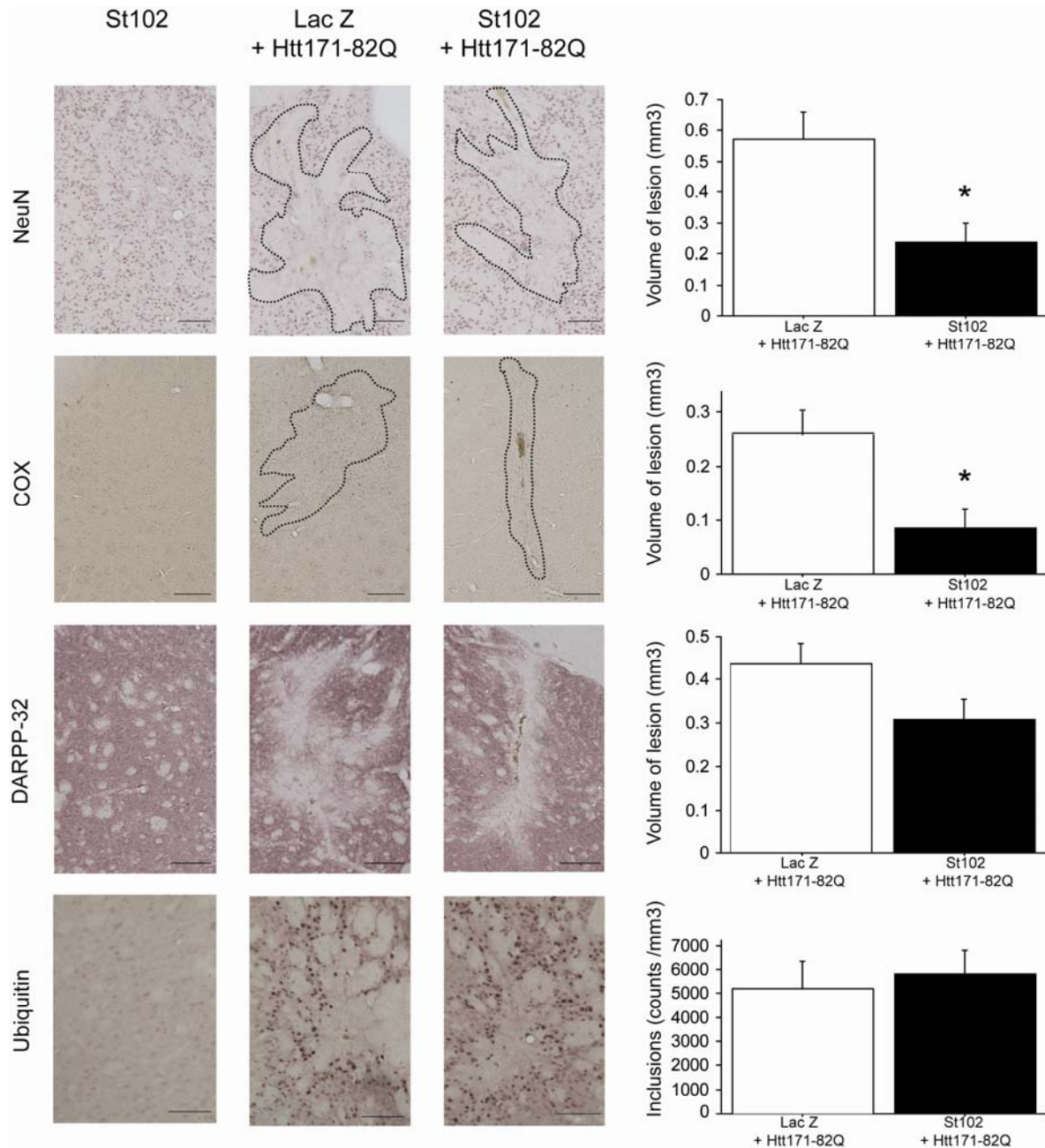


Figure 26: Effet de la surexpression de St102 sur la toxicité du fragment Htt171-82Q. Le striatum de souris (n=10/groupe) a été infecté avec un mélange de virus codant pour le LV-LacZ et le LV-Htt171-82Q dans l'hémisphère gauche tandis que le LV-St102 et le LV-Htt171-82Q ont été injectés dans l'hémisphère droit. Le LV-St102 a été injecté séparément dans le striatum de souris comme contrôle de sa toxicité (n=5). Six semaines après l'infection, les cerveaux ont été analysés par immunohistochimie du NeuN, DARPP-32, et Ubiquitine, ainsi que par l'histochimie de la COX. La surexpression de St102 en présence de la htt-m produit une diminution des volumes de lésion en NeuN et en Cox. * p<0.05, Student t test, non apparié. Scale bars: HA 0.2mm, NeuN 0.1mm, DARPP-32 et Cox 0.25mm, ubiquitine 50µM.

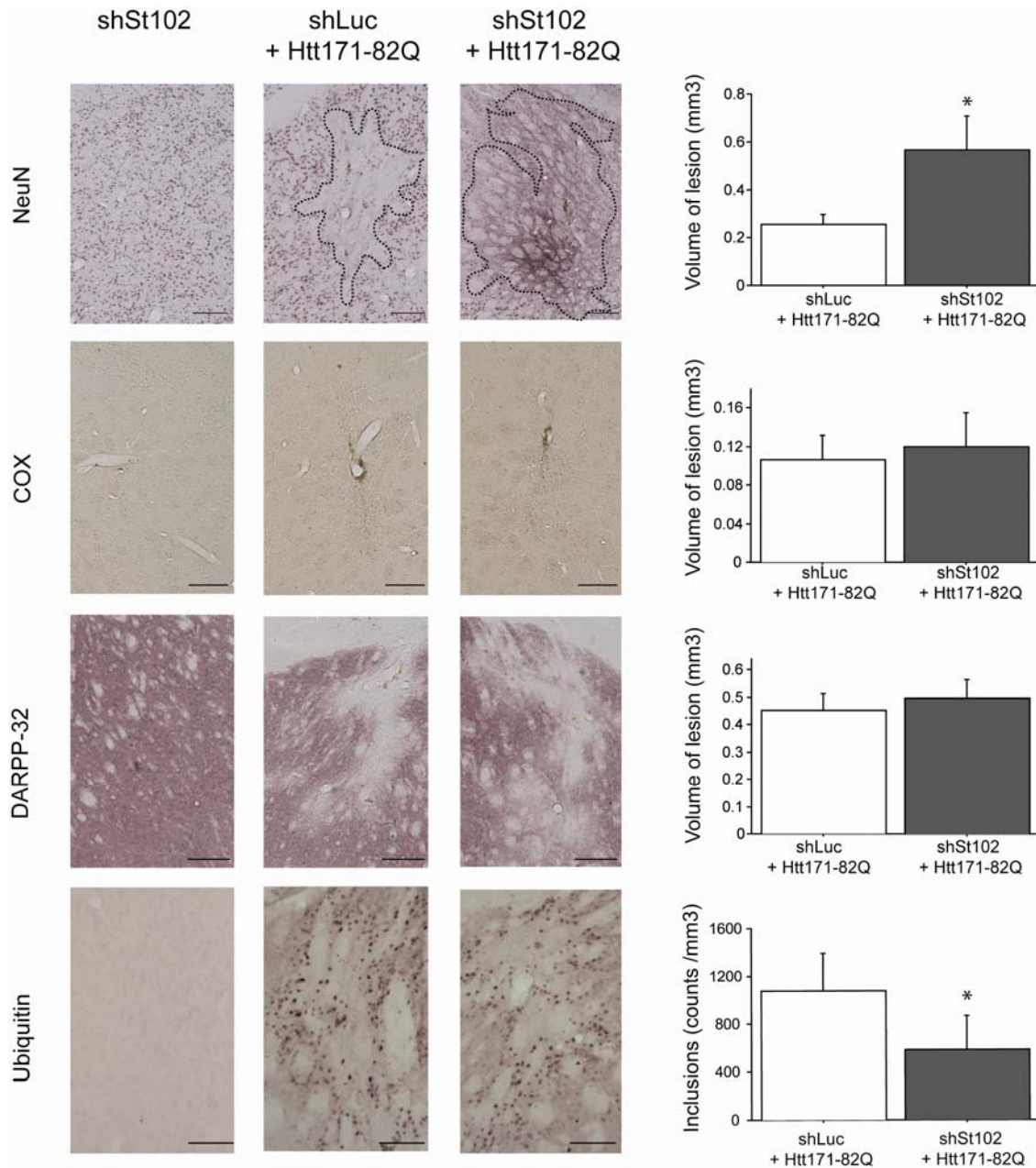


Figure 27: Effet de l'inactivation de St102 sur la toxicité du fragment Htt171-82Q. Le striatum de souris (n=10/groupe) a été infecté avec un mélange de LV-shLuc et de LV-Htt171-82Q dans l'hémisphère gauche tandis qu'un mélange de LV-shSt102 et de LV-Htt171-82Q a été injecté dans l'hémisphère droit. Le LV-shSt102 a été injecté séparément dans le striatum de souris pour étudier sa toxicité potentielle (n=5). Six semaines après l'infection, les cerveaux ont été analysés par marquage immunohistochimique de NeuN, DARPP-32, et Ubiquitine, ainsi que par marquage histochimique de la COX. L'inactivation de St102 en présence de la htt-m produit une augmentation du volume de lésion en NeuN et une diminution du nombre d'agrégats. * p<0.05, Student t test, non apparié.

Discussion

La surexpression de St102 par le LV-St102 induit une faible augmentation d'expression (1,5 fois le niveau endogène) *in vivo*. Il semble que cette faible expression soit suffisante pour diminuer significativement la toxicité induite par la htt-m mise en évidence par la perte de NeuN. L'invalidation de St102 produit en miroir une augmentation de la perte de marquage NeuN induite par la htt-m. Cet effet sur le NeuN est corrélé à une diminution significative du nombre d'inclusions positives pour l'ubiquitine. De manière surprenante, les taux de St102 ne changent pas les effets de la htt-m sur les marquages DARPP-32 et COX. La fonction du transcrit St102 étant totalement inconnue, l'interprétation de ces résultats n'est que préliminaire et reste spéculative. L'effet « pro-toxique » sur le marquage NeuN, corrélé à la baisse de la densité des inclusions d'ubiquitine, suggère néanmoins que l'expression de St102 puisse moduler certaines voies cellulaires impliquées dans la toxicité de la htt-m, possiblement en partie *via* la régulation de l'agrégation de la htt-m. Ces effets seraient dissociés des voies régulant les atteintes de DARPP-32 et COX.

De par sa séquence, il est possible que St102 ne soit pas traduite en protéine. Les études récentes ont amené à la découverte qu'un ARN messager codé en protéine est associé à un transcrit partenaire antisens, un « ARN non codant long » (ARNnc) (pour revue (Mattick and Makunin, 2006)). Ces ARNnc contrôleraient soit l'expression soit la stabilité de leur homologue codant. Des exemples récents démontrent leur implication dans les maladies neurodégénératives. BACE1-AS (AntiSens) a été identifié comme un ARNnc capable de contrôler l'expression et la stabilité de BACE1 et ainsi de participer à l'augmentation de la génération du peptide toxique A β 1-42 dans la maladie de Alzheimer (Faghihi et al., 2008). Dans la maladie de Huntington, REST est associé à un ARNnc « HAR1 » (Human Accelerated Region 1) qui serait responsable de sa répression. Le niveau d'expression de HAR1 est diminué dans les échantillons de patients (Johnson et al., 2010). Il est donc possible que St102 joue un rôle similaire pour un ARN codant non identifié (Figure 28). De ce fait, la surexpression de St102 bien que faible, permettrait d'augmenter fortement la traduction de son homologue codant non identifié. L'impact sur la toxicité de la htt-m produit par la modification d'expression de St102 serait la conséquence de son rôle sur le transcrit codant. L'invalidation de St102 par son shRNA produirait un effet sur l'intégrité des neurones striataux à six semaines post-infection du fait de

la perte de régulation de son gène cible. Les mécanismes conduisant à la modulation d'une part de l'effet de la htt-m sur le marquage NeuN et d'autre part sur les inclusions restent à déterminer.

La détermination qu'un ARN soit codant ou non codant se fait par une analyse de la taille de l'ORF. Quatre vingt quinze pourcents des protéines traduites ont une séquence ADN avec une ORF de taille supérieure à 300nt (pour revue Doner et la ;, 2008). Cette valeur est souvent utilisée dans les bases de données pour discriminer les ARN. Cependant nombres d'exceptions sont décrites dans la littérature. C'est notamment le cas de « Tal » qui était décrit comme un transcrit non codant du fait que son ORF soit petite (100nt). Tal qui comme St102 possède plusieurs ORF, conduirait d'après certains auteurs à la synthèse d'un ARN codant pour des isoformes protéiques capables d'induire un phénotype sur le développement (Galindo et al., 2007). St102 pourrait lui aussi conduire à l'expression d'une protéine ou deux protéines (2 ORF) ce qui pourrait expliquer la neuroprotection observée dans notre modèle de la MH. Il serait intéressant de cloner St102 à partir des différentes ORF possibles et d'y ajouter une étiquette HA afin de déterminer si les ARN peuvent être traduits en protéine. De plus, il serait intéressant de tester ces constructions dans notre modèle de la MH afin de déterminer si une isoforme permet de retrouver le phénotype neuroprotecteur vis-à-vis de la htt-m que nous observons dans cette étude.

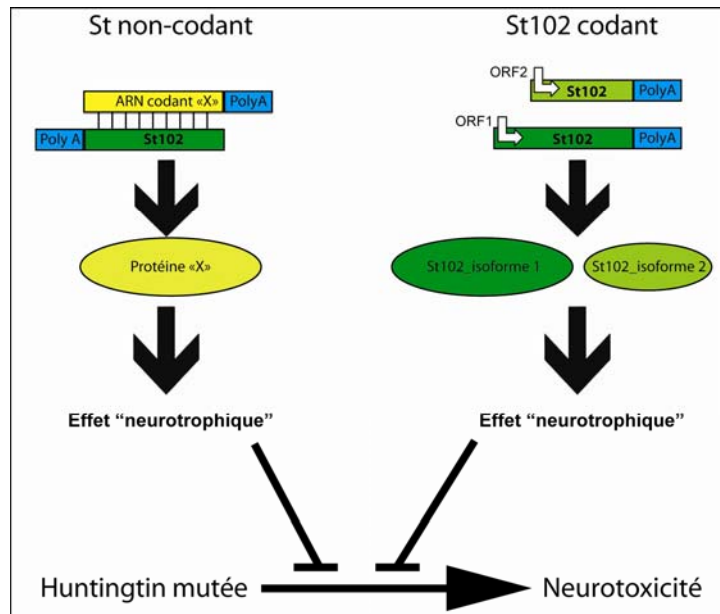


Figure 28: Mode d'action potentiel de St102 dans la MH. A gauche, St102 serait un ARNnc qui pourrait faciliter la traduction d'un ARN codant pour une protéine « X » dont les effets trophiques seraient bénéfiques pour les neurones du striatum. Dans la MH, le niveau d'expression de l'ARNnc de St102 pourrait diminuer l'expression de la protéine « X », ce qui fragiliserait les neurones vis-à-vis de la htt-m. A droite, St102 pourrait coder une ou deux protéine(s) qui aurait un effet trophique. Dans la MH la perte de St102 fragiliserait directement les neurones vis-à-vis de la htt-m. Dans les deux cas, la surexpression de St102 inhibe les effets neurotoxiques de la htt-m.

Conclusion

La surexpression de St102 permet d'améliorer la survie des neurones dans notre modèle *in vivo* de la MH. Deux hypothèses peuvent être avancées quant aux mécanismes engagés dans ce phénomène. La première consiste à considérer que St102 permettrait d'augmenter la traduction d'un autre ARN qui serait codant pour une protéine ayant des effets trophiques sur les neurones. La seconde suggère que St102 puisse être un gène polycistronique qui serait traduit en plusieurs protéines favorisant la survie des neurones dans la MH. Dans les deux cas, St102 étant préférentiellement exprimé dans les MSN sur striatum, la baisse d'expression des ARNm de St102 rapportée dans la MH, rendrait ces neurones très vulnérables vis-à-vis de la htt-m. Ainsi, St102 jouerait un rôle dans la vulnérabilité du striatum dans la MH.

DISCUSSION

Le striatum est la première zone affectée dans la MH. Les mécanismes sous-jacents à cette vulnérabilité du striatum vis-à-vis de la htt n'ont jamais été éclaircis. L'hypothèse que le striatum exprime un ensemble de gènes particuliers qui pourraient expliquer cette sensibilité, a conduit à de nombreuses études comparatives de transcriptome en condition saine et en condition (Becanovic et al.; de Chaldee et al., 2003; Hodges et al., 2006; Lein et al., 2007; Brochier et al., 2008; Mazarei et al., 2009). La découverte de gènes spécifiquement enrichis dans le striatum dont l'expression est diminuée dans la MH a été à l'origine de ce travail. Notre travail s'est porté sur un ensemble de 5 gènes (St102, Gpr88, Crym, Capucine, et Dclk3) dont l'expression est fortement diminuée dans la MH.

La nature des protéines suggérée par les séquences primaires des marqueurs choisis évoque des fonctions diverses. Le choix de ces 5 marqueurs couvre potentiellement de nombreuses fonctions biologiques toutes atteintes dans la MH parmi celles-ci : la régulation transcriptomique (St102, séquence non codante), la signalisation liée à la dopamine (Gpr88, récepteur membranaire), la régulation du métabolisme (Crym, protéine NADPH dépendante), le transport vésiculaire (Capucine, protéine *cis*-Golgienne) et les voies de signalisation (Dclk3, une kinase). Les 5 marqueurs choisis ont été surexprimés et invalidés à l'aide de vecteur lentiviral *in vivo* et testés pour leur capacité à modifier la toxicité de la htt-m. Les analyses histologiques ont permis de mettre en évidence que certains d'entre eux pouvaient modifier la vulnérabilité des neurones du striatum vis-à-vis de la htt-m.

Cette étude des protéines striatales jusqu'alors inconnues ou peu étudiées, permet une meilleure compréhension de la physiologie du striatum, ce qui est déterminant pour appréhender la MH mais aussi d'autres pathologies impliquant cette région cérébrale telles que la schizophrénie, la dépression, l'addiction et les intoxications métaboliques.

Les marqueurs du striatum étudiés peuvent être classés en 2 groupes : 1) Les marqueurs dont l'expression n'a pas d'effet majeur sur la toxicité de la htt-m. 2) Les marqueurs dont l'expression conduisent à une modification de la toxicité induite par la htt-m. Parmi lesquels, je distinguerais les modificateurs protoxiques des modificateurs neuroprotecteurs.

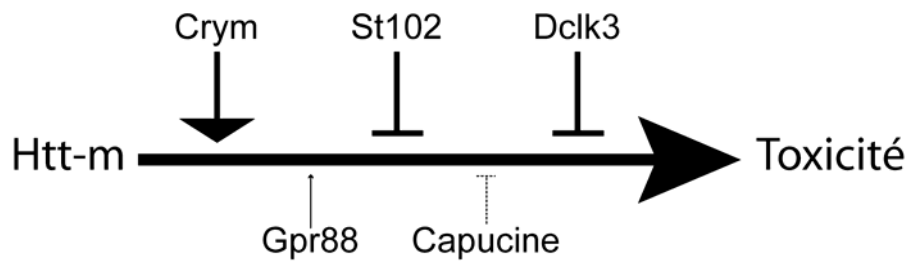


Figure 29: Représentation schématique des effets modulateurs des marqueurs striataux étudiés sur la toxicité induite par la htt-m. Les flèches indiquent un effet pro-toxique. Les barres indiquent un effet neuroprotecteur. L'épaisseur des traits définit la force de l'effet observé.

Les marqueurs du striatum dont l'expression n'a pas d'effet majeur sur la physiopathologie de la MH.

Nos résultats indiquent que Gpr88 et Capucine ne semblent pas avoir un impact fort sur la toxicité du fragment court de la htt-m (Htt171-82Q).

La Capucine est une protéine *cis*-golgienne. L'appareil de Golgi est le lieu de l'exocytose et des modifications post-traductionnelles dont la glycosylation, la phosphorylation et la sulfatation. Capucine ne serait pas impliquée au même titre que d'autres protéines connues de l'appareil de Golgi dans ces phénomènes de modifications post-traductionnelles. Capucine ne présente ni de domaines kinases ni de domaines peptidases connus typiques des principales protéines golgienne ce qui suggère qu'elle n'est pas impliquée dans ces phénomènes. De plus, si la Capucine était impliquée dans la glycosylation des protéines, les expériences d'inactivation en présence de la htt-m, auraient dû mener à une augmentation de l'activité du système UPS conduisant à une modification du nombre d'agrégats. L'appareil de Golgi est impliqué par ailleurs dans l'exocytose. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la modification d'expression de Capucine dans le processus d'exocytose. Des déficits de l'exocytose conduisent à de nombreuses pathologies lysosomales.

Gpr88 est un récepteur à GCPR qui ne semble pas modifier la toxicité de la htt-m. Cependant la modification d'expression de Gpr88 en présence de la htt-m modifie le niveau d'expression de DARPP-32. Massart et ses collaborateurs (Massart et al.,

2009) suggère que la voie dopaminergique pourrait influencer l'expression de Gpr88. Notre étude démontre que Gpr88 ne modifie le niveau d'expression de DARPP-32 qu'en présence de la htt-m. Il serait intéressant d'étudier les modifications transcriptomiques créées par cette interaction (Gpr88 - htt-m). L'étude de Gpr88 et son implication dans la maladie de Parkinson ouvre un champ d'investigation prometteur.

On trouve dans la littérature des exemples de marqueurs du striatum potentiellement pertinents dans la MH mais qui ne seraient pas directement impliqués dans la physiopathologie. C'est le cas de l'Hippocalcin qui est une protéine « senseur » du calcium essentiellement exprimée dans l'hippocampe et le striatum et plus particulièrement dans les MSN (Paterlini et al., 2000). Son expression est dramatiquement diminuée dans le striatum de patient de la MH (Rudinskiy et al., 2009). Cette baisse d'expression pourrait rendre les MSN très vulnérables aux stress excitotoxiques qui vraisemblablement interviennent dans la MH. Cependant, les expériences ont montré que les neurones exprimant l'Hippocalcin ne sont pas plus sensibles à des stimuli excitotoxiques (3NP, glutamate) que des neurones ne l'exprimant pas (Rudinskiy et al., 2009).

Comment expliquer la diminution d'expression des protéines striatales telles que Gpr88, Capucine et l'Hippocalcin dans les modèles transgéniques de la MH et chez les patients, alors que leur niveau d'expression ne semble pas influencer la toxicité de la htt-m ? Plusieurs explications peuvent être envisagées :

(1) Les marqueurs du striatum choisis pour cette étude ont une expression sélective pour le striatum et sont préférentiellement exprimés dans les MSN. Les MSN font partie de la population la plus touchée par le processus dégénératif dans la MH. Il est donc envisageable que la perte d'expression de ces marqueurs observés dans les différents modèles de la MH et chez les patients ne soit que la conséquence de la disparition de la population neuronale qui les exprime. Il s'agirait d'une conséquence directe de la dégénérescence.

(2) La diminution d'expression observée pourrait être la conséquence secondaire de l'inhibition de la transcription par la htt-m. La htt-m réprime la transcription médiée par CBP (Nucifora et al., 2001), mais aussi par son action sur REST (pour revue (Buckley et al., 2010)). Les séquences promotrices des marqueurs

striataux étudiés n'ont pas encore fait l'objet d'étude et les bases de données ne nous permettent pas de déterminer leur promoteur (Ensembl). La htt-m pourrait réguler négativement la transcription des gènes que nous avons étudiés durant cette thèse.

(3) Les marqueurs du striatum auraient un rôle important dans la MH qui ne pourrait pas être mis en lumière par le modèle expérimental que nous avons étudié. Cette hypothèse sera développée dans la section suivante « limites de l'approche expérimentale ».

Limites de l'approche expérimentale

Notre stratégie pour étudier les transcrits striataux d'intérêt a consisté à utiliser les vecteurs lentiviraux pour surexprimer ou invalider les transcrits et déterminer l'impact de la modification d'expression sur la toxicité de la htt-m *in vivo* dans le striatum de souris. Ce choix a été motivé par le fait que l'approche lentivirale chez l'adulte présente un certain nombre d'avantages par rapport à d'autres approches expérimentales. Notamment la fabrication de vecteurs lentiviraux est plus rapide que le développement de souris transgéniques telles que les souris KO. L'approche *in vivo* que nous avons choisie a été déterminée par l'absence d'expression des transcrits striataux dans les lignées cellulaires et même dans les cultures primaires de neurones striataux. De plus, nous avons pu rapidement développer et valider l'incorporation d'une étiquette HA dans nos constructions pour pouvoir « suivre » les protéines, alors qu'aucun anticorps pour ces protéines n'existait lorsque nous avons initié ce programme de recherche. Par ailleurs, la stratégie consistant à infecter le striatum avec des mélanges de vecteurs codant pour la htt-m et les vecteurs codant les transcrits ou leur shRNA correspondant nous a permis d'étudier l'impact de la modification d'expression de manière relativement rapide par rapport au temps nécessaire que requiert le développement et le croisement de souris transgéniques ou KO de différentes lignées avec des souris modèles de la MH.

Notre modèle de la MH par surexpression de la partie N-terminale de la htt-m présente aussi un autre avantage par rapport aux souris transgéniques modèles de la MH : la toxicité de la construction est observable rapidement et conduit à une réelle dégénérescence quantifiable, ce qui, pour notre crible des effets modificateurs des transcrits, était indispensable.

Cependant si notre approche présente des avantages pour le crible initial, elle présente également un nombre de limitations qui doivent être prises en compte et qui sont discutées ci-dessous.

Les marqueurs ont été clonés avec une étiquette HA dans la partie C-terminale de la protéine afin de pouvoir la détecter. La présence de cette étiquette peut théoriquement produire une modification de la fonction de la protéine. Néanmoins, cette étiquette est petite (9 a.a.) et son encombrement stérique reste très limité, comparé à d'autres étiquettes, en particulier les étiquettes fluorescentes (GFP, DsRED etc). Gpr88 qui est susceptible d'avoir un effet par son domaine C-terminal comme de nombreuses protéines GPCR, a été cloné sans étiquette. St102 sensée être une séquence non codante, a été générée sans étiquette.

Une autre limitation potentiel concernel'utilisation de la stratégie shRNA. Bien que nos études montrent que l'expression des shRNA que nous avons étudiés n(ont pas d'effets toxiques majeurs quand ils sont exprimés seuls, il reste difficile d'exclure totalement que les effets des différents shRNA que nous avons développés et testés in vivo contre l'htt-m ne sont pas associés à des effets « off target ». Le shRNA témoin que nous avons choisi (shRNA contre la luciférase) possède une séquence qui n'est pas retrouvé dans le génome de mammifère, et lorsqu'il est exprimé seul, ne semble pas produire d'effets toxiques. Néanmoins, il est extrêmement difficile de s'assurer qu'il ne perturbe pas d'autres mRNA par une liaison même non spécifique. L'idéal serait, même si cela est pratiquement très lourd, de comparer les effets des siRNA contre les marqueurs striataux à plusieurs shRNA témoins en plus du shRNA contre la luciférase.

La conclusion qui peut être tirée d'une expérience de surexpression doit toujours être tempérée par le fait que la situation expérimentale puisse éventuellement modifier la physiologie de la protéine. Néanmoins cette démarche expérimentale est la base de nombreuses recherches en biologie cellulaire, et dans bien des cas où la surexpression est extrême dans la cellule (cas des transfections), les effets observés sont à relier à la fonction de la protéine étudiée.

Le niveau de surexpression d'un transgène dans une cellule est dépendant du vecteur/technique utilisée et dépend aussi du transgène considéré. Dans nos expériences Gpr88, Dclk3, Capucin, St102 et Crym ont été insérés séparément dans le même vecteur lentiviral (promoteur PGK et séquences régulatrices identiques) (ANNEXE V). Or les niveaux de surexpression évalués par qRT-PCR sont différents

d'un marqueur à l'autre (respectivement ~230%, 1000%, 120%, 105% et 2000%). Il semblerait qu'il soit difficile d'exprimer les protéines recombinantes *in vivo* lorsque leur niveau endogène est déjà très élevé. C'est le cas de St102 et de la Capucine dans nos expériences. Il semble que cela soit aussi le cas pour la protéine CalDAG-GEFI étudiée récemment par Crittenden et collaborateurs (Crittenden et al., 2010). D'autres études au laboratoire sur des protéines mitochondriales présentes à de hauts niveaux d'expression, montrent également la difficulté de produire une surexpression. Il est donc possible que l'absence d'effets nettement protecteurs ou pro-toxiques de certains des transcrits étudiés puisse résulter d'une faible surexpression. C'est possiblement le cas pour Capucin. Cependant, la surexpression de St102 est limitée, mais l'effet protecteur est net. A l'inverse, bien que les vecteurs codant les shRNA soient généralement efficaces (diminution d'expression de -70% en moyenne), l'expression de tous les transgènes n'est pas affectée de manière similaire. Suivant les effets biologiques de différentes protéines, l'impact fonctionnel d'une diminution similaire d'expression peut être éminemment différent. Dans nos expériences, certains shRNA ne semblent pas modifier la toxicité de la htt-m alors que la diminution d'expression obtenue est très forte (Capucine). En d'autres termes il semble qu'il n'existe pas de corrélation nette ou systématique entre l'amplitude de la surexpression ou de l'invalidation et l'impact sur la toxicité de la htt-m. De plus, certains effets ne sont pas systématiquement obtenus « en miroir », la surexpression ne conduisant pas forcément à un effet opposé à celui obtenu par l'invalidation. La fonction des protéines que nous avons étudiées est inconnue. Il est possible que l'impact de ces protéines sur la signalisation cellulaire impliquée dans la toxicité de la htt-m ne suive pas une relation linéaire. Certains systèmes fonctionnent de manière « tout ou rien ». De plus il est probable que plusieurs voies cellulaires soient impliquées, ce qui pourrait également expliquer que les effets que nous observons ne soient pas toujours symétriques.

