

INSTITUT DE GENETIQUE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

CNRS-INSERM-UNIVERSITE DE STRASBOURG

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par Aurélien DAVRANCHE

Étude des mécanismes moléculaires responsables des interactions aberrantes de la Huntingtine dans la maladie de Huntington

Soutenue le 30 Septembre 2010 devant la commission d'examen suivante :

Directeur de thèse : Dr. Yvon TROTTIER

Rapporteur Interne : Pr. Jean Louis MANDEL

Rapporteur Externe : Dr. Paolo PAGANETTI

Rapporteur Externe : Dr. Anne BERTOLOTTI

Membre Invité : Dr. Danièle ALTSCHUH

Membre Invité : Dr. Fabrice KLEIN

"La vérité de demain se nourrit de l'erreur d'hier"
Saint-Exupéry

*"Notre plus grande force n'est pas de ne jamais tomber,
mais de toujours nous relever"*
Confucius

À mes parents,
À Johanne,
À Karen

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse **Jean Louis Mandel, Paolo Paganetti, Anne Bertolotti, Danièle Altschuh, Fabrice Klein** et **Yvon Trottier** d'avoir accepté de juger mon travail, mais surtout de participer aux discussions des résultats.

Le **département de génétique humaine**, car la solidarité au sein de ce groupe et son excellente cohésion, m'ont beaucoup apporté, au niveau professionnel et humain. Merci à **Jean Louis Mandel** pour son soutien et pour ne pas hésiter à nous faire partager ses passions scientifique et musicale. Merci aussi à **tous les membres de l'équipe « polyQs » : Yvon, Fabrice, Chantal, Alice, Karine** et **Agathie** travailler avec vous a été un plaisir.

Yvon, merci de m'avoir accueilli dans ton équipe, et de m'avoir fait confiance en me confiant ce projet ambitieux et passionnant. Ta participation à l'écriture des demandes de financement et ton implication pour que j'obtienne la bourse du ministère m'ont été d'une grande aide. Tu as suivi mon projet avec un recul que je ne pouvais avoir, et tu as toujours laissé la porte de ton bureau ouverte pour que je puisse venir discuter avec toi, détails que j'ai toujours appréciés. Enfin, tu as su nous faire partager ta passion de la randonnée et du ski en organisant des w-e en équipe, qui ont été à chaque fois un grand succès !

Fabrice, tu as initié ce projet et m'a suivi tout au long de ma progression « exponentielle ». Ce travail n'aurais jamais été aussi abouti si tu ne t'étais pas autant investi, et n'avais pas autant gribouillé des idées farfelues (et illisibles) sur de multiples bouts de brouillons. Tu as été celui qui m'a initié aux techniques comme en me plaçant « the broken bone in my hand ». Enfin tu ne m'as jamais considéré comme un robot même qui rêve... Tu as été mon guide dans cette expérience de thèse mais tu es surtout devenu un ami. MERCI.

Chantal, si moi je suis le ying, toi tu es le yang. Discuter de nos différents points de vue m'ont beaucoup apporté et je pourrais dire m'ont même fait évoluer, et le Monsieur PLUS que j'étais en arrivant dans l'équipe est devenu un peu plus nuancé ! Merci. Je pense souvent à toi en me disant Ahhh... si Chanchan me voyait : elle serait fière de moi ;) Tu as été comme le renard dans « le petit prince » méfiante et distante au début : il a fallu t'apprivoiser, mais maintenant ça va être dur de ne plus passer autant de temps avec toi...

Alice notre perle du Liban, qu'est ce que tu m'as fait rire... Ah, ha, aha il faudra que tu me réexpliques les nuances ;) Tu as contribué à la bonne ambiance de l'équipe, pour ça je te remercie BEAUCOUP : ne changes pas !

Karine, nos interactions ont toujours été agréables et nos discussions scientifiques enrichissantes.

Nos stagiaires du labo :

Camille, tu as été celle qui m'a donnée l'envie d'encadrer un stagiaire : curieuse, motivée et dynamique, comment être déprimé à tes côtés ? Tu as été un vent de fraîcheur dans une période difficile : MERCI !

Hubert, Ahhh cousin Hub... Mon vrai stagiaire à moi tout seul lol... Comment te dire à quel point tu m'as aidé ? Ben il te suffit de lire ma thèse... Tu verras que le moment où tu es arrivé a été un moment charnière pour mon projet, où tout s'est débloqué et où le temps manque pour tout finir... (Même si tu trouvais que tout ratait, pour moi ça n'avait jamais aussi bien fonctionné...). Tu as été un stagiaire plus que brillant et tu es voué à un avenir prometteur dans la recherche : continues comme ça !

« La pierre n'a point d'espoir d'être autre chose que pierre. Mais de collaborer, elle s'assemble et devient temple », **Saint-Exupéry**.

Ce travail n'aurait pas été réalisable sans l'implication de plateformes scientifiques, et de l'aide de collaborateurs :

Katrin, pour la qualité de notre collaboration, et les échanges toujours agréables que nous avons entretenus.

Plateforme « Biacore », **Danièle**, **Mireille**, **Laurence**, **Aletia** et **Gabrielle**, qui m'ont fait découvrir la SPR, dans une ambiance idéale : votre aide et votre bonne humeur m'ont été très précieuses !

Clonage plateforme GW du CEBGS avec **Didier B.** et ces précieux vecteurs et **Edouard pour ces conseils** et ses protocoles bien utiles.

Les services communs de l'IGBMC, **Isabelle** du service « baculovirus », **Betty** du service de culture cellulaire, **Pascal** qui m'a fourni de petits peptides bien utiles, **Serge** et son séquençage d'ADN, **Jean-Marie** pour ces précieux conseils sur les clonages.

Maïté, notre fée de l'impression, pour ton aide dans nos moments les plus stressants : quand on arrive à l'impression des demandes de financements, des rapports ou de la thèse, on est à bout. Tes sourires et ton efficacité rendent ces moments presque agréables... Merci aussi pour tous les articles que tu m'as trouvé pour écrire ce manuscrit ! Et à **Hélène** ton acolyte.

Olga, pour ta relecture du manuscrit, pour nos délires et ta générosité.

Thom, pour tes conseils d'écriture, et tous les bon repas partagés ensemble à philosopher sur l'avenir...

Cette expérience à l'IGBMC m'a permis de côtoyer des gens d'exception et je voudrais leur dédier les quelques lignes qui suivent...

Myriam, Ahhhh Myriam... Même en ayant quitté le labo tu es toujours présente. Tu es devenue mon âme sœur durant cette thiiise... Qu'aurait-elle été sans toi, je n'ose l'imaginer... Notre amitié à traversé ta thèse, ma thèse et continuera de longues années, alors ce n'est pas dans ces quelques lignes que je pourrais te remercier assez pour tout ce que tu m'as apporté et m'apportes encore aujourd'hui...

Stéphane, un extra terrestre tellement humain... Tu as été là dès le début, et nos interactions n'ont jamais été aberrantes... Ce que tu as fait pour moi je ne l'oublierai jamais, car il est rare de voir autant de générosité chez quelqu'un ! Comme un funambule tu traverses la vie et tends la main pour que les autres ne tombent pas : MERCI ! **Charlotte**, ta bonne humeur tes rires et ton soutien, tu ramènes toujours de la joie autour de toi... Ne changes pas !

François, tous ces moments partagés, ces passions et ces vices m'ont aidé à franchir les étapes difficiles et à terminer cette thèse comme la fin d'un La Chapelle 91... Merci pour toutes ces soirées passées ensembles, ces cafés, ces discussions, ces soirées films... Je suis sûr qu'après les moments partagés on n'est pas près de se perdre de vue alors j'aurai l'occasion de te remercier à moult reprise mon petit bountarr... **Malika** ta bonne humeur, ton dynamisme et tes conseils pour le futur mais surtout ta grande gentillesse ont été à chaque fois comme une caresse (t'as vu ça rime....)

Fredo, quel chemin tu as parcouru depuis l'époque où on t'a surnommé « la gamine » : je dois bien l'avouer tu n'as plus rien d'une gamine ;) Tu es l'une des personnes qui me manquera le plus à l'IGBMC, ne change pas grimpe au sommet de ta pyramide et n'oublies pas ton cavalier... **Pierre** merci pour toutes ces bonnes soirées, et de t'occuper si bien d'une personne qui m'est chère !

Guillaume notre chasseur du labo... Tous les moments passés ensemble autour d'un café et nos discussions sur l'avenir. Mais aussi les soirées, notre tour de France MINI *versus* SAAB, nos trips « jour de l'an »...

La **blonde**, tu es la personne qui m'a mis de bonne humeur en arrivant tout les matins. Tu respirez le bonheur, et la joie... ne changes surtout pas !

Gretta, ou plutôt Grrreeeeet'Aaaaa la première polyQ et Libanaise que j'ai rencontré! Tu es partie vite mais tu as quand même eu le temps de me montrer ta générosité. A bientôt au Liban ☺

Je voudrais aussi remercier ceux qui ont amené de la bonne humeur au quotidien et qui ont tout fait pour que ma thèse se passe dans les meilleures conditions :

Evelyne (pour son sourire communicatif), **Astrid** (pour ses conseils), **Karim** (pour nos nombreuses discussions et pour être une personne sur qui l'on peut compter !), **Anne-Sophie** (et sa gentillesse dès le premier jour, ainsi que son aide et sa générosité gratuite), **Eric**, **Solange** et **Laurence** (pour leur aide technique et leur disponibilité), **Fanny** (pour son aide administrative), **Karine C.** (pour qu'on soit dans un milieu idéal), **Youry** (pour son aide informatique et ses talents de HACKER), **Nathalie et Gaétan** (pour leurs conseils et leurs bonnes humeurs), **Christine** (Alias Kimberly Clark, pour les délires fb), **Aileen Bar** (pour sa contribution à trouver des articles introuvables), **Lama** (pour sa gentillesse ses souRyR et ses conseils), **Joelle** (pour toutes les bonnes soirées passées ensemble), **Didier D.** (et nos discussions pendant les pauses), **Florent** (pour mettre un brun de plus de folie dans le labo), **Alain** (et ses conseils dignes d'un grand sage), **Mel** (pour ses talents d'artiste et son soutien), **Mac Carthy** (parce que ça a toujours été un havre de paix).

Sophie, tu as été ma première amiE, sur Strasbourg, comment ne pas te remercier pour m'avoir guidé dans cette ville et au cours de mes premiers pas. Nos fous rires et nos délires me manqueront...

Edwina, pour ces moments partagés, et ton implication dans les activités doctorales qui m'ont motivé plus d'une fois !

Delphine, malgré la distance tu es restée présente et ce n'est pas grâce à moi et à mon amour du téléphone... Tu m'as soutenu pendant la rédaction, aidé et conseillé sur de nombreux aspects, merci pour tout, tu es une véritable amie !

Mitsoo, on dit qu'on garde toujours le meilleur pour la fin... Tu es celle qui m'a appris que « quand on aime on ne compte pas », et tu me l'as bien démontré ! Rien ne sert de détailler : toutes les raisons pour lesquelles je devrais te remercier ne tiendront pas en une page... Merci pour tout !

Enfin je remercie mes **parents**, pour m'avoir soutenu dans ces études et avoir su rester à l'écoute dans les moments difficiles... Mais aussi **Johanne** pour m'avoir aidé à relativiser mes « petits » problèmes de la thèse face aux valeurs de la vie... Et **Karen** qui a été la première à être docteur de la famille, et qui par sa passion m'a donné l'envie de faire une thèse en me montrant la voie.

Résumé

Les maladies à Polyglutamines (polyQ)

La maladie de Huntington (MH) fait partie d'un groupe de 9 maladies neurodégénératives héréditaires et dominantes. Dans chacune de ces maladies, le gène porteur de la mutation code pour une protéine différente, cependant une mutation commune affecte ces protéines. En effet, les gènes impliqués dans ces maladies possèdent tous une séquence trinuécléotidique répétée (CAG)_n qui code pour un homopolymère de glutamines (polyglutamine ou polyQ) dans les protéines concernées. Cette séquence est de nature polymorphique dans la population normale. Cependant lorsque la répétition excède une certaine taille cette séquence mutée confère des propriétés toxiques à la protéine porteuse.

Points communs des maladies à polyQ

La mutation étant semblable dans ces protéines, il est logique d'observer des similarités cliniques vraisemblablement conférées par des mécanismes physiopathologiques communs. En effet, les maladies à expansion de polyQ sont toutes des affections neurodégénératives qui se déclarent dans la majorité des cas à l'âge adulte. D'autre part, plus l'expansion est grande, plus la toxicité est importante et plus les symptômes sont sévères et précoces. Enfin, des accumulations d'agrégats protéiques de type amyloïdes dans les neurones de patients sont observées dans la plupart de ces maladies. Les protéines mutantes ou des fragments de protéolyse comprenant la polyQ s'agrègent dans la cellule. La caractérisation *in vitro* de ce processus suggère un mécanisme progressif de formation d'oligomères solubles, précédant la formation d'agrégats fibrillaires insolubles. La toxicité des différentes entités générées semble variable, et il est actuellement admis que les oligomères solubles sont les plus toxiques. Un rôle protecteur des agrégats matures a également été proposé.

Quelles sont les mécanismes moléculaires expliquant le seuil toxique?

Il est remarquable d'observer qu'au dessous d'une certaine taille, les séquences de polyQ ne semblent pas conférer de propriété toxique à leur protéine porteuse, puisque la maladie ne se manifeste pas, alors qu'au-delà d'un certain seuil la maladie se déclare. Ce phénomène de seuil de toxicité, commun à toutes les maladies à polyQ, a été particulièrement étudié.

Un premier modèle dit de "seuil structural" propose que la séquence de polyQ n'adopte de façon stable une structure toxique qu'au-delà d'une certaine taille.

Cependant, notre laboratoire et d'autres équipes ont montré que les petits comme les longs polyQ ont des propriétés structurales très similaires. Notamment, les petits polyQ s'agrègent comme les longs. La principale différence observée concerne leur cinétique d'agrégation, qui est fortement influencée par la taille de la polyQ: plus l'expansion de polyQ est grande plus le polyQ s'agrège rapidement. Prenant en compte ces nouveaux résultats, notre équipe favorise un autre modèle expliquant le seuil de toxicité observé dans les maladies à polyQ, que nous nommons "modèle de seuil toxique contexte dépendant".

Ce modèle propose que la toxicité des polyQ augmente graduellement en fonction de leur taille, et que l'apparition du seuil de toxicité dépende de la taille de la polyQ et de son contexte protéique et cellulaire. Ainsi l'apparition d'un seuil apparent de toxicité découlerait à la fois d'une cinétique accrue d'agrégation de fragments de protéines mutantes en fonction de la taille de la polyQ et de l'incapacité croissante de la cellule à dégrader ces entités toxiques. La déclaration tardive des formes non-juvéniles de ces maladies pourrait donc résulter d'une accumulation lente de ces entités toxiques, combinée à une capacité cellulaire d'élimination progressivement réduite lors du processus naturel de vieillissement.

Les différences des maladies à polyQ

Malgré les nombreuses similarités des maladies à polyQ, il existe des différences notables. Certaines dérégulations cellulaires sont spécifiques à chacune des maladies et se traduisent par des atteintes neuronales différentes d'une maladie à l'autre. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les 9 protéines mutées dans ces maladies n'ont en commun que la polyQ. La localisation cellulaire, la taille, la fonction et les interacteurs, spécifiques à chacune des protéines porteuses, pourraient expliquer ces différences. Ainsi, en plus d'un mécanisme toxique commun à toutes les maladies à polyQ, des effets toxiques additionnels, dépendant de la fonction de la protéine porteuse de la mutation, permettraient d'expliquer les effets spécifiques propres à chaque maladie.

La maladie de Huntington (MH)

Durant ma thèse je me suis intéressé à comprendre plus particulièrement quels pourraient être les mécanismes moléculaires expliquant la spécificité d'atteinte neuronale d'une de ces

maladies à polyQ : la maladie de Huntington (MH). La MH est une maladie rare, qui affecte environ 1 individu sur 12 000 (près de 6 000 cas en France). Les patients présentent des signes cliniques progressifs, caractérisés par des troubles du comportement, parfois associés à un état dépressif, des mouvements involontaires de type choréique et une perte des fonctions cognitives, conduisant au décès 10 à 20 ans après la déclaration de la maladie. Ces symptômes sont principalement associés à une dégénérescence précoce et dramatique d'une zone des ganglions de la base : le striatum.

La huntingtine (Htt)

Le gène responsable de la MH a été cloné en 1993. Il couvre 180kb en position q16.3 du chromosome 4, contient 67 exons, et code pour une très grande protéine de 3142 acides aminés, nommée huntingtine (Htt). La séquence (CAG)*n* polymorphique, qui se trouve dans le premier exon du gène (Htt-exon1), varie entre 6 et 35 CAG dans la population normale. La MH se déclare si le seuil de toxicité, de 36 à 39 répétitions, est atteint ou dépassé. Cette mutation confère un gain de fonction toxique à la Htt. En effet, lors de la protéolyse naturelle de la Htt, sa partie amino-terminale (N-ter) correspondant à la partie codée par Htt-exon1 s'agrège et s'accumule. D'autre part, la Htt interagit avec un grand nombre de protéines et elle est considérée comme une plateforme d'interactions moléculaires qui participe à diverses fonctions cellulaires (endocytose, trafic vésiculaire, signalisation post-synaptique, homéostasie du calcium, régulation transcriptionnelle, ...).

Les dysinteractions de la Htt

Il a été proposé qu'une dérégulation de l'interactome de la htt puisse être responsable des spécificités de la MH faces aux autres maladies à polyQ. En effet, de nombreuses études suggèrent que la Htt mutante interagit de façon aberrante avec ses partenaires.

Ces interactions aberrantes - ou « dysinteractions » - de la protéine mutante avec ses partenaires naturels pourraient causer des dysfonctions cellulaires précédant la mort sélective des neurones, de façon spécifique à la MH. Par exemple, il a été récemment démontré que la Htt et son partenaire le mieux caractérisé, HAP1 (pour Huntingtin Associated Protein 1) interagissent de façon aberrante avec le récepteur aux inositols triphosphate (IP3R), un canal calcique du réticulum endoplasmique abondant dans le système nerveux central. Il est proposé que cette dysinteraction affecte l'activité du canal calcique

IP3R induisant un déséquilibre chronique du taux de calcium intracellulaire. Les neurones épineux, composant les 95% du striatum, pourraient être plus sensibles à ces dérégulations de l'homéostasie du calcium. La dysinteraction Htt/HAP1/IP3R pourrait donc contribuer à la dégénérescence spécifique du striatum dans la MH.

Les mécanismes moléculaires responsables des dysinteractions de la Htt

Le fait que la Htt mutée interagisse de façon aberrante avec ses partenaires constitue une hypothèse très séduisante qui pourrait expliquer les mécanismes pathologiques spécifiques impliqués dans la MH. Cependant, le mécanisme moléculaire de ces dysinteractions n'a jamais été étudié. Il a été proposé, sans toutefois le démontrer, que la Htt mutante adopte une conformation structurale particulière qui participerait aux dysinteractions observées. Cette hypothèse de changement conformationnel de la polyQ étendue fait écho au modèle de "seuil structural" mentionné précédemment.

Cependant, les travaux de notre laboratoire ne supportent pas ce modèle, et démontrent au contraire que des polyQ de taille pathologique et non-pathologique ont des propriétés structurales très proches. D'autre part, les dysinteractions publiées de la Htt ont été étudiées au moyen de techniques peu quantitatives (pull-down, immuno-précipitation, double hybride chez la levure), dans des conditions où le processus d'agrégation de la Htt mutante n'a pas été contrôlé. Or, il est connu que la surexpression de protéines porteuses de polyQ mutantes génère des agrégats, lesquels peuvent influencer voire séquestrer non seulement des protéines endogènes, mais également la Htt.

Dans ce contexte, il paraît difficile d'exclure que la présence d'agrégats de polyQ n'aient pu influencer les résultats d'expériences de type double hybride (Y2H), pull-down (PD) ou immunoprécipitation (IP).

Mon travail de thèse

L'objectif principal de mon travail de thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires responsables des dysinteractions de la Htt mutante, dans des conditions où le processus d'agrégation est strictement contrôlé.

Etude des dysinteractions en absence d'agrégation.

Dans des conditions où l'absence d'agrégation est strictement contrôlée, j'ai étudié pour la première fois au moyen d'une technique biophysique dédiée : la Résonance Plasmonique de Surface (SPR), l'affinité de fragments N-ter de la Htt, portant des polyQ de tailles variables (non-pathogénique et pathogénique), pour deux partenaires:

(1) l'endophiline-3 (SH3GI3), une protéine impliquée dans l'endocytose, qui reconnaît une séquence riche en prolines (PRD) immédiatement adjacente au polyQ, et dont l'interaction est rapportée renforcée avec la Htt mutante (Sittler et al., 1998)

(2) un anticorps monoclonal généré au laboratoire (2B4) qui reconnaît la même séquence PRD de la Htt, et qui constitue un interacteur modèle de la Htt

Chacune des protéines utilisées, y compris les fragments de Htt de tailles de polyQ variables, a été exprimée de façon recombinante chez la bactérie, purifiée et caractérisée par diverses méthodes (par exemple : SDS-PAGE, Western blot, Gel filtration, mass spectrométrie, etc), permettant de s'assurer de l'état de pureté et de l'absence d'agrégats au moment de l'expérience.

Les résultats que j'ai obtenus par SPR démontrent qu'en absence d'agrégation l'affinité de ce fragment de Htt pour ces deux partenaires est indépendante de la taille de la polyQ.

Ces résultats démontrent que, dans le contexte de la Htt soluble, la polyQ n'interfère pas avec les interactions étudiées. A la suite de ces résultats, j'ai vérifié dans quelle mesure la présence d'agrégats de l'exon 1 de la Htt pouvait perturber le comportement de ces interacteurs modèles.

Influence du processus d'agrégation de la Htt sur ses partenaires

L'expression de fragments mutés de Htt dans de nombreux systèmes cellulaires résulte en l'accumulation d'agrégats contenant la polyQ mutante. L'absence de dysinteraction observée en absence d'agrégation nous a amenés à émettre l'hypothèse que la présence d'agrégats pourrait affecter le comportement des partenaires de la Htt. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai généré une agrégation contrôlée de l'exon 1 de la Htt, et suivi l'influence de ces agrégats sur la solubilité des partenaires de la Htt. J'ai pu montrer que la présence d'agrégats d'exon-1 de la Htt modifiait fortement le comportement de ses interacteurs, qui sont recrutés dans la phase insoluble. De plus, j'ai pu également démontrer que ce recrutement est spécifique, puisqu'il dépend de l'interaction spécifique avec le PRD de la Htt.

Un modèle moléculaire expliquant les dysinteractions Htt-partenaires

Lors de ma thèse, j'ai pu pour la première fois quantifier de façon fiable l'affinité de la Htt pour certains partenaires, au moyen d'une technique dédiée: la SPR. Mes résultats démontrent que, dans un système où l'absence d'agrégation est strictement contrôlée, la taille de la polyQ de la Htt n'influence pas ses interactions. Ces résultats remettent en question un modèle impliquant un changement conformationnel de la polyQ mutante. D'autre part, j'ai pu démontrer que la présence d'agrégats de Nter-Htt influence fortement le comportement de partenaires de la Nter-Htt. Dans leur ensemble, mes résultats permettent de proposer un nouveau mécanisme moléculaire où la présence d'agrégats de Nter-Htt expliquerait les dysinteractions de la Htt avec ses partenaires.

Rappelons en effet qu'*in-vivo* la Htt établit de nombreuses interactions avec ses partenaires pour accomplir des fonctions cellulaires essentielles. En parallèle, dans la cellule, le processus d'agrégation de la Htt mutante se produit après protéolyse de la Htt pleine longueur, générant ainsi des fragments N-ter qui contiennent l'expansion de polyQ, équivalents au fragment Htt-exon1 utilisé au cours de mon projet. La partie N-ter de la Htt, qui s'accumule sous forme de corps d'inclusions, contient en plus du polyQ un domaine adjacent riche en proline (PRD). Plusieurs partenaires de la Htt interagissent avec le PRD, et dans plusieurs cas il a été reporté que ces interactions avec la Htt mutante sont dérégulées.

Nous proposons que dans la cellule, les agrégats de la partie N-ter de la Htt - et notamment les intermédiaires de type oligomères, plus solubles et certainement plus mobiles que les agrégats matures - puissent perturber les interactions de la Htt. Ces agrégats pourraient notamment établir une interaction directe avec tout partenaire interagissant en condition normale avec la Nter-Htt, par exemple si le partenaire interagit avec le PRD. Ils pourraient également agir indirectement en séquestrant la Htt pleine longueur, l'empêchant ainsi de réaliser ses interactions normales et ses fonctions.

Ce modèle suggère qu'en modulant le phénomène général d'agrégation il est envisageable de corriger des dysinteractions pouvant avoir des conséquences toxiques spécifiques propres à la MH. Nous suggérons donc que le développement de drogues permettant de

contrôler l'agrégation pourrait permettre de minimiser les effets dysfonctionnels délétères qui découlent des dysinteractions spécifiques Htt-partenaires.

Etude d'un nouvel interacteur de la Htt

Un de mes projets annexes, en collaboration avec Dr. Katrin Lindenberg et Pr. Bernhard Landwehrmeyer (Universitätsklinik Ulm - Allemagne) a été de caractériser un nouvel interacteur potentiel de la Htt – le récepteur aux ryanodines (RyR), un canal calcique jouant un rôle crucial de contrôle de l'homéostasie du calcium.

Notre laboratoire a en effet identifié une importante homologie entre le domaine C-terminal (C-ter) d'IP3R responsable de son interaction avec HAP1 et le domaine C-ter de RyR. Rappelons que l'interaction aberrante de la Htt mutante avec HAP1 et IP3R pourrait être responsable des dérégulations localisées de l'homéostasie du calcium dans les neurones épineux du striatum. La forte homologie entre C-ter RyR et C-ter IP3R suggère que RyR pourrait également interagir avec la Htt via HAP1, et qu'une éventuelle dysinteraction Htt-HAP1-RyR pourrait également jouer un rôle dans la spécificité de la MH.

Durant ma thèse j'ai participé à la caractérisation de ce nouveau partenaire de la Htt. Ce projet a nécessité le clonage, l'expression et la purification de nombreux domaines de la Htt, de HAP1 et de RyR et IP3R. J'ai notamment pu démontrer par pull-down que le RyR interagit directement avec HAP1. La caractérisation de cette interaction, et l'étude de son éventuelle importance dans la maladie de Huntington, sont actuellement en cours dans le laboratoire de Katrin Lindenberg.

Sommaire

Liste des figures	1
Liste des tableaux	3
Abréviations	4
Introduction	6
1. La maladie de Huntington	6
1.1 Historique	6
1.2 Aspects cliniques	7
1.2.1 Symptômes moteurs	7
1.2.2 Symptômes cognitifs	8
1.2.3 Symptômes psychiatriques	8
1.2.4 Âge de déclaration de la maladie	8
1.2.5 Les causes de décès des patients	9
1.3 Les fonctions cérébrales altérées dans la MH	9
1.3.1 Les ganglions de la base	10
1.3.2 Les neurones du striatum	11
1.3.3 Neuropathologie de la MH	12
1.3.3.1 Dégénérescence striatale	13
1.3.3.2 La dégénérescence neuronale	14
1.3.3.3 Les autres régions de dégénérescence	16
1.4. Les bases moléculaires de la MH	17
1.4.1 Découverte du gène	17
1.4.2 La MH : une maladie génétique	17
2. La huntingtine	19
2.1 Les 17 premiers acides aminés de la Htt	20
2.2 La polyQ de la Htt	20
2.2.1 Evolution des polyQ	20
2.2.2 Fonction des polyQs	21
2.3 Le domaine riche en proline de la Htt	22
2.4 Les domaine HEATs de la Htt	22
2.5 La fonction de la huntingtine	23
2.5.1 Rôle de la huntingtine dans le développement	23
2.5.2 Dis-moi qui tu fréquentes, je te dirai qui tu es...	24
2.5.3 Rôle de la Htt dans le transport vésiculaire	27

3. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la MH	29
3.1 Les maladies à polyQ	29
3.2 Toxicité de l'expansion	31
3. Agrégation de la Htt mutée	32
3.3.1 Agrégats : entités toxiques ou protectrices ?	32
3.3.2 L'agrégation : un mécanisme dynamique et complexe	34
3.3.3 Différentes espèces avec une toxicité variable	36
3.3.4 Hypothèses sur les mécanismes de toxicité des agrégats	36
3.4 Les éléments influençant le processus d'agrégation	38
3.4.1 Effet de seuil	39
3.4.2 Le clivage de la Htt mutée	42
3.4.3 Modifications post-traductionnelles de la Htt et agrégation	44
3.4.4 Importance des séquences entourant la polyQ sur le processus d'agrégation	45
4. Corrélacion entre dysinteraction et dysfonction de la Htt	47
Résultats	55
1. Contexte de la recherche	55
2. Aspects méthodologiques : biologie moléculaire et biochimie	61
2.1 Le choix de la méthode de clonage : le système Gateway (GW)	61
2.2 Sélection des domaines	62
2.3 Construction d'une bibliothèque de vecteurs	63
2.4 Exemples d'analyse d'expression dans la bactérie	64
3. Étude de la polyQ dépendance des interactions	66
3.1 L'interaction de la Htt avec HAP1 est difficile à analyser en absence d'agrégation	66
3.2 SH3GL3 : un partenaire de choix pour étudier les dysinteractions de la Htt mutée	70
3.2.1 Les domaines d'interaction de la Htt avec SH3GL3	71
3.2.2 La technique de résonance plasmonique de surface (SPR)	76
3.2.3 Premiers tests d'interaction par SPR du domaine N-ter de la Htt portant des polyQs de taille variable avec des anticorps	76
3.2.4 Utilisation des protéines de fusion TRX-Htt-Qn	81
3.2.5 Tests d'interaction par SPR de TRX-Htt-Qn portant des polyQs de taille variable avec SH3 et SH3GL3	85

3.2.6 Tests d'interaction par ITC de TRX-Htt-Qn portant des polyQs de tailles variables avec SH3 et 2B4-Fab	86
3.2.7 Utilisation de nouvelles protéines de fusion MBP-Htt-Qn	88
3.2.8 Manuscrit provisoir	90
3.2.9 Caractérisation du clivage de la TRX-Htt-Q46	91
4. RyR : un nouvel interacteur de la Htt ayant un impact potentiel sur la pathogénèse de Huntington	94
4.1 Les domaines utilisés pour notre étude	96
4.2 Caractérisations biochimiques des domaines de l'étude	98
4.3 Identification d'un nouvel interacteur de HAP1	101
4.4 Optimisation du pull-down (en cours)	102
4.5 Utilisation d'autres systèmes d'expression que la bactérie	103
Discussion	105
1. Construction d'outils biologiques	106
1.1 Le clonage	106
1.2 La caractérisation des protéines recombinantes	107
2. Étude de la polyQ dépendance des interactions	108
2.1 Les difficultés rencontrées pour caractériser les interactions entre la Htt et HAP1 ou HIP1	110
2.2 Les interactions de la Htt avec ses partenaires ne sont pas influencées par la taille de la polyQ : la perturbation de l'interactome et de la fonction de la Htt est-elle liée à la présence d'agrégats d'exon 1 de la Htt mutée ?	111
2.2.1 L'interaction de deux partenaires interagissant avec le PRD de l'exon1 de la Htt ne sont pas influencées par la polyQ	112
2.2.2 L'interaction entre SH3GL3 et l'exon1 de la Htt n'est pas d'influencé par la taille de la polyQ	114
2.2.3 Un partenaire de la Htt est spécifiquement recruté dans des agrégats d'exon1 de la Htt	115
2.2.4 Un nouveau modèle expliquant les dysinteractions de la Htt mutée	117
3. Implication thérapeutique de mon étude	119
4. RyR, un nouveau partenaire de la Htt impliqué dans la régulation du calcium	121

Matériels et Méthodes	123
Bibliographie	132

Liste des figures

Figure 1 : Illustration représentant le jugement des sorcières dans le village de Salem	6
Figure 2 : Exemple de dessins réalisés à deux ans d'intervalle par le même patient.....	7
Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe frontale de cerveau indiquant les structures associées aux ganglions de la base	10
Figure 4 : Le striatum : noyau caudé et putamen.....	11
Figure 5 : Neurone épineux du striatum de taille moyenne.....	12
Figure 6 : L'atrophie striatale	13
Figure 7 : Caractéristiques des différents types cellulaires affectés dans la MH.....	15
Figure 8 : Représentation schématique de la corrélation entre l'âge de déclaration des premiers symptômes et la longueur des répétitions CAG dans la MH.....	18
Figure 9 : Représentation schématique des différents domaines de la Htt.....	19
Figure 10 : Evolution des domaines N-ter de la Htt (17 premiers a.a., polyQ et PRD).....	21
Figure 11 : Structures du motif et domaine HEAT.....	23
Figure 12 : La Htt est une protéine qui coordonne les différentes protéines motrices et leurs partenaires pour faciliter le transport des vésicules le long du cytosquelette.....	28
Figure 13 : Représentation schématique des différentes protéines contenant une expansion de polyQ	29
Figure 14 : Agrégats intranucléaires et cytoplasmiques visualisés par microscopie optique.....	32
Figure 15 : Les différents intermédiaires d'agrégations de l'exon 1 de la Htt visualisés <i>in vitro</i>	35
Figure 16 : Un seuil de toxicité variant selon les différentes maladies à polyQ.....	39
Figure 17 : Structure linéaire des polyQs en interaction avec un anticorps.....	41
Figure 18 : Modèle de seuil toxique dépendant du contexte cellulaire.....	42
Figure 19 : Sites de clivages protéolytiques identifiés au sein de la Htt.....	43
Figure 20 : Modèle illustrant comment les 17 premiers acides aminés de la Htt (Htt-NT) pourraient initier le processus d'agrégation	46
Figure 21 : Représentation schématique de l'activation de Rab11 dans des cellules contrôles et des cellules modèles de la MH : conséquences fonctionnelles sur l'homéostasie cellulaire.....	50
Figure 22 : Modèle d'excitotoxicité des neurones épineux du striatum, lié à des interactions aberrantes de la Htt mutée.....	53
Figure 23 : Méthodologie suivie pour réaliser les différents tests d'interactions de la Htt.....	60
Figure 24 : Principe du système de clonage GW	61
Figure 25 : Représentation schématique des domaines d'intérêt de la Htt et de ses partenaires.....	62
Figure 26 : Exemples d'analyse d'expression des protéines recombinantes pour HAP1 et la Htt.....	65