Un autre facteur qui ne peut être écarté concerne l'aspect temporel de l'impact des modifications d'expression que nous avons produites avec les vecteurs lentiviraux. Nos mesures par qPCR montrent que l'invalidation des gènes ciblés est relativement rapide (quelques semaines). Cependant la nature et l'amplitude des effets cellulaires de l'invalidation ou de la surexpression peuvent nécessiter un temps plus long que notre temps d'observation (6 semaines post-infection). Pour ne citer qu'un exemple, l'invalidation de la htt endogène chez l'adulte ne produit une

dégénérescence des neurones striataux et corticaux qu'après des semaines en absence de la htt (Dragatsis et al., 2000). Il est donc possible que l'absence apparente d'effets dans nos expériences soit liée à la limitation dans le temps du modèle LV-Htt171-82Q où la dysfonction cellulaire intervient probablement tôt après l'infection (environ 3 semaines post-infection). De ce point de vue, l'invalidation par un LV-shRNA n'est pas comparable à une souris KO. Le système de KO conditionnel inducible caractérisé par l'invalidation d'un gène dans un tissu spécifique (promoteur tissu spécifique) au temps « t » désiré par une recombinaison Cre/Lox pourrait permettre de mieux s'affranchir de cette limitation temporelle. Néanmoins, l'invalidation est souvent partielle du fait du taux variable de recombinaison dans ces modèles KO dépendants de nombreux paramètres (locus du transgène, de l'âge de l'animal et de l'état de la chromatine).

Une autre limitation importante des données que nous présentons concerne la construction de la htt-m utilisée pour produire une neurotoxicité. Le modèle employé durant ma thèse a été l'utilisation de vecteurs lentiviraux codant les 171 premiers acides aminés de la htt humaine. Nombre d'études indiquent l'importance de mécanismes cellulaires/biochimiques impliquant des domaines au-delà de la partie C-terminale de cette construction. Il ne peut donc pas être exclu que les transcrits que nous avons étudiés n'interagissent pas fonctionnellement (directement ou indirectement) avec les domaines C-terminaux de la htt-m pleine longueur, ce qui ne peut pas être mis en évidence avec la construction Htt171-82Q. Notre approche pour cribler des modificateurs de la htt-m peut donc conduire à des « faux négatifs ». C'est peut être le cas pour Gpr88 et Capucine. Avant d'exclure ces marqueurs de la liste des protéines impliquées dans la MH, il serait intéressant de les cribler à travers un modèle de la MH utilisant la forme pleine longueur de la htt. Des expériences utilisant la forme pleine longueur de la htt-m mettent en évidence des phénotypes différents de ceux observés avec des fragments courts. Les souris transgéniques YAC128 exprimant la forme pleine longueur présentent une perte de neurones striataux en relation avec l'âge. Les souris « shortstop » (SS) sont des souris YAC exprimant les 117 premiers acides aminés de la htt avec le même nombre de CAG que les YAC128 (Slow et al., 2003). Ces souris SS ne présentent ni dégénérescence striatale ni phénotype moteur (Zhang et al., 2008). Les MSN issus de ces deux lignées de souris transgéniques soumises à des applications répétées de glutamate ne répondent pas de la même manière. Les MSN des souris YAC128 répondent par

une élévation importante de calcium qui n'est pas détectable chez les souris SS. De plus, les souris YAC128 présentent une modification des courants glutamatergiques *via* NR2B alors que les souris SS ne présentent pas cette anomalie (Zhang et al., 2008). La *htt-m* pleine longueur (YAC128 et BACHD) est capable d'induire l'expression d'IGF-1 *in vivo* et *in vitro* alors que les fragments courts ne le peuvent pas (Pouladi et al., 2010).

Considérant les limites du modèle LV-Htt171-82Q, nous avons choisi de compléter nos résultats par de nouvelles expériences dans les souris BACHD et KI-140 qui expriment la *htt-m* pleine longueur. La mise au point du set-up expérimental permettant l'injection de vecteur lentiviral pour permettre la surexpression et invalidation des marqueurs dans le striatum de ces souris et modifier l'atteinte cellulaire est en cours d'étude au laboratoire. Néanmoins la caractérisation du phénotype de ces souris qui est en cours, suggère que la dégénérescence est lente et donc difficilement quantifiable. L'étude des effets d'une surexpression des marqueurs dans ces modèles constitue un enjeu important. Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier les effets de la surexpression des marqueurs striataux, en particulier, *St102* et *Dclk3* dans des modèles transgéniques de la MH où la dégénérescence et la symptomatologie évoluent rapidement, comme les souris R6/2 et 171-82Q. Probablement l'utilisation de vecteurs AAV qui permettraient l'infection d'une plus large zone du striatum et donc la surexpression plus étendue des marqueurs dans le striatum pourraient possiblement conduire à ralentir l'évolution de la pathologie dans des modèles à évolution rapide.

L'expression d'un marqueur du striatum peut modifier la toxicité de la *htt-m*

Certains des marqueurs que nous avons étudiés (*Gpr88* et *Capucine*) ne semblent pas modifier de façon majeure la toxicité de la *htt-m*. D'autres apparaissent comme étant capable d'intervenir pour corriger les anomalies cellulaires induites par la *htt-m*. C'est le cas de *Crym*, *St102* et *Dclk3*. Cette observation renforce l'hypothèse que les marqueurs du striatum dont l'expression est diminuée dans la MH peuvent jouer un rôle majeur sur la sensibilité du striatum. Bien qu'on ne puisse pas généraliser ce phénomène, ces transcrits s'ajoutent à la liste des marqueurs sélectivement exprimées dans la MH impliquées dans les mécanismes de dégénérescence du striatum. Deux types de « modificateurs » de toxicité existent :

ceux qui amplifient la toxicité, les modificateurs « pro-toxiques » dont Crym et ceux qui la restreignent, les modificateurs « neuroprotecteurs » dont St102 et Dclk3.

Modificateurs pro-toxiques dans la MH

La surexpression de la Crym conduit à une mortalité d'une partie des neurones du striatum. À cette toxicité s'ajoute celle de la htt-m qui résulte d'une augmentation de la mortalité neuronale. Cette aggravation du phénotype serait due à la capacité de la Crym de diminuer la formation d'agrégats de la htt-m ou d'accélérer leur solubilisation. Les mécanismes mis en place sont à éclaircir. D'autres protéines dans la littérature démontrent des caractéristiques similaires, c'est le cas de Rhes.

La surexpression de Rhes en présence de la htt-m augmente la toxicité cellulaire. De par sa fonction d'ubiquitine ligase E3, Rhes induit et favorise la SUMOylation de la htt-m directement et indirectement par d'autres protéines dont RanGAP1 et SP100. La htt-m SUMOylée permet la désagrégation de la htt-m en fraction soluble ce qui conduit à un phénomène pro-toxique pour les cellules (Subramaniam et al., 2009).

Modificateurs neuroprotecteurs dans la MH

L'expression de St102 et de Dclk3 permet une neuroprotection vis-à-vis des effets produits par la htt-m.

La surexpression de St102 diminue fortement la perte cellulaire induite par la htt-m observée dans le striatum. Son mode d'action est inconnu. La détermination de la traduction ou non de St102 en protéine(s) permettrait d'avancer des hypothèses quant à la mécanistique sous-jacente à la neuroprotection.

L'expression de Dclk3 dans les neurones striataux diminue la toxicité de la htt-m. Nous avons observé l'effet de son invalidation à trois et six semaines post-infection. Bien qu'à trois semaines, aucune différence significative ne soit présente, à six semaines, les effets pro-toxiques de cette invalidation sont détectés par le marquage immunohistochimique de DARPP-32. Des expériences préliminaires nous ont montré que des neurones en culture surexprimant Dclk3-HA ne sont pas protégés vis-à-vis de stress excitotoxiques impliqués dans la MH (3NP et glutamate) par rapport aux neurones ne l'exprimant pas. La neuroprotection induite par Dclk3 *in vivo* et *in vitro* serait donc relativement spécifique des voies cellulaires perturbées par la htt-m.

Peu d'exemples dans la littérature présentent cette caractéristique de neuroprotection dans la MH. Citons l'exemple de CalDAG-GEFI (appelée également RasGRP2) (Crittenden et al., 2010). C'est une protéine sélectivement exprimée dans le striatum dont l'effet neuroprotecteur a été découvert récemment. CalDAG-GEFI est une protéine de signalisation ayant des sites de liaison au calcium (Cal) et au diacylglycerol (DAG) ainsi qu'un domaine pour les facteurs d'échange de petites protéines (GEF) telles que Rap1 et 2. Cette protéine est enrichie dans le striatum (Kawasaki et al., 1998) et plus particulièrement dans les MSN (Toki et al., 2001). L'expression de CalDAG-GEFI est significativement réduite dans les échantillons de striatum de souris R6/1 et R6/2 ainsi que chez les patients de la MH (Crittenden et al., 2010). L'inactivation de CalDAG-GEFI dans des coupes organotypiques de cortico-striatum de rat en présence de la htt-m (Htt83Q) permet une diminution forte (50%) du nombre de cellules en dégénérescence. À l'opposé, la surexpression de cette protéine tend à augmenter la toxicité induite par la htt-m sur les neurones du striatum chez le rat (Crittenden et al., 2010). Les mécanismes sous-tendant ces effets de modulation de toxicité ne sont pas encore connus. Il reste à établir comment la diminution d'expression de CalDAG-GEFI peut être neuroprotectrice *in vitro* alors qu'*in vivo* elle est inversement corrélée à la progression de la pathologie.

Nous avons étudié les mécanismes sous-jacents à la neuroprotection de Dclk3 dans la MH. Des résultats préliminaires permettent de mieux appréhender son mécanisme d'action

Neuroprotection et Dclk3

La neuroprotection induite par Dclk3 semble directement reliée au domaine kinase présent dans la partie C-terminale de la protéine. Ses homologies de séquence avec des kinases existantes dont le mécanisme d'activation est bien connu, nous a permis d'orienter notre recherche sur un site potentiel d'activation du domaine kinase de Dclk3 (T457). Les résultats de nos expériences ont démontré que la mutation dirigée de ce site produit la perte de la neuroprotection vis-à-vis de la htt-m *in vitro*, très probablement par la perte d'activité kinase. Les expériences visant à démontrer que Dclk3 est une kinase active capable de s'autophosphoryler et de phosphoryler un substrat universel sont en cours. Les substrats de Dclk3 restent à identifier.

Nos travaux suggèrent que Dclk3 possède la propriété de s'attacher aux microtubules. La préparation de microtubules obtenus à partir de neurones striataux en culture infectés afin d'exprimer Dclk3-HA (short, long, kin), montre que plusieurs fragments de Dclk3 sont capables de se lier aux microtubules. Il reste difficile de déterminer si ces formes accrochées sont des formes actives de la protéine. À ce jour, la séquence de Dclk3 ne permet pas la reconnaissance d'un domaine de liaison au microtubule « double cortin » (DC) connu, ce qui suggère que Dclk3 porte un domaine DC non répertorié. En effet, la transfection de « kin-Dclk3-HA » comprenant la moitié de la séquence de la protéine (C-terminal) démontre qu'en absence théorique du domaine DC (N-terminal), « kin-Dclk3-HA » est capable de se lier aux microtubules. L'identification de ce domaine serait réalisable par des expériences de mutagénèses de séquences du fragment « kin-Dclk3-HA ». Un domaine riche en proline et serine, proche de la Th457 pourrait aussi être impliqué dans les interactions de Dclk3 avec des partenaires protéiques.

La partie C-terminale de la protéine regrouperait le domaine d'attachement aux microtubules et le domaine kinase ce qui suggère que ce fragment est le fragment actif de la protéine. De par son interaction avec les microtubules, Dclk3 pourrait favoriser le transport axonal ce qui pourrait expliquer l'effet neuroprotecteur observé. En effet, le transport est altéré dans la MH par plusieurs mécanismes. Les agrégats de la htt-m piègent de nombreuses protéines impliquées dans le trafic axonal (Trushina et al., 2004). De plus, l'expansion polyGln de la htt-m modifie ses affinités pour les protéines de la voie de signalisation des JNK conduisant à l'inhibition du transport rapide axonal (FAT) (Morfini et al., 2009). L'identification des partenaires protéiques de Dclk3 en relation avec le transport permettrait de caractériser sa direction de transport. L'impact de Dclk3 sur le transport axonal pourrait être observé *via* la modification de la vitesse de transport de protéines dites "cargo" et *via* la fréquence d'attachement/détachement des moteurs moléculaires aux microtubules.

Dclk3 a un lien fonctionnel avec les microtubules que nous devons éclaircir. De manière plus spécifique, il serait intéressant de voir si Dclk3 a un effet bénéfique sur le transport du BDNF dans le striatum. Un des membres de la famille de Dclk3, Dclk1 a la particularité d'avoir son expression génique contrôlée positivement par le BDNF (Le Hellard et al., 2009). Dclk1 est peu exprimé dans le striatum. En

transposant cette observation à Dclk3, il est tentant d'imaginer une boucle de régulation qui serait perturbée dans la MH. En condition normale, Dclk3 qui est aussi exprimée dans certains neurones du cortex cérébral, faciliterait le transport de BDNF (vitesse ou attachement des moteurs) vers les neurones du striatum. De plus BDNF pourrait possiblement (comme pour Dclk1) favoriser l'expression de Dclk3 au niveau du striatum. La baisse d'expression de BDNF et Dclk3 dans la MH formerait un cercle vicieux conduisant à la dégénérescence préférentielle du striatum.

Dclk3 est une protéine clivée dont les fragments ont été observés dans nos échantillons par Western Blot par le suivi de l'étiquette HA en condition normale. Les observations du clivage de Dclk3 ont été réalisées *via* l'étude du tag HA dans la partie C-terminale de la protéine. « Long Dclk3-HA » est une protéine dont le poids moléculaire théorique est de 88KDa tandis que son isoforme « short Dclk3-HA » est aux alentours de 81 KDa. Les formes entières des Dclk3-HA sont des formes minoritaires que nous avons rarement pu observées *in vitro* et *in vivo* quelques soient les conditions d'extractions.

Les deux isoformes de Dclk3 (Long et Short) sont clivées (AnnexeVII). Nous avons répertorié au total sept peptides (95, 75, 70, 55, 43, 37, 24 KDa) issus du clivage de Dclk3 *in vivo*. Nous avons identifié la calpaïne comme étant la protéase responsable de deux clivages séquentiels (75 en 24 KDa, 70 en 43 et 37 KDa) (AnnexeVII). De manière surprenante, « kin-Dclk3-HA » exprimée *in vitro* et *in vivo* ne semble pas être soumise à des clivages détectables. Ce résultat suggère que la protéolyse de Dclk3 découle d'événements ciblés et séquentiels. Le rôle de ces différents clivages reste à élucider.

Il est crucial de pouvoir déterminer avec précision la séquence des peptides générés par le clivage de Dclk3. La spectrométrie de masse permettrait ainsi de mettre en lumière la séquence des fragments et par conséquent les sites de clivage sur la protéine. Ces informations nous permettraient d'émettre des hypothèses quant aux protéases (caspase, calpaïne, cathepsine,...) potentiellement impliquées dans les autres clivages de Dclk3. Dans un second temps, il serait nécessaire de muter successivement ces sites de clivage afin d'empêcher la protéolyse de Dclk3. Cette expérience montrerait l'effet des différentes formes (dont la pleine longueur) de Dclk3 sur les effets de la htt-m *in vivo*. Le fragment neuroprotecteur pourrait ainsi être identifié.

Nous avons observé que le nombre de clivage de « short Dclk3-HA » chez les souris BACHD de 6 mois et chez les souris témoins (WT) est le même. Cependant, les formes majoritaires ont changé (AnnexeVI). La différence d'abondance de ces peptides est à ce jour inexpliquée et les mécanismes sous-jacents très spéculatifs. Les souris BACHD ayant un phénotype pathologique très faible à 6 mois, cette modification suggère que Dclk3 est impliquée précocement dans la MH et que son état fondamental est modifié en contexte pathologique de la MH.

La liaison aux microtubules et le changement d'état de Dclk3 ne sont pas sans évoquer des similitudes avec la protéine Tau. Tau est une protéine soluble associée aux microtubules (MAP) très abondante dans les axones. Elle permet le bon assemblage et la stabilité des microtubules. La protéine Tau ne régule pas la vitesse du transport mais la liaison des moteurs aux microtubules (Trinczek et al., 1999). Sa surexpression inhibe le transport antérograde médiée par la kinésine en favorisant son détachement (Ebner et al., 1998). La forme pathologique de Tau est une forme hyperphosphorylée insoluble dont l'affinité pour les microtubules est fortement diminuée. La forme de Tau hyperphosphorylée s'associe avec des filaments pour créer des agrégats et engendre des dégénérescences neurofibrillaires. La présence de ces agrégats est associée à de nombreuses démences dont celle associée à la maladie d'Alzheimer (pour revue Querfurth and LaFerla).

Hypothèse d'activation de Dclk3

Les mécanismes régulant l'activation de Dclk3 sont inconnus. Dclk3 serait capable de s'autophosphoryler et / ou être phosphorylée par une autre kinase, un phénomène récurrent dans les chaînes d'activations des kinases. Dclk3 possède un site potentiel de phosphorylation par la CaMKK qui phosphoryle CaMKI et IV pour les activer (pour revue Wayman et al., 2008). Il serait intéressant de tester l'effet de la CaMKK sur le niveau de phosphorylation de Dclk3 et de son impact physiologique vis-à-vis de la htt-m.

L'étude du clivage de Dclk3 par ailleurs est une étape clé dans la compréhension de son mécanisme d'activation et d'action. Deux modes d'activation de Dclk3 liées à ce clivage pourraient être envisagés (Figure18) :

1) La forme pleine longueur de Dclk3 est associée aux microtubules, suite à un stimulus, elle est phosphorylée et clivée en plusieurs peptides. Ces peptides non actifs sont libérés dans le cytosol pour être possiblement dégradés. Le fragment actif contenant le domaine kinase quant à lui est toujours lié aux microtubules où il pourrait phosphoryler ses substrats.

2) La forme pleine longueur Dclk3 est présente sur les microtubules. Suite à un stimulus, elle est phosphorylée en plusieurs sites entraînant son changement de conformation. Dclk3 peut ainsi atteindre son substrat afin de le phosphoryler. Elle est ensuite dégradée en plusieurs fragments non actifs.

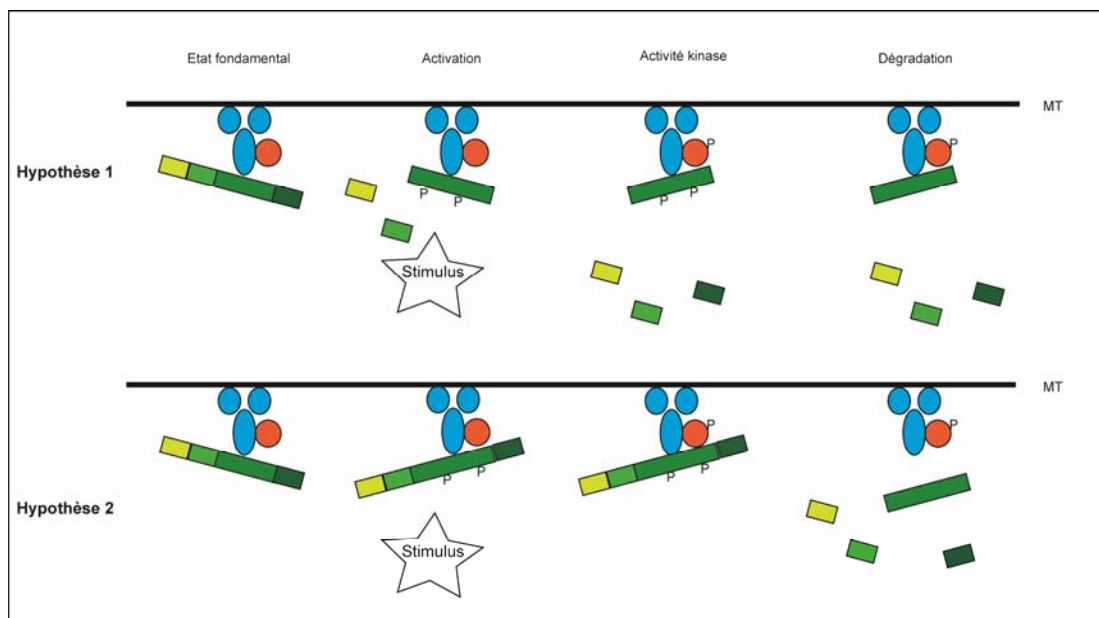


Figure 30 : Hypothèse d'activation de Dclk3.

Dclk3 (dégradé de vert) est liée au microtubule (MT, noir) via les moteurs moléculaires (bleu). Hypothèse1 : Suite à une activation, Dclk3 est phosphorylée (P) et les fragments non actifs se détachent afin d'être dégradés par le protéasome. Dclk3 change alors de conformation afin de pouvoir phosphoryler son substrat lié aux microtubules (orange). Hypothèse2 : Suite à un stimulus, Dclk3 est phosphorylée ce qui change sa confirmation. Une fois le substrat phosphorylé, Dclk3 est dégradée en plusieurs peptides.

PERSPECTIVES

Perspectives quant à l'étude de Dclk3

Les axes de recherches pour l'étude de Dclk3 concernent la meilleure compréhension de son mode d'action en condition physiologique et dans la MH.

La génération de souris KO conditionnelle inductible pour Dclk3 serait un outil de choix afin de mieux aborder sa relation aux microtubules. L'arrêt de la fonction de Dclk3 à plusieurs stades critiques de la maturation du cerveau pourrait mettre en lumière son effet sur la mise en place des connexions entre les neurones et l'arborisation dendritique. L'étude de la fonction kinase consisterait dans l'identification des sites critiques de phosphorylation de Dclk3 permettant son activation ainsi que l'identification de ses partenaires protéiques. De plus, l'identification des protéases responsables de son clivage permettrait de comprendre sa cinétique d'action.

L'étude de la régulation physiologique de Dclk3 permettrait de mieux aborder le phénomène de neuroprotection observés dans la MH. Une approche intéressante pour étudier Dclk3 dans le contexte de la MH consisterait à créer des souris doubles transgéniques par le croisement de souris transgéniques modèles de la MH avec des souris transgéniques pour Dclk3. Les expériences permettraient de déterminer si Dclk3 est capable de diminuer l'atrophie striatale et d'améliorer le phénotype moteur observé.

Perspectives générales concernant les marqueurs du striatum

Dans un premier temps, il serait intéressant d'étudier les marqueurs testés dans cette étude dans un modèle de la MH utilisant la forme entière de la htt-m. Ces expériences permettraient la validation des marqueurs capables de moduler la toxicité de la htt-m.

Les protéines particulièrement exprimées dans le striatum sont toutes potentiellement intéressantes dans l'étude de la MH. La sous-unité $\beta 4$ du canal sodique voltage dépendant (Scn4b) semble un candidat prometteur pour lequel nous avons développé les outils lentiviraux. Scn4b est une sous-unité auxiliaire du canal sodique modifiant la conductance d'ouverture du canal.

Scn4b est très exprimée dans le striatum (de Chaldee et al., 2003; Brochier et al., 2008). Scn4b est fortement diminuée à la fois dans les modèles transgéniques de la MH (HD190Q (Oyama 2006), R6/1 (Hodges et al., 2006), R6/2 (Brochier et al., 2008)) et chez les patients pré-symptomatiques et symptomatiques de la maladie (Desplats et al., 2006). Les canaux sodiques voltage-dépendent ont une grande importance dans le cerveau puisqu'ils permettent la propagation et le maintien du potentiel d'action (pour revue (Leterrier et al., 2010)). La perte de Scn4b modifierait la sensibilité d'ouverture des canaux en fonction du voltage. Il est tentant de penser que de telle modification puisse modifier l'activité électrique des neurones et ainsi favoriser leur dégénérescence dans le striatum.

CONCLUSION

L'étude que nous avons réalisé a conduit à l'identification de deux candidats (St102 et Dclk3) enrichis dans le striatum capable par leur présence de diminuer les effets pro-toxiques de la htt-m *in vivo*. Les mécanismes sous-jacents à cette neuroprotection sont en cours d'étude dans le laboratoire.

Notre étude est à l'interface des études transcriptomiques et des études sur la compréhension de la dégénérescence qui a lieu *in fine* dans la MH. Le criblage *via* notre modèle lentiviral de la MH a permis de restreindre l'étude des marqueurs du striatum sélectionnés de cinq à deux gènes d'intérêts.

Le plan expérimental de cette étude est facilement transposable aux autres maladies neurodégénératives affectant précocement une région du cerveau dont la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer.

ANNEXES

ANNEXE I : Revue "Mitochondria in Huntington's disease"

ANNEXES

ANNEXE I : Revue "Mitochondria in Huntington's disease"



Review

Mitochondria in Huntington's disease

Maria Damiano^{a,b}, Laurie Galvan^{a,b}, Nicole Déglon^{a,b}, Emmanuel Brouillet^{a,b,*}^a CEA, DSV, I2BM Molecular Imaging Research Center (MIRCent), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France^b CEA, CNRS URA 2210, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2009

Received in revised form 31 July 2009

Accepted 31 July 2009

Available online 11 August 2009

Keywords:

Huntington's disease

Mitochondrion

Excitotoxicity

Calcium

Glutamate

NMDA receptor

Dopamine

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an inherited progressive neurodegenerative disorder associated with involuntary abnormal movements (chorea), cognitive deficits and psychiatric disturbances. The disease is caused by an abnormal expansion of a CAG repeat located in exon 1 of the gene encoding the huntingtin protein (Htt) that confers a toxic function to the protein. The most striking neuropathological change in HD is the preferential loss of medium spiny GABAergic neurons in the striatum. The mechanisms underlying striatal vulnerability in HD are unknown, but compelling evidence suggests that mitochondrial defects may play a central role. Here we review recent findings supporting this hypothesis. Studies investigating the toxic effects of mutant Htt in cell culture or animal models reveal mitochondrial changes including reduction of Ca²⁺ buffering capacity, loss of membrane potential, and decreased expression of oxidative phosphorylation (OXPHOS) enzymes. Striatal neurons may be particularly vulnerable to these defects. One hypothesis is that neurotransmission systems such as dopamine and glutamate exacerbate mitochondrial defects in the striatum. In particular, mitochondrial dysfunction facilitates impaired Ca²⁺ homeostasis linked to the glutamate receptor-mediated excitotoxicity. Also dopamine receptors modulate mutant Htt toxicity, at least in part through regulation of the expression of mitochondrial complex II. All these observations support the hypothesis that mitochondria, acting as "sensors" of the neurochemical environment, play a central role in striatal degeneration in HD.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Basic research has demonstrated that mitochondria are key actors in cell survival by controlling energy metabolism, apoptosis pathways and Ca²⁺ homeostasis [1–4]. The hypothesis that mitochondria could play a role in neurodegenerative diseases arises from the observation that mitochondrial defects and oxidative stress can be detected in biological materials from patients with neurodegenerative conditions. In addition, a number of cell biology experiments demonstrated that mitochondria play an active role in the complex cascade of events leading to cell demise in various models of neurodegenerative disorders [5,6]. However, the question as to how mitochondrial defects could be involved in the region specific pattern of degeneration is unclear. It has been known for a long time that the striatum is extremely sensitive to impairment in energy metabolism. Acute poisoning with mitochondrial toxins (cyanide, sodium azide, and 3NP) is often associated with striatal degeneration in man and laboratory animals [7,8]. Mitochondrial defects of genetic origins (e.g. mutation or deletion of mitochondrial DNA or nuclear DNA) can lead to striatal degeneration [7]. In Huntington's disease, recent studies have highlighted the par-

ticular mechanisms that directly link mitochondrial defects with the preferential vulnerability of the striatum, the brain region which displays the earliest and most striking neuropathological changes in patients.