Figure 27 : Représentation schématique de l'interaction de HAP1 avec la Htt.....	67
Figure 28 : Exemple de caractérisation d'un domaine de HAP1.....	68
Figure 29 : Exemple de caractérisation d'un domaine de la Htt.....	69
Figure 30 : Représentation schématique de l'interaction de SH3GL3 avec la Htt.....	70
Figure 31 : Caractérisation biochimique en condition dénaturante de GST-Htt(12-80)-Qn.....	72
Figure 32 : Caractérisation biochimique avancée de GST-Htt(12-80)-Q24.....	73
Figure 33 : Caractérisation biochimique avancée de GST-Htt(12-80)-Q42.....	74
Figure 34 : Représentation schématique d'une étude d'interaction par SPR.....	77
Figure 35 : Profils d'interaction en SPR des anticorps 1C2et 2B4 sur GST-Htt(12-80)-Qn.....	78
Figure 36 : Cinétique d'interaction en SPR du Fab 1C2 sur GST-Htt(12-80)-Qn.....	78
Figure 37 : Cinétique d'interaction en SPR du Fab 2B4 sur GST-Htt(12-80)-Qn.....	79
Figure 38 : Test de purification des protéines de fusion TRX-Htt-Qn.....	82
Figure 39 : Caractérisation en conditions dénaturantes des protéines de fusion TRX-Htt-Qn.....	83
Figure 40 : Caractérisation avancée des protéines de fusion TRX-Htt-Qn.....	84
Figure 41 : Test de congélation de TRX-Htt-Q46.....	85
Figure 42 : Profil ITC de l'interaction de 2B4-Fab avec TRX-Htt-Q16.....	87
Figure 43 : Caractérisation des protéines MBP-Htt-Qn après sonication.....	89
Figure 44 : Analyses des fragments solubles de TRX-Htt-Q46 après différent temps de protéolyse avec l'entérokinase.....	92
Figure 45 : Analyses ESI-TOF de l'agrégat de TRX-Htt-Q46 après clivage à l'entérokinase.....	93
Figure 46 : Alignement des domaines C-terminaux des IP3Rs et des RyRs.....	95
Figure 47 : Structure secondaire de deux sous-unités du tétramère RyR1 insérés dans la membrane du réticulum endoplasmique.....	95
Figure 48 : Construction des protéines de fusion HAP1, IP3R1 et RyR3.....	98
Figure 49 : Purification par affinité de MBP-IP3R1 et MBP-RyR3.....	98
Figure 50 : Caractérisation de MBP-IP3R1 et MBP-RyR3 en GF.....	99
Figure 51 : Test de congélation de MBP-IP3R1 et MBP-RyR3 en GF.....	100
Figure 52 : WB de MBP-HAP1 (143-619).....	100
Figure 53 : Identification d'une nouvelle interaction entre RyR3 et HAP1.....	101
Figure 54 : Caractérisation de GST-HAP1(143-619) exprimée dans les cellules d'insecte.....	103
Figure 55 : Caractérisation de GST-HAP1(307-425) exprimée dans les cellules d'insecte.....	104
Figure 56 : Modèle permettant d'expliquer les dysinteractions de la Htt dans la MH.....	118
Figure 57 : Exemple d'amorces utilisées pour le processus d'amplification précédent le clonage GW.....	124
Figure 58 : Principe des réactions BP et LR.....	126

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les interacteurs de la Htt et leur fonction cellulaire	26
Tableau 2 : Protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle et interagissant avec la Htt	48
Tableau 3 : Liste des clones GW générés pour RyR3, IP3R1, HAP1, HIP1, SH3GL3 et Htt.....	63

Abréviations

A.a. : acides aminés	FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy
AAV : Adeno-Associated Virus	FF : colonne Fast flow
A β : peptide amyloïde β	Fmol : fico-mole
Akt : Serine/threonine protein kinase	GABA : Acide γ -aminobutyrique
AR : Androgen Receptor	GF : Gel Filtration
ADN : Acide désoxyribonucléique	GFP : Green Fluorescent Protein
ADNc : ADN complémentaire	GPe : globus pallidus externe
AFM : Atomic Force Microscopy	GPi : globus pallidus interne
AMPA : acide Amino-Methyl-Phosphonique	GST : Glutathion-S-Transferase
Alpha	GW : Gateway
ARNi : ARN interference	HAP1 : Huntingtin-Associated Protein 1
Att : séquence de recombinaison GW	HDAC : histone deacetylase
BET : Bromure d'Ethyidium	HEAT : Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A, TOR1
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor	HF : High fidelity
BSA : Bovine Serum Albumin	HIP1 : Huntingtin Interacting Protein 1
CA150/ TCERG1 : transcription elongation regulator 1	HIP12 : Huntingtin Interacting Protein 12
CACAN1A : CALcium Channel Alpha-1A	HIP14 : Huntingtin Interacting Protein 14
CaCl ₂ : Di-chlorure de Calcium	Hippi : HIP1 protein interactor
CBP : cAMP response element Binding Protein	His : Histidine
Cdk-5 : Cyclin-dependent kinase-5	Hprt : Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
CI : Inclusions cytoplasmiques	HSP40 : Heat-Shock Protein 40
Cyt c : Cytochrome c	HSP70 : Heat-Shock Protein 70
D1 : récepteur dopaminergique de type 1	Htt : Huntingtine
D2 : récepteur dopaminergique de type 2	HYPA/FBP11 : Hydrogenase Accessory Protein type A
DARPP-32 : Dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein-32	IHC : immuno-histo-chimie
D.O : Densité Optique	IP : Immunoprécipitation
DMSO : Di-Méthyle-Sulfoxyde	IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
dNTP : DésoxyNucléotide TriPhosphate	INI : Inclusions intranucléaires
DRPLA : Dentato-Rubral-Pallido-Luysian Atrophy	InsP ₃ : Inositol triphosphate
DTT : Dithiothreitol	InsP ₃ R : Inositol 1,4,5-triphosphate receptor
E. coli : Escherichia coli	IP3R : récepteur aux inositols tri-phosphate
EDTA : Ethylenediaminetetracetic	IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
EM : Electronic microscopy	IT15 : Interesting Transcript 15
Enk: Entérokinase	ITC : Titration Calorimétrique Isotherme
ES : Extrait Soluble	K : lysine
ET : Extraits Totaux	KCl : Chlorure de Potassium
Fab: Fragment antibody / fragment d'anticorps	kDa: Kilo Dalton
FC: Flow Channel / canal d'écoulement	L.B : Lennox L Broth Base
	LB : Corps de Lewy

MBP : Maltose Binding Protein	RU : Relative Unit
Min : Minute	RyR : Récepteur au ryanodine
mGluR5 : metabotropic Glutamate Receptor 5	SBMA : Spino-Bulbar Muscular Atrophy
MH : Maladie de Huntington	SCA : Spino-Cerebellar Ataxia
MnCl ₂ : Di-chlorure deMagnésium	SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
MS : Mass-Spectrometric	Sec : Seconde
MSN : Medium Spiny Neuron	SGC : Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	SH3 : Src homology 3
NaOH : Hydroxyde de sodium	SH3GL3 : SH3-containing Grb2-like protein / endophiline 3
NES : Nuclear Export Signal	SLA : Sclérose latérale amyotrophique
NFκB : Nuclear Factor κB	SN : Substance noire
NLS : Nuclear localisation signal	SNc : Substance noire compacte
NMDA : N-Methyl-D-Aspartate	SOD2 : Mn-superoxyde dismutase
NMDAR : récepteur NMDA	SP1 : Specificity Protein-1
N-ter : N-terminale	SPR : Résonance plasmonique de surface
PACSIN1 : Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	STN : nucleus sous-thalamique
PAGE : Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis	SUMO : Small Ubiquitin-like MODifiers
pb : paire de base	TAE : Tris Acetate EDTA
P/CAF : p300/CBP-associated factor	TAF : TBP-Associated Factor
PCR : polymerase Chain reaction	TAFII130 : TBP-Associated Factor II130
PD : Pull-Down	TBP : TATA box Binding Protein
PGC-1α : PPAR Gamma Coactivator 1α	TBS : Tris Buffer Saline
PKA : Proteine Kinase A	TBS-T : TBS + 0,1% Tween 20
PolyQ : Polyglutamine	TEP: Tomographie par émission de positron
PolyP : Polyproline	TEV : Tobacco etch virus
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	Thr : thréonine
PRD : Prolin-rich domain	Tm : Melting temperature
PSD95 : PostSynaptic Density 95	TM : domaine transmembranaire
Q : Glutamine	UPS : Ubiquitin-Proteasome System
RasGAP : Ras GTPase-activating protein	U.V. : Ultra-violet
RE : Réticulum Endoplasmique	VBM : Voxel-based morphometry
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire	WT : Wild type
	Y2H : Yeast Two Hybrid

1. La maladie de Huntington

1.1 Historique

Au moyen âge, la chorée de Huntington fut connue sous le terme « danse de Saint Guy », bien que ce terme générique définisse plusieurs types de chorée (du grec « khoreia » signifiant la danse). Lorsqu'éclata en Allemagne une épidémie de peste noire, la population affaiblie subit une épidémie infectieuse caractérisée par des symptômes choréiques. La peur des maladies s'intensifiant, Saint-Guy qui était connu pour avoir guéri un malade atteint de chorée, devint alors le recours des malades, et l'affection prit le nom de « danse de Saint Guy ».

George Huntington fût un pionnier dans le domaine puisqu'il fût le premier à distinguer les patients atteints de chorée infectieuse de ceux atteints d'une maladie héréditaire. En 1872, basé sur son travail, celui de son père et de son grand père, il établit une description précise de cette maladie génétique. Il donnera son nom à cette affection : maladie de Huntington (MH).

L'étude de la généalogie des patients MH, permis de remonter jusqu'en 1630 où deux frères originaires du Suffolk (Sud-est de l'Angleterre) semblaient présenter des symptômes choréiques. Établissant également que certains de leurs ancêtres avaient habité Salem, petit village du Massachusetts, célèbre pour le terrible procès qui condamna un grand nombre de sorcières. Il est difficile de s'empêcher de penser que certaines personnes condamnées pour être possédées par le diable n'étaient en définitif que des malades (**Figure 1**).

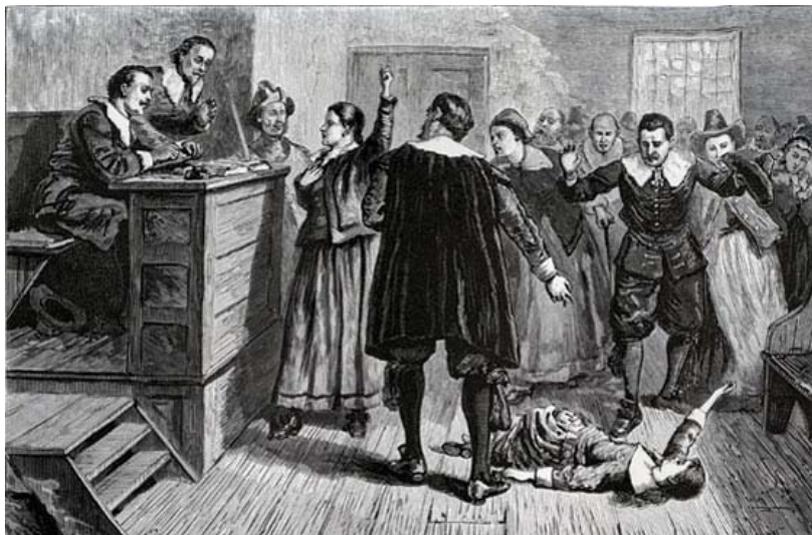


Figure 1 : Illustration représentant le jugement des sorcières dans le village de Salem. Tiré du livre de Samuel Walker, 1876.

En 1983, Nancy Wexler et Jim Gusella identifiaient le bras court du chromosome 4 comme porteur du gène associé à la MH (Gusella et al., 1983). Mais ce n'est que 10 ans plus tard, en 1993, que le gène et la mutation responsables de la pathologie seront précisément identifiés (HD Research Collaborative Group (1993)).

1.2 Aspects cliniques

La MH est l'une des rares maladies héréditaires qui se déclare, dans la majorité des cas, à l'âge adulte. Les symptômes sont classiquement classés en trois catégories : moteurs, cognitifs et psychiatriques. Cette maladie est évolutive : les symptômes s'aggravent avec le vieillissement, conduisant inexorablement à la mort du patient 15 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes moteurs. Cependant, suivant la mutation et les facteurs environnementaux, l'âge de déclaration et l'évolution de la maladie varient.

1.2.1 Symptômes moteurs

Les déficits moteurs sont les premiers symptômes cliniques, et sont utilisés pour établir l'âge de déclaration de la maladie. Aux premiers stades de la maladie, ceux-ci se manifestent par des troubles oculomoteurs subtils et des maladresses. Ces troubles s'intensifient au cours de l'évolution de la MH et se traduisent par des troubles de la déglutition (dysphagie), des difficultés à articuler, un manque général de coordination (**Figure 2**), des mouvements de types choréiformes (mouvements incontrôlés, désordonnés, saccadés) avec une démarche instable et des troubles de l'équilibre. Aux stades avancés, la rigidité et la perte du tonus musculaire (bradykinésie) entraînent une diminution des aptitudes physiques générales, privant le patient MH de son autonomie motrice (Sanchez-Pernaute et al., 2000).

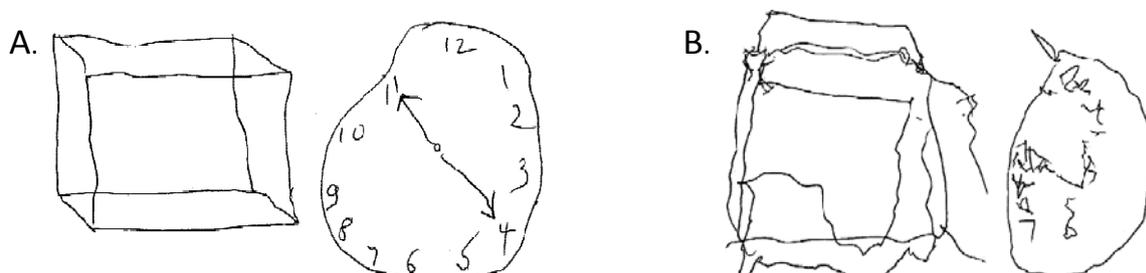


Figure 2 : Exemple de dessins réalisés à deux ans d'intervalle par le même patient. A/ Le patient a réalisé les dessins demandés de façon relativement correcte : un cube et un pendule. B/ Deux ans plus tard, le cube n'a plus de relief et la pendule n'est pas reconnaissable : ceci traduit une extrême incoordination (Georgiou et al., 1999).

1.2.2 Symptômes cognitifs

Chez les patients encore asymptomatiques, le déclin cognitif précède l'âge de déclaration de la maladie (identifié après diagnostic des déficits moteurs). Un déclin des fonctions exécutives est notamment observé, qui concerne principalement une diminution des capacités d'inhibition et ceci en absence de symptomatologie motrice (Hahn-Barma et al., 1998). Dès les stades précoces de la maladie, les troubles des fonctions exécutives ont un impact dans la vie quotidienne des patients, avec des difficultés à organiser (planifier) leurs activités et à s'adapter aux changements et aux événements imprévus. Avec la progression de la maladie, ces déficits s'étendent progressivement aux fonctions mnésiques, attentionnelles (concentration) et d'apprentissages (Lemiere et al., 2004). Le dépistage précoce des déficits cognitifs chez les patients encore asymptomatiques représente actuellement un enjeu de santé publique majeur. En effet, leur mise en évidence permettrait une prise en charge plus précoce des patients et d'assurer un suivi avant la déclaration des premiers symptômes moteurs.

1.2.3 Symptômes psychiatriques

A l'inverse des symptômes moteurs et cognitifs, les troubles psychiatriques fluctuent et peuvent apparaître à n'importe quel moment pendant l'évolution de la maladie. Ainsi, les patients MH présentent par période des troubles du comportement caractérisés par une impulsivité, irritabilité, agressivité. Ces troubles s'accompagnent d'une apathie générale modifiant leur personnalité et rendant l'aide de leurs proches d'autant plus difficile. En parallèle, le taux de dépression chez les patients est deux fois plus élevé que dans la population générale (Paulsen et al., 2005). Cet état dépressif s'accompagne souvent d'anxiété et de troubles du sommeil, conduisant parfois au suicide.

1.2.4 Âge de déclaration de la maladie

L'âge de déclaration de la MH est fixé après diagnostic des premières déficiences de la motricité. Dans la grande majorité des cas, la MH est déclarée vers 35-50 ans et les patients décèdent une vingtaine d'années après. Cependant, il existe des formes juvéniles et des formes tardives de la MH qui comportent des différences cliniques et d'espérance de vie.

Les formes juvéniles de la MH

8 à 10% des patients MH présentent des symptômes qui se déclarent avant l'âge de 20 ans. La progression de la maladie est plus rapide : le décès survient une dizaine d'années après l'âge de déclaration de la maladie. Certains symptômes cliniques diffèrent de la forme classique de la MH. En effet, les patients déclarent une rigidité musculaire et une bradykinésie particulièrement précoces et l'absence fréquente de chorée est la différence la plus marquante. Ces patients sont également sujets à des crises d'épilepsie et des tremblements du tronc et des jambes (Nance and Myers, 2001). Enfin, la dégénérescence du cerveau est beaucoup plus importante et rapide que chez les patients MH classiques, suggérant l'existence de mécanismes pathologiques additionnels dans ces formes juvéniles de la maladie (Squitieri et al., 2006).

Les formes tardives de la MH

Dans un peu plus de 10% des cas, la MH se déclare après l'âge de 60 ans. Le processus pathologique de ces formes tardives évolue lentement et se traduit par des symptômes atténués par rapport aux formes communes de la MH. Les symptômes cognitifs et choréiques sont toujours présents, mais la dysphagie est moindre et les troubles psychiatriques parfois inexistantes.

1.2.5 Les causes de décès des patients

Les patients meurent de complications secondaires à la MH. En fin de vie, les patients MH sont très affaiblis et présentent une perte de poids extrême, malgré l'augmentation de leur prise d'alimentation (Trejo et al., 2004). Cet affaiblissement est la première cause de mortalité (> 50% des cas) et se traduit par des pneumonies ou autres troubles respiratoires. Les défaillances cardiaques et les maladies cardio-vasculaires constituent la deuxième cause de mortalité (20%). Enfin, certains décèdent d'étouffement (liés aux troubles de la déglutition), d'infections ou d'accidents (chutes).

1.3 Les fonctions cérébrales altérées dans la MH

Il n'est pas surprenant de constater qu'il existe une corrélation positive entre les symptômes observés chez le patient et les fonctions assurées par les régions du cerveau qui dégénèrent.

Une grande partie du cerveau est altérée au cours de la progression de la maladie. Cependant, la dégénérescence la plus importante et la plus rapide se produit au sein des ganglions de la base.

1.3.1 Les ganglions de la base

Les ganglions de la base sont formés d'un ensemble de structures nerveuses dont les principales sont le noyau caudé, le putamen et le globus pallidus. Par ailleurs, le noyau sous-thalamique, le noyau ventrolatéral du thalamus et la substance noire sont des structures étroitement associées aux fonctions des ganglions de la base (**Figure 3**).

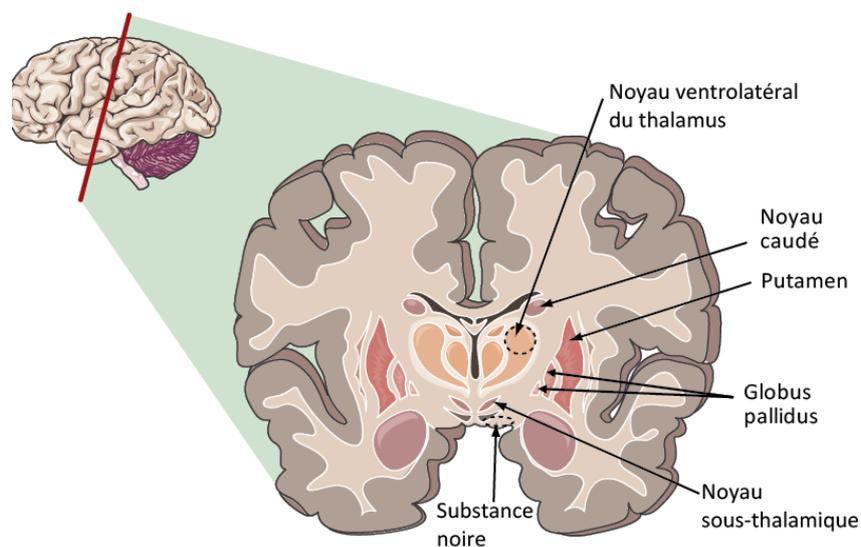


Figure 3 : Représentation schématique d'une coupe frontale de cerveau indiquant les structures associées aux ganglions de la base. Le noyau caudé, le putamen et le globus pallidus sont les structures principales des ganglions de la base. Le noyau sous-thalamique, le noyau ventrolatéral du thalamus et la substance noire sont quant à elles des structures étroitement associées à ses fonctions.

Ces structures reçoivent des informations en provenance de nombreuses régions du cortex cérébral, et notamment des aires frontales, préfrontales et pariétales. Ainsi, les informations d'origine corticale sont traitées au niveau d'une boucle impliquant les ganglions de la base, le thalamus, et le cortex cérébral en retour. La boucle motrice a pour fonction de focaliser les informations issues de diverses régions corticales sur l'aire du cortex moteur appropriée, autrement dit de sélectionner et déclencher les mouvements volontaires. Bien que la régulation de l'initiation des mouvements soit l'activité la plus connue des ganglions de la base, ceux-ci sont également au centre de boucles anatomiques qui modulent des aspects

non-moteurs des comportements : la boucle exécutive, oculomotrice et limbique. Ces boucles parallèles trouvent également leurs origines dans de nombreuses régions corticales. Elles comprennent des sous-structures spécifiques des ganglions de la base et du thalamus et se projettent dans le lobe frontal, hors des aires motrices et pré-motrices. La ressemblance anatomique entre les boucles non-motrices et la boucle motrice, laisse penser que les ganglions de la base exercent une fonction de régulation similaire pour les fonctions non-motrices et l'initiation des mouvements. La boucle exécutive, par exemple, pourrait réguler le début et l'arrêt des processus cognitifs tels que la planification, la mémoire de travail et l'attention (Neuroscience et cognition, 3eme édition, 2005).

Au sein des ganglions de la base, le noyau caudé et le putamen forment une structure nerveuse appelée striatum (**Figure 4**). Noyau caudé et putamen sont traversés par des axones myélinisés. Ces faisceaux de substance blanche forment des stries qui se démarquent de la substance grise des noyaux qu'ils traversent, d'où leur nom de *corpus striatum*. Le striatum est impliqué dans l'exécution du mouvement volontaire.

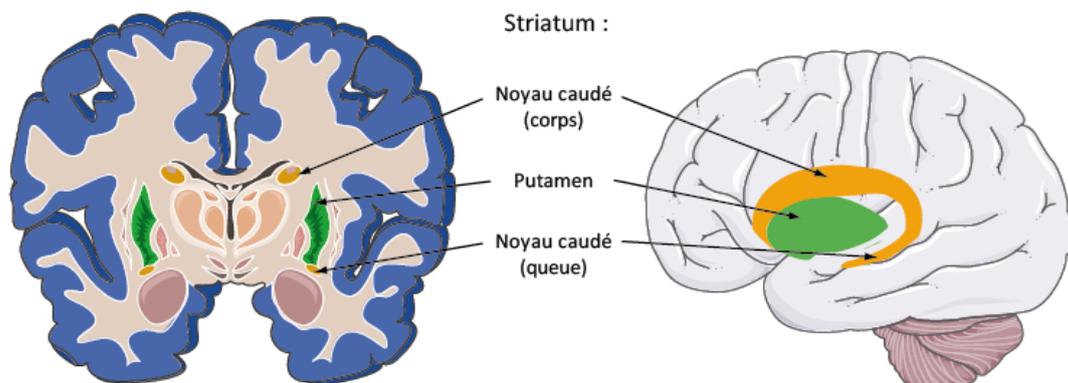


Figure 4 : Le striatum : noyau caudé et putamen. Le noyau caudé est représenté en orange et le putamen en vert sur une coupe frontale (à gauche) et une coupe latérale (à droite) de cerveau.

1.3.2 Les neurones du striatum

Les neurones afférents vers le striatum proviennent du cortex et contiennent un acide aminé (a.a.) excitateur : le glutamate. Les neurones du striatum reçoivent d'importants afflux de glutamate. Ils régulent ainsi les signaux provenant du cortex pour les redistribuer dans les zones corticales de projection appropriées. Par ailleurs, les neurones dopaminergiques en provenance de la substance noire se projettent également vers le striatum, où ils facilitent l'initiation des mouvements volontaires.

Les neurones épineux

90 à 95% de la population des neurones du striatum est composée de neurones épineux de taille moyenne (**Medium Spiny Neuron : MSN**), reconnaissables par leur nombreuses épines dendritiques et leur axone long (**Figure 5**).



Figure 5 : Neurone épineux du striatum de taille moyenne.
(<http://www.usc.edu/dept/gero/faculty/Walsh/neuron.jpg>)

Ils ont pour neurotransmetteur principal le GABA (acide γ -aminobutyrique) et comme co-transmetteur la Met-enképhaline, la dynorphine ou encore la substance P.

Les interneurones

Les interneurones striataux constituent 5 à 10% de la population neuronale du striatum. Ils diffèrent des neurones épineux par l'absence d'épines dendritiques et la présence d'un axone court en connexion avec des dendrites d'autres neurones.

Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales de forme étoilée représentant moins de 1% des neurones du striatum. Ces derniers jouent un rôle dans la propagation du signal nerveux en agissant sur la dispersion des neurotransmetteurs. De plus, ils agissent sur la recapture des différents neurotransmetteurs, influant ainsi sur l'intensité et la durée d'un signal nerveux.

1.3.3 Neuropathologie de la MH

L'atrophie du cerveau chez les patients MH est complexe et apparait avant le diagnostic des premiers symptômes moteurs. Le processus neurodégénératif commence par la perte précoce et sélective des neurones épineux afférents du striatum (Vonsattel et al., 1985). Avec la progression de la maladie, d'autres régions du cerveau comme le cortex, le thalamus, le noyau subthalamique ainsi que la matière blanche dégénèrent (Fennema-Notestine et al., 2004; Rosas et al., 2006). De plus, tous les neurones ne dégénèrent pas mais certains d'entre eux sont dysfonctionnels.

1.3.3.1 Dégénérescence striatale

Classification de la gravité de la MH

Le processus pathologique de la MH conduit à l'atrophie du striatum qui s'accompagne d'un élargissement des ventricules. Elle apparaît de façon précoce, avant même l'apparition des premiers symptômes. En 1985, Vonsattel et collaborateurs ont évalué l'atteinte striatale de 163 cerveaux de patients *post-mortem*. Cette étude a été réalisée d'après des critères macroscopiques et microscopiques pour établir une classification de la pathologie en 5 stades (de 0 à 4 par ordre croissant de gravité) (Vonsattel et al., 1985) (**Figure 6**). Le stade 0 correspond à une absence d'anomalie macroscopique et microscopique d'après examen histologique. Le stade 1 présente uniquement des anomalies microscopiques : perte neuronale de 50% dans la tête et la queue du noyau caudé. Au stade 2, une astrogliose (augmentation anormale du nombre d'astrocytes) est détectable parallèlement à la perte neuronale. L'atrophie du noyau caudé à ce stade adopte un aspect convexe du côté ventriculaire, qui devient droit dans le stade 3, puis concave dans le stade 4. Ce dernier est le stade le plus sévère avec 95% de perte des neurones du striatum (Vonsattel et al., 1985).

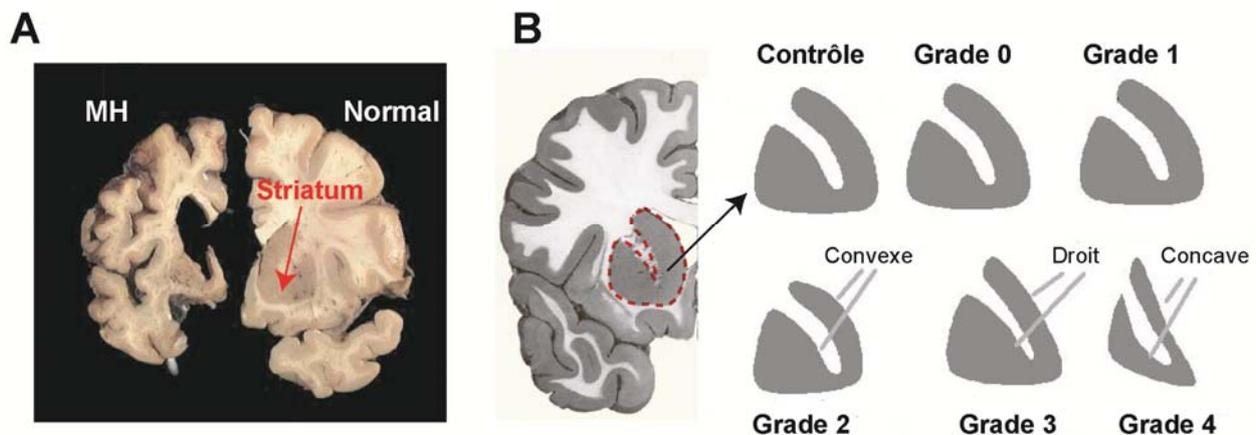


Figure 6 : L'atrophie striatale. A/ Coupes frontales de demi-cerveaux *post-mortem* d'un individu contrôlé (à droite) et d'un patient MH (à gauche). On peut observer une diminution globale de la taille du cerveau avec une atrophie très prononcée du striatum. A ce stade de la maladie, le cortex cérébral est également atrophié. **B/ Stades de l'atrophie cérébrale.** Le striatum (en pointillés rouges) s'atrophie progressivement au cours de la pathologie. Au stade 0, le diagnostic génétique est porté mais les lésions neuropathologiques ne sont pas apparentes ; au stade 1, les lésions sont seulement microscopiques ; au stade 2, l'atrophie débute mais la tête du noyau caudé bombe toujours dans le ventricule latéral ; au stade 3, le bord du noyau caudé est rectiligne ; au stade 4, il est concave et l'atrophie est maximale. D'après <http://hdroster.iu.edu/AboutHD> et <http://ist.inserm.fr/basisateliers>.

Corrélation entre les symptômes et les pertes neuronales

L'évolution importante des techniques d'imagerie médicale ces 30 dernières années a permis, pour chaque patient, de suivre la dégénérescence du cerveau au cours de l'évolution de la maladie. Une technique couramment utilisée est l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN), qui permet de déterminer la structure anatomique du cerveau (IRM anatomique), mais aussi d'en suivre le fonctionnement en mesurant les variations du débit sanguin cérébral (IRM fonctionnelle). Par ailleurs, la technique de tomographie par émission de positron (TEP) permet d'observer les changements du métabolisme du glucose. L'émergence de ces techniques ont permis d'établir les bases cérébrales des troubles associés à la MH. La première région du striatum à dégénérer semble être le noyau caudé (Harris et al., 1996). La dégénérescence de cette zone est corrélée avec l'apparition des premiers déficits cognitifs comme l'attention, la mémoire de travail et les fonctions exécutives. A des stades plus avancés de la pathologie, des analyses fonctionnelles (TEP) ont révélé que la dérégulation du métabolisme du glucose dans le noyau lenticulaire (élément du noyau caudé) est étroitement corrélée avec la sévérité des mouvements choréiques incontrôlés (Kuwert et al., 1990). Enfin, l'atrophie du putamen s'accompagne de déficits des réflexes moteurs diagnostiqués après examen neurologique (Harris et al., 1992).

L'IRM utilisée avec une technique récente d'analyse Voxel-Based Morphometry (VBM), permet de détecter de subtiles variations morphologiques au niveau du striatum mais aussi d'autres régions du cerveau, chez des patients encore asymptomatiques. La précision et la standardisation de ces techniques d'imagerie permettent d'envisager la possibilité de les utiliser comme biomarqueurs, lors d'essais cliniques, pour suivre la régénération ou la diminution de la dégénérescence du cerveau des patients (Squitieri et al., 2009; Stoffers et al., 2010).

1.3.3.2 La dégénérescence neuronale

Du stade 1 au stade 4 de la maladie, la perte neuronale du striatum passe de 50 à 95%. Une astrogliose est également observée en parallèle de cette dégénérescence (Vonsattel et al., 1985). A l'inverse, les interneurons sont épargnés. Les causes de cette dégénérescence précoce et sélective des neurones épineux du striatum sont très intrigantes et mal comprises. Cependant, quelques hypothèses ont été émises pour essayer de comprendre cette spécificité.

Morphologie et contenu biochimique des neurones

Les MSNs et les neurones du cortex qui sont les premiers affectés dans la MH, ont des projections axonales très longues, à l'inverse des interneurones (du striatum ou du cortex). Ces derniers sont majoritairement épargnés et possèdent des axones courts. Il a alors été proposé que ces différences, morphologiques et fonctionnelles, participent aux différences de vulnérabilité neuronale dans la MH (Cicchetti et al., 2000). De plus, le contenu biochimique (neuropeptides, neurotransmetteurs) de ces différentes populations neuronales pourrait également contribuer à la sélectivité de dégénérescence neuronale (Deng et al., 2004) (**Figure 7**).