2. Huntington's disease

2.1. Description

Huntington's disease (HD) is an autosomal-dominant inherited neurodegenerative disorder of midlife onset caused by an abnormal expansion of a CAG repeat located in the exon 1 of the gene encoding for the Huntingtin protein (Htt) [9]. HD is characterized by involuntary abnormal movements and postures (chorea, dyskinesia, and dystonia) of the legs, trunk and face [10]. Speech disturbance (dysarthria) is often seen. Other highly alienating symptoms consist of mood, psychiatric disturbances and cognitive deficits characterized by a perseverative behaviour and impaired strategy and planification. With the progression of the disease, motor rigidity and dementia predominate. The disease is fatal within 15–20 years after onset. Although several cerebral regions show signs of neurodegeneration in HD, the most striking neuropathological hallmark of this disorder is the atrophy of the striatum as seen using post mortem histological evaluation [11] or non-invasive brain magnetic resonance imaging (MRI) [12–14]. Detection of pre-symptomatic patients (i.e. carrying

* Corresponding author. URA CEA-CNRS 2210, Molecular Imaging Research Center (MIRCent), I2BM, Bat 61, CEA Center, 18 route du Panorama, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France. Tel.: +33 1 46 54 96 22; fax: +33 1 46 54 91 16.

E-mail address: Emmanuel.brouillet@cea.fr (E. Brouillet).

the mutation but asymptomatic) demonstrated significant atrophy of the caudate and putamen [12–14]. This suggests that degenerative events (cell shrinkage or loss) begin years before the occurrence of clinical symptoms. The disease preferentially affects the GABAergic medium size spiny neurons of the striatum that project to substantia nigra reticulata and pallidum. Intriguingly, large cholinergic interneurons and medium size aspiny interneurons are preserved in the HD striatum [15,16]. Cortical atrophy and early degeneration of the hypothalamus are also important aspects of HD pathogenesis, and late stage HD patients show widespread brain degeneration [17]. However, the severity of striatal alterations is correlated with the degree of motor, cognitive and psychiatric perturbations [18], suggesting that striatal degeneration is an important aspect of HD pathophysiology.

Many genetic models of HD have been generated in mice [19,20]. Transgenic mice express N-terminal fragments of different sizes, the R6/2 mice which overexpress human exon 1 of the HD gene, have a very strong behavioural phenotype with short life span and have been the most studied model so far. Other transgenic models that express the entire mutant human gene show a milder and more progressive neurological phenotype (BACHD, YAC128Q). One transgenic rat model expressing two thirds of the gene shows relatively mild degeneration but develops motor and cognitive symptoms. The mouse models that are genetically the most relevant to HD are the knock-in models where a CAG expansion is inserted in the mouse homologue HD gene (HDh111, HDh140, and HDh150). Excellent reviews have been released for a comprehensive view of the characteristics of the mouse models that have been generated and are still currently used for research [21–23]. The different types (summarized in Table 1) of the mitochondrial defects which have been observed in these animal models will be discussed below.

2.2. Pathogenesis

The mutation induces both a loss of function and a gain of function. Wild-type Htt plays an important role in cell survival by controlling apoptosis pathways, regulating intracellular transport machinery, vesicle trafficking and secretion [24–26].

The toxic functions acquired by mutant Htt may involve the full-length Htt and the short N-terminus fragments produced by the cleavage performed by different proteases, all of which have not been identified yet. Cleavage by calpain [27–32] and caspases has been demonstrated [33–35]. Experimental approaches have shown that the N-terminus fragments of mutant Htt recapitulate several aspects of the full-length mutant protein's toxicity. Of interest, reducing the caspase-6-dependent cleavage of full length mutant Htt markedly slows down the progression of symptoms and neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease [34]. However, it cannot be totally ruled out that the C-terminal part of full length mutant Htt could trigger toxic events. In a recently developed transgenic mouse model of HD (bacterial artificial chromosome HD – BACHD) expressing the full length human mutant gene, neuronal dysfunction starts early while the accumulation of N-terminal Htt fragment is minimal [36].

Abnormal transcription and transcription regulation have been demonstrated [37,38]. Mutant Htt alters macromolecular complexes regulating transcription. The mutation produces changes in protein–protein interaction between Htt and transcription factors or co-factors such as CBP, TAF4, CA150, Sp1, and p53, that can produce deleterious downstream events. Mutant Htt could also lead to increased transglutaminase activity thus producing an abnormal covalent link between proteins [39].

It has been shown that wild-type Htt regulates the expression of BDNF by increasing REST/NRSF at the RE1/NRSE site located in the BDNF promoter [40]. BDNF is an important factor contributing to neuronal survival in the striatum. It is mainly synthesized in the cortical neurons and delivered to the striatum through vesicles using axonal transport [24]. Reduced BDNF levels in the striatum would render medium size spiny neurons highly vulnerable.

Early axonal transport dysfunction and alteration of vesicle trafficking have been shown [41]. In particular impaired transport of vesicles containing BDNF along the axon would further reduce the delivery of BDNF to striatal cells [24]. Impaired axonal transport might also affect organelle, including mitochondria localization (see below). Protein misfolding, proteasome dysfunction [42,43], and reduction of autophagy [44], likely play important roles in HD. Abnormal entry of

Table 1
Main mitochondrial defects observed in genetic models of Huntington's disease.

Mitochondrial target/function	Organism/model	Change (mutant/wt)	Ref.
Mitochondria membrane potential	Primary culture of striatal neurons expressing N-terminal Htt fragments	Decreased	[80,81]
Sensitivity of permeability transition pore to Ca ²⁺	STHdhQ111/Q111 striatal cell line	Increased	[78,104]
Induction of permeability transition	Recombinant N-terminal Htt fragments in vitro	Increased	[50,79]
Ca ²⁺ buffering capacity/handling	Mitochondrial preparation from YAC72Q tg mouse brains	Decreased	[53]
	STHdhQ111/Q111 striatal cell line	Decreased	[83]
	Mitochondrial preparation from tg HD rat brains	Decreased	[77]
	Striatal primary neurons from YAC128Q tg mice	Decreased	[104]
	Striatal primary neurons from HD150Q knock-in mice	Decreased	[105]
	Mitochondrial preparation from R6/2 tg mouse brains	Increased	[84]
	Mitochondrial preparation from YAC128Q tg mouse brains	Increased	[105]
	Mitochondrial preparation from HD150Q, 111Q, 92Q and 50Q knock-in mouse brains	~	[84,105]
Aconitase	R6/2 brains	Decreased	[70]
Pyruvate dehydrogenase	R6/2 brains	Decreased	[70]
Complex II/SDH activity	Rat HD models using lentiviral vectors	Decreased	[95]
	Primary culture of striatal neurons expressing N-terminal Htt fragments	Decreased	[81,117]
	Neuro2A cells expressing Htt exon I	Decreased	[97]
	HeLa cells expressing Htt exon 1	Decreased	[97]
	Yeast expressing full length Htt	Decreased	[98]
Expression of complex II subunits	R6/1 tg mice	Decreased	[95]
	R6/2 tg mice (depending on age)	Decreased, increased, ~	[94]
	Primary culture of striatal neurons expressing N-terminal Htt fragment	Decreased	[81,117]
Complex IV (COX) activity	N171-82Q tg mice	Decreased	[80]
Mitochondrial movement	Cortical primary neurons expressing a N-terminal fragment and full length Htt	Decreased	[100]
Mitochondria transport machinery	Cortical primary neurons	Decreased	[101]

The left column indicates the mitochondrial targets/functions found defective in HD models (indicated in the second column). The table is not exhaustive. It lists main findings in genetic models and corresponding references for further reading.

Ca²⁺ through NMDA receptors and excitotoxicity has been suggested [45,46]. Defective cytosolic Ca²⁺ buffering by mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) have been observed [47].

In the present review, we aim to provide an overview of how mitochondrial dysfunction in HD could play a central role in cell degeneration in HD [48,49]. How mitochondrial defects could contribute to striatal degeneration is however debated. One important point is that mutant Htt can interact with the outer mitochondrial membrane [50–53]. Besides the direct interaction, the transcriptional changes induced by mutant Htt and excitotoxicity could modify some mitochondrial functions. The eventual energy failure would render striatal cells more fragile, and eventually trigger the irreversible cascade of events leading to cell death.

3. Preferential vulnerability of the striatum in human mitochondrial disorders

It has been known for a long time that the striatum is extremely vulnerable to the impairment in the OXPHOS system. Primary genetic mitochondrial defects can lead to striatal degeneration and associated motor and cognitive symptoms. For example deletions or mutations in several mitochondrial genes may lead to Leigh syndrome, characterized by various degrees of basal ganglia damage, and possibly striatal necrosis and, clinically, by choreoathetosis and dystonia. Point mutations in mitochondrial genes coding for several subunits of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductases) can lead to putaminal degeneration and dystonia, in association with other severe alterations such as epilepsy, stroke and optic nerve atrophy. Mutations in mitochondrial DNA encoded ND1 [54] genes produce Leber hereditary optic neuropathy and spastic dystonia. Mutations in ND3 [55] can also produce Leigh syndrome.

More rarely, nuclear genes encoding for mitochondrial proteins or assembly factors can lead to neurological abnormalities reminiscent of Leigh syndrome. Defects in succinate oxidation [56] were associated with bilateral striatal degeneration and dystonia. Loss of function in the gene coding one of the succinate dehydrogenases (SDHA) determines Leigh syndrome [57]. A recent work reported striatal atrophy resulting from homozygous point mutation in subunits VII of complex III, ubiquinol–cytochrome *c* reductase [58].

Mutations in nuclear genes that encode for mitochondrial proteins that are indirectly associated with OXPHOS can also lead to basal ganglia dysfunction. For instance, mutation in the Myofibrillogenesis regulator-1 (MR-1) gene is the cause of the Paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia (PNKD) a rare autosomal-dominant movement disorder characterized by paroxysmic episodes of dystonia and chorea [59].

4. General mitochondrial and OXPHOS defects in HD patients and HD models

4.1. Mitochondrial enzymes

Defects in the respiratory chain in HD have been observed in early biochemical studies. Severe reduction in the activity of complex II/III and milder reduction of complex IV were found in post mortem samples of the caudate/putamen in HD patients [60–64]. No changes were observed in pre-symptomatic patients [65]. The cerebral cortex showed minor changes in respiratory chain enzymes [61,63,66]. No change was observed in blood cells. Reduced activity of other enzymes of oxidative metabolism in the striatum was also reported. In particular massive loss of aconitase activity has been found in the caudate (~90%), and putamen (~70%) [66,67]. Loss of the pyruvate dehydrogenase complex was also shown [62,68]. Those defects were observed in symptomatic patients with caudate/putamen atrophy. Thus, whether they are a consequence of striatal degeneration, or they play a pivotal role in it, remains to be determined.

In a transgenic mouse model of HD (R6/2) with limited cell loss, aconitase and pyruvate dehydrogenase have been found to be decreased to various extents [69]. It seems that in addition to presenting reduced levels, many proteins are modified by oxidative stress in these transgenic models [70]. Thus abnormalities in mitochondrial proteins related to energy metabolism might not simply result from the loss of mitochondria due to the neuronal loss. Experiments using the mitochondrial toxin 3NP and recent studies on mitochondrial complex II support the hypothesis that complex II dysfunction (alteration), in conjunction with oxidative damage to mitochondrial proteins might be causal in HD-linked striatal cell death (see below).

4.2. Brain examination using non-invasive methods

Other indications for energy metabolism problems in HD patients were reported. In particular, early striatal hypometabolism was detected in vivo using positron emission tomography and [¹⁸F]fluorodeoxyglucose [7,71]. Increased lactate concentrations were found in the cortex of symptomatic HD patients using proton NMR spectroscopy [72,73]. Lactate/pyruvate ratio was elevated in the CSF of HD patients [74]. In one NMR study, half of the pre-symptomatic HD patients examined showed increased lactate concentration in the striatum [73]. In muscle, phosphorus NMR spectroscopy showed reduced ATP production [75].

4.3. Mitochondrial membrane potential

Mitochondria isolated from cells expressing mutant Htt show decreased membrane potential. As first reported by Sawa et al., lymphoblasts derived from lymphocytes from HD patients showed increased stress-induced apoptotic cell death [76]. When subjected to apoptotic stress, lymphoblasts from patients displayed increased mitochondrial membrane depolarisation as compared to control lymphocytes. This aggravated loss of potential was correlated with CAG repeat expansion. Other studies also suggest an abnormal mitochondrial membrane potential in cell expressing mutant Htt. Others have reported similar observations in lymphocytes/lymphoblasts [53]. In neural cells, particularly in studies performed on clonal cells derived from knock-in mice harbouring a pathologically expanded CAG repeat tract (STHdhQ111/Q111), showed high sensitivity to Ca²⁺ induced permeability transition [50]. This sensibility was confirmed in many recent studies, specifically when using mitochondria isolated from HD transgenic rats [77]. STHdhQ111/Q111 cells also show higher vulnerability to permeability transition when treated with the 3NP, an effect that could be prevented by cyclosporine-A [78]. It has also been demonstrated that recombinant mutant Htt (short N-terminal fragment) could directly trigger loss of membrane potential and permeability transition, likely through an interaction with the outer mitochondrial membrane [50,79]. *In situ* studies using fluorescent dyes (JC-1, MitoTracker Red) that accumulate in the mitochondria as a function of the membrane potential confirmed that neuronal cells expressing mutant Htt could display reduced mitochondrial membrane potential at rest [80,81].

4.4. Mitochondrial Ca²⁺ buffering capacity

Increased cytoplasmic Ca²⁺ levels are toxic to neurons [82]. Impaired Ca²⁺ homeostasis in HD might have different causes. Although it may originate from various extra-mitochondrial origins (see below), mechanisms related to mitochondrial dysfunction have received the closest attention. The Ca²⁺ buffering capacity of cells expressing mutant Htt can be reduced. This was first shown by Panov et al. in lymphoblasts derived from lymphocytes of HD patients [53]. Similarly, reduced Ca²⁺ loading capacity was found in the brains of YAC72Q mice [53]. Compared to mitochondria from control cells (STHdhQ7/Q7), the mitochondria from clonal striatal cells with mutant Htt (STHdhQ111/Q111)

undergo permeability transition at a lower Ca^{2+} concentration when treated with increasing Ca^{2+} loads and have a reduced capacity to take up Ca^{2+} [83]. Isolated mitochondria from transgenic rats expressing mutant Htt, show reduced rates of Ca^{2+} accumulation compared to control rats [77]. However, other studies using knock-in HD mice (50Q, 92Q, 111Q and 150Q) did not show reduced brain mitochondrial Ca^{2+} loading capacity [84,105]. The latter was even found increased in 12 week old R6/2 mice and 12 month old YAC128Q [84]. One possibility is that changes in mitochondrial Ca^{2+} loading capacity are transient in HD mice. Aging processes and cell substitution may occur in later stages thus hiding the original defect.

5. Complex II defects in Huntington's disease

5.1. 3-Nitropropionic acid, a complex II inhibitor replicating many aspects of Huntington's disease

In man the ingestion of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid (3NP) produces putaminal necrosis and delayed dyskinesias and dystonia [85,86]. Systemic administration of 3NP produces in rats [87,88] and in non-human primates [89] preferential degeneration in the striatum, abnormal movements and frontal type cognitive deficits that are highly reminiscent of HD [8,48]. The 3NP models strongly suggest that complex II defects detected in the striatum of HD patients may participate to cell demise. Alongside the similar phenotype, studies on 3NP toxicity also showed that mitochondrial defects and mutant Htt toxicity share common pathogenic pathways, such as impaired Ca^{2+} homeostasis, calpain and caspase activation, and JNK activation [48]. However, 3NP does not produce transcriptional changes that are comparable to those found in transgenic and knock-in mice expressing mutant Htt [90,91]. The 3NP model should be considered as an excellent model to study the consequences of chronic mitochondrial impairment and oxidative stress *in vivo*. As a model of HD, it presents several limitations compared to transgenic animals [48].

5.2. The SDH–complex II molecular evidence in HD

The main component of complex II is the enzyme succinate dehydrogenase (SDH) [92]. Complex II/SDH is composed of four nuclear-encoded subunits: the 70 kDa Fp subunit that catalyses the oxidation of succinate, the 30 kDa Ip subunit which transfers electrons to the ubiquinone via its iron centers, and two small subunits (SDH-D and SDH-C) that anchor the complex to the internal mitochondrial membrane. Thus, complex II/SDH plays a central role in the respiratory chain, in the tricarboxylic acid cycle and probably in the control of free radical production [92,93].

The expression of the 30 kDa iron–sulfur (Ip) subunit and of the 70 kDa FAD (Fp) subunit was preferentially decreased in the striatum of HD patients, compared with controls [81]. Other mitochondrial proteins were examined including subunit IV of complex IV, alpha subunit of the F1-ATPase, BclXL, a protein of the mitochondrial outer membrane, and cytochrome *c*. None showed significant changes in the striatum of HD patients, suggesting that the defective expression of complex II is not only the consequence of mitochondrial loss, secondary to neuronal death. In the cortex and cerebellum there was no decrease in SDH subunits [81].

Despite these observations, the possible role of complex II in HD is questioned by the fact that many attempts to detect significant reduced enzymatic activity have failed in transgenic mouse models of HD [71]. We also initially failed to find reduced activity or expression of complex II when studying R6/2 and N171-82Q mice at relatively advanced symptomatic stages (Brouillet, Benchoua, personnel communication). The reason for this is not totally understood but recent findings strongly suggest that transient changes in SDH expression might occur in transgenic HD mouse models. Careful longitudinal

analysis of R6/2 mice using well-controlled proteomics methods showed expression changes of the Ip subunit [94]. A significant 34% decrease was seen in the 2 week old R6/2 mice. In the same model, a 50% increase was observed in 4 week old animals, before gross brain atrophy and severe symptoms. Increased activity of many glycolysis and OXPHOS enzymes was also observed in R6/2 mice at 4 weeks. At 6 weeks no changes were observed in the Ip subunit. At 8 weeks, in contrast, Ip was again reduced by 37%. We also found reduced levels of SDH Ip and Fp subunits in the striatum of R6/1 mice at 16 weeks of age while at 32 weeks, changes were less pronounced [95]. Cortex showed no change at either age. The apparent “wavy” changes in Ip expression in R6/2 mice [94] may result from changes in cellular composition of the brain tissue (i.e. neurons and astrocytes) especially considering that reactive gliosis is a physiological phenomenon that follows neuronal loss.

SDH activity was also reduced in the striatum of rats injected with lentiviral vectors coding the 171 N-terminal part of Htt with 82 glutamines (Htt171-82Q) [95,96]. This was observed along with reduced regional glucose consumption as assessed using quantitative ^{14}C -2-deoxyglucose autoradiograph [95,96]. Depletion of activity was in the 50% range at 8 weeks post infection in the region expressing mutant, but not wild-type Htt fragment. Blocking mutant Htt using siRNA strategy prevented the SDH and regional glucose consumption reduction [95,96].

Only few studies report complex II changes in cells expressing mutant Htt in culture. Complex II activity was found reduced in Neuro2A and HeLa cells expressing Htt exon 1 [97]. Interestingly, in yeast, mutant Htt can be cytotoxic through alteration of OXPHOS, in particular reduced function and amount of mitochondrial respiratory chain complex II + III [98]. The potential role of SDH/complex II in HD has been examined in striatal neurons in primary culture using infection with lentiviral vectors coding for the N-terminus part of huntingtin (Htt) with either a pathological (Htt171-82Q) or physiological (Htt171-19Q) polyglutamine tract [81]. A longitudinal biochemical analysis after infection showed that, compared with Htt171-19Q, expression of Htt171-82Q decreased the levels of Ip followed by Fp subunits and reduction of the dehydrogenase activity of the complex. Other mitochondrial proteins remained unchanged. Of interest, the Htt171-82Q-induced loss of complex II did not result from a decrease in mRNA levels. Thus reduction of SDH subunits may be the result of a post-transcriptional problem. Overexpression of Ip or Fp subunit restored complex II levels, blocked mitochondrial dysfunction and prevented striatal cell death induced by Htt171-82Q in primary neurons [81]. These results provide evidence that complex II/SDH subunits are critical for the execution of mutant Htt-induced cell death.

6. Possible mechanisms of mitochondrial dysfunction in HD

As discussed above, mutant Htt (N-terminal small fragments) can possibly directly interact with the outer mitochondrial membrane. This may destabilize mitochondrial membrane, and increase the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) to Ca^{2+} or other apoptotic stimuli. Mitochondrial changes that have been hypothesised to play a role in other neurodegenerative diseases could also be involved in HD (Fig. 1). In particular a shift in the fusion/fission equilibrium might occur [99]. Reduced mitochondrial mobility could reduce the incorporation of certain proteins leading to mitochondrial dysfunction [100]. An elegant study using live cell video microscopy showed that aggregates impair mitochondrial movements along neuronal processes. Mitochondria may remain embedded in the aggregate formations in the somato-dendritic compartment [101]. A very interesting observation in this study is that full length mutant Htt, more than the short N-terminal fragments, impairs mitochondrial mobility. Radical oxygen species (ROS), whose production is thought to be increased in HD patients and HD mouse models [67,71,102,103]

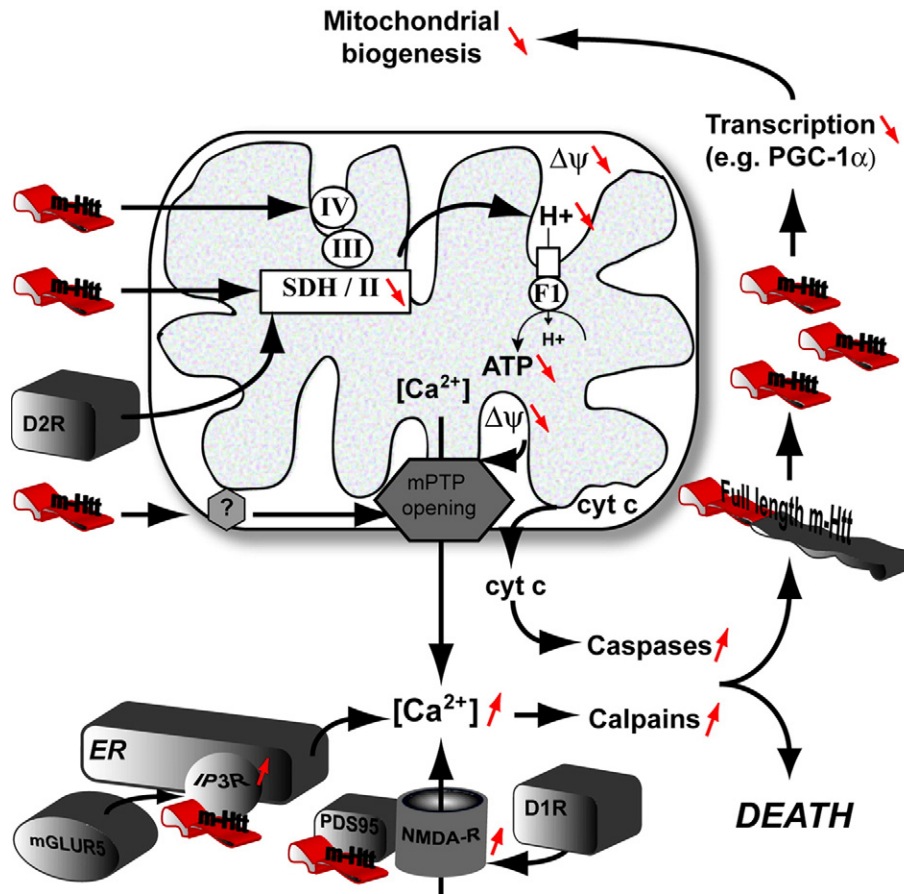


Fig. 1. Hypothetical mechanisms involving mitochondria in Huntington's disease pathogenesis. Mutant huntingtin (m-Htt) produces mitochondrial impairment through different mechanisms. Mitochondria from HD patients and genetic models of HD show reduced membrane potential ($\Delta\psi$), decreased Ca^{2+} buffering capacity, enhanced sensitivity to Ca^{2+} -induced permeability transition, and triggering of caspase-mediated apoptotic pathways involving caspases. In addition, m-Htt can produce preferential reduction of respiratory chain enzymes, in particular complex II (SDH/II) and to a lesser extent cytochrome c oxidoreductase (IV). These mitochondrial defects may result from a direct interaction of m-Htt with the outer membrane and/or indirect modification of protein(s) expression linked to m-Htt-induced transcriptional changes. One important effect of m-Htt-induced mitochondrial defects includes deregulation of cytosolic Ca^{2+} concentrations. In striatal cells, this could act in synergy with other m-Htt-induced modification of Ca^{2+} homeostasis: m-Htt increases the activation of the InP_3 receptor (IP3R) triggering Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) and enhances Ca^{2+} entry through NMDA receptors. In this scenario, glutamate is a primary cause of Ca^{2+} transients during synaptic transmission, leading to Ca^{2+} deregulation and cell death (excitotoxicity) in cells expressing m-Htt. In addition, the presence of dopamine could also render striatal cells more vulnerable to m-Htt toxicity. D1 receptors can exacerbate glutamate toxicity and D2 receptors might down regulate expression of mitochondrial complex II. Mitochondrial defects can indirectly increase the activity of proteases that cleaves Htt, leading to enhanced production of N-terminal Htt fragments. This would further exacerbate transcriptional defects which, through a vicious cycle, would further accentuate mitochondrial impairment.

could also lead to mitochondrial impairment, particularly by increasing the vulnerability of the mPTP in the presence of Ca^{2+} .

A cellular function that is severely altered in HD and could lead to mitochondrial dysfunction is transcription. The vulnerability of mitochondria to Ca^{2+} loads and induction of permeability transition have been recently studied by Oliveira and co-workers [104,105]. In this accurate study, the authors show that mitochondria of STHdh111Q/111Q cells derived from knock-in HD mice, as well as primary striatal neurons from YAC128 mice, have reduced Ca^{2+} handling capacity, when compared to control cells. These changes were prevented by applying HDAC inhibitors [104]. This suggests that, at least in part, mitochondrial defects are secondary to impaired nuclear transcription. Indeed mitochondrial biogenesis, and import of matrix and membrane proteins, are under the control of several nuclear transcription factors and co-activators [106]. Reduced CREB-dependent transcription in HD could have specific consequences on mitochondrial physiology. For example, CREB regulates respiratory chain proteins (e.g. COX-IV and cytochrome c) [107]. Recently, Ryu et al. demonstrated that CREB could directly bind mtDNA on CRE binding sites, a process that is stimulated by mitochondrial PKA [108]. Interestingly, the regulation of CREB phosphorylation in mitochondria may involve Ca^{2+} -dependent phosphatase in neurons [109]. Thus, transcriptional problems produced by mutant Htt could lead to disruption of Ca^{2+} homeostasis,

which in mitochondria may further reduce CREB-dependent expression of OXPHOS proteins, and result in energy failure and apoptotic cell death.

It has been demonstrated that the accumulation of p53 plays a role in mitochondrial dysfunction and HD-linked degeneration [80]. The strong interaction between p53 and mutant Htt causes p53 accumulation in the nucleus thus inducing p53 dependent transcription. Reducing p53 activity using siRNA or gene deletion is neuroprotective against mutant Htt. Knocking down p53 rescues striatal cells from mutant Htt-induced mitochondrial dysfunction (loss of mitochondrial membrane potential and COX activity) [80]. It is currently unknown whether the transcriptional effect of p53 plays a direct or indirect role on cytosolic proteins that can regulate apoptosis such as Puma.

Another very interesting mechanism that has recently been proposed to be involved in HD-linked striatal degeneration is the PGC-1alpha pathway. Reduced expression of PGC-1alpha has been reported in HD models [110,111]. PGC-1alpha is a nuclear co-activator that plays a major role in mitochondrial biogenesis [110,111]. Mice that are nullizygous for PGC-1alpha display abnormalities related to energy metabolism and strikingly develop striatal lesions [112]. Increasing PGC-1alpha expression is neuroprotective against mutant Htt toxicity and, on the contrary, when PGC1-alpha is knocked down, neurons are highly vulnerable to mutant Htt toxicity in cell culture

and *in vivo* [111]. Other family members (PGC1beta and PGC-1 Related co-activator –PRC), also known to regulate important aspects of mitochondrial biogenesis and of respiratory enzymes, could be also involved [113]. In line with this, it cannot be excluded that downstream of PGC-1alpha, the nuclear respiratory factors, NRF-1 and NRF-2 [114] could also participate in HD-linked mitochondrial dysfunction. The possible mechanisms through which mutant Htt could impair mitochondrial function is likely multifactorial and highly complex.

How could mutant Htt produce the loss of complex II/SDH activity? The loss of SDH subunits may not be directly produced by transcription regulation. The Fp SDH subunit possesses a CRE consensus sequence in its promoter [115]. However it is unknown whether this site is active or not. The mRNA expression for SDH-A and SDH-B is not markedly reduced in the brain of HD patients [116], while there is a dramatic loss of the proteins as assessed using western blots [81] and activity assay [61,63]. Using cultured striatal neurons, we showed that expression levels of mRNA coding for SDH subunits were not modified by mutant Htt while protein expression and activity was reduced [81,117]. Mutant Htt could decrease the import of the Ip subunit into mitochondria, increase its degradation, or disturb its assembly into a functional complex. Mutant Htt can bind to the outer mitochondrial membrane [50,53]. This could modify the molecular machinery for the SDH import. It is also possible that loss of membrane potential could reduce or alter the incorporation of the FAD prosthetic group to the Fp subunit and eventually induce complex II disassembly. Another interesting possibility is related to the Ip protein mRNA structure [81] which presents an un-translated region (UTR) named IRE (Iron Responsive Element). Oxidative stress or imbalance in iron metabolism could modify Ip expression through the binding of IRP-1 and IRP-2 [118].

7. Environmental factors underlying striatal vulnerability through mitochondrial mechanisms

Obviously, reduced energy production, anomalies in the control of apoptosis and reduced cytosolic Ca^{2+} handling capacity can affect cell survival. Why is the striatum particularly vulnerable to mitochondrial dysfunction in HD? The general hypothesis is that striatal vulnerability to impairment in energy metabolism is caused by many factors. In particular, neurotransmission systems which modulate activity of striatal medium-sized spiny neurons could play a role.

7.1. Glutamate, excitotoxicity and mitochondria

Whereas purely mitochondrial changes (protein expression, mitochondrial membrane potential, and Ca^{2+} loading capacity) are not always consistently observed in all experimental models (cell types and mouse lines), one consistent observation is that in neurons, mitochondrial Ca^{2+} handling is reduced, upon stimulation of glutamate receptors *in situ*. The cause of this defect is not totally understood but elegant studies try to explain how HD-induced mitochondrial dysfunction could transform a physiological effect into an excitotoxic one.

There are mainly two studied mechanisms able to lead to impaired Ca^{2+} homeostasis within striatal neurons: 1) increase in Ca^{2+} entry, and 2) impaired Ca^{2+} sequestration/release into/from intracellular stores. In fact the two mechanisms could co-exist and synergistically exacerbate Ca^{2+} deregulation thus triggering cell death.

In addition, abnormal release of Ca^{2+} from ER likely exists in neurons expressing mutant Htt. Mutant Htt facilitates activity of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (InsP(3)R1) [119]. This is an important aspect since, in the presence of impaired mitochondrial Ca^{2+} handling, and upon the pathologic stimulation of NMDA receptors, the increased Ca^{2+} release from the ER could further increase cytosolic Ca^{2+} up to excitotoxic levels and thus cause neuronal apoptosis.

Compelling evidence shows that abnormal activation of NMDA receptors likely plays a role in HD pathogenesis [45,46,120,121]. Pioneering studies show that intrastriatal injection of NMDA receptor agonists, including NMDA and quinolinate in laboratory animals produces axon-sparing lesions which are reminiscent of HD [8]. In particular, while medium-sized spiny neurons preferentially degenerate, interneurons (large cholinergic interneurons and medium size aspiny GABAergic neurons expressing nNOS, somatostatin and neuropeptide Y) are spared [122,123]. More recently, several approaches have shown that mutant Htt can directly modify NMDA-receptor function through its interaction with PSD95 [124,125]. In particular, mutant Htt increases the sensibility of neurons to excitotoxicity associated to stimulation of NMDA receptors harbouring the NR2B subunits [126,127]. Degeneration is exacerbated in mice with CAG expansion in the Htt homologue gene (knock-in Hdh150Q) and overexpressing NR2B [128]. NMDA currents are increased in the striatum of transgenic mice overexpressing full length Htt [124,127,129]. Decortication, which removes glutamate afferents in the striatum, protects against striatal degeneration in R6/2 mice [130]. Many electrophysiological data support the view that abnormal glutamatergic transmission in the corticostriatal pathway is a prominent aspect of striatal degeneration (reviewed in [131]).

However, increased activation of NMDA receptors might not be a prerequisite for excitotoxicity. Indeed, extracellular normal glutamate concentrations can trigger excitotoxic cell death in neurons with impaired energy metabolism [132]. In cell culture, pre-treatment with 3NP exacerbates the toxicity of low NMDA or glutamate concentrations [133–135]. Three studies have demonstrated that this synergy also operates *in vivo* by providing evidence that the size of striatal lesions produced by NMDA is significantly increased by injecting malonate, a reversible complex II inhibitor, into the striatum [136] or by systemic administration of 3NP [137,138]. Potentiation of QA toxicity by inhibiting SDH/complex II with 3NP (in the 45% range) is observed at non toxic doses 3NP. This effect is likely associated with increased cytosolic Ca^{2+} concentrations *in vivo*. Intracellular Ca^{2+} imaging studies [132,137,139] showed that NMDA receptor activation leads to higher cytoplasmic Ca^{2+} concentrations in 3NP-treated cultured neurons and brain slices, as compared with untreated preparations. However, results obtained from $^{45}\text{Ca}^{2+}$ experiments demonstrated that, during NMDA receptor stimulation by an agonist, Ca^{2+} entry into primary striatal neurons is similar with or without 3NP [137]. Thus the increased vulnerability of neurons to excitotoxicity when complex II is deficient is likely due to reduced mitochondrial capacity to uptake cytosolic Ca^{2+} upon NMDA receptor stimulation [132,137,139]. A similar process may occur in neurons expressing mutant Htt and subjected to NMDA receptor stimulation, despite the fact that reduction in complex II is likely not a prerequisite. Complex II would further aggravate the vulnerability of mitochondria to Ca^{2+} transients. Consistent with this view, a study performed in the YAC128 mouse model indicated that during the initial phase of NMDA toxicity, NMDA receptor current and cytosolic Ca^{2+} loading are similar to those observed in wild-type striatal neurons [140]. However, NMDA receptor-mediated Ca^{2+} load triggered a more profound loss of mitochondrial membrane potential in YAC128 neurons than in wild-type cells. After removal of NMDA, YAC128 cells displayed a longer time to recover normal Ca^{2+} concentrations. This was attributed to higher sensitivity of YAC128 striatal cells to Ca^{2+} induced mitochondrial permeability transition [140]. Oliveira and collaborators studied Ca^{2+} transients after NMDA receptor stimulation in YAC128 striatal neurons in relation to the modification of mitochondrial membrane potential assessed using the fluorescent TMRM+ probe [104,105]. They characterized the patterns of Ca^{2+} recovery after NMDA receptor stimulation in wild-type cells and YAC128 striatal cells in culture. The proportion of neurons with delayed recovery (i.e. initial cytosolic Ca^{2+} peak progressively returns to normal after MK801 application) was significantly higher in YAC128 neurons. Striatal neurons prepared from heterozygous Hdh150Q knock-in mouse

embryos were more vulnerable to Ca^{2+} deregulation than wild-type neurons [104,105].

7.2. Dopamine and mitochondria

In addition to glutamate, other neurotransmission systems likely play a role in HD pathogenesis [48,141,142]. In particular dopamine, which is at high concentrations in the striatum compared to other brain areas, might play an important role in the preferential vulnerability of the striatum in HD [143], possibly through a functional interaction with mitochondria.

A number of *in vivo* and *in vitro* experiments showed that dopamine contributes to striatal lesions produced by the mitochondrial toxin 3NP (see for review [48]), suggesting that dopamine could have an impact on mitochondrial function. Dopamine may act as a co-factor in mutant Htt-induced death *in vitro*, possibly through stimulation of autophagy [144]. However, autophagy is rather considered as neuroprotective in HD pathogenesis [145]. Increased autophagy might lead to enhanced mitochondria clearance in HD cells, and prevent the cells from entering the apoptotic cascade. The production of free radicals following dopamine oxidation [146] may also increase Htt toxicity [147].

However, direct support for the role for DA in HD comes from the recent demonstration that the toxicity of the N-terminal fragments of mutant Htt is potentiated by dopamine. Dopamine modifies the formation of Htt-containing aggregates in primary striatal neurons transfected with exon 1 of Htt gene and exacerbates mutant Htt-induced cell death [147]. Of interest, this effect involves D2 receptor signalling, since dopamine had this detrimental effect when neurons were prepared from D2 receptor null mice [147]. In addition D2 antagonists significantly reduce the effects of dopamine. *In vivo* experiments also support a role for dopamine and its receptors in HD pathogenesis: DAT (dopamine transporter) knock-out (KO) mice crossed with a knock-in transgenic mouse model of HD showed enhanced motor symptoms and striatal degeneration induced by mutant Htt [148]. In YAC128 HD mice, L-dopa treatment (which elevates dopamine concentrations) accelerates striatal degeneration, whereas the neuroleptic tetrabenazine, which reduces dopamine release, was neuroprotective [149]. Chronic treatment with the D2 antagonist haloperidol significantly reduces the striatal toxicity of Htt171–82Q *in vivo* [150]. Stack et al. [130] showed that 6OHDA-induced degeneration of the nigro-striatal dopaminergic pathway prevents striatal degeneration in R6/2 HD mice.

We found that one of the underlying mechanisms of this “prototoxic” effect of dopamine in mutant Htt toxicity directly involves mitochondria. Primary striatal neurons expressing Htt171–82Q were highly vulnerable to dopamine when compared to normal neurons or neurons expressing the wild-type fragments [117]. This was correlated with the level of reduction of complex II/SDH activity. Indeed, incubation of striatal neurons with dopamine alone produced a significant loss of SDH activity and reduced expression of the subunits of the complex. This was related to a transient reduction of Ip and Fp complex II subunit mRNAs. This dopamine-induced loss of complex II was mediated by D2 receptors. D2 receptor antagonists blocked the effect of dopamine and D2 agonist replicated the effect of dopamine. The combined down regulation of SDH/complex II by dopamine and mutant Htt leads to cell death that can be blocked by overexpression of the Ip protein using lentiviral vector-mediated gene transfer methods [117]. How this novel mechanism could play a role *in vivo* in the striatum is not yet elucidated. However it could explain why the striatum is preferentially vulnerable to the complex II inhibitor 3NP and mutant Htt toxicity.

8. Therapeutic strategies from theory to proof of concept

Theoretically, if mitochondrial defects found in HD patients and HD models play a role in neuronal dysfunction and eventually death, correcting these defects may provide beneficial effects. Recent findings support this hypothesis.

Whereas gene transfer-based experiments recently led to the discovery of potential therapeutic targets that could improve mitochondria in HD (such as PGC-1alpha or the mitochondrial complex II), preclinical studies are yet required to precisely determine whether it is possible to modulate these systems *in vivo*. From a practical perspective, the targeting of these complex systems will require important and long-term developments. However, a few strategies which were suggested many years ago have shown great promise in preclinical and even clinical studies. Examples are given below.

In cells expressing mutant Htt, accumulation of p53 has been shown to induce neuronal death. Reducing accumulation of p53 using RNA interference and the p53 inhibitor pifithrin- α suppresses mutant Htt-induced mitochondrial depolarisation. Intraperitoneal injection of pifithrin- α in 171–82Q HD transgenic mice restores levels of complex IV activity to normal levels [80]. It can be speculated that pifithrin-like drugs could be neuroprotective in patients.

The loss of mitochondrial Ca^{2+} handling observed in cell lines derived from knock-in mouse model can be corrected by treatment with the HDAC inhibitors trichostatin A or sodium butyrate, suggesting that acting on transcription defects could correct some of mitochondrial defects produced by mutant Htt [104]. Treatment with HDAC inhibitors in mouse models of HD reduces striatal atrophy and motor deficits [151,152]. These beneficial effects in mice could at least in part involve amelioration of mitochondrial physiology.

Another approach consists in brain fuel supplementation. The most promising compound that could be efficacious in increasing brain energy metabolism is creatine, a compound produced endogenously and acquired exogenously through diet [153]. Diet supplementation with creatine (in the range of 600 mg/kg) in mice expressing the N-terminal part of mutant huntingtin is neuroprotective. It extends life span in transgenic mice, and reduces motor dysfunction and striatal atrophy [154–156]. Creatine is well tolerated in patients [157]. It seems that creatine produces an actual biological effect in HD patients since blood levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2'dG), a biomarker of oxidative stress that is elevated in untreated HD patients are near control levels in patients with creatine treatment. Ongoing clinical trials may determine within few years whether creatine treatment can slow the progression of the disease.

Production of ROS is likely increased in HD patients and HD mouse models [67,71,102,103]. Reducing ROS production using compounds with antioxidant properties has been tested in HD models [23]. For example, ascorbate treatment in R6/2 mice ameliorates behavioural deterioration [158]. The newly developed antioxidant BN82451 protects and extends survival in R6/2 mice [159]. The most debated but still very promising compound is coenzyme Q10, which has antioxidant properties and plays an important role in the transfer of electrons in the respiratory chain [160]. Transgenic R6/2 mice treated with coenzyme Q10 alone or in association with the NMDA receptor antagonist remacemide show increased survival, attenuated weight loss, improved motor performances, and reduced striatal atrophy when compared with untreated transgenic mice [161,162]. Clinical trials with relatively low dose showed no major protective effects, suggesting that higher doses may be necessary.

9. Conclusion

Mitochondria likely play a key role in HD, although the exact mechanisms involved are still under debate. Of interest, the striatum might be particularly vulnerable to mitochondrial defects through multiple mechanisms involving molecular factors which are selectively present in this brain region. Amongst these factors, dopamine and D2 receptors, which are present in high concentrations in the striatum likely play a role in the selective degeneration of striatal neurons expressing mutant Htt. Many other factors possibly determine striatal vulnerability and may directly regulate mitochondrial homeostasis. Beyond a better understanding of these mechanisms,

there is really an urgent need to find an efficacious therapeutic strategy to slow disease progression. Many therapeutic strategies are studied at a preclinical level and several clinical trials have been carried out in HD patients. None have provided major beneficial effects. Continuing to precisely decipher the various ways by which mitochondria are involved in HD pathogenesis will certainly help to disclose new therapeutic strategies.

Acknowledgements

L.G. is supported for her PhD training program by Neuropole de Recherche Francilien (NeRF), Région Ile-de-France. M.D., E.B. and N.D. are supported by CHDI (formerly HighQ foundation). We are grateful to Dr Romina Aron-Badin for English editing.

References

- [1] D.C. Chan, Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development, *Cell* 125 (2006) 1241–1252.
- [2] D.R. Green, G. Kroemer, The pathophysiology of mitochondrial cell death, *Science* 305 (2004) 626–629.
- [3] D.R. Green, J.C. Reed, Mitochondria and apoptosis, *Science* 281 (1998) 1309–1312.
- [4] D.D. Newmeyer, S. Ferguson-Miller, Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death, *Cell* 112 (2003) 481–490.
- [5] M.T. Lin, M.F. Beal, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature* 443 (2006) 787–795.
- [6] M.P. Mattson, Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 1997–2006.
- [7] M.F. Beal, Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 31 (1992) 119–130.
- [8] E. Brouillet, F. Conde, M.F. Beal, P. Hantraye, Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals, *Prog. Neurobiol.* 59 (1999) 427–468.
- [9] The-Huntington's-Disease-Collaborative-Research-Group, A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group, *Cell* 72 (1993) 971–983.
- [10] P.S. Harper, Huntington's disease, 1991.
- [11] R.J. Ferrante, N.W. Kowall, M.F. Beal, J.B. Martin, E.D. Bird, E.P. Richardson Jr., Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46 (1987) 12–27.
- [12] E.H. Aylward, B.F. Sparks, K.M. Field, V. Yallapragada, B.D. Shpritz, A. Rosenblatt, J. Brandt, L.M. Gourley, K. Liang, H. Zhou, R.L. Margolis, C.A. Ross, Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease, *Neurology* 63 (2004) 66–72.
- [13] J. Kassubek, F.D. Juengling, T. Kioschies, K. Henkel, J. Karitzky, B. Kramer, D. Ecker, J. Andrich, C. Saft, P. Kraus, A.J. Aschoff, A.C. Ludolph, G.B. Landwehrmeyer, Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75 (2004) 213–220.
- [14] H.H. Ruocco, I. Lopes-Cendes, L.M. Li, M. Santos-Silva, F. Cendes, Striatal and extra-striatal atrophy in Huntington's disease and its relationship with length of the CAG repeat, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 1129–1136.
- [15] R.J. Ferrante, M.F. Beal, N.W. Kowall, E.P. Richardson Jr., J.B. Martin, Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease, *Brain Res.* 411 (1987) 162–166.
- [16] R.J. Ferrante, N.W. Kowall, M.F. Beal, E.P. Richardson Jr., E.D. Bird, J.B. Martin, Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease, *Science* 230 (1985) 561–563.
- [17] A. Petersen, M. Bjorkqvist, Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington's disease, *Eur. J. Neurosci.* 24 (2006) 961–967.
- [18] R.H. Myers, J.P. Vonsattel, T.J. Stevens, L.A. Cupples, E.P. Richardson, J.B. Martin, E.D. Bird, Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease, *Neurology* 38 (1988) 341–347.
- [19] M.Y. Heng, P.J. Detloff, R.L. Albin, Rodent genetic models of Huntington disease, *Neurobiol. Dis.* 32 (2008) 1–9.
- [20] M.S. Levine, C. Cepeda, M.A. Hickey, S.M. Fleming, M.F. Chesselet, Genetic mouse models of Huntington's and Parkinson's diseases: illuminating but imperfect, *Trends Neurosci.* 27 (2004) 691–697.
- [21] L.B. Menalled, Knock-in mouse models of Huntington's disease, *NeuroRx* 2 (2005) 465–470.
- [22] L.B. Menalled, M.F. Chesselet, Mouse models of Huntington's disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 23 (2002) 32–39.
- [23] M.F. Beal, R.J. Ferrante, Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 373–384.
- [24] M. Borrell-Pages, D. Zala, S. Humbert, F. Saudou, Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 2642–2660.
- [25] E. Cattaneo, C. Zuccato, M. Tartari, Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (2005) 919–930.
- [26] A. Reiner, I. Dragatsis, S. Zeitlin, D. Goldowitz, Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival, *Mol. Neurobiol.* 28 (2003) 259–276.
- [27] C.M. Cowan, L.A. Raymond, Selective neuronal degeneration in Huntington's disease, *Curr. Top. Dev. Biol.* 75 (2006) 25–71.
- [28] J. Gafni, L.M. Ellerby, Calpain activation in Huntington's disease, *J. Neurosci.* 22 (2002) 4842–4849.
- [29] J. Gafni, E. Hermel, J.E. Young, C.L. Wellington, M.R. Hayden, L.M. Ellerby, Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20211–20220.
- [30] D. Goffredo, D. Rigamonti, M. Tartari, A. De Micheli, C. Verderio, M. Matteoli, C. Zuccato, E. Cattaneo, Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39594–39598.
- [31] Y.J. Kim, Y. Yi, E. Sapp, Y. Wang, B. Cui, K.B. Keigel, Z.H. Qin, N. Aronin, M. DiFiglia, Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 12784–12789.
- [32] N. Bizat, J.M. Hermel, F. Boyer, C. Jacquard, C. Creminon, S. Ouary, C. Escartin, P. Hantraye, S. Kajewski, E. Brouillet, Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease, *J. Neurosci.* 23 (2003) 5020–5030.
- [33] C.L. Wellington, L.M. Ellerby, A.S. Hackam, R.L. Margolis, M.A. Trifiro, R. Singaraja, K. McCutcheon, G.S. Salvesen, S.S. Propp, M. Bromm, K.J. Rowland, T. Zhang, D. Rasper, S. Roy, N. Thornberry, L. Pinsky, A. Kakizuka, C.A. Ross, D.W. Nicholson, D.E. Bredesen, M.R. Hayden, Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9158–9167.
- [34] R.K. Graham, Y. Deng, E.J. Slow, B. Haigh, N. Bissada, G. Lu, J. Pearson, J. Shehadeh, L. Bertram, Z. Murphy, S.C. Warby, C.N. Doty, S. Roy, C.L. Wellington, B.R. Leavitt, L.A. Raymond, D.W. Nicholson, M.R. Hayden, Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin, *Cell* 125 (2006) 1179–1191.
- [35] S.T. Lee, M. Kim, Aging and neurodegeneration. Molecular mechanisms of neuronal loss in Huntington's disease, *Mech. Ageing Dev.* 127 (2006) 432–435.
- [36] M. Gray, D.I. Shirasaki, C. Cepeda, V.M. Andre, B. Wilburn, X.H. Lu, J. Tao, I. Yamazaki, S.H. Li, Y.E. Sun, X.J. Li, M.S. Levine, X.W. Yang, Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice, *J. Neurosci.* 28 (2008) 6182–6195.
- [37] K.L. Sugars, D.C. Rubinsztein, Transcriptional abnormalities in Huntington disease, *Trends Genet.* 19 (2003) 233–238.
- [38] J.H. Cha, Transcriptional signatures in Huntington's disease, *Prog. Neurobiol.* 83 (2007) 228–248.
- [39] M. Lesort, W. Chun, J. Tucholski, G.V. Johnson, Does tissue transglutaminase play a role in Huntington's disease? *Neurochem. Int.* 40 (2002) 37–52.
- [40] C. Zuccato, M. Tartari, A. Crotti, D. Goffredo, M. Valenza, L. Conti, T. Cataudella, B.R. Leavitt, M.R. Hayden, T. Timmusk, D. Rigamonti, E. Cattaneo, Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes, *Nat. Genet.* 35 (2003) 76–83.
- [41] S.H. Li, X.J. Li, Huntingtin–protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease, *Trends Genet.* 20 (2004) 146–154.
- [42] S. Finkbeiner, S. Mitra, The ubiquitin–proteasome pathway in Huntington's disease, *ScientificWorldJournal* 8 (2008) 421–433.
- [43] Z. Ortega, M. Diaz-Hernandez, J.J. Lucas, Is the ubiquitin–proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 2245–2257.
- [44] F.M. Menzies, B. Ravikumar, D.C. Rubinsztein, Protective roles for induction of autophagy in multiple proteinopathies, *Autophagy* 2 (2006) 224–225.
- [45] M.M. Fan, L.A. Raymond, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease, *Prog. Neurobiol.* 81 (2007) 272–293.
- [46] E.C. Stack, R.J. Ferrante, Huntington's disease: progress and potential in the field, *Expert. Opin. Investig. Drugs* 16 (2007) 1933–1953.
- [47] I. Bezprozvanny, M.R. Hayden, Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (2004) 1310–1317.
- [48] E. Brouillet, C. Jacquard, N. Bizat, D. Blum, 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover pathophysiological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease, *J. Neurochem.* 95 (2005) 1521–1540.
- [49] S.E. Browne, Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: insight from genetic and chemical models, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147 (2008) 358–382.
- [50] Y.S. Choo, G.V. Johnson, M. MacDonald, P.J. Detloff, M. Lesort, Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome *c* release, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 1407–1420.
- [51] C.A. Gutekunst, S.H. Li, H. Yi, J.S. Mulroy, S. Kuemmerle, R. Jones, D. Rye, R.J. Ferrante, S.M. Hersch, X.J. Li, Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology, *J. Neurosci.* 19 (1999) 2522–2534.
- [52] A.V. Panov, J.R. Burke, W.J. Strittmatter, J.T. Greenamyre, In vitro effects of polyglutamine tracts on Ca^{2+} -dependent depolarization of rat and human mitochondria: relevance to Huntington's disease, *Arch. Biochem. Biophys.* 410 (2003) 1–6.
- [53] A.V. Panov, C.A. Gutekunst, B.R. Leavitt, M.R. Hayden, J.R. Burke, W.J. Strittmatter, J.T. Greenamyre, Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines, *Nat. Neurosci.* 5 (2002) 731–736.
- [54] L. Spruijt, H.J. Smeets, A. Hendrickx, M.W. Bettink-Remeijer, A. Maat-Kievit, K.C. Schoonderwoerd, W. Sluiter, I.F. de Co, R.Q. Hintzen, A. MELAS-associated ND1 mutation causing leber hereditary optic neuropathy and spastic ataxia, *Arch. Neurol.* 64 (2007) 890–893.
- [55] E. Sarzi, M.D. Brown, S. Lebon, D. Chretien, A. Munnich, A. Rotig, V. Procaccio, A novel recurrent mitochondrial DNA mutation in ND3 gene is associated with isolated complex I deficiency causing Leigh syndrome and dystonia, *Am. J. Med. Genet.* 143 (2007) 33–41.
- [56] J.J. Martin, F.L. Van de Vyver, H.R. Scholte, A.M. Roodhooft, C. Ceuterick, L. Martin, I.E. Luyt-Houwen, Defect in succinate oxidation by isolated muscle mitochondria