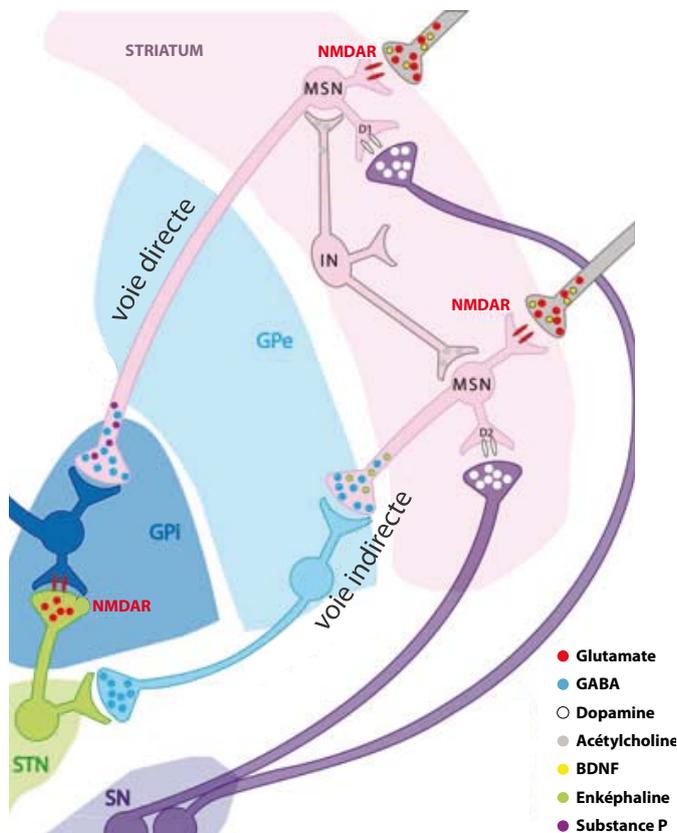


Figure 7 : Caractéristiques des différents types cellulaires affectés dans la MH. Les MSNs sont des neurones GABAergiques (GABA : ronds bleus) qui reçoivent des quantités importantes de Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF ; ronds jaunes) des neurones glutamatergiques provenant du cortex (glutamate : ronds rouges), ainsi que des neurones dopaminergiques (dopamine : ronds blancs) de la substance noire (SN). De façon intéressante, les MSNs les plus vulnérables sont ceux de « la voie indirecte » qui expriment l'enképhaline (enképhaline : ronds verts) et les récepteurs dopaminergiques D2, alors que les MSNs les moins vulnérables sont ceux de « la voie directe » qui sécrètent la substance P (ronds mauves) et les récepteurs dopaminergiques D1. IN : interneurone; BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor; D1 : récepteur dopaminergique de type 1; D2 : récepteur dopaminergique de type 2; NMDAR : récepteur NMDA; GPe : globus pallidus

externe; GPi : globus pallidus interne; SN, substance noire; STN, nucleus sous-thalamique. D'après (Han et al., 2010).

L'excitotoxicité : une hypothèse pour expliquer la spécificité de la dégénérescence

La raison précise de la dégénérescence précoce des MSNs dans la maladie n'est toujours pas élucidée. Cependant, une hypothèse intéressante est celle liée à l'excitotoxicité. Le striatum, principale cible de la neurodégénérescence, reçoit une innervation glutamatergique abondante en provenance du cortex (voir chapitre 1.3.2). Le glutamate est le premier neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des mammifères. Il active les

récepteurs ionotropes (canaux ioniques) AMPA (acide **A**mino-**M**éthyl-**P**hosphonique **A**lpha), NMDA (**N**-**M**éthyl-**D**-**A**spartate) et kaïnate, entraînant l'excitation neuronale. Lorsque l'activation du récepteur est anormalement excessive ou prolongée, la cellule cible subit un stress soutenu qui peut lui être fatal. Ce phénomène est appelé « excitotoxicité ». Depuis longtemps, l'excitotoxicité a été proposée comme un des mécanismes impliqués dans le processus neurodégénératif de la MH. L'origine de cette hypothèse remonte à 1976, lorsque Coyle et Schwarcz ont remarqué que l'injection de kaïnate, un agoniste glutamatergique, dans le striatum de rat entraîne des lésions présentant des similitudes avec certains aspects histologique et neurochimique de la MH (Coyle and Schwarcz, 1976). Ainsi, l'un des premiers modèles murins utilisés pour étudier la MH était des souris normales ayant subi une injection intrastriatale d'acide quinolique, un autre agoniste du récepteur NMDA. Cette excitotoxine provoque la mort des neurones GABAergique, notamment les MSNs, en épargnant de façon relative les autres populations de neurones (Beal et al., 1991).

Cette voie de neurodégénérescence est toujours d'actualité. En effet, il a été montré que le « riluzole », antagoniste des récepteurs NMDA et utilisé pour traiter les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (SLA), réduit la perte de matière grise chez les patients MH (Squitieri et al., 2009). Cependant, des études plus approfondies ont montré que le riluzole n'est pas efficace pour traiter les patients MH (Landwehrmeyer et al., 2007; Mestre et al., 2009). En effet, dans une étude réalisée sur 379 patients suivis pendant 3 ans, il n'y a pas eu d'effet significatif sur les symptômes choréiques suite à un traitement journalier par riluzole, comparé au traitement placebo (Landwehrmeyer et al., 2007). Ces résultats ont été confirmés en 2009, sur une cohorte de patients plus grande (1366 patients) mais avec une durée de traitement plus courte (de 30 à 144 semaines) (Mestre et al., 2009).

1.3.3.3 Les autres régions de dégénérescence

Même s'il est sévèrement atrophié, le striatum ne constitue qu'une pièce du puzzle et sa dégénérescence n'explique pas complètement l'ensemble des différents symptômes cliniques observés lors de la progression de la maladie (Rosas et al., 2003). Ainsi, d'autres régions sont altérées chez les patients, comme le lobe temporal et frontal du cortex, le cortex entorhinal, le tronc cérébral (Rosas et al., 2003), le cervelet (Fennema-Notestine et al., 2004), et l'hypothalamus (Kassubek et al., 2004). L'atrophie ou la diminution de volume de ces tissus cérébraux est facilement identifiable par observation anatomique.

De façon importante, il existe également des dysfonctions neuronales qui s'effectuent en l'absence de perte cellulaire. Ces dysfonctions sont plus délicates à identifier et requièrent l'utilisation d'imagerie fonctionnelle. Il a ainsi été possible d'identifier des changements fonctionnels dans le thalamus, la substance grise et blanche du cortex (Fennema-Notestine et al., 2004; Rosas et al., 2003). L'utilisation de l'IRMf a mis en évidence une réduction du débit sanguin au niveau du cortex préfrontal et du cortex fronto-temporal. La dysfonction de ces régions peut être corrélée aux pertes de mémoire et à certains symptômes psychiatriques observés chez les patients (Cabeza and Nyberg, 2000). D'autre part, la réduction du métabolisme du glucose (mesurée par TEP) au niveau du cortex frontal pariétal et occipital est corrélée avec les déficits cognitifs associés à la mémoire épisodique, le raisonnement, l'attention et les capacités visuo-motrices. L'atrophie du cerveau est telle que dans les cas les plus sévères, le poids global du cerveau d'un patient peut être diminué de plus de 40% (Gomez-Tortosa et al., 2001).

1.4 Les bases moléculaires de la MH

1.4.1 Découverte du gène

Dès 1983, James Gusella localise l'emplacement du gène responsable de la MH sur le bras court du chromosome 4. La mutation fut identifiée 10 ans plus tard, en 1993, par un consortium international coordonné par James Gusella et composé de six équipes basées aux U.S.A., en Grande-Bretagne et au Pays de Galles (HD Research Collaborative Groups, 1993). La région du gène impliquée dans la maladie a été réduite à un segment de 2,2 Mb localisé en 4p16.3 (MacDonald et al., 1989). Au sein de cette région, un fragment de 500 Kb a été étudié par la technique de capture d'exons, permettant d'isoler un nouveau gène appelé *IT15* pour « *Interesting Transcript 15* ». Ce gène, composé de 67 exons, contient une séquence trinuécléotidique répétée (CAG)_n située dans le premier exon. Cette séquence est de nature polymorphique, variant entre 6 et 35 CAG dans la population normale. Chez les patients MH, cette séquence est anormalement amplifiée.

1.4.2 La MH : une maladie génétique

LA MH est une maladie héréditaire qui se transmet de manière autosomique dominante. En effet, la présence d'un allèle mutant est suffisante pour déclarer la maladie. Ainsi, lorsque l'un des parents est atteint de la MH, leurs enfants ont 1 risque sur 2 de déclarer la maladie.

L'expansion de CAG est instable, notamment durant la spermatogénèse. Cette instabilité implique des modifications de la longueur de l'expansion, qui tend à augmenter au cours de la transmission : ce phénomène est appelé anticipation (Carpenter, 1994). La mutation a tendance à s'amplifier au fil des générations successives, et plus particulièrement lorsque la maladie est transmise par le père. Ce processus est dramatique car la taille de l'expansion de CAG représente 70% des facteurs qui vont déterminer l'âge d'apparition de la maladie. De plus, il existe une corrélation inverse entre le nombre de répétition CAG et l'âge d'apparition des symptômes : plus l'expansion de CAG est grande, plus la déclaration de la maladie est précoce (Ross, 1995). Ainsi, les formes tardives de la MH sont associées à des expansions de petites tailles tandis que les formes juvéniles ont de grandes expansions supérieures à 50 répétitions (Nance and Myers, 2001) (**Figure 8**).

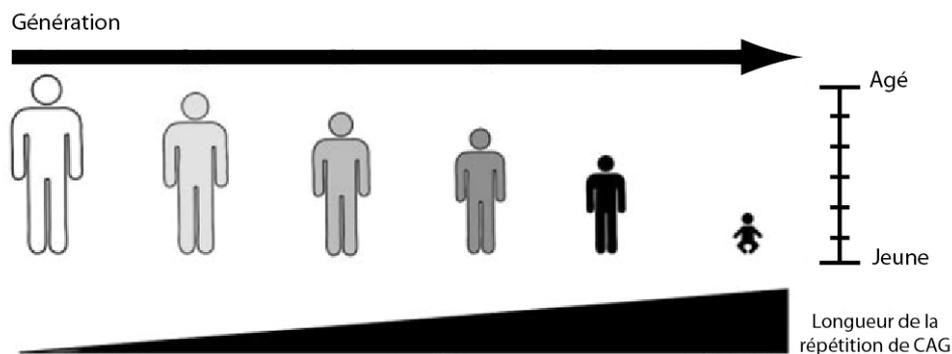


Figure 8 : Représentation schématique de la corrélation entre l'âge de déclaration des premiers symptômes et la longueur des répétitions CAG dans la MH. La couleur du patient indique la sévérité des symptômes (croissant de blanc à noir). La taille du patient correspond à l'âge de déclaration des premiers symptômes (échelle à droite). De façon générale, un patient est atteint de la MH uniquement lorsqu'il présente 35 répétitions, l'âge des premiers symptômes étant d'autant plus précoce et la maladie sévère que l'expansion de CAG est grande. La taille de l'expansion de CAG augmente au fil des générations.

Outre le nombre de répétitions CAG, d'autres facteurs influencent l'âge d'apparition des symptômes de la MH. Ces facteurs peuvent être de nature génétique, par exemple, dû au polymorphisme des gènes modificateurs tel que le gène codant le récepteur au glutamate GluR6 (MacDonald et al., 1999; Rubinsztein et al., 1997) et le gène impliqué dans l'autophagie Atg7 (Atg : **A**utophagy-related **g**ene **7**) (Metzger et al., 2010). Les facteurs peuvent également être de nature environnementale (Wexler et al., 2004). Il est donc impossible de prédire l'âge de déclaration de la maladie en considérant uniquement le nombre de répétitions CAG. Enfin, l'apparition des symptômes précoces est corrélée avec la neuropathologie de la maladie : les grandes expansions, considérées comme plus toxiques, impliquent une dégénérescence neuronale rapide et touchent une population de neurones

L'expression de la Htt est ubiquitaire, avec un niveau plus élevé dans le cerveau et les testicules (Strong et al., 1993; Trottier et al., 1995a). Cependant, il y a peu de différences d'expression de la Htt au sein des différentes régions du cerveau. Ainsi, la vulnérabilité accrue du striatum dans la MH n'est pas due à une expression plus élevée de la Htt dans cette région. Au niveau cellulaire, la protéine est majoritairement cytoplasmique, même si elle a déjà été observée dans le noyau (Kegel et al., 2002).

2.1 Les 17 premiers acides aminés de la Htt

Les 17 premiers a.a. de la Htt sont extrêmement conservés (**Figure 10**) (Atwal et al., 2007; Tartari et al., 2008). Récemment, la structure secondaire de la partie N-terminale (N-ter) de la Htt (contenant 17Q) a été résolue par rayon X, dévoilant une structure en hélice alpha (α) pour les 17 premiers a.a. de la Htt (Kim et al., 2009). Ces a.a. sont essentiels pour la protéine puisqu'ils influencent sa localisation intracellulaire en lui permettant de s'associer aux membranes plasmiques de l'endosome du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi, des mitochondries mais aussi des vésicules d'endocytose et des vésicules d'autophagie (Atwal et al., 2007; Kegel et al., 2005; Rockabrand et al., 2007; Strehlow et al., 2007).

Enfin, de nombreux sites de modifications post-traductionnelles ont été identifiés sur les 17 premiers a.a.. Le 3^{ème} a.a. de la Htt, une thréonine (Thr), est un site de phosphorylation et d'acétylation; les résidus lysines (K) localisés juste avant la polyQ, sont des sites de SUMOylation (SUMO : **S**mall **U**biquitin-like **M**odifiers) et d'ubiquitination. La Htt peut également être phosphorylée sur ses résidus sérines en position 13 et 16. Ces sites de modifications post-traductionnelles pourraient réguler la demi-vie, la localisation et l'exportation nucléaire de la Htt normale, mais aussi moduler la toxicité et l'agrégation de la protéine mutée (Aiken et al., 2009; Dohmen, 2004; Gu et al., 2009; Kalchman et al., 1996; Steffan et al., 2004).

2.2 La polyQ de la Htt

2.2.1 Evolution des polyQ

Tous les orthologues de la Htt ne possèdent pas de polyQ. Contrairement aux 17 premiers a.a., la polyQ de la Htt est peu conservée : elle est apparue au cours de l'évolution des

espèces (**Figure 10**). Ainsi, elle est absente chez la drosophile et la cione (*Ciona intestinalis*). Cependant, chez les vertébrés, la polyQ est conservée et sa taille (non pathologique) varie de 4Q chez les poissons à 37Q chez les humains, ces derniers ayant la polyQ la plus longue et la plus polymorphique (Tartari et al., 2008).

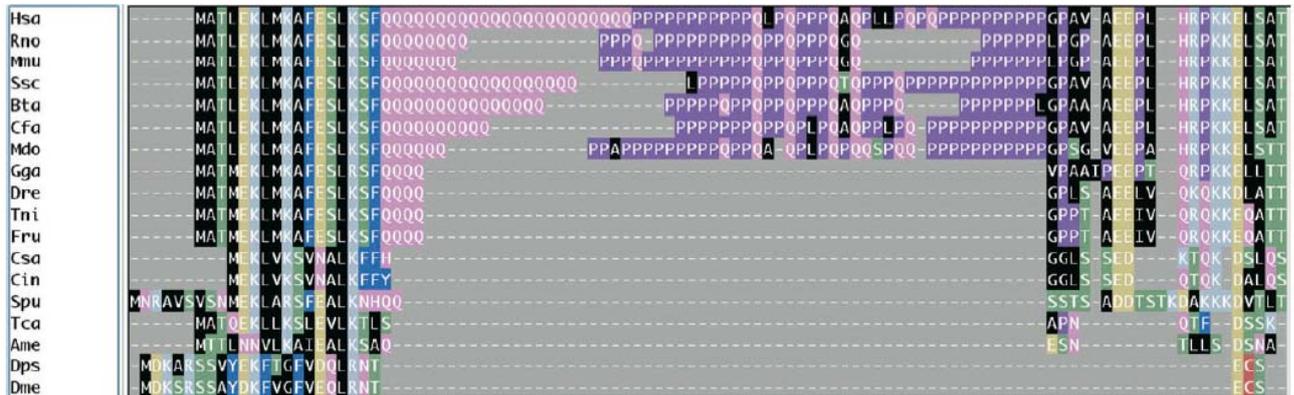


Figure 10 : Evolution des domaines N-ter de la Htt (17 premiers a.a., polyQ et PRD). Détails d'un alignement multiple de séquences en a.a. de l'exon 1 de la Htt. La couleur des a.a. dépend de leurs propriétés physico-chimiques. Les abréviations du nom des espèces sont détaillés ci-après : *Homo sapiens* (Hsa); *Rattus norvegicus* (Rno); *Mus musculus* (Mmu); *Sus scrofa* (Ssc); *Bos taurus* (Bta); *Canis familiaris* (Cfa); *Monodelphis domestica* (Mdo); *Gallus gallus* (Gga); *Danio rerio* (Dre); *Tetraodon nigroviridis* (Tni); *Fugu rubripes* (Fru); *Ciona savignyi* (Csa); *Ciona intestinalis* (Cin); *Strongylocentrotus purpuratus* (Spu); *Tribolium castaneum* (Tca); *Apis mellifera* (Ame); *Drosophila pseudoobscura* (Dps); and *Drosophila melanogaster* (Dme).
D'après (Tartari et al., 2008).

2.2.2 Fonction des polyQs

Les séquences riches en glutamines sont des séquences fréquentes chez les eucaryotes et sont souvent retrouvées dans des facteurs de transcription ou dans des protéines impliquées dans l'activation de la transcription. Il a ainsi été suggéré que les répétitions de glutamines pourraient être des domaines favorisant l'assemblage ou la stabilisation de complexes multiprotéique ou nucléoprotéique (complexes impliquant des protéines de l'ADN ou de l'ARN) (Faux et al., 2005). En ligne directe avec cette observation, il a été remarqué que la fusion d'une séquence répétée de glutamines (ou de prolines) à un domaine de liaison à l'ADN induisait l'activation de la transcription *in vitro* (Gerber et al., 1994).

Cependant, des études récentes basées sur la génération de modèle souris ayant une délétion de la polyQ dans la Htt (Hdh $\Delta Q/\Delta Q$), ont révélé que la polyQ n'est pas indispensable à la fonction de la Htt. De plus, la caractérisation de ces souris (Hdh $\Delta Q/\Delta Q$) a permis d'avoir des informations sur le rôle de la polyQ de la Htt. De façon très intéressante, ces souris présentent une espérance de vie plus longue et des performances motrices

accrues, avec une augmentation de l'autophagie au niveau cellulaire (Clabough and Zeitlin, 2006). Ces observations suggèrent que la polyQ joue un rôle dans le métabolisme énergétique et la longévité.

2.3 Le domaine riche en proline de la Htt

Le domaine riche en proline (PRD) de la Htt est situé juste après la polyQ. Il est peu conservé au sein des espèces mais est apparu presque en même temps que la polyQ (**Figure 10**). Chez l'homme, le PRD est composé de 40 résidus organisés en 2 séquences de prolines pures, respectivement 11 et 10 prolines, séparées par un domaine riche en proline (**Figure 9**). Ce domaine PRD est connu pour interagir avec un grand nombre de protéines, notamment les protéines contenant les domaines SH3 (pour « Src homology 3 ») ou WW (caractérisés par la conservation de deux tryptophanes). Parmi ces protéines, on retrouve par exemple SH3GL3 (endophiline 3) (Sittler et al., 1998), la protéine kinase C et la « casein kinase substrate in neurons 1 » (PACSIN1/syndapin) (Modregger et al., 2002), HYPA/FBP11 (Faber et al., 1998), PSD-95 (Sun et al., 2001), RasGAP (Liu et al., 1997) et CA150 (Holbert et al., 2001). Moins de 10 a.a. sont nécessaires pour interagir avec les domaines SH3 ou WW (Kay et al., 2000). Certaines protéines interagissent avec le PRD de la Htt via les deux séquences de prolines répétées pures, alors que d'autres protéines interagissent avec le PRD de la Htt via la séquence intermédiaire riche en proline (Gao et al., 2006).

2.4 Les domaine HEATs de la Htt

Les motifs HEATs sont composés d'environ 50 a.a., avec des séquences primaires très variables mais avec une même structure secondaire (Andrade et al., 2001). Ces motifs sont formés de 2 hélices α antiparallèles formant une hélice hydrophobe en épingle à cheveux (**Figure 11.A**). La structure secondaire de ces motifs est très conservée et a été dupliquée au cours de l'évolution. La répétition de ces motifs forme un domaine HEAT composé de plusieurs hélices qui forment une super hélice (**Figure 11.B**). Les motifs de type HEAT en hélice α sont très flexibles et favorisent les interactions avec d'autres protéines, mais également avec les microtubules (Neuwald and Hirano, 2000; Palidwor et al., 2009). Des analyses préliminaires, biochimiques et biophysiques, sur la Htt pleine longueur ont conduit à proposer un modèle selon lequel la Htt serait entièrement composée de motifs HEATs. La

structure de la Htt serait, selon ce modèle, super-hélicoïdale expliquant le grand nombre d'interacteurs identifiés (**Figure 11.C**). Ce modèle propose que les sites de protéolyse de la Htt sont uniquement localisés entre les domaines structurés HEATs (Li et al., 2006; Seong et al., 2010; Takano and Gusella, 2002). Notons que ce modèle ne soutient pas les études bio-informatiques démontrant qu'il n'y aurait que 3 domaines HEAT dans la Htt (Palidwor et al., 2009)(**Figure 9**).

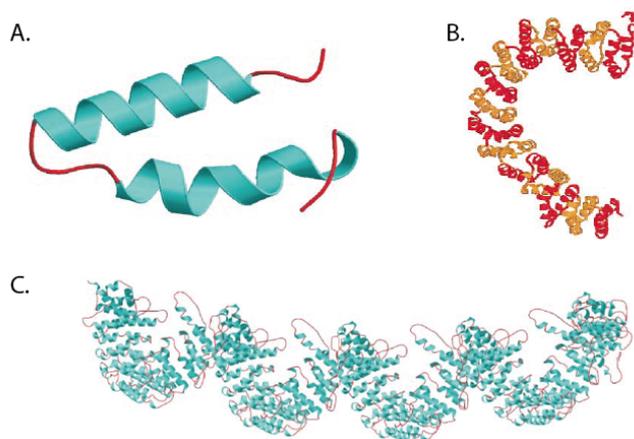


Figure 11: Structures du motif et domaine HEAT. A/ Motif HEAT composé de 2 hélices α antiparallèles (adapté de Li et al., 2006). B/ Domaine HEAT composé de plusieurs répétitions de motifs HEAT formant une super-hélice (adapté de Andrade et al., 2001). C/ Modèle hypothétique de la Htt composée principalement de domaines HEATs (adapté de Li et al., 2006).

Selon des études bioinformatiques du groupe d'Andrade, la Htt ne contiendrait que 3 domaines HEATs principaux. Les deux premiers domaines HEAT, appelés H1 et H2 respectivement, sont situés dans la partie N-ter de la Htt. H1 est situé du 114^{ème} au 413^{ème} a.a. et est composé de 6 hélices α répétées. Les a.a. 172-372 constitueraient une région du domaine H1 capable de s'associer aux phospholipides acides situés près de la membrane plasmique (Kegel et al., 2005). H2 se situe du 672^{ème} au 969^{ème} a.a. et est composé de 7 hélices α répétées. Enfin, le 3^{ème} domaine HEAT (H3), dans la partie C-terminale (C-ter), est situé du 2667^{ème} au 2938^{ème} a.a. et est composé de 7 hélices α répétées (Palidwor et al., 2009). De façon intéressante, il a été montré que les domaines HEATs de la Htt peuvent interagir entre eux (Palidwor et al., 2009), expliquant ainsi des phénomènes de dimérisation de la Htt observés lors de la purification de la protéine pleine longueur (Li et al., 2006).

2.5 La fonction de la huntingtine

2.5.1 Rôle de la huntingtine dans le développement

Les premières études visant à comprendre la fonction de la Htt ont été réalisées il y a une quinzaine d'années. À cette époque, des modèles murins dans lesquels le gène de la Htt a été inactivé ont été créés. Chez ces modèles, l'absence de la Htt entraîne la mort précoce

des embryons entre le jour 8.5 et 10.5 (Zeitlin et al., 1995). Ainsi, la Htt est indispensable au développement. Néanmoins, la mutation responsable de la MH ne perturbe pas complètement la fonction de la Htt. En effet, les souris n'exprimant pas la Htt endogène mais la Htt avec une expansion de polyQ, ne meurent pas au stade embryonnaire (Hodgson et al., 1999; Leavitt et al., 2001). Par ailleurs, il existe des patients homozygotes pour le gène muté de la Htt (Wexler et al., 1987). De façon intéressante, seulement 50% d'expression du gène de la Htt suffit pour permettre un développement sans anomalie visible chez la souris. Cependant, lorsque l'expression de la Htt est inférieure à 50% de son niveau normal, on observe des malformations développementales sévères, notamment au niveau du cortex et du striatum, qui peuvent s'accompagner de dimorphismes cranio-faciaux, allant jusqu'à la mort du fœtus (White et al., 1997). Enfin, l'utilisation de modèles murins « knock-out » conditionnels semble montrer que la Htt possède une fonction après les stades du développement. En effet chez la souris, l'inactivation postnatale du gène *HTT* dans le cerveau et les testicules conduit à la stérilité, à un phénotype moteur progressif et à une durée de vie réduite (Dragatsis et al., 2000).

Il est ainsi proposé que la Htt possède une fonction cellulaire prépondérante au cours du développement mais aussi tout au long de la vie. Cependant, sa fonction précise au sein de la cellule n'est toujours pas complètement comprise. C'est pourquoi il a fallu déterminer une autre méthode d'analyse pour comprendre la fonction de la Htt.

2.5.2 Dis-moi qui tu fréquentes, je te dirai qui tu es...

Relation entre structure et fonction de la Htt

La Htt est une véritable plateforme d'interaction moléculaire. En effet, tous les domaines de la Htt semblent faciliter les interactions entre lipides, protéines, ADN ou ARN. Tout d'abord, les 17 premiers a.a. sont connus pour s'assembler aux membranes lipidiques (voir chapitre 2.1). Il a été proposé que le domaine polyQ de la Htt soit un adaptateur favorisant l'assemblage ou la stabilisation de complexes multiprotéique ou nucléoprotéique (voir chapitre 2.2). De plus, la Htt possède un domaine PRD connu pour favoriser de nombreuses interactions avec les domaines SH3 ou WW (voir chapitre 2.3). Enfin, la séquence de la Htt semble être majoritairement composée de domaines HEATs impliqués dans les interactions entre les protéines (voir chapitre 2.4). Ainsi, l'exploration de son interactome a contribué à mieux comprendre la fonction de la Htt.

La Htt : une plateforme d'interactions protéiques

Les premières études des interacteurs de la Htt ont été réalisées par les systèmes double hybride chez la levure (Y2H : « **Y**east **T**wo **H**ybrid »), chromatographie d'affinité (PD : « **P**ull-**D**own ») et Immuno-Précipitation (IP), utilisant, le plus souvent la partie N-ter de la Htt. C'est pourquoi la majorité des interacteurs identifiés interagissent avec la partie N-ter de la Htt. La quantité très importante d'interacteurs ainsi identifiés supporte le rôle de plateforme d'interaction de la Htt. En effet, une étude relativement récente a dénombré jusqu'à 234 interacteurs de la Htt (Kaltenbach et al., 2007). L'importance de ce nombre a compliqué l'attribution d'une fonction précise à la Htt. De ce fait, une approche fonctionnelle a systématiquement été nécessaire pour confirmer l'implication de la Htt dans une fonction cellulaire. Aujourd'hui, il semble que la Htt soit impliquée dans plusieurs processus cellulaires importants, tel que la régulation transcriptionnelle, l'apoptose, le transport vésiculaire, l'endocytose, et l'homéostasie du calcium (**Tableau 1**).

Fonction cellulaire	Nom de la protéine	Fonction	Région de la Htt nécessaire pour l'interaction
Transcription			
	CA150	Activateur de transcription	Pas connu
	CBP	Activateur de transcription	1-588
	CtBP	Répresseur de transcription	Pas connu
	HYP-A, B	Facteur d'épissage	PRD
	HYP-C	Facteur de transcription	PRD
	NCOR	Répresseur de transcription	1-171
	NF-kB	Facteur de transcription	Domaine HEAT
	SP1	Activateur de transcription	1-171
	TAFII130	Activateur de transcription	1-480
	TBP	Facteur de transcription	Pas connu
	P53	Facteur de transcription	PRD
	REST–NRSE	Suppresseur de transcription	1-548
Endocytose et transport			
	HAP1	Transport vésiculaire	171-230
	HIP1	endocytose, apoptose	1-540
	HIP14	transport, endocytose	1-550
	PACSIN1	endocytose	PRD
	PSD-95	organisation des synapses	Pas connu
	SH3GL3	endocytose	PRD
Homéostasie du calcium			
	HAP1	Permet l'interaction avec IP3R1	171-230
	Calmodulin	intéragit avec le calcium	Pas connu
	IP3R1	canal calcique	171-230
Signalisation			
	CIP-4	relié au transport de Cdc42	1-152
	FIP2	interacteur de la GTPase Rab8	1-150
	GRb2	Facteur de croissance	PRD
	RasGAP	Ras GTPase protéine activatrice	PRD
Métabolisme			
	Cystathionine β -synthase	Génération de cystéine	1-171
	GAPDH	enzyme glycolitique	PRD
	HIP2	enzyme	1-540

Tableau 1 : Les interacteurs de la Htt et leur fonction cellulaire. Les interacteurs de la Htt peuvent être groupés par rapport à leur fonction dans la transcription, l'endocytose et le transport, l'homéostasie du calcium, la signalisation ou le métabolisme. La fonction cellulaire exacte de ces interacteurs est indiquée ainsi que la région de la Htt impliquée dans chaque interaction. **CA150** : co-activator 150 ; **CBP** : (cAMP-response element binding protein) binding protein ; **CIP-4** : Cdc42-interacting protein 4 ; **CtBP** : C-terminal-binding protein ; **FIP2** : for 14.7K interacting protein ; **GAPDH** : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; **GRB2** : growth factor receptor-binding protein 2 ; **GST** : glutathione S-transferase ; **HAP1** : htt-associated protein 1 ; **HIP** : htt-interacting protein ; **HYP** : htt-yeast partner ; **IP3R1** : inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor type 1 ; **NCOR** : nuclear receptor co-repressor ; **NF-kB** : nuclear factor-kB transcription factor ; **PACSIN1** : protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1 ; **PSD-95** : postsynaptic density 95 ; **RasGAP** : Ras GTPase-activating protein ; **REST–NRSE** : the repressor element-1 transcription factor–the neuron restrictive silencer element ; **SH3GL3** : SH3-containing GRB2-like protein 3 ; **SP1** : specificity protein-1 ; **TAFII130** : TBP-associated factor ; **TBP** : TATA box binding protein (Adapté d'après la revue de (Li and Li, 2004)).

Etant donné le nombre d'interacteurs de la Htt, il serait très long de décrire toutes les études fonctionnelles réalisées sur la Htt. Ainsi dans la suite de la section, un exemple utile pour justifier les choix entrepris au cours de mon travail de thèse sera présenté.

2.5.3 Rôle de la Htt dans le transport vésiculaire

La Htt est une protéine majoritairement cytoplasmique qui s'associe aux vésicules et aux microtubules (DiFiglia et al., 1995; Gutekunst et al., 1995; Hoffner et al., 2002). Il n'est donc pas surprenant de constater que la Htt est une protéine qui régule le transport vésiculaire. Chez la drosophile et dans des cellules neuronales de mammifères, des études ont montré que la Htt facilite le transport vésiculaire dans les deux sens, rétrograde et antérograde (Caviston et al., 2007; Gunawardena et al., 2003). En effet, en 2008, deux études ont démontré que l'état de phosphorylation de la serine 421 de la Htt détermine la direction du transport des vésicules le long des microtubules (Colin et al., 2008; Zala et al., 2008). Ainsi, lorsque la Htt est phosphorylée sur cette sérine, le transport vésiculaire antérograde est favorisé, tandis que le transport vésiculaire rétrograde est favorisé lorsqu'elle n'est pas phosphorylée.

Un certain nombre d'interacteurs sont nécessaires pour que la Htt accomplisse sa fonction dans le transport vésiculaire. En effet, il a récemment été montré que la Htt ayant une délétion de son site d'interaction, soit avec la dynéine, soit avec HAP1 (**Huntingtin Associated Protein 1**), est incapable de réorganiser l'appareil de Golgi (Pardo et al., 2010). Ces observations confirment les études précédentes démontrant à la fois que la Htt interagit avec les microtubules et que le mécanisme de transport vésiculaire dépend de la Htt et de son interaction avec la Dynéine et HAP1 (**Figure 12**) (Caviston et al., 2007; McGuire et al., 2006). Rappelons que HAP1, la première protéine identifiée comme interagissant avec la Htt, est une protéine essentielle dans ce processus puisqu'elle fait partie du complexe Htt, kinesine et dynactine (Rong et al., 2006). De plus, une diminution de l'expression de HAP1 inhibe le transport des vésicules contenant du BDNF. Enfin, il est intéressant de noter qu'une expression réduite de HAP1 a des effets neurotoxiques se traduisant par une dégénérescence de l'hypothalamus, région du cerveau qui dégénère également chez les souris modèles de la MH. A l'inverse, la surexpression de HAP1 diminue les effets toxiques de la Htt mutée (Li et al., 2003).