- in a patient with symmetrical lesions in the basal ganglia, *J. Neurol. Sci.* 84 (1988) 189–200.
- [57] T. Bourgeron, P. Rustin, D. Chretien, M. Birch-Machin, M. Bourgeois, E. Viegas-Pequignot, A. Munnich, A. Rotig, Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency, *Nat. Genet.* 11 (1995) 144–149.
- [58] O. Barell, Z. Shorer, H. Flusser, R. Ofir, G. Narkis, G. Finer, H. Shalev, A. Nasasra, A. Saada, O.S. Birk, Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ, *Am. J. Hum. Genet.* 82 (2008) 1211–1216.
- [59] D. Ghezzi, C. Viscomi, A. Ferlini, F. Gualandi, P. Mereghetti, D. DeGrandis, M. Zeviani, Paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia is caused by mutations of the MR-1 mitochondrial targeting sequence, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 1058–1064.
- [60] W.A. Brennan Jr., E.D. Bird, J.R. Aprile, Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain, *J. Neurochem.* 44 (1985) 1948–1950.
- [61] S.E. Browne, A.C. Bowling, U. MacGarvey, M.J. Baik, S.C. Berger, M.M. Muqit, E.D. Bird, M.F. Beal, Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia, *Ann. Neurol.* 41 (1997) 646–653.
- [62] J. Butterworth, C.M. Yates, G.P. Reynolds, Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases, *J. Neurol. Sci.* 67 (1985) 161–171.
- [63] M. Gu, M.T. Gash, V.M. Mann, F. Javoy-Agid, J.M. Cooper, A.H. Schapira, Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus, *Ann. Neurol.* 39 (1996) 385–389.
- [64] V.M. Mann, J.M. Cooper, F. Javoy-Agid, Y. Agid, P. Jenner, A.H. Schapira, Mitochondrial function and parental sex effect in Huntington's disease, *Lancet* 336 (1990) 749.
- [65] P. Guidetti, V. Charles, E.Y. Chen, P.H. Reddy, J.H. Kordower, W.O. Whetsell Jr., R. Schwarcz, D.A. Tagle, Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production, *Exp. Neurol.* 169 (2001) 340–350.
- [66] S.J. Tabrizi, M.W. Cleeter, J. Xuereb, J.W. Taanman, J.M. Cooper, A.H. Schapira, Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain, *Ann. Neurol.* 45 (1999) 25–32.
- [67] M.A. Sorolla, G. Reverter-Branchat, J. Tamarit, I. Ferrer, J. Ros, E. Cabiscol, Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 667–678.
- [68] S. Sorbi, E.D. Bird, J.P. Blass, Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain, *Ann. Neurol.* 13 (1983) 72–78.
- [69] A. Zourlidou, T. Gidalevitz, M. Kristiansen, C. Landles, B. Woodman, D.J. Wells, D.S. Latchman, J. de Bellerche, S.J. Tabrizi, R.I. Morimoto, G.P. Bates, Hsp27 overexpression in the R6/2 mouse model of Huntington's disease: chronic neurodegeneration does not induce Hsp27 activation, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 1078–1090.
- [70] M. Perluigi, H.F. Poon, W. Maragos, W.M. Pierce, J.B. Klein, V. Calabrese, C. Cini, C. De Marco, D.A. Butterfield, Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in R6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease, *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 1849–1861.
- [71] S.E. Browne, M.F. Beal, Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 2061–2073.
- [72] B.G. Jenkins, W.J. Koroshetz, M.F. Beal, B.R. Rosen, Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy, *Neurology* 43 (1993) 2689–2695.
- [73] B.G. Jenkins, H.D. Rosas, Y.C. Chen, T. Makabe, R. Myers, M. MacDonald, B.R. Rosen, M.F. Beal, W.J. Koroshetz, 1H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers, *Neurology* 50 (1998) 1357–1365.
- [74] W.J. Koroshetz, B.G. Jenkins, B.R. Rosen, M.F. Beal, Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10, *Ann. Neurol.* 41 (1997) 160–165.
- [75] R. Lodi, A.H. Schapira, D. Manners, P. Styles, N.W. Wood, D.J. Taylor, T.T. Warner, Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy, *Ann. Neurol.* 48 (2000) 72–76.
- [76] A. Sawa, G.W. Wiegand, J. Cooper, R.L. Margolis, A.H. Sharp, J.F. Lawler Jr., J.T. Greenamyre, S.H. Snyder, C.A. Ross, Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization, *Nat. Med.* 5 (1999) 1194–1198.
- [77] F.N. Gellerich, Z. Gizatullina, H.P. Nguyen, S. Trumbeckaite, S. Vielhaber, E. Seppet, S. Zierz, B. Landwehrmeyer, O. Riess, S. von Horsten, F. Striggow, Impaired regulation of brain mitochondria by extramitochondrial Ca^{2+} in transgenic Huntington disease rats, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 30715–30724.
- [78] Q. Ruan, M. Lesort, M.E. MacDonald, G.V. Johnson, Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 669–681.
- [79] E. Rockabrand, N. Slepko, A. Pantalone, V.N. Nukala, A. Kazantsev, J.L. Marsh, P.G. Sullivan, J.S. Steffan, S.L. Sensi, L.M. Thompson, The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 61–77.
- [80] B.I. Bae, H. Xu, S. Igarashi, M. Fujimuro, N. Agrawal, Y. Taya, S.D. Hayward, T.H. Moran, C. Montell, C.A. Ross, S.H. Snyder, A. Sawa, p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease, *Neuron* 47 (2005) 29–41.
- [81] A. Benchoua, Y. Trioulier, D. Zala, M.C. Gaillard, N. Lefort, N. Dufour, F. Saudou, J.M. Elalouf, E. Hirsouf, P. Hantraye, N. Deglon, E. Brouillet, Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 1652–1663.
- [82] E. Bossy-Wetzell, R. Schwarzenbacher, S.A. Lipton, Molecular pathways to neurodegeneration, *Nat. Med.* 10 Suppl (2004) S2–S9.
- [83] T. Milakovic, R.A. Quintanilla, G.V. Johnson, Mutant huntingtin expression induces mitochondrial calcium handling defects in clonal striatal cells: functional consequences, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 34785–34795.
- [84] N. Brustovetsky, R. LaFrance, K.J. Purl, T. Brustovetsky, C.D. Keene, W.C. Low, J.M. Dubinsky, Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's Disease, *J. Neurochem.* 93 (2005) 1361–1370.
- [85] F. He, S. Zhang, F. Qian, C. Zhang, Delayed dystonia with striatal CT lucencies induced by a mycotoxin (3-nitropropionic acid), *Neurology* 45 (1995) 2178–2183.
- [86] A.C. Ludolph, F. He, P.S. Spencer, J. Hammerstad, M. Sabri, 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin, *Can. J. Neurol. Sci.* 18 (1991) 492–498.
- [87] M.F. Beal, E. Brouillet, B.G. Jenkins, R.J. Ferrante, N.W. Kowall, J.M. Miller, E. Storey, R. Srivastava, B.R. Rosen, B.T. Hyman, Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, *J. Neurosci.* 13 (1993) 4181–4192.
- [88] E. Brouillet, B.G. Jenkins, B.T. Hyman, R.J. Ferrante, N.W. Kowall, R. Srivastava, D.S. Roy, B.R. Rosen, M.F. Beal, Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid, *J. Neurochem.* 60 (1993) 356–359.
- [89] E. Brouillet, P. Hantraye, R.J. Ferrante, R. Dolan, A. Leroy-Willig, N.W. Kowall, M.F. Beal, Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7105–7109.
- [90] J.M. Lee, E.V. Ivanova, I.S. Seong, T. Cashorali, I. Kohane, J.F. Gusella, M.E. MacDonald, Unbiased gene expression analysis implicates the huntingtin polyglutamine tract in extra-mitochondrial energy metabolism, *PLoS Genet.* 3 (2007) e135.
- [91] A.D. Strand, Z.C. Baquet, A.K. Aragaki, P. Holmans, L. Yang, C. Cleren, M.F. Beal, L. Jones, C. Kooperberg, J.M. Olson, K.R. Jones, Expression profiling of Huntington's disease models suggests that brain-derived neurotrophic factor depletion plays a major role in striatal degeneration, *J. Neurosci.* 27 (2007) 11758–11768.
- [92] B.A. Ackrell, Progress in understanding structure–function relationships in respiratory chain complex II, *FEBS Lett.* 466 (2000) 1–5.
- [93] P. Rustin, A. Munnich, A. Rotig, Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme, *Eur. J. Hum. Genet.* 10 (2002) 289–291.
- [94] C. Zabel, L. Mao, B. Woodman, M. Rohe, M.A. Wacker, Y. Klare, A. Koppelstatter, G. Nebrich, O. Klein, S. Grams, A. Strand, R. Luthi-Carter, D. Hartl, J. Klose, G.P. Bates, A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for huntingtin disease, *Mol. Cell. Proteomics* 8 (2009) 720–734.
- [95] E. Brouillet, E. Digue, J. Garcia-Martinez, Y. Trioulier, T. Delzescaux, A. Benchoua, F. Petit, C. Malgorn, N. Dufour, P. Hantraye, J. Canals, J. Alberch and N. Deglon, Short N-terminal fragment of mutant huntingtin produces an early loss of mitochondrial complex II in vivo, (2008).
- [96] V. Drouet, V. Perrin, R. Hassig, N. Dufour, G. Auregan, S. Alves, G. Bonvento, E. Brouillet, R. Luthi-Carter, P. Hantraye, N. Deglon, Sustained effects of nonallelic-specific Huntington silencing, *Ann. Neurol.* 65 (2009) 276–285.
- [97] P. Majumder, S. Raychaudhuri, B. Chattopadhyay, N.P. Bhattacharyya, Increased caspase-2, calpain activations and decreased mitochondrial complex II activity in cells expressing exogenous huntingtin exon 1 containing CAG repeat in the pathogenic range, *Cell. Mol. Neurobiol.* 27 (2007) 1127–1145.
- [98] A. Solans, A. Zambrano, M. Rodriguez, A. Barrientos, Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 3063–3081.
- [99] E. Bossy-Wetzell, A. Petrilli, A.B. Knott, Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction, *Trends Neurosci.* 31 (2008) 609–616.
- [100] A.L. Orr, S. Li, C.E. Wang, H. Li, J. Wang, J. Rong, X. Xu, P.G. Mastroberardino, J.T. Greenamyre, X.J. Li, N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking, *J. Neurosci.* 28 (2008) 2783–2792.
- [101] D.T. Chang, G.L. Rintoul, S. Pandipati, I.J. Reynolds, Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons, *Neurobiol. Dis.* 22 (2006) 388–400.
- [102] E.C. Stack, W.R. Matson, R.J. Ferrante, Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147 (2008) 79–92.
- [103] D. Lim, L. Fedrizzi, M. Tartari, C. Zuccato, E. Cattaneo, M. Brini, E. Carafoli, Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 5780–5789.
- [104] J.M. Oliveira, S. Chen, S. Almeida, R. Riley, J. Goncalves, C.R. Oliveira, M.R. Hayden, D.G. Nicholls, L.M. Ellerby, A.C. Rego, Mitochondrial-dependent Ca^{2+} handling in Huntington's disease striatal cells: effect of histone deacetylase inhibitors, *J. Neurosci.* 26 (2006) 11174–11186.
- [105] J.M. Oliveira, M.B. Jekabsons, S. Chen, A. Lin, A.C. Rego, J. Goncalves, L.M. Ellerby, D.G. Nicholls, Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and in situ mitochondria from transgenic mice, *J. Neurochem.* 101 (2007) 241–249.
- [106] R.C. Scarpulla, Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells, *Gene* 286 (2002) 81–89.
- [107] L. Gopalakrishnan, R.C. Scarpulla, Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB-dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 105–113.
- [108] H. Ryu, J. Lee, S. Impey, R.R. Ratan, R.J. Ferrante, Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 13915–13920.

- [109] R.A. Schuh, T. Kristian, G. Fiskum, Calcium-dependent dephosphorylation of brain mitochondrial calcium/cAMP response element binding protein (CREB), *J. Neurochem.* 92 (2005) 388–394.
- [110] J.K. McGill, M.F. Beal, PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell* 127 (2006) 465–468.
- [111] L. Cui, H. Jeong, F. Borovecki, C.N. Parkhurst, N. Tanese, D. Kraic, Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration, *Cell* 127 (2006) 59–69.
- [112] J. Lin, P.H. Wu, P.T. Tarr, K.S. Lindenberg, J. St-Pierre, C.Y. Zhang, V.K. Mootha, S. Jager, C.R. Vianna, R.M. Reznick, L. Cui, M. Manieri, M.X. Donovan, Z. Wu, M.P. Cooper, M.C. Fan, L.M. Rohas, A.M. Zavacki, S. Cinti, G.I. Shulman, B.B. Lowell, D. Kraic, B.M. Spiegelman, Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice, *Cell* 119 (2004) 121–135.
- [113] R.C. Scarpulla, Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 673–683.
- [114] R.C. Scarpulla, Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 611–638.
- [115] B. Parfait, D. Chretien, A. Rotig, C. Marsac, A. Munnich, P. Rustin, Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome, *Hum. Genet.* 106 (2000) 236–243.
- [116] A. Hodges, A.D. Strand, A.K. Aragaki, A. Kuhn, T. Sengstag, G. Hughes, L.A. Elliston, C. Hartog, D.R. Goldstein, D. Thu, Z.R. Hollingsworth, F. Collin, B. Synek, P.A. Holmans, A.B. Young, N.S. Wexler, M. Delorenzi, C. Kooperberg, S.J. Augood, R.L. Faull, J.M. Olson, L. Jones, R. Luthi-Carter, Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 965–977.
- [117] A. Benchoua, Y. Trioulier, E. Diguert, C. Malgorn, M.C. Gaillard, N. Dufour, J.M. Elalouf, S. Krajewski, P. Hantraye, N. Deglon, E. Brouillet, Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 1446–1456.
- [118] N.K. Gray, K. Pantopoulos, T. Dandekar, B.A. Ackrell, M.W. Hentze, Translational regulation of mammalian and *Drosophila* citric acid cycle enzymes via iron-responsive elements, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 4925–4930.
- [119] I. Bezprozvanny, Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor, calcium signalling and Huntington's disease, *Subcell. Biochem.* 45 (2007) 323–335.
- [120] M.F. Beal, Huntington's disease, energy, and excitotoxicity, *Neurobiol. Aging* 15 (1994) 275–276.
- [121] U. Wojda, E. Salinska, J. Kuznicki, Calcium ions in neuronal degeneration, *IUBMB Life* 60 (2008) 575–590.
- [122] M.F. Beal, N.W. Kowall, D.W. Ellison, M.F. Mazurek, K.J. Swartz, J.B. Martin, Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid, *Nature* 321 (1986) 168–171.
- [123] R.J. Ferrante, N.W. Kowall, P.B. Cipolloni, E. Storey, M.F. Beal, Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization, *Exp. Neurol.* 119 (1993) 46–71.
- [124] C. Song, Y. Zhang, C.G. Parsons, Y.F. Liu, Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 33364–33369.
- [125] Y. Sun, A. Savanenin, P.H. Reddy, Y.F. Liu, Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 24713–24718.
- [126] M.M. Zeron, N. Chen, A. Moshaver, A.T. Lee, C.L. Wellington, M.R. Hayden, L.A. Raymond, Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death, *Mol. Cell. Neurosci.* 17 (2001) 41–53.
- [127] M.M. Zeron, O. Hansson, N. Chen, C.L. Wellington, B.R. Leavitt, P. Brundin, M.R. Hayden, L.A. Raymond, Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease, *Neuron* 33 (2002) 849–860.
- [128] M.Y. Heng, P.J. Detloff, P.L. Wang, J.Z. Tsien, R.L. Albin, In vivo evidence for NMDA receptor-mediated excitotoxicity in a murine genetic model of Huntington disease, *J. Neurosci.* 29 (2009) 3200–3205.
- [129] G.A. Laforet, E. Sapp, K. Chase, C. McIntyre, F.M. Boyce, M. Campbell, B.A. Cadigan, L. Warzecki, D.A. Tagle, P.H. Reddy, C. Cepeda, C.R. Calvert, E.S. Jokel, G.J. Klapstein, M.A. Ariano, M.S. Levine, M. DiFiglia, N. Aronin, Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease, *J. Neurosci.* 21 (2001) 9112–9123.
- [130] E.C. Stack, A. Dedeoglu, K.M. Smith, K. Cormier, J.K. Kubilus, M. Bogdanov, W.R. Matson, L. Yang, B.G. Jenkins, R. Luthi-Carter, N.W. Kowall, S.M. Hersch, M.F. Beal, R.J. Ferrante, Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice, *J. Neurosci.* 27 (2007) 12908–12915.
- [131] C. Cepeda, N. Wu, V.M. Andre, D.M. Cummings, M.S. Levine, The corticostriatal pathway in Huntington's disease, *Prog. Neurobiol.* 81 (2007) 253–271.
- [132] J.G. Greene, J.T. Greenamyre, Bioenergetics and glutamate excitotoxicity, *Prog. Neurobiol.* 48 (1996) 613–634.
- [133] M. Weller, S.M. Paul, 3-Nitropropionic acid is an indirect excitotoxin to cultured cerebellar granule neurons, *Eur. J. Pharmacol.* 248 (1993) 223–228.
- [134] J.G. Greene, S.S. Sheu, R.A. Gross, J.T. Greenamyre, 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms, *Neuroscience* 84 (1998) 503–510.
- [135] P. Nasr, H.I. Gursahani, Z. Pang, V. Bondada, J. Lee, R.W. Hadley, J.W. Geddes, Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid, *Neurochem. Int.* 43 (2003) 89–99.
- [136] J.G. Greene, J.T. Greenamyre, Exacerbation of NMDA, AMPA, and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate, *J. Neurochem.* 64 (1995) 2332–2338.
- [137] C. Jacquard, Y. Trioulier, F. Cosker, C. Escartin, N. Bizat, P. Hantraye, J.M. Cancela, G. Bonvento, E. Brouillet, Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation, *FASEB J.* 20 (2006) 1021–1023.
- [138] J.R. Simpson, O. Isacson, Mitochondrial impairment reduces the threshold for in vivo NMDA-mediated neuronal death in the striatum, *Exp. Neurol.* 121 (1993) 57–64.
- [139] P. Calabresi, P. Gubellini, B. Picconi, D. Centonze, A. Pisani, P. Bonsi, P. Greengard, R.A. Hipskind, E. Borrelli, G. Bernardi, Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine, *J. Neurosci.* 21 (2001) 5110–5120.
- [140] H.B. Fernandes, K.G. Baimbridge, J. Church, M.R. Hayden, L.A. Raymond, Mitochondrial sensitivity and altered calcium handling underlie enhanced NMDA-induced apoptosis in YAC128 model of Huntington's disease, *J. Neurosci.* 27 (2007) 13614–13623.
- [141] D. Blum, R. Hourez, M.C. Galas, P. Popoli, S.N. Schiffmann, Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics, *Lancet Neurol.* 2 (2003) 366–374.
- [142] P. Popoli, D. Blum, A. Martire, C. Ledent, S. Ceruti, M.P. Abbracchio, Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A2A receptors in Huntington's disease, *Prog. Neurobiol.* 81 (2007) 331–348.
- [143] R.J. Jakel, W.F. Maragos, Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine, *Trends Neurosci.* 23 (2000) 239–245.
- [144] A. Petersen, K.E. Larsen, G.G. Behr, N. Romero, S. Przedborski, P. Brundin, D. Sulzer, Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration, *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001) 1243–1254.
- [145] B. Ravikumar, D.C. Rubinsztein, Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin: a step towards therapy? *Mol. Aspects Med.* 27 (2006) 520–527.
- [146] D. Blum, S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, A.L. Benabid, R. Sadoul, J.M. Verna, Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease, *Prog. Neurobiol.* 65 (2001) 135–172.
- [147] D. Charvin, P. Vanhoutte, C. Pages, E. Borrelli, J. Caboche, Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 12218–12223.
- [148] M. Cyr, T.D. Sotnikova, R.R. Gainetdinov, M.G. Caron, Dopamine enhances motor and neuropathological consequences of polyglutamine expanded huntingtin, *FASEB J.* 20 (2006) 2541–2543.
- [149] T.S. Tang, X. Chen, J. Liu, I. Bezprozvanny, Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease, *J. Neurosci.* 27 (2007) 7899–7910.
- [150] D. Charvin, E. Roze, V. Perrin, C. Deyts, S. Betuing, C. Pages, E. Regulier, R. Luthi-Carter, E. Brouillet, N. Deglon, J. Caboche, Haloperidol protects striatal neurons from dysfunction induced by mutant huntingtin in vivo, *Neurobiol. Dis.* 29 (2008) 22–29.
- [151] R.J. Ferrante, J.K. Kubilus, J. Lee, H. Ryu, A. Beesen, B. Zucker, K. Smith, N.W. Kowall, R.R. Ratan, R. Luthi-Carter, S.M. Hersch, Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice, *J. Neurosci.* 23 (2003) 9418–9427.
- [152] E. Hockly, V.M. Richon, B. Woodman, D.L. Smith, X. Zhou, E. Rosa, K. Sathasivam, S. Ghazi-Noori, A. Mahal, P.A. Lowden, J.S. Steffan, J.L. Marsh, L.M. Thompson, C.M. Lewis, P.A. Marks, G.P. Bates, Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 2041–2046.
- [153] H. Ryu, H.D. Rosas, S.M. Hersch, R.J. Ferrante, The therapeutic role of creatine in Huntington's disease, *Pharmacol. Ther.* 108 (2005) 193–207.
- [154] O.A. Andreassen, A. Dedeoglu, R.J. Ferrante, B.G. Jenkins, K.L. Ferrante, M. Thomas, A. Friedlich, S.E. Browne, G. Schilling, D.R. Borchelt, S.M. Hersch, C.A. Ross, M.F. Beal, Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease, *Neurobiol. Dis.* 8 (2001) 479–491.
- [155] A. Dedeoglu, J.K. Kubilus, L. Yang, K.L. Ferrante, S.M. Hersch, M.F. Beal, R.J. Ferrante, Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice, *J. Neurochem.* 85 (2003) 1359–1367.
- [156] R.J. Ferrante, O.A. Andreassen, B.G. Jenkins, A. Dedeoglu, S. Kuemmerle, J.K. Kubilus, R. Kaddurah-Daouk, S.M. Hersch, M.F. Beal, Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease, *J. Neurosci.* 20 (2000) 4389–4397.
- [157] S.M. Hersch, S. Gevorgian, K. Marder, C. Moskowitz, A. Feigin, M. Cox, P. Como, C. Zimmerman, M. Lin, L. Zhang, A.M. Ulug, M.F. Beal, W. Matson, M. Bogdanov, E. Ebbel, A. Zaleta, Y. Kaneko, B. Jenkins, N. Hevelone, H. Zhang, H. Yu, D. Schoenfeld, R. Ferrante, H.D. Rosas, Creatine in Huntington's disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH2'dG, *Neurology* 66 (2006) 250–252.
- [158] G.V. Rebec, S.J. Barton, A.M. Marseilles, K. Collins, Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice, *NeuroReport* 14 (2003) 1263–1265.
- [159] P. Klivenyi, R.J. Ferrante, G. Gardian, S. Browne, P.E. Chabrier, M.F. Beal, Increased survival and neuroprotective effects of BN82451 in a transgenic mouse model of Huntington's disease, *J. Neurochem.* 86 (2003) 267–272.
- [160] A.J. Young, S. Johnson, D.C. Steffens, P.M. Doraiswamy, Coenzyme Q10: a review of its promise as a neuroprotectant, *CNS Spectr.* 12 (2007) 62–68.
- [161] R.J. Ferrante, O.A. Andreassen, A. Dedeoglu, K.L. Ferrante, B.G. Jenkins, S.M. Hersch, M.F. Beal, Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease, *J. Neurosci.* 22 (2002) 1592–1599.
- [162] K.M. Smith, S. Matson, W.R. Matson, K. Cormier, S.J. Del Signore, S.W. Hagerty, E.C. Stack, H. Ryu, R.J. Ferrante, Dose ranging and efficacy study of high-dose coenzyme Q10 formulations in Huntington's disease mice, *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2006) 616–626.

ANNEXE II : Tableau récapitulatif des modèles murins de la MH

souris transgeniques	Construction			Neuroanatomie			Comportemental	Phenotype		Durée de vie (semaines)	Références
	promoteur	Htt	Glutamine	Atrophie striatale	Inclusions	Dysfonction		Moteur			
R6/1	Htt humain	Fragment de 1,9kb à partir de 5' de la htt humain	113	oui sans perte cellulaire	noyau et cytoplasme	(-) Récepteurs D1, D2, CB1 (-) DARPP-32	(-) Anxiété	Déficit au rotarod, de posture. Clasping	jusqu'à 40	Mangiarini et al., 1996	
R6/2	Htt humain	Fragment de 1,9kb à partir de 5' de la htt humain	144	oui sans perte cellulaire	noyau et cytoplasme	(-) Récepteurs D1, D2, AMPA, kainate, A2A Astrogliose	Syndrome persévératif (+) Comport. exploratoire	Perte de poids Déficit au rotarod. Clasping Tremblement au repos	jusqu'à 15	Mangiarini et al., 1996	
N171-82Q	Prion souris (PrP)	171èmes premiers acides aminés de la Htt humaine	82	oui avec perte cellulaire	noyau	(-) Récepteurs D1, D2, Adénosine Astrogliose	Syndrome persévératif (-) Mémoire de travail	Déficit au rotarod. Clasping. Hypokinésie Tremblement au repos	jusqu'à 24	Schilling et al., 1999	
YAC128	Htt humain	Chromosome artificiel de levure exprimant la forme entière de la Htt humaine	128	oui avec perte cellulaire	cytoplasme	(+) Récepteurs NMDA, AMPA	Comportement dépressif	Déficit au rotarod, de posture. Clasping Ataxie, hyperkinesie suivie d'hypokinésie Gain de poids progressif	normal	Slow et al., 2003	
BAC	Htt humain	Chromosome artificiel de bactérie exprimant la forme entière de la Htt humaine comprenant 20kb de la séquence génomique en 5' et 50kb en 3'	97	oui sans perte cellulaire	peu dans le noyau, cytoplasme majoritairement cytoplasme majoritairement			Déficit moteurs progressif Gain de poids progressif	normal	Gray et al., 2008	

souris KI	Construction			Neuroanatomie			Comportemental	Phenotype		Durée de vie (semaines)	Références
	promoteur	Htt	Glutamine	Atrophie striatale	Inclusions	Dysfonction		Moteur			
HdhQ111 (KI111)	Htt souris	Remplacement de l'exon 1 souris par l'exon 1 souris/humain	109	oui sans perte cellulaire	noyau et cytoplasme	Astrogliose		Démarche altérée	normal	Wheeler 1999	
HD94	Htt souris	Remplacement de l'exon 1 souris par l'exon 1 souris/humain	94	oui sans perte cellulaire	noyau et cytoplasme			Hyperkinesie suivie d'hypokinésie Démarche altérée	normal	Menalled 2003	

ANNEXE III: Revue "Rhes, a protein with selective expression in the striatum, plays a major role in Huntington's disease pathogenesis"

Rhes, a protein with selective expression in the striatum, plays a major role in Huntington's disease pathogenesis

Laurie Galvan & Emmanuel Brouillet[†]

[†]Author for correspondence: CEA, DSV, I2BM, Molecular Imaging Research Center (MIRGen), F-92265 Fontenay-aux-Roses, France • Tel: +33 146 549 622 • Fax: +33 146 549 116 • brouille@shfj.cea.fr

Evaluation of: Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH: Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* 324, 1327–1330 (2009). Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by choreiform movements, cognitive deficits and psychiatric disturbances. The disease is caused by an abnormal expansion of a CAG repeat located in exon 1 of the gene encoding the huntingtin protein (Htt). The genetic defect encodes a polyglutamine tract in the N-terminal part of Htt that confers a toxic function to the protein. The most striking neuropathological hallmark in HD patients is the selective atrophy of the striatum. The mechanisms underlying the particular vulnerability of the striatum are unknown. Subramaniam and collaborators demonstrate that the cytotoxicity of mutant Htt is greatly enhanced in the presence of the small GTPase, Rhes, a protein of unclear function that has a preferential expression in the striatum. The study shows that Rhes is an E3 ligase, interacts with mutant Htt and modifies it through SUMOylation, a post-transcriptional process that consists of addition of the protein SUMO1 to mutant Htt. By contrast, the GTPase activity of Rhes does not seem to be involved in the toxicity of mutant Htt. The Rhes-mediated sumoylation of mutant Htt eventually leads to reduced levels of neuroprotective insoluble aggregates, and increased levels of the toxic soluble form of mutant Htt. These completely novel results shed new light on HD pathogenesis. The selective expression of Rhes in the striatum and its role in mutant Htt toxicity could explain why the striatum is so vulnerable in HD. This work may lead to new therapeutic strategies targeting Rhes.

The striatum, which is part of the extrapyramidal pathway, is a subcortical brain structure that plays a key role in motor and cognitive functions. For reasons that are unclear, the striatum is found preferentially damaged in a number of acute and chronic neurological conditions, leading to devastating cognitive deficits and abnormal movements [1]. The most studied of these illnesses is Huntington's disease (HD).

Huntington's disease is a predominantly inherited disorder generally affecting young adults. Symptoms include involuntary abnormal movements (chorea, dyskinesia and dystonia), frontal cognitive deficits and psychiatric disturbances [2]. The disease is fatal approximately 15 years after onset of symptoms. There is no treatment available to slow the progression of this devastating disorder.

Huntington's disease is caused by a mutation in the gene encoding the protein huntingtin (Htt) that consists of a CAG triplet repeat expansion translated into an abnormal polyglutamine (polyQ) tract within the N-terminal region of

the protein [3]. Mutant Htt expression is ubiquitous in the brain, but the striatum is primarily affected in the pathology [4]. MRI findings have demonstrated that the striatum is significantly atrophied even in presymptomatic gene carriers [5,6]. Neuropathological studies carried out post-mortem in HD brain showed that the atrophy of the striatum is associated with loss of striatal neurons (medium-sized spiny neurons), whereas interneurons are relatively spared [7]. In advanced cases, the cerebral cortex and other brain regions, such as the hypothalamus, also show degeneration.

The polyQ expansion in mutated Htt produces a gain-of-function that is toxic to neurons through several mechanisms. One important early event in HD is the alteration of transcription [8]. Other early alterations are also noted in the presence of mutant Htt including intracellular signaling defects, alteration of synaptic function, defects in brain neurotrophic factor signaling [3], perturbation of calcium homeostasis [9] and mitochondrial defects [10]. However,

Future Neurology
Priority Paper Evaluation

future medicine part of fsg

most of the proposed mechanisms suggested to play a role in HD pathogenesis cannot explain why the striatum is selectively vulnerable in HD.

One hypothesis to explain the vulnerability of the striatum is that a group of factors that are selectively expressed in the striatum could markedly influence the survival of striatal cells expressing mutant Htt [1]. In other words, these striatal factors would play a permissive role, allowing mutant Htt toxicity to eventually trigger cell death. Only few of these factors have been identified. For example, the presence of high levels of dopamine and D2 receptors in the striatum may have an important role in striatal vulnerability [11–13]. However, the molecular mechanisms underlying the permissive or 'pro-toxic' role of dopamine signaling have not been totally elucidated.

In their remarkable study, Subramaniam and collaborators [14] demonstrate using a different type of cells that Rhes, a protein with selective expression in the striatum, significantly contributes to the toxicity of mutant Htt. The authors have deciphered the molecular mechanisms that underlie the effects of Rhes.

Methods & results

First, the authors demonstrate that Rhes physically interacts with full length mutant Htt and shorter N-terminal fragments (the first 171 amino acids) with expanded (82Q) polyQ tract. For this, they performed 'pull-down' assay using chimeric Htt and Rhes constructs with the Flag tag and glutathione transferase (GST), respectively. Similar observation was made in the immortalized cell line derived from the striatum of a knock-in mouse model of HD with 111Q expansion (STHdhQ111/Q111). In this case, recombinant Rhes interacts with endogenous mutant Htt. Results also show that Rhes poorly interacts with wild-type Htt. Of interest, co-immunoprecipitation experiments in brain extract prepared from transgenic HD mouse striatum, show that mutant Htt (N-terminal 171 amino acids with-82Q) and endogenous Rhes interact with each other. Experiments also indicate that the affinity of purified Rhes is higher for mutant Htt than wild-type Htt.

In human embryonic kidney cells transfected with construct expressing mutant Htt and STHdhQ111/Q111 cells, apoptosis is not markedly increased when compared with control cells (human embryonic kidney cells transfected with wild-type Htt and STHdhQ7/Q7 respectively). Of interest, whereas the

overexpression of Rhes was not toxic *per se* in these control cells (which do not constitutively express Rhes), it triggers cell death in cells expressing mutant Htt. In line with this, knockdown of Rhes using small hairpin RNA interference is neuroprotective against mutant Htt toxicity in PC12 cells that endogenously express Rhes. These experiments show that the expression of Rhes confers to the cells a greater vulnerability to mutant Htt toxicity.

The authors also aimed to decipher the mechanisms involved in the modifying effect of Rhes upon mutant Htt. They show that Rhes increases soluble mutant Htt whereas the levels of insoluble aggregates are reduced. The soluble form is likely cytotoxic since it can interfere with many proteins and disrupt some intracellular processes such as transcription or mitochondrial homeostasis. The authors hypothesized that one mechanism for explaining this increase in soluble mutant Htt may imply a post-transcriptional modification of mutant Htt by the small ubiquitin-like modifier small protein (SUMO). A number of proteins can be modified post-transcription by the addition of SUMO on lysine residues [15]. Sumoylation of such target proteins is mediated by activating, conjugating and ligating enzymes (called E1, E2 and E3, respectively). The sumoylation is reversible through cleavage produced by a family of SUMO-specific proteases (SENPs). Whereas sumoylation is known to control many aspects of nuclear function, it also plays a key role in many extranuclear processes, in particular in neurons [15]. A few years ago, Steffan and collaborators demonstrated that sumoylation stabilizes mutant Htt (exon 1), and decreases its ability to form aggregates, increasing its capacity to repress transcription [16]. In addition, sumoylation of mutant Htt exacerbates neurodegeneration in a *Drosophila* model of HD [16].

Subramaniam and collaborators demonstrate that the overexpression of Rhes markedly elevates the sumoylation of mutant Htt [14]. This mainly involves SUMO1 – mutant Htt could not be sumoylated by SUMO2 and SUMO3 in the presence of Rhes. Mutation of sumoylation sites on mutant Htt abrogated the effects of Rhes on mutant Htt. Rhes does not modify the sumoylation of wild-type Htt. Further experiments show that Rhes interacts with the E2 conjugating UBC9, and is sumoylated, two prerequisites for a protein that is supposed to sumoylate target proteins. Supporting this view, the authors identified several proteins (e.g., IκB and RanGAP1) that, in addition to mutant Htt,

were also sumoylated when Rhes was overexpressed. Thus, Rhes possesses the characteristics of an E3 ligase.

The ability of Rhes to increase mutant Htt toxicity does not seem to be related to its GTPase activity, at least in the cell models presently studied. This was supported by the finding that a mutant of Rhes at serine 33, which is devoid of its GTPase activity retains its ability to sumoylate mutant Htt and to increase its toxicity.

Finally, the authors provide evidence that sumoylation of mutant Htt and the exacerbation of its toxicity by Rhes require the attachment of Rhes to plasma and intracellular membranes through a fatty acid (farnesyl).

Discussion & significance

These experiments in assay tubes and in different types of cultured cells strongly suggest an important role of Rhes in HD pathogenesis. In particular, the preferential expression of Rhes in the striatum as compared to the rest of the brain could account for the selective degeneration of the striatum in HD. Few studies have previously suggested that some factors highly expressed in the striatum such as dopamine and D2 receptors could constitute possible 'accomplices' of mutant Htt toxicity *in vivo* [11-13]. The study by Subramaniam and colleague is the first to provide a detailed molecular mechanism that could explain how the ubiquitous expression of mutant Htt in the brain may lead to selective striatal degeneration in HD.

One potentially important aspect of this work concerns the potential therapeutic implication for HD. Indeed, one major hope is that understanding the molecular mechanisms responsible for striatal degeneration in HD might open new avenues toward the discovery of an efficacious therapy. Does Rhes constitute a potential therapeutic target to treat HD patients? It would be premature to give a definite answer to this question. Theoretically, the drugs with inhibitory properties toward sumoylation activity of Rhes could directly downregulate mutant Htt toxicity. A 'magic bullet' molecule aiming at abrogating the effect of Rhes on mutant Htt toxicity, should selectively block the interaction between Rhes and mutant Htt. High throughput screening of newly synthesized compounds using fluorescence resonance energy transfer-based assay to directly detect in a cellular context the interaction between chimeric Rhes and mutant Htt tagged with fluorescent proteins could be used to discover such a potential drug.

Another interesting strategy would be to identify the mechanisms that can regulate upstream Rhes activity *in vivo*, in the striatum. The post-transcription regulation provided by sumoylation is a rapid/dynamic process that can lead to rapid modification of protein-protein interaction and therefore likely constitutes a regulatory signaling process in neurons [15]. It is conceivable that specific signaling pathways in the striatum control Rhes sumoylation activity. The selective expression of Rhes in the striatum is likely associated with a particular function in this structure. This function is unknown. However, a role in dopamine signaling has been suggested. An involvement of Rhes in cAMP/protein kinase A signaling pathway has been suggested [17]. Mice with a null mutation in the *Rhes* gene have abnormal behavioural responses to D1 and D2 receptor stimulation [17,18]. The absence of Rhes leads to an increase in Golf protein levels in both striatopallidal and striatonigral projection neurons [17]. Absence of Rhes might preferentially affect D2 receptor signaling [17]. In line with this, removal of nigrostriatal dopaminergic afferents using the neurotoxin 6-hydroxy-dopamine produces a downregulation of Rhes expression [19], and is neuroprotective in the R6/2 mouse model of HD [20]. Thus decreasing Rhes levels through regulation of dopamine signaling pathways may attenuate mutant Htt toxicity *in vivo*.

It is possible that partial/limited inhibition of Rhes may be sufficient to significantly attenuate mutant Htt toxicity and retard disease progression without perturbing too severely its physiological function. In this regard, it would be very interesting to cross mice that are heterozygously knocked down for Rhes with genetic mouse models of HD. This would make it possible to determine whether, as compared with HD mice, HD-Rhes^{-/-} mice would have reduced behavioral deficits along with striatal degeneration/dysfunction. Such a preclinical study in mice would constitute a proof-of-concept that partial reduction of Rhes activity is sufficient to attenuate mutant Htt toxicity *in vivo*.

Conclusion & future perspective

The article by Subramaniam and collaborators demonstrates that the small GTPase, Rhes is an E3 ligase with activity that allows the sumoylation of different proteins, including mutant Htt. Since Rhes has a preferential expression in the striatum, this effect of Rhes on mutant Htt could underlie the selectivity of the degeneration that affect the striatum in HD.

From a therapeutic point of view, these observations bring new possibilities to design, develop and validate new pharmaceuticals, which could disrupt the deleterious interaction between Rhes and mutant Htt. Although the evaluation of Rhes as a therapeutic target awaits a long, albeit exciting, translational research process, the work performed by Subramaniam and collaborators provides further hope that, in the near future, an efficacious neuroprotective treatment will be available for HD patients.

Financial & competing interests disclosure

Laurie Galvan is supported for her PhD training program by Neuropole de Recherche Francilien (NeRF), Région Ile-de-France, France. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Background

- Huntington's disease is an inherited neurological disorder caused by mutation in the gene coding the protein huntingtin.
- Whereas mutant huntingtin is ubiquitously expressed in the brain, a hallmark of Huntington's disease is the preferential neurodegeneration of the striatum.
- Thus, the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease could involve proteins that have selective expression in the striatum

Methods & results

- The small GTPase Rhes known to have selective striatal expression increases the toxicity of mutant huntingtin as assessed using cell models of Huntington's disease.
- Rhes was found to be an E3 ligase that participates in the post transcriptional modification of mutant Htt through a process called sumoylation.
- Interaction of mutant Htt with Rhes increases mutant Htt sumoylation, producing in turn an increase in the concentrations of the toxic soluble forms of mutant Htt and eventually cell death.

Discussion & significance

- Specific expression of a Rhes in the striatum could, through the mechanisms described, account for the preferential degeneration of this brain region in Huntington's disease.

Conclusion & future perspective

- The discovery of Rhes as an essential actor of HD pathogenesis opens a new path toward the discovery of novel therapeutic strategies to slow disease progression
- Beside Huntington's disease, these results support the view that the regionally restricted pattern of degeneration in other neurodegenerative disorders, (e.g. Parkinson's and Alzheimer's disease) could involve the region specific expression of a particular set of proteins.

Bibliography

1. Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D: 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 95, 1521–1540 (2005).
2. Harper PS: *Huntington's Disease*. WB Saunders, London, UK (1991).
3. Borrell-Pages M, Zala D, Humbert S, Saudou F: Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2642–2660 (2006).
4. Myers RH, Vonsattel JP, Stevens TJ *et al.*: Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38, 341–347 (1988).
5. Aylward EH, Sparks BF, Field KM *et al.*: Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 63, 66–72 (2004).
6. Kassubek J, Juengling FD, Kioschies T *et al.*: Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 213–220 (2004).
7. Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Martin JB, Bird ED, Richardson EP Jr: Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 46, 12–27 (1987).
8. Sugars KL, Rubinsztein DC: Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet.* 19, 233–238 (2003).
9. Cowan CM, Raymond LA: Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75, 25–71 (2006).
10. Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB: Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 31, 609–616 (2008).
11. Benchoua A, Trioulier Y, Diguier E *et al.*: Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1446–1456 (2008).
12. Charvin D, Vanhoutte P, Pages C, Borrelli E, Caboche J: Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 12218–12223 (2005).
13. Cyr M, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG: Dopamine enhances motor and neuropathological consequences of polyglutamine expanded huntingtin. *FASEB J.* 20, 2541–2543 (2006).
14. Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH: Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* 324, 1327–1330 (2009).

15. Martin S, Wilkinson KA, Nishimune A, Henley JM: Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 948–959 (2007).
16. Steffan JS, Agrawal N, Pallos J *et al.*: SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304, 100–104 (2004).
17. Errico F, Santini E, Migliarini S *et al.*: The GTP-binding protein Rhes modulates dopamine signalling in striatal medium spiny neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 335–345 (2008).
18. Quintero GC, Spano D, Lahoste GJ, Harrison LM: The Ras homolog Rhes affects dopamine D1 and D2 receptor-mediated behavior in mice. *Neuroreport* 19, 1563–1566 (2008).
19. Harrison LM, LaHoste GJ: Rhes, the Ras homolog enriched in striatum, is reduced under conditions of dopamine supersensitivity. *Neuroscience* 137, 483–492 (2006).
20. Stack EC, Dedeoglu A, Smith KM *et al.*: Neuroprotective effects of synaptic modulation in Huntington's disease R6/2 mice. *J. Neurosci.* 27, 12908–12915 (2007).

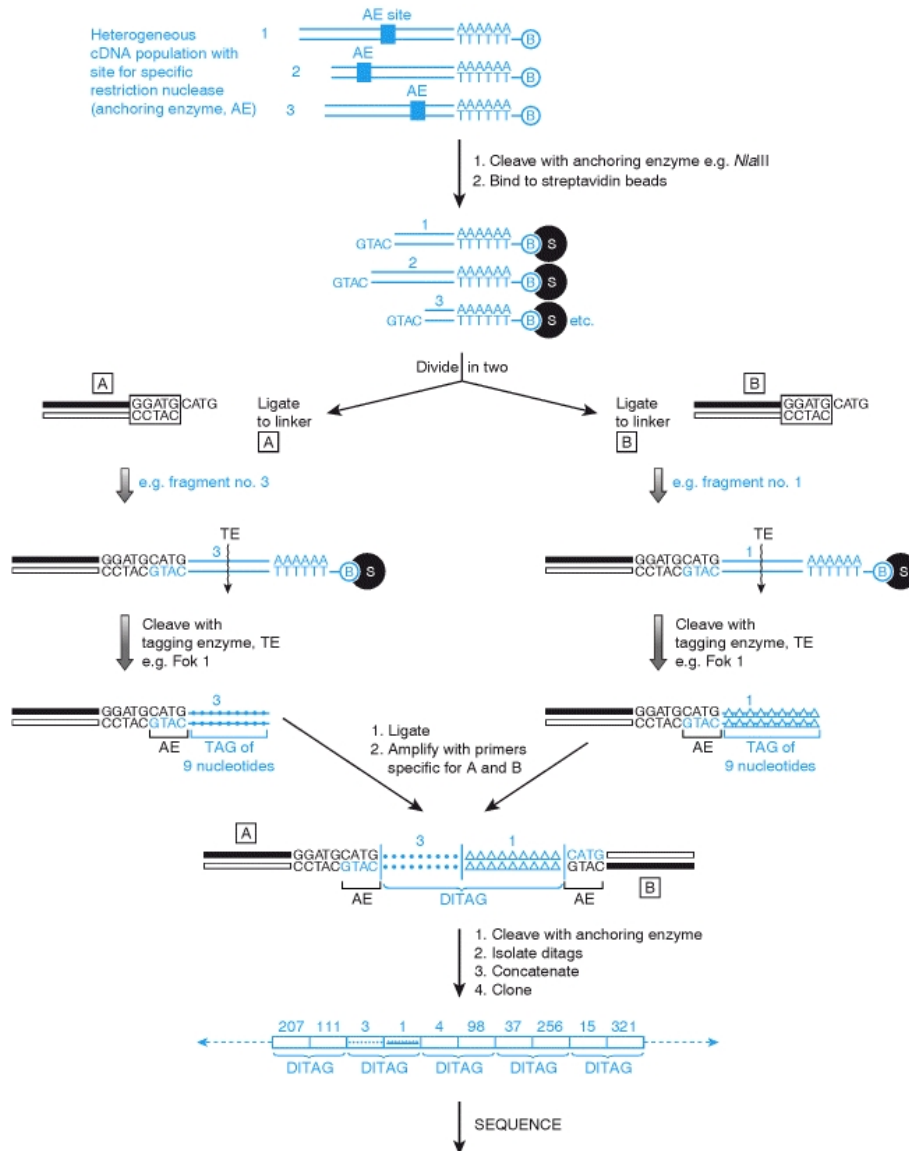
Affiliations

Laurie Galvan
CEA, DSV, I2BM, Molecular Imaging
Research Center (MIRCent), F-92265
Fontenay-aux-Roses, France
and

CEA, CNRS URA 2210, F-92265
Fontenay-aux-Roses, France
Tel.: +33 146 548 331
Fax: +33 146 549 116
laurie.galvan@cea.fr

Emmanuel Brouillet
CEA, DSV, I2BM, Molecular Imaging
Research Center (MIRCent), F-92265
Fontenay-aux-Roses, France
and
CEA, CNRS URA 2210, F-92265
Fontenay-aux-Roses, France
Tel.: +33 146 549 622
Fax: +33 146 549 116
brouille@shfj.cea.fr

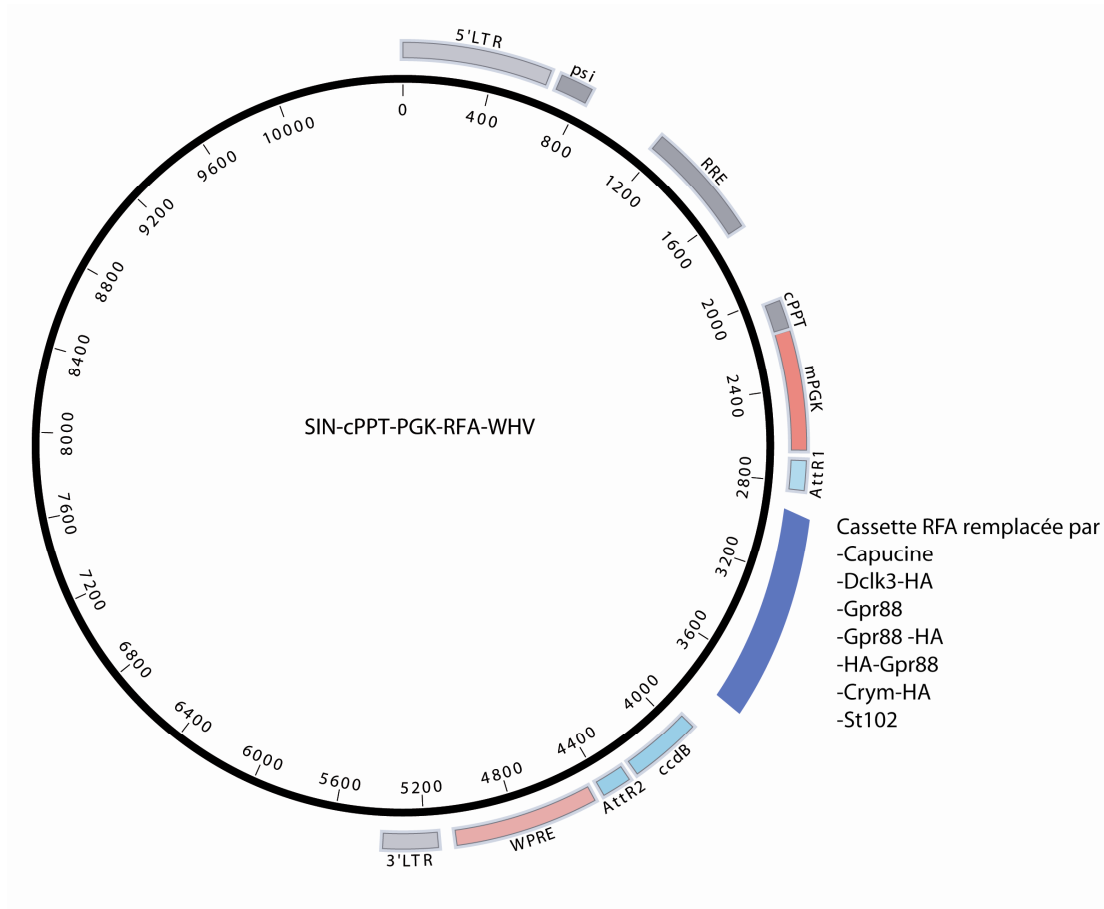
ANNEXE IV : Méthode SAGE



Serial Analysis of Gene Expression method (SAGE):

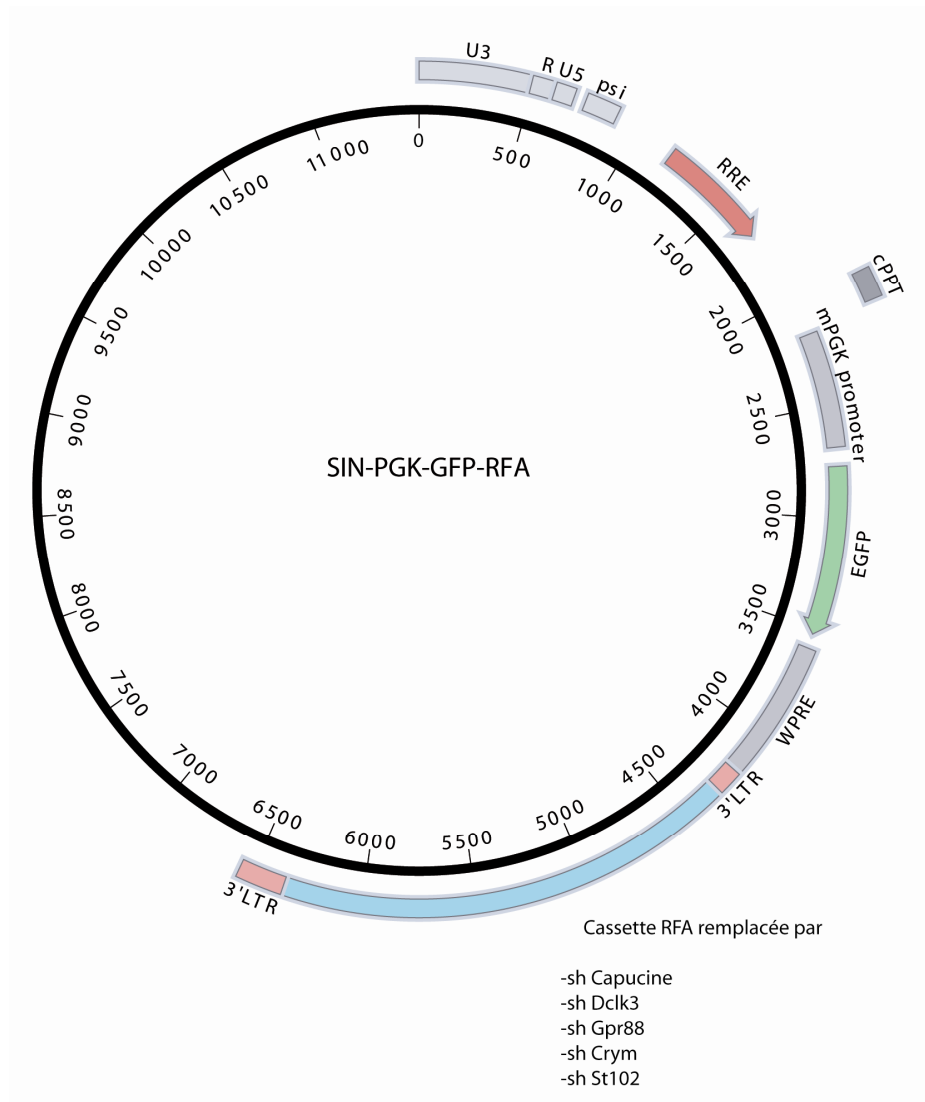
Les ARNm ont été extraits par leur queue polyA et retro transcrit en ADNc pour un primer oligo(dT) attaché à un groupe biotine. L'ADNc biotinilé est clivé avec des nucléases de restriction (anchoring enzyme AE). L'ADNc ayant une partie 3' ouverte est récupéré par des billes recouverte de streptavidin et séparés en 2 groupes. Dans chaque groupe, les ADNc vont être ligués soit au linker d'oligonucléotides A ou B. Les deux linkers ont des séquences différentes. Ils ont en commun une séquence en 3' CTAG adjacente au site de l'enzyme de restriction IIS qui sert d'enzyme d'étiquetage (tagging enzyme TE) créant une séquence unique pour chaque ADNc de 9 bases. Les fragments des 2 pools sont mis en commun afin de former des concaténations dites « ditags » (Extrait de "Human Molecular Genetics. 2nd edition." De Strachan T, Read AP.). Les ditags sont lus et quantifiés.

ANNEXE V : Vecteurs lentiviraux



Vecteur lentiviral utilisé pour la surexpression des marqueurs

Le site « Att » permet l'intégration du virus dans le génome de l'hôte. La séquence « Psi » est nécessaire à l'encapsidation de l'ARN viral. La séquence RRE (Rev Responsive Element) favorise le transport dans le cytoplasme de l'ARN. Un domaine riche en purine (cPPT, Central polypurine tract) est ajouté pour augmenter la transduction du transgène. Le promoteur ici PGK et le transgène d'intérêt sont insérés. La séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus) est un élément de régulation post-transcriptionnelle qui favorise l'expression du transgène. Pour des raisons de sécurité, la séquence *gag* est déléetée ainsi qu'une partie de la séquence 3'LTR (SIN, self inactivating) contenant le promoteur viral pour empêcher sa réplication dans l'hôte.



Vecteur lentiviral bicistronique d'inactivation des marqueurs

Le site « Att » permet l'intégration du virus dans le génome de l'hôte. La séquence « Psi » est nécessaire à l'encapsidation de l'ARN viral. La séquence RRE (Rev Responsive Element) favorise le transport dans le cytoplasme de l'ARN. Un domaine riche en purine (cPPT, Central polypurine tract) est ajouté pour augmenter la transduction du transgène. Le promoteur PGK est en amont de la séquence Enhanced Green fluorescent protein et du transgène d'intérêt. La séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus) est un élément de régulation post-transcriptionnelle qui favorise l'expression du transgène. Pour des raisons de sécurité, la séquence *gag* est déléetée ainsi qu'une partie de la séquence 3'LTR (SIN, self inactivating) contenant le promoteur viral pour empêcher sa réplication dans l'hôte.

ANNEXE VI : Matériels et Méthodes

Animaux

Des souris males adultes C57BL/6J (25g; Charles River, Saint-Germain-sur l'Arbresle, France) ont été utilisés pour les expériences d'infections virales. Les animaux sont hébergés dans un environnement contrôlé pour la température avec un cycle jour/nuit de 12 H. L'eau et la nourriture sont disponibles *ad libitum*. Toutes les expériences ont été supervisées par une autorisation d'expérimentation disposant d'une licence de niveau 1 délivrée par le Ministère de l'Agriculture, en conformité avec la Loi Française et les recommandations Européennes (86/609/EEC) concernant le soin et l'usage des animaux de laboratoire.

Construction des vecteurs lentivirus, production et infection

Les séquences ADN codant pour la GFP (Galvan et al; 2011), Crym, Gpr88 et St102 avec ou sans une étiquette HA ont été clonées suivant les amorces de PCR suivantes:

Crym-HA: 5'CATGAAGCGGGCGCCAGCGTTCC 3' et

5' TCAGGAGGCGTAGTCAGGCACGTCGTATGGGTAGGCCTTGCCAGATGACCAAGA 3'

Gpr88 : 5' CACCATGACCAACTCCTCCTCCACTTC3' et 5' TTACCAGTGCTGGCCAGCCGCCCG3'

Gpr88-HA:5' CACCATGACCAACTCCTCCTCCACTTC 3' et

5' TTAGGAGGCGTAGTCAGGCACGTCGTATGGGTAGGCCAGTGCTGGCCAGCCGCC3'

HA-Gpr88:

5'CACCATGGCCTACCCATACGACGTGCCTGACTACGCCTCCACCAACTCCTCCTCCAC3'

5' TTACCAGTGCTGGCCAGCCGCCCG3'

St102: 5' AAAGGAAGCGAGCGGTG3' et 5' AAGACCTCCAGCAGTTGAGC3'

Suite au clonage, ils ont été insérés dans des vecteurs lentiviraux SIN-W-PGK lentiviral (de Almeida et al., 2002) pour générer les LV-GFP, LV-Gpr88, LV-Gpr88-HA, LV-HA-Gpr88, LV-Crym-HA et LV-St102.

Les LV-sh Crym, LV-shGpr88 et LV-shSt102 ont pour cible respective les séquences suivantes :

sh Crym : 5' GGGAAATGCTGAGAAGTT 3'

shGpr88: 5' CCAACGGTATGGTCATCTA 3'

shSt102 : 5GGGATGAAGCCATTGCTAA3'

Les LV-shRNA ont été clonés et insérés dans un vecteur lentiviral bicitronique pour la GFP (Drouet et al., 2009). Les vecteurs codant pour le fragment sauvage de la Htt (LV-Htt171-18Q), le fragment muté de la Htt (LV-Htt171-82Q) et le LacZ (LV-LacZ) ont été précédemment décrits (Diguet et al., 2009; Faideau et al., 2010). Les particules virales ont été produites comme décrites précédemment (Hottinger et al., 2000). La quantité de particules virales pour chaque batch a été déterminée par un test ELISA pour l'antigène p24 (Gentaur, Paris, France). LV-Htt171-18Q et LV-Htt171-82Q sont utilisés à la concentration de 150 ng/μl de p24, LV-Gpr88, LV-Crym-HA, LV-St102, LV-shGpr88, LV-shCrym, LV-shSt102, LV-shLuciférase et LV-LacZ ont été utilisés à la concentration de 100 ng/μl de p24, et le LV-GFP à la concentration de 50 ng/μl de p24. Un volume total de 2 μl de suspension de lentivirus a été injecté dans le striatum de souris (Faideau et al., 2010), en utilisant les coordonnées stéréotaxiques suivantes: +1.0 mm en antérieur, +/- 2.0 mm en latéral par rapport au bregma, -2.7 mm par rapport à la dure-mère avec la barre de gueule à 0.0 mm.

Analyses histologiques

Après une injection d'une dose létale de sodium pentobarbital (50 μg par gramme) provoquant une anesthésie profonde, les souris sont perfusées par voie transcardiaque avec 100 mL de tampon phosphate contenant 4 % paraformaldéhyde à 8 ml/min. Les cerveaux extraits sont post-fixés sur la nuit dans la même solution, puis une cryoprotection est assurée par une immersion sur 24H dans une solution de sucrose 15% suivie d'une immersion sur 24H dans une solution de sucrose 30%. Les coupes coronales flottantes de striatum d'une épaisseur de 30 μm sont collectées en utilisant un freezing sliding microtome (SM2400; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Pour l'immunohistochimie, les coupes sont traitées avec 0.3% de peroxyde d'hydrogène pendant 1h, lavées 3 fois avec du PBS, bloquées avec du PBS contenant 4.5% de normal goat serum (NGS) pendant 1h puis incubées sur la nuit à 4°C dans une solution de PBS contenant 3% de NGS et l'un des anticorps suivants : Rabbit anti-DARPP-32 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; 1:1000), mouse anti-NeuN (Millipore, Molsheim, France; 1:200), rabbit anti-Ubiquitin (Wako Chemicals, Neuss, Germany; 1:1000), ou mouse anti-HA (Covance, Princeton, NJ; 1:500). Les coupes sont rincées 3 fois avec du PBS avant d'être incubées avec une solution contenant du PBS, 3% de NGS et l'anticorps anti-IgG biotinilé (Vector

Laboratories, Burlingame, CA) à la concentration 1:1000 pendant 1 heure. Le marquage est visualisé par l'addition de peroxydase avidine-biotinilée suivie d'une incubation dans le substrat VIP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) pendant une minute. Pour le marquage NeuN, nous utilisons le kit d'immuno-détection M.O.M. (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les coupes sont montées et observées au microscope. Le marquage histochimique de la COX est réalisée suivant la méthode de Wez Rilez (1979) où le cytochrome c réduit est utilisé comme substrat et la DAB comme accepteur d'électron.

La mesure de l'aire de la lésion induite par le LV-Htt171-82Q infection est délimitée manuellement en identifiant les bords de la lésion sur chaque coupe. La surface correspondante est calculée par le logiciel d'analyse d'image MCID (InterFocus Imaging, Cambridge, UK). Le volume de la lésion du striatum est déterminé en utilisant la méthode de Cavalieri (Diguët et al., 2009). Le nombre d'agrégats ubiquitine-positifs est quantifiés comme déjà décrit (Diguët et al., 2009) avec les modifications suivantes la distance inter-coupe était de 210 μm et l'observation a été réalisée en utilisant un objectif x10 (microscope Axioplan 2 (Carl Zeiss, Le Pecq, France). Avec ce set-up, les objets avec une aire apparente supérieure à 5 μm^2 peuvent être détectés de manière fiable.