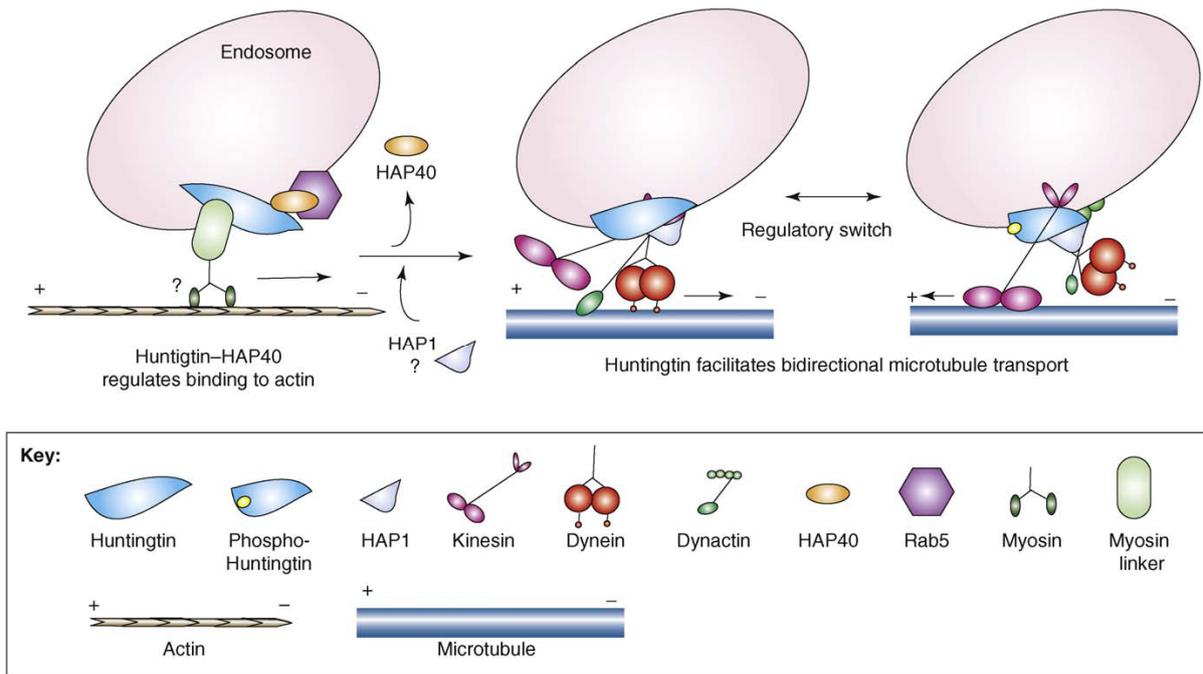


Figure 12 : La Htt est une protéine qui coordonne les différentes protéines motrices et leurs partenaires pour faciliter le transport des vésicules le long du cytosquelette. Quand les vésicules cargo traversent le cytosquelette d'actine, l'interaction du complexe Htt-HAP40 (**Htt Associated Protein 40**) avec Rab5 pourrait permettre l'attachement de ces vésicules sur l'actine grâce à un adaptateur « myosine » (à gauche). Après dissociation de HAP40 et association de HAP1, l'affinité des vésicules pour les microtubules augmente (au centre). Enfin, d'autres phénomènes pourraient réguler le transport vésiculaire le long des microtubules comme la phosphorylation de la Htt qui détermine le sens du transport vésiculaire (à droite). D'après Caviston et al., 2009.

Le rôle de la Htt dans le transport vésiculaire a particulièrement été étudié dans le cas du transport du BDNF. Le BDNF est sécrété par les neurones du cortex, puis endocyté par les neurones du striatum (Altar et al., 1997). Les neurones du striatum requièrent du BDNF pour survivre et la dérégulation du transport du BDNF pourrait être dévastatrice pour ces cellules (Baquet et al., 2004). Il a été démontré que la surexpression de la Htt normale augmente spécifiquement le transport vésiculaire du BDNF le long des microtubules. *In vitro*, la Htt stimule le transport du BDNF dans les cellules neuronales. Ce transport est atténué lorsque le niveau d'expression de la Htt est diminué par ARNi (ARN interférence) (Gauthier et al., 2004). Enfin, il a récemment été démontré que HAP1 pouvait interagir avec le domaine précurseur du BDNF, suggérant un rôle de HAP1 dans la libération du précurseur du BDNF (Wu et al., 2010).

Le nombre considérable d'interacteurs de la Htt et sa fonction essentielle dans le développement laissent suggérer un rôle primordial de cette protéine dans la cellule.

Cependant, il est important de noter que la majorité des recherches a été effectuée sur la Htt mutée dans le but de comprendre la pathogénèse de la maladie. Ainsi, beaucoup de mécanismes dysfonctionnels dus à la présence de la Htt mutée ont été observés avant même de comprendre la fonction de la Htt normale. Ainsi dans le chapitre « corrélation entre dysfonction et dysinteraction de la Htt mutée », d'autres fonctions de la Htt mises en évidence par la présence de la Htt mutée seront présentées.

D'autre part, la MH s'intègre au sein d'un groupe contenant huit autres maladies provoquées par une expansion de polyQ. Bien que les protéines portant l'expansion de polyQ diffèrent dans chaque maladie, il existe un certain nombre de caractéristiques communes au cours du processus pathogénique.

3. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la MH

3.1 Les maladies à polyQ

Actuellement, neuf maladies neurodégénératives provoquées par une expansion de polyQ ont été identifiées: la MH, l'amyotrophie spino-bulbaire (SBMA), l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA) et six ataxies spinocérébelleuses (SCA). Ces neuf affections présentent toutes une dégénérescence neuronale sélective (**Figure 13**).

Maladie	Protéine	Longueur normale de l'expansion	Longueur pathogénique de l'expansion	Localisation	Taille relative des protéines
DRPLA	Atrophine-1	7-34	49-88	N	
MH	Huntingtine	6-34	36-121	C/N	
SBMA	Récepteur des Androgènes	9-36	38-62	N	
SCA1	Ataxine-1	6-39	40-82	N	
SCA2	Ataxine-2	15-24	32-200	C	
SCA3	Ataxine-3	13-36	61-84	C/N	
SCA6	Sous-unité α du canal calcique	4-20	20-29	M	
SCA7	Ataxine-7	4-35	37-306	N	
SCA17	Tata Binding Protein	25-42	47-63	N	

Figure 13 : Représentation schématique des différentes protéines contenant une expansion de polyQ. L'expansion de polyQ est représentée en rouge. C : cytoplasmique, N : nucléaire, M : membranaire. (Gusella and MacDonald, 2000; Shao and Diamond, 2007).

DRPLA

Dans cette maladie, l'expansion de polyQ se situe au sein de la protéine atrophine-1 qui pourrait être impliquée dans la régulation de la transcription. Les manifestations cliniques se

caractérisent par une chorée, un manque de coordination, une ataxie et une démence. La maladie entraîne une atrophie du cerveau impliquant une dégénérescence du cervelet, du cortex cérébral, des ganglions de la base et des corps de Luys.

SBMA

La protéine impliquée dans cette pathologie est le récepteur aux androgènes (AR), récepteur nucléaire codé par un gène situé sur le chromosome X, qui régule l'expression de gènes en réponse aux androgènes. L'expansion de polyQ est localisée dans le domaine d'activation N-ter de la protéine. La dégénérescence affecte sélectivement les motoneurones. Les patients, qui sont principalement de type masculin, présentent une atrophie des testicules et des muscles proximaux.

SCAs

Il existe six ataxies spinocérébelleuses causées par des expansions de polyQ : SCA 1, 2, 3, 6, 7 et 17. Dans SCA 1, 2, 3 et 7, l'expansion de glutamines se situe au sein de protéines appelées ataxine 1, 2, 3 et 7 respectivement. Dans la maladie SCA6, la protéine contenant l'expansion est la sous-unité α d'un canal calcique voltage dépendant CACAN1A (**CA**lcium **C**hannel **A**lpha-**1A**) et dans la maladie SCA17, il s'agit du facteur de transcription TBP. Toutes ces pathologies ont en commun une atteinte du cervelet, d'autres régions étant également affectées selon le type d'ataxie. La maladie à expansion de polyQ SCA7 est étudiée dans notre laboratoire : l'identification de l'expansion dans l'ataxine-7 a précédé celle du gène (David et al., 1997; Trottier et al., 1995b). Il a été montré que l'ataxine-7 est une sous-unité du complexe transcriptionnel TFTC/STAGA (Helmlinger et al., 2004). Cette pathologie a la caractéristique de présenter, en plus de l'atteinte du cervelet, une atteinte de la rétine pouvant conduire à la cécité (Enevoldson et al., 1994).

Les maladies à polyQs : des spécificités et des caractéristiques communes

Les protéines mutées impliquées dans chaque maladie à expansion de polyQ sont exprimées ubiquitairement, à la fois dans les cellules neuronales et les cellules non neuronales. Cependant, nous avons vu que dans chacune de ces maladies, les zones de dégénérescence sont distinctes et se traduisent par des manifestations cliniques spécifiques. Bien qu'il n'y ait pas de corrélation entre le niveau d'expression des protéines mutées, leur localisation

subcellulaire et les régions du cerveau atteintes, il est fort probable que les différences entre les maladies à polyQ soit dues au fait que chacune des protéines porteuses de la polyQ est différente (Cancel et al., 2000; Einum et al., 2001; Strong et al., 1993).

D'autre part, les maladies à polyQ partagent des caractéristiques communes, comme le fait qu'elles soient toutes dominantes, qu'elles se déclarent à l'âge adulte ou que la taille de l'expansion de polyQ détermine la sévérité des symptômes ainsi que l'âge à laquelle la maladie se déclare. Ces points communs semblent liés à la présence de l'expansion de polyQ et au processus d'agrégation des protéines mutées.

3.2 Toxicité de l'expansion

L'expansion anormale de glutamines au sein de toutes ces protéines leur confère un gain de fonction toxique. En effet, la plupart des modèles animaux de maladies à polyQ sont obtenus en faisant un knock-in de la protéine porteuse de la polyQ, et non un knock-out. Ainsi, les modèles transgéniques de souris, de rat et de drosophile exprimant les protéines mutées reproduisent les signes de neurodégénérescence observés dans les maladies à polyQ. L'expansion de polyQ confère donc aux protéines un caractère toxique pour la cellule. Cette observation a été confirmée par une expérience élégante dans laquelle une expansion de CAG a été insérée dans le gène murin *Hprt* (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase*), gène qui n'est associé à aucune maladie à polyQ. Les souris porteuses de la mutation dans le gène *Hprt* développent un phénotype neurologique tardif avec des caractéristiques communes aux maladies à polyQ, conduisant à la mort prématurée des souris. Les souris déficientes pour le gène *Hprt* ne développent, quant à elles, aucun phénotype neurologique (Ordway et al., 1997). Donc l'expansion de glutamines est capable de conférer des propriétés toxiques aux protéines qui les portent, ce qui conduirait à la neurodégénérescence.

D'autre part, il a été montré que les polyQs seules sont capables de conférer une toxicité cellulaire. L'expression de polyQ (Q29, Q33, Q35, Q40 et Q44) chez *C. Elegans* entraîne une diminution de la mobilité et de l'espérance de vie de ces animaux. Ainsi, même les polyQs de petite taille (Q29) confèrent une toxicité cellulaire (Morley et al., 2002). De plus, l'introduction de Q20 (sous formes agrégés) dans le noyau de cellules de mammifères est extrêmement toxique (Yang et al., 2002).

Ainsi, les polyQ confèrent aux protéines qui les portent un gain de fonction toxique pour la cellule. Ajouté à cela, ces polyQ sont capables de former des agrégats. Ainsi, une autre caractéristique commune à toutes les maladies à polyQ est l'accumulation intracellulaire d'agrégats protéiques de type amyloïdes. Ces inclusions sont retrouvées dans le cerveau de patients atteints de maladie à polyQ, mais également dans les modèles animaux et cellulaires de ces pathologies.

3.3 Agrégation de la Htt mutée

La présence de corps d'inclusion nucléaires et cytoplasmiques dans les neurones est une caractéristique commune aux maladies à polyQ (Davies et al., 1997; Paulson et al., 1997) (*Figure 14*).

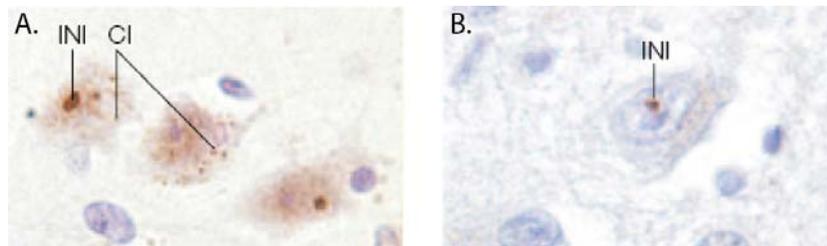


Figure 14 : Agrégats intranucléaires et cytoplasmiques visualisés par microscopie optique. A/ Inclusions intranucléaires (IntraNuclear Inclusion INI) et cytoplasmiques (Cytoplasmic Inclusions : CI) dans le cortex moteur d'un patient MH détectées par l'anticorps 1C2. B/ Inclusion intranucléaire dans le cortex frontal d'un patient MH détectée avec un anticorps dirigé contre l'ubiquitine. D'après (Ross and Poirier, 2004).

Ces observations suggèrent que l'agrégation des protéines mutées soient responsables, au moins en partie, des pathologies du système nerveux central observées dans les maladies à polyQ. Plus précisément, la Htt est clivée et les fragments de protéolyse libérés vont déterminer leur localisation cellulaire, agrégation et toxicité (Hackam et al., 1998).

3.3.1 Agrégats : entités toxiques ou protectrices ?

Depuis quelques années, l'hypothèse selon laquelle l'agrégation des polyQs est toxique est sujette à controverse. D'un côté il est soutenu que l'agrégation est toxique, de l'autre côté il est proposé que l'agrégation soit un rejet inerte de ces maladies à polyQ, enfin il est également proposé que le processus d'agrégation soit protecteur. L'un des facteurs alimentant ce débat est le terme général « d'agrégat » qui définit en vérité différentes

entités toxiques, générées par les polyQs, au cours du processus complexe d'agrégation (Hands and Wyttenbach, 2010).

Traditionnellement, le terme agrégat était attribué aux corps d'inclusion, insolubles, facilement détectable par immuno-histo-chimie (IHC) et quantifiables (par un comptage de leur nombre ou par mesure de la quantité de matériel insoluble) dans les tissus de patients. De plus, des corps d'inclusion ont été retrouvés dans le cerveau de plusieurs modèles murins de la MH. Ainsi, certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'agrégation de la Htt mutée serait le point de départ de la pathologie et pourrait conduire à la mort cellulaire. En accord avec cette hypothèse, plusieurs études ont montré que l'inhibition du processus d'agrégation était protecteur au niveau cellulaire et dans des modèles animaux des maladies à polyQ. Plusieurs stratégies comme l'ajout de peptides (comme QBP1), de petites molécules, l'expression d'intrabodies ou encore la surexpression de protéines chaperonnes telles que HSP70 (**H**eat-**S**hock **P**rotein 70) ont été utilisées pour inhiber l'agrégation. Pour citer un exemple, dans un modèle drosophile de la MH, l'utilisation de molécules inhibitrices de l'agrégation permet de diminuer la neurodégénérescence (Zhang et al., 2005).

Cependant, d'autres études semblent indiquer, au contraire, que les agrégats de Htt mutée pourraient être protecteurs. Il a été démontré que la présence d'inclusions nucléaires ne corrèle pas avec la mort cellulaire induite par la Htt mutée. De plus, l'inhibition de la formation de corps d'inclusion dans des neurones striataux exprimant la Htt mutée conduit à une augmentation de la mortalité cellulaire, tandis que la formation de ces mêmes inclusions diminue le niveau de Htt mutée soluble et augmente la survie neuronale (Arrasate et al., 2004; Saudou et al., 1998). Des études *in vivo* ont également permis de mettre en évidence que les agrégats de Htt mutée ne sont pas nécessairement associés à une pathologie : dans un modèle murin qui exprime un fragment N-ter de la Htt mutée, de nombreuses et larges inclusions contenant la protéine apparaissent à un stade précoce. Pourtant, ces souris ne présentent aucun signe clinique d'une dysfonction neuronale ni aucune dégénérescence neuronale, contrairement au modèle murin similaire exprimant la forme entière de la Htt mutée (Slow et al., 2005).

Il est possible de concilier ces deux hypothèses si l'on considère qu'au cours de l'agrégation, plusieurs espèces sont générées avec des toxicités variables. L'agrégation est en effet un

processus dynamique et évolutif, et il est proposé que certains intermédiaires soient toxiques et d'autres non-toxiques (Ehrnhoefer et al., 2008).