Real-time quantitative RT-PCR

Les souris adultes après anesthésie profonde due à l'injection intra péritonéale d'une solution sodium pentobarbital (50 μg per gram) ont été décapitées. Les cerveaux ont été enlevés et positionnés dans une matrice coronale (Ted Pella, 10 Redding, CA). Des coupes de cerveaux de 1-mm d'épaisseur ont été examinées sous le microscope à fluorescence (DM6000 M; Leica Microsystems) et la zone exprimant la GFP dans le striatum a été extraite avec un punch de 1.5mm de diamètre (Ted Pella, Redding, CA). L'extraction des ARN totaux et la PCRq ont été réalisées suivant la procédure standard en utilisant les sondes murines suivantes :

Gpr88 : 5'CGAGCCACCGCAAGTCC 3' et 5'CACGCTGACCCGCTTGAC 3'

Crym: 5' CTATGAGGGCCACAGCAACA3' et 5' ATGACCGCCAGCAGGGA3'

St102:5' AAAGGAAGCGAGCGGTG 3' et 5' AAGACCTCCAGCAGTTGAGC 3'

Long Dcl3: 5'CCAACAGCAACAGCGACAAG3' et TGTCTGTCCTCTCTCCGCATGT

Short Dcl3:5' CCTCAACAGGCGGTGTCAG 3' et 5'GGTGAACAGCTTCCGCACA 3'

Penk:5' CCCTTGGGATAACATCGACAT 3' et 5' AAGCCTCCGTACCGTTTCAT 3'

Darpp-32: 5' CCCTGAGCCTGGCACATAAG 3' et 5' AAGCCGCAGCCCTAGCA 3'
D2 : 5' TGCCAACCCTGCCTTCGTG 3' et 5' TGACCCGCTTCCGACGCT 3'
Htt: 5'TCTGTGAAGAGTGAGATTGGTGGAG 3' et
5'TCTGCTTGAAGTGTGTGCTGGG3'

Western blot

Après dosage des protéines par le kit BCA (Pierce), chaque échantillon a été dilué dans du tampon NuPAGE® Sample Reducing agent (10X) et NuPAGE LDS sample buffer (4X) (Invitrogen) pour réaliser un Western blot sur des gels 4%-12% Bis-tris (NuPAGE® Novex Bis-tris midi gel 15wells, Invitrogen) ou pour les hauts poids moléculaires les gels 3-8% Tris-acetate (NuPAGE® Novex Tris-acetate midi gel 15 wells, Invitrogen). Les protéines sont séparés par SDS-PAGE. Nous avons utilisé le marqueur de poids moléculaires "Precision PlusProtein™ Standards Kaleidoscope™" (Bio Rad Laboratories), Novex® Sharp Protein Standard (Invitrogen) et pour les protéines de haut poids moléculaires, le HiMark™ Unstained Protein Standard (Invitrogen). Après transfert sur gel de nitrocellulose, les membranes sont bloquées 1h avec une solution contenant du TBS/ lait 5% puis incubés sur la nuit à 4° avec cette solution et l'anticorps primaire : Crystalline μ (1:500, Chicken), antibody against non-erythroid spectrin "fodrin" (1:750, mouse; Chemicon, Temecula, CA), actin (1:2000, rabbit, Sigma), hemagglutinin (1:3000, mouse, Covance). Les membranes sont incubés avec la horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (1:3000, GE healthcare); ou antirabbit (1:5000, GE healthcare) ou antiChicken (1:3000, GE) pendant 1h à température ambiante. L'activité de la peroxydase est détectée en utilisant un réactif amplificateur de chimioluminescence (ECL, GE healthcare) et détecté par le système de caméra Fusion FX7 (Fisher scientific).

Culture primaire de neurones striataux

La culture primaire de neurones striataux a été réalisée à partir d'embryons de ratte Sprague Dawley (Charles River) (Benchoua et al., 2006 ; Jacquard et al., 2006). À 14 jours de développement *in utero* (E14-E15), la ratte a reçu une dose létale de Pentobarbital (2ml/200g) et les embryons ont été prélevés rapidement. La dissection des embryons a été réalisée dans un milieu HBSS (Hank's balanced sodium salts) complété avec de l'Hepes (0.01M) et du sodium pyruvate (1mM). Les striata ont été disséqués sous une loupe binoculaire à l'aide de micropinces (pincés Dumont n°4 et

n°5). Les striata extraits ont été découpés en petits morceaux et incubés 15 min à 37°C avec de la DNase I (300µg/ml final). La dissociation se poursuit à l'aide d'une pipette P1000 (Gilson) en réalisant plusieurs allers-retours. Une fois le tissu bien dissocié, il a été centrifugé (10min, 1000g, température ambiante). Le culot a été repris dans le milieu HBSS complété et a été dissocié mécaniquement avec des pipettes Pasteur de différents diamètres. Les cellules ont été recentrifugées (10min, à 1000 g, température ambiante). Le culot de cellules a été repris dans un milieu de culture Neurobasal complété avec du B27 (suivant les recommandations du revendeur), de la L-glutamine (0.5mM), et un mélange d'antibiotiques (Streptomycine 100µg/ml, penicilline 100U/ml et amphotéricine B 250ng/ml). Les cellules ont été comptées sur une grille de Malassez etensemencées à $2,5 \cdot 10^5$ cellules/cm² sur des plaques 24 puits (Costar 24) préalablement recouvertes de poly-D-lysine 30-70kDa (50µg/ml). Les plaquesensemencées ont été mises à l'étuve (5%CO₂, 37°C). La moitié du milieu a été changée une fois par semaine.

Les infections de cultures primaires ont lieu à DIV 7. Les LV-short Dclk3-HA, LV-Gpr88-HA, LV-HA-Gpr88, LV-LacZ sont injectés à 19ng/µL de P24 pour $3,8 \cdot 10^5$ cellules/puit avec le LV-GFP à la même concentration.

Fractionnement lipidique des membranes réalisé pour Gpr88

Le striatum de rat adulte a été broyé sur glace dans un tampon MBS (MES 25 mM, NaCl 150mM) contenant des inhibiteurs de protéase (complete mini, Roche) et du PMSF (100µM). L'homogénat a été dosé. L'échantillon est dilué à 3µg/µL avec du MBS puis incubés pendant 30 min sur glace en présence de détergent Brij58 1% et de PMSF (100µM). Un volume d'échantillon est ensuite mélangé à un volume de sucrose 80% (final 40%) et coulé au fond du tube. Un coussin de sucrose de 30% puis de 5% ont été déposés par dessus. Le tube est centrifugé dans l'ultracentrifugeuse Beckman à 4°C, 135 700g pendant 17H. 12 fractions de 400µL ont été collectées en partant du haut du tube. Un volume égal de chaque fraction été séparé par un SDS-PAGE.

Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation pour Crym

Après avoir reçu une dose létale d'une solution de pentobarbital (50µg per gram), le cerveau d'une ratte adulte (Sprague-Dawley, Charles River) a été prélevé et le striatum et le cortex cérébral ont été disséqués à l'aide d'une matrice. Les

échantillons tissulaires ont été homogénéisés dans du Tris 50 mM (contenant du NaCl 50 mM et du saccharose 0,25 M). L'homogénat a été récolté et centrifugé 5 min, 4°C à 800 g pour éliminer les débris cellulaires et les noyaux. Le surnageant a été coulé sur une solution dense en saccharose (9,5ml de Tris 50 mM, NaCl 50 mM, 1,7 M saccharose). Les échantillons ont été centrifugés à 100 000 g pendant 40 min à 4°C à l'aide d'une ultracentrifugeuse Beckman Optima XL équipée d'un rotor SW41 (Palo Alto, Californie). La phase supérieure (S100) contenant le cytosol a ensuite été prélevée (1,7 ml). L'interface des solutions saccharose 0,25 M / 1,7 M contenant les membranes a été prélevée (300 µl) et remélangée avec 11 ml de Tris 50 mM, NaCl 50 mM, puis re-centrifugées à 100 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot (membranes) a été repris dans 1,5 ml de tampon de lyse Tris 50 mM contenant du NaCl 150 mM, de l'EDTA 1 mM, 1% de NP40, 0,5% de Triton X-100 et contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Complete, Roche).

Clivage de Dclk3 et Fodrin par la Calpaïne

Les neurones infectés avec le lenti(short-Dclk3-HA ont été lysé avec un tampon contenant 25mM de HEPES, 0.1% Triton X-100, 3mM de MgCl₂, 1.3mM de EDTA et 1mM d'EGTA et les inhibiteurs de protéases (complete mini, Roche, France). les cellules ont été centrifugés (4°C, 13000g, 30min) et le surnageant est récupéré pour réaliser un dosage selon la méthode BCA (Pierce,Rockford, IL). Les tests calpaines ont été réalisés avec 30µg de protéines par condition.

Condition 1) extraits protéiques

Condition 2) extraits protéiques et 5mM de CaCl₂

Condition 3) extraits protéiques et Calpastatine (100µM)

Condition 4) extraits protéiques et la µ Calpaine 0,2U ((0.2U, porcine erythrocyte form, Calbiochem)

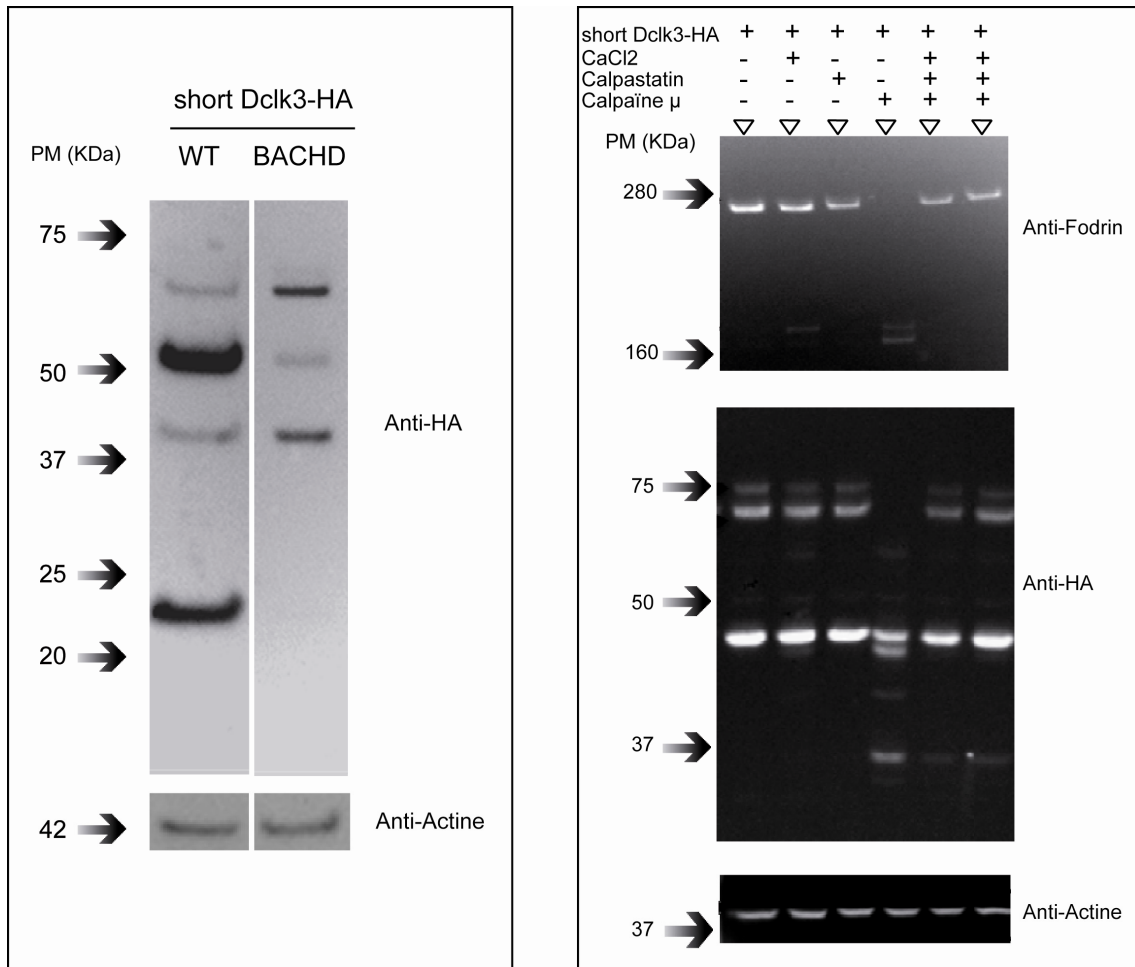
Condition 5) extraits protéiques, 5mM de CaCl₂, µ et la Calpaine 0,2U

Condition 6) extraits protéiques, Calpastatine (100µM) pendant 10 min à 37°C puis ajout de 5mM de CaCl₂, µ Calpaine 0,2U

Condition 6) extraits protéiques, Calpastatine (75µM) pendant 10 min à 37°C puis ajout de 5mM de CaCl₂, µ Calpaine 0,2U

Tous les échantillons ont été incubés 15min à 37°C puis dilués dans le Nupage 4x et 10x pour réaliser des analyses en Western blot..

ANNEXE VII : Clivage de Dclk3



Clivage de Dclk3

A- *in vivo* -le striatum de souris WT (n=5) et BACHD (n=5) a été injecté avec un mélange de LV-short-Dclk3-HA et LV-GFP. Six semaines après infection, les zones de fluorescentes ont été extraites et analysées en Western blot par un anticorps anti-HA. **B - *In vitro*** : les neurones du striatum de la culture primaire ont été infectés avec LV-short-Dclk3HA et le LV-GFP à DIV7. À DIV28, les neurones ont été extraits et analysés en Western blot. Le clivage calpaïne résulte de l'addition dans l'extrait protéique de la calpaïne (0.1U) , de CaCl₂+ (5mM) pendant 15 min à 37°C. Les fragments à 75 KDa et 70KDa ont été dégradés en fragments plus petits à 40 KDa, 37 KDa et 25 KDa

IN VIVO			IN VITRO	
Dclk3 HA Cterm	Dclk3 HA long	Dclk3 HA court	Dclk3 HA court	Dclk3 HA court
				Calpaïne
58	95		75	
	75			
	70	70	70	
	55	55		55
	43	43	43	43
				40
			24	24
				24

Récapitulatif des clivages protéiques observés de Dclk3.

In vivo : des souris ont été injectées avec les LV-Dclk3HA cterm, long, court avec le LV-GFP. Six semaines après l'infection, la zone fluorescente dans le striatum a été extraite et analysée en western blot par un anticorps anti-HA. *In vitro* : les neurones du striatum issus de la culture primaire ont été infectés avec LV-Dclk3HA cterm, long, court avec le LV-GFP à DIV7. À DIV28, les neurones ont été extraits et analysés en western blot par un anticorps anti-HA. Le clivage calpaïne résulte de l'addition dans l'extrait protéique de la calpaïne (0.1U) , de CaCl₂⁺ (5mM) pendant 15 min à 37°C. Les chiffres en gras correspondent aux formes majoritaires.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe S, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Usami S, Inoue Y, Tsunoda T, Nakamura Y (2003) Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am J Hum Genet* 72:73-82.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Albin RL, Young AB, Penney JB, Handelin B, Balfour R, Anderson KD, Markel DS, Tourtellotte WW, Reiner A (1990) Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. *N Engl J Med* 322:1293-1298.
- Alexi T, Hughes PE, van Roon-Mom WM, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD (1999) The IGF-I amino-terminal tripeptide glycine-proline-glutamate (GPE) is neuroprotective to striatum in the quinolinic acid lesion animal model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 159:84-97.
- Ali NJ, Levine MS (2006) Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits occur early in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Dev Neurosci* 28:230-238.
- Anderson KE, Marshall FJ (2005) Behavioral symptoms associated with Huntington's disease. *Adv Neurol* 96:197-208.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431:805-810.
- Atwal RS, Xia J, Pinchev D, Taylor J, Epanand RM, Truant R (2007) Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum Mol Genet* 16:2600-2615.
- Aylward EH, Li Q, Stine OC, Ranen N, Sherr M, Barta PE, Bylsma FW, Pearlson GD, Ross CA (1997) Longitudinal change in basal ganglia volume in patients with Huntington's disease. *Neurology* 48:394-399.
- Aylward EH, Sparks BF, Field KM, Yallapragada V, Shpritz BD, Rosenblatt A, Brandt J, Gourley LM, Liang K, Zhou H, Margolis RL, Ross CA (2004) Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 63:66-72.
- Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, Brugieres P, Lefaucheur JP, Bourdet C, Baudic S, Gaura V, Maison P, Haddad B, Boisse MF, Grandmougin T, Jeny R, Bartolomeo P, Dalla Barba G, Degos JD, Lisovoski F, Ergis AM, Pailhous E, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M (2000) Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356:1975-1979.

- Battaglia G, Farrace MG, Mastroberardino PG, Viti I, Fimia GM, Van Beeumen J, Devreese B, Melino G, Molinaro G, Busceti CL, Biagioni F, Nicoletti F, Piacentini M (2007) Transglutaminase 2 ablation leads to defective function of mitochondrial respiratory complex I affecting neuronal vulnerability in experimental models of extrapyramidal disorders. *J Neurochem* 100:36-49.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13:4181-4192.
- Becanovic K, Pouladi MA, Lim RS, Kuhn A, Pavlidis P, Luthi-Carter R, Hayden MR, Leavitt BR (2008) Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis. *Hum Mol Genet* 19:1438-1452.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292:1552-1555.
- Benchoua A, Trioulier Y, Diguet E, Malgorn C, Gaillard MC, Dufour N, Elalouf JM, Krajewski S, Hantraye P, Deglon N, Brouillet E (2008) Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. *Hum Mol Genet* 17:1446-1456.
- Benchoua A, Trioulier Y, Zala D, Gaillard MC, Lefort N, Dufour N, Saudou F, Elalouf JM, Hirsch E, Hantraye P, Deglon N, Brouillet E (2006) Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. *Mol Biol Cell* 17:1652-1663.
- Bett JS, Cook C, Petrucelli L, Bates GP (2009) The ubiquitin-proteasome reporter GFPu does not accumulate in neurons of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 4:e5128.
- Bett JS, Goellner GM, Woodman B, Pratt G, Rechsteiner M, Bates GP (2006) Proteasome impairment does not contribute to pathogenesis in R6/2 Huntington's disease mice: exclusion of proteasome activator REGgamma as a therapeutic target. *Hum Mol Genet* 15:33-44.
- Bibb JA, Yan Z, Svenningsson P, Snyder GL, Pieribone VA, Horiuchi A, Nairn AC, Messer A, Greengard P (2000) Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6809-6814.
- Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Creminon C, Escartin C, Saudou F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet E (2003) In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-

- nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 278:43245-43253.
- Block-Galarza J, Chase KO, Sapp E, Vaughn KT, Vallee RB, DiFiglia M, Aronin N (1997) Fast transport and retrograde movement of huntingtin and HAP 1 in axons. *Neuroreport* 8:2247-2251.
- Blum D, Galas MC, Pintor A, Brouillet E, Ledent C, Muller CE, Bantubungi K, Galluzzo M, Gall D, Cuvelier L, Rolland AS, Popoli P, Schiffmann SN (2003) A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists. *J Neurosci* 23:5361-5369.
- Boutell JM, Thomas P, Neal JW, Weston VJ, Duce J, Harper PS, Jones AL (1999) Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum Mol Genet* 8:1647-1655.
- Braunstein KE, Eschbach J, Rona-Voros K, Soylu R, Mikrouli E, Larmet Y, Rene F, De Aguilar JL, Loeffler JP, Muller HP, Bucher S, Kaulisch T, Niessen HG, Tillmanns J, Fischer K, Schwalenstocker B, Kassubek J, Pichler B, Stiller D, Petersen A, Ludolph AC, Dupuis L (2010) A point mutation in the dynein heavy chain gene leads to striatal atrophy and compromises neurite outgrowth of striatal neurons. *Hum Mol Genet* 19:4385-4398.
- Brennan WA, Jr., Bird ED, Aprille JR (1985) Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J Neurochem* 44:1948-1950.
- Brochier C, Gaillard MC, Diguët E, Caudy N, Dossat C, Segurens B, Wincker P, Roze E, Caboche J, Hantraye P, Brouillet E, Elalouf JM, de Chaldee M (2008) Quantitative gene expression profiling of mouse brain regions reveals differential transcripts conserved in human and affected in disease models. *Physiol Genomics* 33:170-179.
- Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59:427-468.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 95:1521-1540.
- Brouillet E, Hantraye P, Ferrante RJ, Dolan R, Leroy-Willig A, Kowall NW, Beal MF (1995) Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7105-7109.
- Buckley NJ, Johnson R, Zuccato C, Bithell A, Cattaneo E (2010) The role of REST in transcriptional and epigenetic dysregulation in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 39:28-39.

- Butchbach ME, Tian G, Guo H, Lin CL (2004) Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *J Biol Chem* 279:34388-34396.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28:264-278.
- Cammarata S, Caponnetto C, Tabaton M (1993) Ubiquitin-reactive neurites in cerebral cortex of subjects with Huntington's chorea: a pathological correlate of dementia? *Neurosci Lett* 156:96-98.
- Cass WA (1997) Decreases in evoked overflow of dopamine in rat striatum after neurotoxic doses of methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 280:105-113.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M (2005) Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6:919-930.
- Caviston JP, Ross JL, Antony SM, Tokito M, Holzbaur EL (2007) Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10045-10050.
- Cepeda C, Wu N, Andre VM, Cummings DM, Levine MS (2007) The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81:253-271.
- Cepeda C, Ariano MA, Calvert CR, Flores-Hernandez J, Chandler SH, Leavitt BR, Hayden MR, Levine MS (2001) NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J Neurosci Res* 66:525-539.
- Charvin D, Vanhoutte P, Pages C, Borrelli E, Caboche J (2005) Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12218-12223.
- Charvin D, Roze E, Perrin V, Deyts C, Betuing S, Pages C, Regulier E, Luthi-Carter R, Brouillet E, Deglon N, Caboche J (2008) Haloperidol protects striatal neurons from dysfunction induced by mutated huntingtin in vivo. *Neurobiol Dis* 29:22-29.
- Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 13:1407-1420.
- Ciarmiello A, Cannella M, Lastoria S, Simonelli M, Frati L, Rubinsztein DC, Squitieri F (2006) Brain white-matter volume loss and glucose hypometabolism precede the clinical symptoms of Huntington's disease. *J Nucl Med* 47:215-222.
- Cicchetti F, Gould PV, Parent A (1996) Sparing of striatal neurons coexpressing calretinin and substance P (NK1) receptor in Huntington's disease. *Brain Res* 730:232-237.

- Colin E, Zala D, Liot G, Rangone H, Borrell-Pages M, Li XJ, Saudou F, Humbert S (2008) Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *Embo J* 27:2124-2134.
- Cooper JK, Schilling G, Peters MF, Herring WJ, Sharp AH, Kaminsky Z, Masone J, Khan FA, Delanoy M, Borchelt DR, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (1998) Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet* 7:783-790.
- Cornett J, Cao F, Wang CE, Ross CA, Bates GP, Li SH, Li XJ (2005) Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nat Genet* 37:198-204.
- Cowan CM, Fan MM, Fan J, Shehadeh J, Zhang LY, Graham RK, Hayden MR, Raymond LA (2008) Polyglutamine-modulated striatal calpain activity in YAC transgenic huntington disease mouse model: impact on NMDA receptor function and toxicity. *J Neurosci* 28:12725-12735.
- Crittenden JR, Dunn DE, Merali FI, Woodman B, Yim M, Borkowska AE, Frosch MP, Bates GP, Housman DE, Lo DC, Graybiel AM (2010) CalDAG-GEFI down-regulation in the striatum as a neuroprotective change in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 19:1756-1765.
- Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D (2006) Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127:59-69.
- Cyr M, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG (2006) Dopamine enhances motor and neuropathological consequences of polyglutamine expanded huntingtin. *Faseb J* 20:2541-2543.
- Damiano M, Galvan L, Deglon N, Brouillet E (2009) Mitochondria in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802:52-61.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537-548.
- de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P, Deglon N (2002) Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 22:3473-3483.
- de Chaldee M, Brochier C, Van de Vel A, Caudy N, Luthi-Carter R, Gaillard MC, Elalouf JM (2006) Capucin: a novel striatal marker down-regulated in rodent models of Huntington disease. *Genomics* 87:200-207.

- de Chaldee M, Gaillard MC, Bizat N, Buhler JM, Manzoni O, Bockaert J, Hantraye P, Brouillet E, Elalouf JM (2003) Quantitative assessment of transcriptome differences between brain territories. *Genome Res* 13:1646-1653.
- Deacon BJ, Abramowitz JS, Woods CM, Tolin DF (2003) The Anxiety Sensitivity Index - Revised: psychometric properties and factor structure in two nonclinical samples. *Behav Res Ther* 41:1427-1449.
- del Toro D, Alberch J, Lazaro-Diequez F, Martin-Ibanez R, Xifro X, Egea G, Canals JM (2009) Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* 20:1478-1492.
- Desplats PA, Kass KE, Gilmartin T, Stanwood GD, Woodward EL, Head SR, Sutcliffe JG, Thomas EA (2006) Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease. *J Neurochem* 96:743-757.
- Diaz-Hernandez M, Valera AG, Moran MA, Gomez-Ramos P, Alvarez-Castelao B, Castano JG, Hernandez F, Lucas JJ (2006) Inhibition of 26S proteasome activity by huntingtin filaments but not inclusion bodies isolated from mouse and human brain. *J Neurochem* 98:1585-1596.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990-1993.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA, et al. (1995) Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14:1075-1081.
- DiFiglia M, Sena-Esteves M, Chase K, Sapp E, Pfister E, Sass M, Yoder J, Reeves P, Pandey RK, Rajeev KG, Manoharan M, Sah DW, Zamore PD, Aronin N (2007) Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17204-17209.
- Diguet E, Petit F, Escartin C, Cambon K, Bizat N, Dufour N, Hantraye P, Deglon N, Brouillet E (2009) Normal aging modulates the neurotoxicity of mutant huntingtin. *PLoS One* 4:e4637.
- Dinger ME, Pang KC, Mercer TR, Mattick JS (2008) Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. *PLoS Comput Biol* 4:e1000176.
- Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, Saudou F (2007) Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27:3571-3583.
- Dragatsis I, Efstratiadis A, Zeitlin S (1998) Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues. *Development* 125:1529-1539.

- Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S (2000) Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 26:300-306.
- Drouet V, Perrin V, Hassig R, Dufour N, Auregan G, Alves S, Bonvento G, Brouillet E, Luthi-Carter R, Hantraye P, Deglon N (2009) Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann Neurol* 65:276-285.
- Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N, Krainc D (2002) Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296:2238-2243.
- Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143:777-794.
- Errico F, Santini E, Migliarini S, Borgkvist A, Centonze D, Nasti V, Carta M, De Chiara V, Prosperetti C, Spano D, Herve D, Pasqualetti M, Di Lauro R, Fisone G, Usiello A (2008) The GTP-binding protein Rhes modulates dopamine signalling in striatal medium spiny neurons. *Mol Cell Neurosci* 37:335-345.
- Escartin C, Boyer F, Bemelmans AP, Hantraye P, Brouillet E (2007) IGF-1 exacerbates the neurotoxicity of the mitochondrial inhibitor 3NP in rats. *Neurosci Lett* 425:167-172.
- Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G, 3rd, Kenny PJ, Wahlestedt C (2008) Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med* 14:723-730.
- Faideau M, Kim J, Cormier K, Gilmore R, Welch M, Auregan G, Dufour N, Guillemier M, Brouillet E, Hantraye P, Deglon N, Ferrante RJ, Bonvento G (2010) In vivo expression of polyglutamine-expanded huntingtin by mouse striatal astrocytes impairs glutamate transport: a correlation with Huntington's disease subjects. *Hum Mol Genet* 19:3053-3067.
- Fan MM, Fernandes HB, Zhang LY, Hayden MR, Raymond LA (2007) Altered NMDA receptor trafficking in a yeast artificial chromosome transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 27:3768-3779.
- Fernandez-Ruiz J (2009) The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br J Pharmacol* 156:1029-1040.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Richardson EP, Jr. (1991) Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J Neurosci* 11:3877-3887.

- Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E, Beal MF (1993) Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* 119:46-71.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP, Jr., Bird ED, Martin JB (1985) Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230:561-563.
- Franich NR, Fitzsimons HL, Fong DM, Klugmann M, During MJ, Young D (2008) AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Mol Ther* 16:947-956.
- Gafni J, Ellerby LM (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci* 22:4842-4849.
- Gafni J, Hermel E, Young JE, Wellington CL, Hayden MR, Ellerby LM (2004) Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem* 279:20211-20220.
- Galindo MI, Pueyo JI, Fouix S, Bishop SA, Couso JP (2007) Peptides encoded by short ORFs control development and define a new eukaryotic gene family. *PLoS Biol* 5:e106.
- Garnett ES, Firnau G, Nahmias C, Carbotte R, Bartolucci G (1984) Reduced striatal glucose consumption and prolonged reaction time are early features in Huntington's disease. *J Neurol Sci* 65:231-237.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118:127-138.
- Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudakis S, Gutekunst CA, Leavitt BR, Metzler M, Hackam AS, Tam J, Vaillancourt JP, Houtzager V, Rasper DM, Roy S, Hayden MR, Nicholson DW (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat Cell Biol* 4:95-105.
- Giampa C, Laurenti D, Anzilotti S, Bernardi G, Menniti FS, Fusco FR Inhibition of the striatal specific phosphodiesterase PDE10A ameliorates striatal and cortical pathology in R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 5:e13417.
- Gil JM, Mohapel P, Araujo IM, Popovic N, Li JY, Brundin P, Petersen A (2005) Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis* 20:744-751.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97:505-519.

- Godin JD, Colombo K, Molina-Calavita M, Keryer G, Zala D, Charrin BC, Dietrich P, Volvert ML, Guillemot F, Dragatsis I, Bellaïche Y, Saudou F, Nguyen L, Humbert S (2010) Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67:392-406.
- Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Hayden MR (1996) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 13:442-449.
- Graham RK, Deng Y, Carroll J, Vaid K, Cowan C, Pouladi MA, Metzler M, Bissada N, Wang L, Faull RL, Gray M, Yang XW, Raymond LA, Hayden MR (2010) Cleavage at the 586 amino acid caspase-6 site in mutant huntingtin influences caspase-6 activation in vivo. *J Neurosci* 30:15019-15029.
- Graham RK, Deng Y, Slow EJ, Haigh B, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Bertram L, Murphy Z, Warby SC, Doty CN, Roy S, Wellington CL, Leavitt BR, Raymond LA, Nicholson DW, Hayden MR (2006) Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125:1179-1191.
- Graveland GA, DiFiglia M (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res* 327:307-311.
- Gray M, Shirasaki DI, Cepeda C, Andre VM, Wilburn B, Lu XH, Tao J, Yamazaki I, Li SH, Sun YE, Li XJ, Levine MS, Yang XW (2008) Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J Neurosci* 28:6182-6195.
- Greene JG, Greenamyre JT (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48:613-634.
- group THc (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983.
- Gu X, Greiner ER, Mishra R, Kodali R, Osmand A, Finkbeiner S, Steffan JS, Thompson LM, Wetzel R, Yang XW (2009) Serines 13 and 16 are critical determinants of full-length human mutant huntingtin induced disease pathogenesis in HD mice. *Neuron* 64:828-840.
- Gunawardena S, Her LS, Brusch RG, Laymon RA, Niesman IR, Gordesky-Gold B, Sintasath L, Bonini NM, Goldstein LS (2003) Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40:25-40.
- Gutkunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM, Li XJ (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 19:2522-2534.

- Han I, You Y, Kordower JH, Brady ST, Morfini GA (2010) Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. *J Neurochem* 113:1073-1091.
- Hantraye P, Riche D, Maziere M, Isacson O (1990) A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp Neurol* 108:91-104.
- Harjes P, Wanker EE (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28:425-433.
- Harper PS (1992) The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* 89:365-376.
- Harrison LM, He Y (2010) Rhes and AGS1/Dexas1 affect signaling by dopamine D1 receptors through adenylyl cyclase. *J Neurosci Res* 89:874-882.
- Hattula K, Peranen J (2000) FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Curr Biol* 10:1603-1606.
- Havel LS, Wang CE, Wade B, Huang B, Li S, Li XJ (2011) Preferential accumulation of N-terminal mutant huntingtin in the nuclei of striatal neurons is regulated by phosphorylation. *Hum Mol Genet* 20:1424-1437.
- Hayden MR, Martin WR, Stoessl AJ, Clark C, Hollenberg S, Adam MJ, Ammann W, Harrop R, Rogers J, Ruth T, et al. (1986) Positron emission tomography in the early diagnosis of Huntington's disease. *Neurology* 36:888-894.
- Heiser V, Engemann S, Brocker W, Dunkel I, Boeddrich A, Waelter S, Nordhoff E, Lurz R, Schugardt N, Rautenberg S, Herhaus C, Barnickel G, Bottcher H, Lehrach H, Wanker EE (2002) Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4:16400-16406.
- Hermel E, Gafni J, Propp SS, Leavitt BR, Wellington CL, Young JE, Hackam AS, Logvinova AV, Peel AL, Chen SF, Hook V, Singaraja R, Krajewski S, Goldsmith PC, Ellerby HM, Hayden MR, Bredesen DE, Ellerby LM (2004) Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 11:424-438.
- Higo T, Hamada K, Hisatsune C, Nukina N, Hashikawa T, Hattori M, Nakamura T, Mikoshiba K (2010) Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor. *Neuron* 68:865-878.
- Hilditch-Maguire P, Trettel F, Passani LA, Auerbach A, Persichetti F, MacDonald ME (2000) Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum Mol Genet* 9:2789-2797.
- Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PA, Steffan JS, Marsh JL, Thompson LM, Lewis CM, Marks PA,

- Bates GP (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2041-2046.
- Hodges A, Strand AD, Aragaki AK, Kuhn A, Sengstag T, Hughes G, Elliston LA, Hartog C, Goldstein DR, Thu D, Hollingsworth ZR, Collin F, Synek B, Holmans PA, Young AB, Wexler NS, Delorenzi M, Kooperberg C, Augood SJ, Faull RL, Olson JM, Jones L, Luthi-Carter R (2006) Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet* 15:965-977.
- Holbert S, Denghien I, Kiechle T, Rosenblatt A, Wellington C, Hayden MR, Margolis RL, Ross CA, Dausset J, Ferrante RJ, Neri C (2001) The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1811-1816.
- Hottinger AF, Azzouz M, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD (2000) Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci* 20:5587-5593.
- Huang B, Schiefer J, Sass C, Kosinski CM, Kochanek S (2008) Inducing huntingtin inclusion formation in primary neuronal cell culture and in vivo by high-capacity adenoviral vectors expressing truncated and full-length huntingtin with polyglutamine expansion. *J Gene Med* 10:269-279.
- Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME, Saudou F (2002) The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2:831-837.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 9:331-343.
- Jenkins BG, Koroshetz WJ, Beal MF, Rosen BR (1993) Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized ¹H NMR spectroscopy. *Neurology* 43:2689-2695.
- Jenkins BG, Rosas HD, Chen YC, Makabe T, Myers R, MacDonald M, Rosen BR, Beal MF, Koroshetz WJ (1998) ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* 50:1357-1365.
- Johnson R, Richter N, Jauch R, Gaughwin PM, Zuccato C, Cattaneo E, Stanton LW (2010) The Human Accelerated Region 1 noncoding RNA is repressed by REST in Huntington's disease. *Physiol Genomics*.
- Kafri T (2004) Gene delivery by lentivirus vectors an overview. *Methods Mol Biol* 246:367-390.

- Karlin S, Burge C (1996) Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1560-1565.
- Karpuj MV, Becher MW, Springer JE, Chabas D, Youssef S, Pedotti R, Mitchell D, Steinman L (2002) Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat Med* 8:143-149.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.
- Kawasaki H, Springett GM, Toki S, Canales JJ, Harlan P, Blumenstiel JP, Chen EJ, Bany IA, Mochizuki N, Ashbacher A, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998) A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13278-13283.
- Kegel KB, Meloni AR, Yi Y, Kim YJ, Doyle E, Cuiffo BG, Sapp E, Wang Y, Qin ZH, Chen JD, Nevins JR, Aronin N, DiFiglia M (2002) Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem* 277:7466-7476.
- Kim J, Moody JP, Edgerly CK, Bordiuk OL, Cormier K, Smith K, Beal MF, Ferrante RJ (2010) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 19:3919-3935.
- Kim YJ, Yi Y, Sapp E, Wang Y, Cuiffo B, Kegel KB, Qin ZH, Aronin N, DiFiglia M (2001) Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12784-12789.
- Kobayashi M, Hashizume K, Suzuki S, Ichikawa K, Takeda T (1991) A novel NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding protein (CTBP; 5.1S) in rat liver: a comparison with 4.7S NADPH-dependent CTBP. *Endocrinology* 129:1701-1708.
- Kuhl DE, Phelps ME, Markham CH, Metter EJ, Riege WH, Winter J (1982) Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan. *Ann Neurol* 12:425-434.
- Kuhn A, Goldstein DR, Hodges A, Strand AD, Sengstag T, Kooperberg C, Becanovic K, Pouladi MA, Sathasivam K, Cha JH, Hannan AJ, Hayden MR, Leavitt BR, Dunnett SB, Ferrante RJ, Albin R, Shelbourne P, Delorenzi M, Augood SJ, Faull RL, Olson JM, Bates GP, Jones L, Luthi-Carter R (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet* 16:1845-1861.

- Laforet GA, Sapp E, Chase K, McIntyre C, Boyce FM, Campbell M, Cadigan BA, Warzecki L, Tagle DA, Reddy PH, Cepeda C, Calvert CR, Jokel ES, Klapstein GJ, Ariano MA, Levine MS, DiFiglia M, Aronin N (2001) Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* 21:9112-9123.
- Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR (2005) Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:41-50.
- Lazic SE, Grote HE, Blakemore C, Hannan AJ, van Dellen A, Phillips W, Barker RA (2006) Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 23:1829-1838.
- Le Hellard S, Havik B, Espeseth T, Breilid H, Lovlie R, Luciano M, Gow AJ, Harris SE, Starr JM, Wibrand K, Lundervold AJ, Porteous DJ, Bramham CR, Deary IJ, Reinvang I, Steen VM (2009) Variants in doublecortin- and calmodulin kinase like 1, a gene up-regulated by BDNF, are associated with memory and general cognitive abilities. *PLoS One* 4:e7534.
- Leavitt BR, Guttman JA, Hodgson JG, Kimel GH, Singaraja R, Vogl AW, Hayden MR (2001) Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet* 68:313-324.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glatffelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, et al. (2007) Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445:168-176.
- Lesort M, Tucholski J, Miller ML, Johnson GV (2000) Tissue transglutaminase: a possible role in neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 61:439-463.

- Lesort M, Chun W, Tucholski J, Johnson GV (2002) Does tissue transglutaminase play a role in Huntington's disease? *Neurochem Int* 40:37-52.
- Leterrier C, Brachet A, Fache MP, Dargent B Voltage-gated sodium channel organization in neurons: protein interactions and trafficking pathways. *Neurosci Lett* 486:92-100.
- Leterrier C, Brachet A, Fache MP, Dargent B (2010) Voltage-gated sodium channel organization in neurons: protein interactions and trafficking pathways. *Neurosci Lett* 486:92-100.
- Li H, Li SH, Johnston H, Shelbourne PF, Li XJ (2000) Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet* 25:385-389.
- Li H, Li SH, Cheng AL, Mangiarini L, Bates GP, Li XJ (1999) Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice. *Hum Mol Genet* 8:1227-1236.
- Li L, Fan M, Icton CD, Chen N, Leavitt BR, Hayden MR, Murphy TH, Raymond LA (2003) Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington disease. *Neurobiol Aging* 24:1113-1121.
- Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20:146-154.
- Li SH, Cheng AL, Zhou H, Lam S, Rao M, Li H, Li XJ (2002) Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol* 22:1277-1287.
- Liu HY, Yehuda-Shnaidman E, Hong T, Han J, Pi J, Liu Z, Cao W (2009) Prolonged exposure to insulin suppresses mitochondrial production in primary hepatocytes. *J Biol Chem* 284:14087-14095.
- Logue SF, Grauer SM, Paulsen J, Graf R, Taylor N, Sung MA, Zhang L, Hughes Z, Pulito VL, Liu F, Rosenzweig-Lipson S, Brandon NJ, Marquis KL, Bates B, Pausch M (2009) The orphan GPCR, GPR88, modulates function of the striatal dopamine system: a possible therapeutic target for psychiatric disorders? *Mol Cell Neurosci* 42:438-447.
- Lunkes A, Trottier Y, Mandel JL (1998) Pathological mechanisms in Huntington's disease and other polyglutamine expansion diseases. *Essays Biochem* 33:149-163.
- Lunkes A, Lindenberg KS, Ben-Haiem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL, Trottier Y (2002) Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 10:259-269.
- Luthi-Carter R, Apostol BL, Dunah AW, DeJohn MM, Farrell LA, Bates GP, Young AB, Standaert DG, Thompson LM, Cha JH (2003) Complex alteration of NMDA receptors in transgenic Huntington's disease mouse brain: analysis of mRNA and protein

- expression, plasma membrane association, interacting proteins, and phosphorylation. *Neurobiol Dis* 14:624-636.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655-668.
- Malinowska K, Cavarretta IT, Susani M, Wrulich OA, Uberall F, Kenner L, Culig Z (2009) Identification of mu-crystallin as an androgen-regulated gene in human prostate cancer. *Prostate* 69:1109-1118.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493-506.
- Mantle D, Falkous G, Ishiura S, Perry RH, Perry EK (1995) Comparison of cathepsin protease activities in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neurol Sci* 131:65-70.
- Martindale D, Hackam A, Wieczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi-Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F, Hayden MR (1998) Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* 18:150-154.
- Martins-De-Souza D, Dias-Neto E, Schmitt A, Falkai P, Gormanns P, Maccarrone G, Turck CW, Gattaz WF (2010) Proteome analysis of schizophrenia brain tissue. *World J Biol Psychiatry* 11:110-120.
- Massart R, Guilloux JP, Mignon V, Sokoloff P, Diaz J (2009) Striatal GPR88 expression is confined to the whole projection neuron population and is regulated by dopaminergic and glutamatergic afferents. *Eur J Neurosci* 30:397-414.
- Mattick JS, Makunin IV (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1:R17-29.
- Mazarei G, Neal SJ, Becanovic K, Luthi-Carter R, Simpson EM, Leavitt BR (2009) Expression analysis of novel striatal-enriched genes in Huntington disease. *Hum Mol Genet* 19:609-622.
- McC Campbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9:2197-2202.
- McGeer EG, McGeer PL (1976) Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263:517-519.

- McGuire JR, Rong J, Li SH, Li XJ (2006) Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem* 281:3552-3559.
- McLaughlin BA, Nelson D, Erecinska M, Chesselet MF (1998) Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by a mitochondrial inhibitor. *J Neurochem* 70:2406-2415.
- Mehmet H (2000) Caspases find a new place to hide. *Nature* 403:29-30.
- Menalled L, Zanjani H, MacKenzie L, Koppel A, Carpenter E, Zeitlin S, Chesselet MF (2000) Decrease in striatal enkephalin mRNA in mouse models of Huntington's disease. *Exp Neurol* 162:328-342.
- Menalled LB, Chesselet MF (2002) Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci* 23:32-39.
- Mende-Mueller LM, Toneff T, Hwang SR, Chesselet MF, Hook VY (2001) Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum. *J Neurosci* 21:1830-1837.
- Metzler M, Legendre-Guillemin V, Gan L, Chopra V, Kwok A, McPherson PS, Hayden MR (2001) HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *J Biol Chem* 276:39271-39276.
- Micale L, Fusco C, Augello B, Napolitano LM, Dermitzakis ET, Meroni G, Merla G, Raymond A (2008) Williams-Beuren syndrome TRIM50 encodes an E3 ubiquitin ligase. *Eur J Hum Genet* 16:1038-1049.
- Mievis S, Blum D, Ledent C (2011a) A2A receptor knockout worsens survival and motor behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 41:570-576.
- Mievis S, Blum D, Ledent C (2011b) Worsening of Huntington disease phenotype in CB1 receptor knockout mice. *Neurobiol Dis* 42:524-529.
- Miller JP, Holcomb J, Al-Ramahi I, de Haro M, Gafni J, Zhang N, Kim E, Sanhueza M, Torcassi C, Kwak S, Botas J, Hughes RE, Ellerby LM (2010) Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67:199-212.
- Milnerwood AJ, Raymond LA (2010) Early synaptic pathophysiology in neurodegeneration: insights from Huntington's disease. *Trends Neurosci* 33:513-523.
- Mizushima K, Miyamoto Y, Tsukahara F, Hirai M, Sakaki Y, Ito T (2000) A novel G-protein-coupled receptor gene expressed in striatum. *Genomics* 69:314-321.
- Modregger J, DiProspero NA, Charles V, Tagle DA, Plomann M (2002) PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* 11:2547-2558.

- Morfini GA, You YM, Pollema SL, Kaminska A, Liu K, Yoshioka K, Bjorkblom B, Coffey ET, Bagnato C, Han D, Huang CF, Banker G, Pigino G, Brady ST (2009) Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat Neurosci* 12:864-871.
- Myers RH, Vonsattel JP, Stevens TJ, Cupples LA, Richardson EP, Martin JB, Bird ED (1988) Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38:341-347.
- Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81:811-823.
- Nucifora FC, Jr., Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291:2423-2428.
- O'Neal P, Alamdari N, Smith I, Poylin V, Menconi M, Hasselgren PO (2009) Experimental hyperthyroidism in rats increases the expression of the ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 and stimulates multiple proteolytic pathways in skeletal muscle. *J Cell Biochem* 108:963-973.
- Obrietan K, Hoyt KR (2004) CRE-mediated transcription is increased in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurosci* 24:791-796.
- Ohmae S, Takemoto-Kimura S, Okamura M, Adachi-Morishima A, Nonaka M, Fuse T, Kida S, Tanji M, Furuyashiki T, Arakawa Y, Narumiya S, Okuno H, Bito H (2006) Molecular identification and characterization of a family of kinases with homology to Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases I/IV. *J Biol Chem* 281:20427-20439.
- Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, Frey AS, Menon AS, Li XJ, Stieg PE, Yuan J, Penney JB, Young AB, Cha JH, Friedlander RM (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 399:263-267.
- Oshima A, Suzuki S, Takumi Y, Hashizume K, Abe S, Usami S (2006) CRYM mutations cause deafness through thyroid hormone binding properties in the fibrocytes of the cochlea. *J Med Genet* 43:e25.
- Pallos J, Bodai L, Lukacsovich T, Purcell JM, Steffan JS, Thompson LM, Marsh JL (2008) Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a Drosophila model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 17:3767-3775.

- Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5:731-736.
- Paoletti P, Vila I, Rife M, Lizcano JM, Alberch J, Gines S (2008) Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* 28:10090-10101.
- Pasinelli P, Brown RH (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7:710-723.
- Paterlini M, Revilla V, Grant AL, Wisden W (2000) Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience* 99:205-216.
- Paulsen JS, Conybeare RA (2005) Cognitive changes in Huntington's disease. *Adv Neurol* 96:209-225.
- Perrin V, Regulier E, Abbas-Terki T, Hassig R, Brouillet E, Aebischer P, Luthi-Carter R, Deglon N (2007) Neuroprotection by Hsp104 and Hsp27 in lentiviral-based rat models of Huntington's disease. *Mol Ther* 15:903-911.
- Perrin V, Dufour N, Raoul C, Hassig R, Brouillet E, Aebischer P, Luthi-Carter R, Deglon N (2009) Implication of the JNK pathway in a rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 215:191-200.
- Perutz MF (1995) Polar zippers: their role in human disease. *Pharm Acta Helv* 69:213-224.
- Petersen K, Olesen OF, Mikkelsen JD (1999) Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* 91:651-659.
- Poirier MA, Li H, Macosko J, Cai S, Amzel M, Ross CA (2002) Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J Biol Chem* 277:41032-41037.
- Popoli P, Blum D, Domenici MR, Burnouf S, Chern Y (2008) A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease. *Curr Pharm Des* 14:1500-1511.
- Popoli P, Blum D, Martire A, Ledent C, Ceruti S, Abbracchio MP (2007) Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A2A receptors in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81:331-348.
- Popoli P, Pintor A, Domenici MR, Frank C, Tebano MT, Pezzola A, Scarchilli L, Quarta D, Reggio R, Malchiodi-Albedi F, Falchi M, Massotti M (2002) Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. *J Neurosci* 22:1967-1975.
- Pouladi MA, Xie Y, Skotte NH, Ehrnhoefer DE, Graham RK, Kim JE, Bissada N, Yang XW, Paganetti P, Friedlander RM, Leavitt BR, Hayden MR (2010) Full-length huntingtin

- levels modulate body weight by influencing insulin-like growth factor 1 expression. *Hum Mol Genet* 19:1528-1538.
- Pratt G, Rechsteiner M (2008) Proteasomes cleave at multiple sites within polyglutamine tracts: activation by PA28gamma(K188E). *J Biol Chem* 283:12919-12925.
- Querfurth HW, LaFerla FM Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329-344.
- Rangone H, Poizat G, Troncoso J, Ross CA, MacDonald ME, Saudou F, Humbert S (2004) The serum- and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *Eur J Neurosci* 19:273-279.
- Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11:1107-1117.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36:585-595.
- Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR, Moore RY (1982) Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. *Brain Res* 235:93-103.
- Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, Zuccato C, Fossale E, Cattaneo E (2001) Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* 276:14545-14548.
- Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 20:3705-3713.
- Robinson P, Lebel M, Cyr M (2008) Dopamine D1 receptor-mediated aggregation of N-terminal fragments of mutant huntingtin and cell death in a neuroblastoma cell line. *Neuroscience* 153:762-772.
- Rockabrand E, Slepko N, Pantalone A, Nukala VN, Kazantsev A, Marsh JL, Sullivan PG, Steffan JS, Sensi SL, Thompson LM (2007) The first 17 amino acids of Huntingtin modulate its sub-cellular localization, aggregation and effects on calcium homeostasis. *Hum Mol Genet* 16:61-77.
- Roizin L (1979) The relevance of the structural co-factor (chemogenic lesion) in adverse and toxic reactions of neuropsychotropic agents. *Prog Neuropsychopharmacol* 3:245-257.
- Ross CA, Tabrizi SJ (2010) Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 10:83-98.

- Rovati GE, Capra V, Neubig RR (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* 71:959-964.
- Rubchinsky LL, Kopell N, Sigvardt KA (2003) Modeling facilitation and inhibition of competing motor programs in basal ganglia subthalamic nucleus-pallidal circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14427-14432.
- Rudinskiy N, Kaneko YA, Beesen AA, Gokce O, Regulier E, Deglon N, Luthi-Carter R (2009) Diminished hippocalcin expression in Huntington's disease brain does not account for increased striatal neuron vulnerability as assessed in primary neurons. *J Neurochem* 111:460-472.
- Sanchez I, Mahlke C, Yuan J (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421:373-379.
- Sanchez I, Xu CJ, Juo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22:623-633.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55-66.
- Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90:549-558.
- Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuk JA, Slunt HH, Ratovitski T, Cooper JK, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Ross CA, Borchelt DR (1999) Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* 8:397-407.
- Schoenfeld M, Myers RH, Cupples LA, Berkman B, Sax DS, Clark E (1984) Increased rate of suicide among patients with Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47:1283-1287.
- Schumacher JM, Hantraye P, Brownell AL, Riche D, Madras BK, Davenport PD, Maziere M, Elmaleh DR, Brownell GL, Isacson O (1992) A primate model of Huntington's disease: functional neural transplantation and CT-guided stereotactic procedures. *Cell Transplant* 1:313-322.
- Scotter EL, Goodfellow CE, Graham ES, Dragunow M, Glass M (2010) Neuroprotective potential of CB1 receptor agonists in an in vitro model of Huntington's disease. *Br J Pharmacol* 160:747-761.
- Segovia L, Horwitz J, Gasser R, Wistow G (1997) Two roles for mu-crystallin: a lens structural protein in diurnal marsupials and a possible enzyme in mammalian retinas. *Mol Vis* 3:9.

- Senut MC, Suhr ST, Kaspar B, Gage FH (2000) Intraneuronal aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain. *J Neurosci* 20:219-229.
- Seo H, Sonntag KC, Isacson O (2004) Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann Neurol* 56:319-328.
- Shao J, Diamond MI (2007) Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2:R115-123.
- Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, MacDonald M, Yankner B, Yuan J (2006) Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. *J Biol Chem* 281:14474-14485.
- Shimojo M (2008) Huntingtin regulates RE1-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150 Glued. *J Biol Chem* 283:34880-34886.
- Simmons JT, Pastakia B, Chase TN, Shults CW (1986) Magnetic resonance imaging in Huntington disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 7:25-28.
- Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, Oh R, Bissada N, Hossain SM, Yang YZ, Li XJ, Simpson EM, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR (2003) Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 12:1555-1567.
- Solans A, Zambrano A, Rodriguez M, Barrientos A (2006) Cytotoxicity of a mutant huntingtin fragment in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Hum Mol Genet* 15:3063-3081.
- Song C, Zhang Y, Parsons CG, Liu YF (2003) Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 278:33364-33369.
- Song W, Chen J, Petrilli A, Liot G, Klinglmayr E, Zhou Y, Poquiz P, Tjong J, Pouladi MA, Hayden MR, Masliah E, Ellisman M, Rouiller I, Schwarzenbacher R, Bossy B, Perkins G, Bossy-Wetzel E (2011) Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat Med* 17:377-382.
- Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ (2008) Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 1147:79-92.
- Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6763-6768.

- Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, Illes K, Lukacsovich T, Zhu YZ, Cattaneo E, Pandolfi PP, Thompson LM, Marsh JL (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304:100-104.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413:739-743.
- Subramaniam S, Sixt KM, Barrow R, Snyder SH (2009) Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science* 324:1327-1330.
- Subramaniam S, Mealer RG, Sixt KM, Barrow RK, Usiello A, Snyder SH (2010) Rhes, a physiologic regulator of sumoylation, enhances cross-sumoylation between the basic sumoylation enzymes E1 and Ubc9. *J Biol Chem* 285:20428-20432.
- Sugars KL, Rubinsztein DC (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* 19:233-238.
- Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF (2001) Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 276:24713-24718.
- Suzuki S, Suzuki N, Mori J, Oshima A, Usami S, Hashizume K (2007) micro-Crystallin as an intracellular 3,5,3'-triiodothyronine holder in vivo. *Mol Endocrinol* 21:885-894.
- Suzuki T (2002) Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neurosci Res* 44:1-9.
- Svenningsson P, Nairn AC, Greengard P (2005) DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. *Aaps J* 7:E353-360.
- Szebenyi G, Morfini GA, Babcock A, Gould M, Selkoe K, Stenoien DL, Young M, Faber PW, MacDonald ME, McPhaul MJ, Brady ST (2003) Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. *Neuron* 40:41-52.
- Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M, Nukina N (2004) Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10:148-154.
- Tang TS, Chen X, Liu J, Bezprozvanny I (2007) Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 27:7899-7910.
- Tang TS, Guo C, Wang H, Chen X, Bezprozvanny I (2009) Neuroprotective effects of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor C-terminal fragment in a Huntington's disease mouse model. *J Neurosci* 29:1257-1266.
- Tang TS, Tu H, Chan EY, Maximov A, Wang Z, Wellington CL, Hayden MR, Bezprozvanny I (2003) Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium

- signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* 39:227-239.
- Thakur AK, Jayaraman M, Mishra R, Thakur M, Chellgren VM, Byeon IJ, Anjum DH, Kodali R, Creamer TP, Conway JF, Gronenborn AM, Wetzel R (2009) Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 16:380-389.
- Toki S, Kawasaki H, Tashiro N, Housman DE, Graybiel AM (2001) Guanine nucleotide exchange factors CalDAG-GEFI and CalDAG-GEFII are colocalized in striatal projection neurons. *J Comp Neurol* 437:398-407.
- Trinczek B, Ebner A, Mandelkow EM, Mandelkow E (1999) Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 112 (Pt 14):2355-2367.
- Trushina E, Dyer RB, Badger JD, 2nd, Ure D, Eide L, Tran DD, Vrieze BT, Legendre-Guillemain V, McPherson PS, Mandavilli BS, Van Houten B, Zeitlin S, McNiven M, Aebbersold R, Hayden M, Parisi JE, Seeburg E, Dragatsis I, Doyle K, Bender A, Chacko C, McMurray CT (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 24:8195-8209.
- Tukamoto T, Nukina N, Ide K, Kanazawa I (1997) Huntington's disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. *Brain Res Mol Brain Res* 51:8-14.
- Umeda S, Suzuki MT, Okamoto H, Ono F, Mizota A, Terao K, Yoshikawa Y, Tanaka Y, Iwata T (2005) Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Faseb J* 19:1683-1685.
- Van Raamsdonk JM, Pearson J, Bailey CD, Rogers DA, Johnson GV, Hayden MR, Leavitt BR (2005) Cystamine treatment is neuroprotective in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *J Neurochem* 95:210-220.
- Vargiu P, Morte B, Manzano J, Perez J, de Abajo R, Gregor Sutcliffe J, Bernal J (2001) Thyroid hormone regulation of rhes, a novel Ras homolog gene expressed in the striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 94:1-8.
- Venkatraman P, Wetzel R, Tanaka M, Nukina N, Goldberg AL (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell* 14:95-104.
- Voglis G, Tavernarakis N (2006) The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* 7:1104-1110.
- Vonsattel JP, DiFiglia M (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:369-384.

- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP, Jr. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44:559-577.
- Walker FO (2007) Huntington's disease. *Lancet* 369:218-228.
- Wanker EE, Rovira C, Scherzinger E, Hasenbank R, Walter S, Tait D, Colicelli J, Lehrach H (1997) HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet* 6:487-495.
- Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR (2008) Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59:914-931.
- Wellington CL, Hayden MR (2000) Caspases and neurodegeneration: on the cutting edge of new therapeutic approaches. *Clin Genet* 57:1-10.
- Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M, Rowland KJ, Zhang T, Rasper D, Roy S, Thornberry N, Pinsky L, Kakizuka A, Ross CA, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 273:9158-9167.
- Westermann B (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:872-884.
- Xia J, Lee DH, Taylor J, Vandelft M, Truant R (2003) Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet* 12:1393-1403.
- Yang W, Dunlap JR, Andrews RB, Wetzel R (2002) Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet* 11:2905-2917.
- Yehuda-Shnaidman E, Kalderon B, Azazmeh N, Bar-Tana J Gating of the mitochondrial permeability transition pore by thyroid hormone. *Faseb J* 24:93-104.
- Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB (1988) NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241:981-983.
- Zainelli GM, Ross CA, Troncoso JC, Muma NA (2003) Transglutaminase cross-links in intranuclear inclusions in Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:14-24.
- Zala D, Colin E, Rangone H, Liot G, Humbert S, Saudou F (2008) Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Hum Mol Genet* 17:3837-3846.
- Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE, Efstratiadis A (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11:155-163.

- Zeron MM, Chen N, Moshaver A, Lee AT, Wellington CL, Hayden MR, Raymond LA (2001) Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci* 17:41-53.
- Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33:849-860.
- Zhang H, Li Q, Graham RK, Slow E, Hayden MR, Bezprozvanny I (2008) Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 31:80-88.
- Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt BR, Hayden MR, Timmusk T, Rigamonti D, Cattaneo E (2003) Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35:76-83.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293:493-498.