3.3.2 L'agrégation : un mécanisme dynamique et complexe

Un grand nombre de techniques ont été utilisées pour étudier la morphologie ou la structure des espèces générées au cours du processus d'agrégation des polyQs. *In vitro*, il a été possible d'identifier par microscopie électronique (EM) ou microscopie de force atomique (AFM) que les peptides ou protéines contenant des polyQ forment des agrégats fibrillaires. Ces agrégats de polyQ sont détectés avec un anticorps « générique » dirigé contre les agrégats de types amyloïdes. Ces agrégats ont donc des caractéristiques similaires à ceux formés par les peptides amyloïdes β (A β) (Scherzinger et al., 1997). Les fibres amyloïdes, riche en feuillets β , sont formées à partir de protofibrilles courtes et parfois curvilignes (Poirier et al., 2002). Récemment, une étude *in vitro* élégante utilisant des fragments de la Htt (correspondants à l'exon 1 : Htt-ex1) et la technique d'AFM a mis en évidence que la formation de structures sphériques (d'environ 5-65nm de diamètre), appelés oligomères, précédaient l'apparition d'autres espèces intermédiaires d'agrégation comme les protofibrilles, des fibres insolubles ou des agrégats amorphes (**Figure 15 A-C**). De plus, des structures en anneau ont également été observées dans de rares cas (**Figure 15 D-G**) (Legleiter et al., 2010). Les corps d'inclusions semblent être formés après et à partir de ces fibres, et ne contiennent pas uniquement des fragments de Htt mais également d'autres protéines. Ces corps d'inclusion ne sont eux-mêmes pas la dernière étape du processus d'agrégation car ils restent avant tout dynamiques (Chai et al., 2002; Kim et al., 2002)

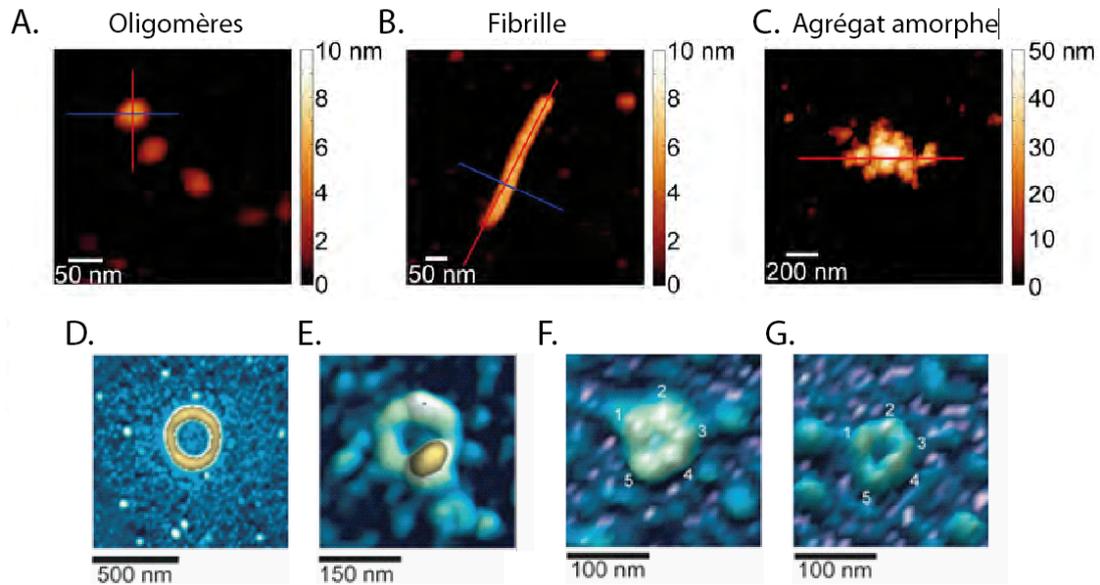


Figure 15 : Les différents intermédiaires d'agréations de l'exon 1 de la Htt visualisés *in vitro*. Photos d'agrégats prises par microscopie de force atomique (Atomic Force Microscopy : AFM). A-C/ Agrégats typiques retrouvés dans la MH : oligomère (A), fibrille (B) et agrégat amorphe (C). L'échelle de taille est à droite de chaque photo. D-G/ Formes intermédiaires atypiques et rares : un anneau (D), structures annulaires constituées de plusieurs oligomères (E-G) (Legleiter et al., 2010).

Les caractéristiques des oligomères, leur taille et le fait qu'ils soient solubles rendent leur détection *in vivo* très difficile mais néanmoins possible. En effet, une des premières méthodes réalisées dans des cultures cellulaires a été de purifier, par affinité, des oligomères de fragment de Htt-ex1 marqués avec différents tags. Ces oligomères ont été par la suite observés par EM ou AFM (Mukai et al., 2005). D'autres méthodes ont été également utilisées pour visualiser ces oligomères, comme la fluorescence (Fluorescence Correlation Spectroscopy : FCS), qui a permis de suivre la formation d'oligomères dans des cultures cellulaires (Takahashi et al., 2007), mais également la technique Seprion, qui a servi à isoler des formes intermédiaires de l'agréation dans des souris modèles de la MH. Les analyses par AFM ou EM réalisées après purification de ces intermédiaires d'agréation ont révélé qu'ils avaient une structure similaire à ceux observés *in vitro* (Sathasivam et al., 2010).

De façon intéressante, en utilisant un gel d'électrophorèse composé d'agarose (AGERA), la présence d'oligomères a été identifiée chez des souris R6/2, modèle murin de la MH le mieux caractérisé, avant l'apparition du phénotype neurologique, suggérant ainsi que la formation de ces formes oligomériques a un rôle causal dans l'apparition de la dysfonction neuronale (Weiss et al., 2008). En effet, il est possible que les oligomères soient les entités les plus toxiques pour la cellule (Kayed et al., 2003).

3.3.3 Différentes espèces avec une toxicité variable

Plusieurs études semblent indiquer que les formes oligomériques sont plus toxiques et peuvent entraîner la dysfonction et la mort neuronale dans les maladies neurodégénératives, tandis que les formes fibrillaires et les gros agrégats amorphes pourraient être inertes ou neuroprotecteurs (Caughey and Lansbury, 2003).

Dans ce sens, il a été démontré que les cellules contenant des corps d'inclusions vivent plus longtemps que celles qui contiennent des formes oligomériques de protéines avec une polyQ. Ainsi, les corps d'inclusions protégeraient les cellules de la toxicité induite par les oligomères. Ces derniers seraient séquestrés dans les corps d'inclusions, les rendant ainsi moins toxiques (Takahashi et al., 2008). Ces résultats semblent être en accord avec une étude précédente qui indique que l'effet protecteur observé après surexpression de protéines chaperonnes telles que HSP70 est dû au fait que ces protéines permettent de diminuer la formation des oligomères de protéines avec une polyQ (Wacker et al., 2004). Enfin, une étude réalisée *in vivo* dans les cellules neuronales PC12 a permis de suivre l'évolution d'agrégats cellulaires toute les 10 minutes sur 96h (Gong et al., 2008). Cette étude confirme que :

- 1) différentes espèces d'agrégats sont formées
- 2) leur localisation peut être nucléaire comme cytoplasmique
- 3) ils présentent des toxicités variables : les cellules contenant des agrégats non visibles ou de petites tailles dégèrent en premier
- 4) les gros agrégats semblent avoir un rôle protecteur

3.3.4 Hypothèses sur les mécanismes de toxicité des agrégats

Nous avons vu que la Htt mutée s'agrège et que ce processus d'agrégation est toxique. Ainsi, ces formes agrégées de la Htt peuvent participer aux dysfonctions cellulaires en séquestrant dans les agrégats des composants clés de différentes voies de signalisation. De plus, plusieurs données semblent indiquer que les agrégats générés ont des fonctions propres qui les rendent toxiques.

Les agrégats séquestrent des partenaires de la Htt

Plusieurs études ont montré que des protéines (SH3GI3, PQBP1, CBP), en plus d'interagir plus fortement avec les polyQs étendus, sont retrouvées *in vivo* dans les corps d'inclusions formés par la Htt mutée, et *in vitro* dans les fractions « insolubles » (Busch et al., 2003; Jiang et al., 2003; Sittler et al., 1998). De plus, il a récemment été démontré que la Htt pleine longueur est également recrutée au cours de l'agrégation de l'exon 1 de la Htt mutée (Swayne and Braun, 2007). Ainsi, il a été proposé que les agrégats soient toxiques et responsables de la dysfonction neuronale en séquestrant un certain nombre de protéines, y compris la Htt pleine longueur, les empêchant ainsi d'accomplir leurs fonctions. Dans ce sens, plusieurs études semblent indiquer que la Htt mutée pourrait entraîner une dysfonction synaptique en modifiant la disponibilité de diverses protéines synaptiques, éventuellement *via* un recrutement de ces protéines dans les agrégats. Il a été montré que l'expression d'un certain nombre de protéines impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques, telles que la complexine II, est altérée dans la MH (Morton and Edwardson, 2001). Il a également été mis en évidence que la Htt mutée, et probablement des intermédiaires au cours de l'agrégation, modifient la localisation cellulaire de PACSIN1 qui joue un rôle dans le recyclage des vésicules synaptiques. PACSIN1, qui est normalement localisé au niveau des synapses, se retrouve principalement localisé dans le cytoplasme et les régions périnucléaires (Modregger et al., 2002). Enfin, la Htt normale interagit avec de nombreuses protéines importantes pour l'endocytose (Li and Li, 2004). Ces interactions peuvent être altérées par la présence de l'expansion de polyQ, compromettant ainsi les processus synaptiques.

D'un autre côté, il est proposé que les agrégats amorphes soient un moyen pour la cellule de séquestrer les fragments N-ter toxiques de la Htt mutée, ainsi que des protéines mal repliées pouvant être plus toxiques et entraîner plus de dommages à la cellule que sous leur forme soluble, expliquant ainsi leur rôle protecteur dans la cellule.

Les agrégats : une barrière physique

Les agrégats peuvent bloquer physiquement le transport à l'intérieur des terminaisons axonales. En effet, les neurites dystrophiques dans le cerveau de patients MH présentent plusieurs caractéristiques d'un blocage axonal telles que l'accumulation de vésicules et d'organelles dans les projections axonales et les multiples agrégats de Htt (Gil and Rego,

2008). L'altération de l'interaction de la Htt avec HAP1 perturbe le rôle de la Htt dans le transport, et la Htt mutée forme des agrégats neuritiques qui pourraient par leur taille constituer une barrière physique et contribuer à l'altération du transport axonal (Borrell-Pages et al., 2006).

Les agrégats de polyQs et les membranes

Il a été suggéré que d'autres protéines qui s'agrègent, notamment l' α -synucléine, forment des oligomères en anneau qui peuvent former des pores dans les membranes cellulaires, les rendant ainsi perméables et révélant un autre mécanisme de toxicité du mécanisme d'agrégation.

La Htt peut s'associer avec les membranes (Suopanki et al., 2006). Plus récemment il a été démontré que dans un modèle souris de la MH, la Htt mutante interagit avec les radeaux lipidiques avec une plus grande affinité que la Htt normale (Kegel et al., 2009a), et que l'expansion de polyQ dans la Htt mutée augmente son insertion dans les membranes (Kegel et al., 2009b). De plus, il a été constaté que les agrégats de polyQs pénètrent dans les cellules sans agents de transfection (Ren et al., 2009), ce qui pourrait s'expliquer par la pénétrance membranaire d'agrégats de la Htt. Enfin, rappelons qu'il a été démontré dans le passé que des peptides de polyQ pouvaient former des canaux dans les membranes, non sélectifs aux ions (Hirakura et al., 2000; Monoi et al., 2000).

Il semble ainsi possible d'envisager, par analogie avec l' α -synucléine, que les oligomères de la Htt et les structure en anneaux récemment observées seraient des intermédiaires d'agrégation capables de constituer des pores membranaires. La Htt mutante via le processus d'agrégation pourrait perturber les membranes et ainsi la compartimentalisation cellulaire de molécules (ions, protéines, peptides). Cette caractéristique des polyQs de la Htt pourrait expliquer beaucoup de mécanismes pathologiques observés dans la MH comme la dérégulation du calcium, les défauts mitochondriaux, ou au niveau des synapses. Mais jusqu'à ce jour, ces pores n'ont jamais été observés *in vivo*.

3.4 Les éléments influençant le processus d'agrégation

Les agrégats de polyQ, et notamment ceux de la Htt mutée, sont toxiques pour la cellule. Il a été démontré que de nombreux éléments peuvent influencer ce processus d'agrégation,

comme la taille de l'expansion de polyQ, le clivage de la Htt, les modifications post-traductionnelles ou les séquences protéiques entourant la polyQ.

3.4.1 Effet de seuil

Dans la population, le nombre de glutamines présentes dans chaque protéine n'excède pas un certain seuil, qui est de l'ordre de 35 à 40 résidus sauf dans le cas de SCA6 où ce seuil est bien plus bas (**Figure 16**). Lorsque le nombre de glutamines excède ce seuil, les individus développent la maladie.

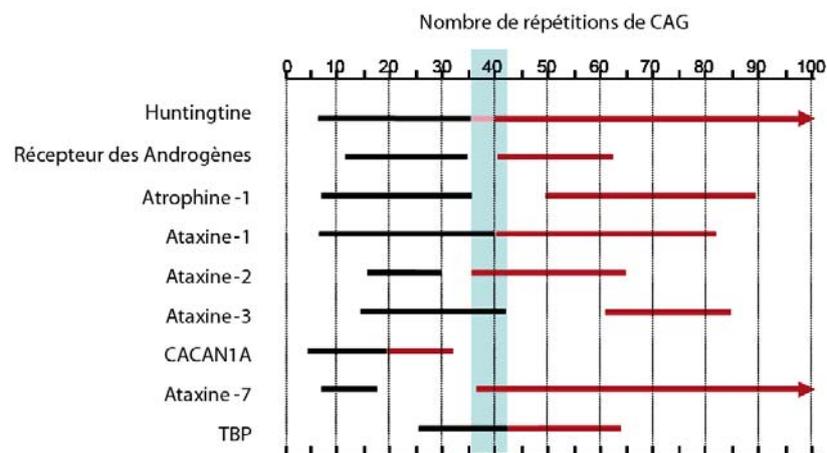


Figure 16 : Un seuil de toxicité variant selon les différentes maladies à polyQ. Les protéines impliquées dans les différentes maladies à polyQ sont indiquées à gauche et le nombre de répétitions de CAG, en haut. Le nombre de répétitions CAG non toxique pour chaque protéine est représenté en noir et le nombre de répétitions toxique en rouge. Le seuil de toxicité le plus courant est indiqué en bleu.

Pour toutes ces maladies à expansion de polyQ, il existe une corrélation inverse entre le nombre de glutamines et l'âge d'apparition des premiers symptômes. Comme indiqué précédemment, plus le nombre de glutamines est important et plus l'âge d'apparition des premiers symptômes est précoce.

Modèle de seuil de toxicité dépendant de la structure des polyQs

Il y a environ 15 ans, Max Perutz, prix Nobel de chimie en 1962 pour avoir découvert la structure de l'hémoglobine, s'intéresse à la structure des polyQs. Dans ses premières études, il démontre qu'un polyQ contenant 15 glutamines peut adopter une conformation en feuillets β lorsqu'il s'agrège (Perutz, 1995).

D'autre part, la capacité à s'agréger et la résistance au traitement SDS/chauffage attribuée aux polyQs seuls étendus (Scherzinger et al., 1997), ont amené à penser que les polyQ longs avaient une conformation particulière, reconnue préférentiellement par un anticorps (Trottier et al., 1995b). Sur la base de ces données, un modèle a été proposé selon lequel les polyQs étendus (> 36) adopteraient une conformation différente des polyQs courts. Cette hypothèse était très séduisante car la conformation particulière des polyQs à partir d'une certaine taille permettait d'expliquer pourquoi la maladie se déclarait uniquement avec des séquences de polyQ supérieure à 36 répétitions, taille à partir de laquelle la polyQ serait toxique, dû à sa conformation (Poirier et al., 2005).

Les failles du modèle structural

Bien que très attrayante, cette hypothèse est en contradiction avec un certain nombre de données récentes dans le domaine. Tout d'abord, il a été démontré que les anticorps 1C2 et MW1 reconnaissent le même épitope, que ce soit pour les polyQs longs ou les polyQs courts (Bennett et al., 2002). L'interaction préférentielle de ces anticorps pour les polyQs étendus est due à leur bivalence d'interaction. En effet, les 2 fragments Fab de l'anticorps interagissent avec les séquences de glutamines (Q) répétées. Les polyQs longs, ayant par définition une chaîne de Qs plus étendue, contiennent plus de sites d'interaction pour les 2 fragments Fab de l'anticorps, qui ont donc plus de difficulté à se dissocier des séquences étendues. Ceci se traduit par une plus grande avidité de l'anticorps complet pour les formes mutées de la Htt (Bennett et al., 2002; Klein et al., 2007; Li et al., 2007) (**Figure 17.A**). De plus, notre équipe a démontré, en combinant des analyses biochimiques et biophysiques, que les polyQs longs (41Q) comme les polyQs courts (22Q) étaient non structurés en solution et avaient des propriétés structurales très similaires (Klein et al., 2007; Masino et al., 2002). Enfin, la cristallisation de polyQ (GQ10G) avec un anticorps (MW1) a révélée une structure linéaire des polyQs (Li et al., 2009) (**Figure 17.B**).

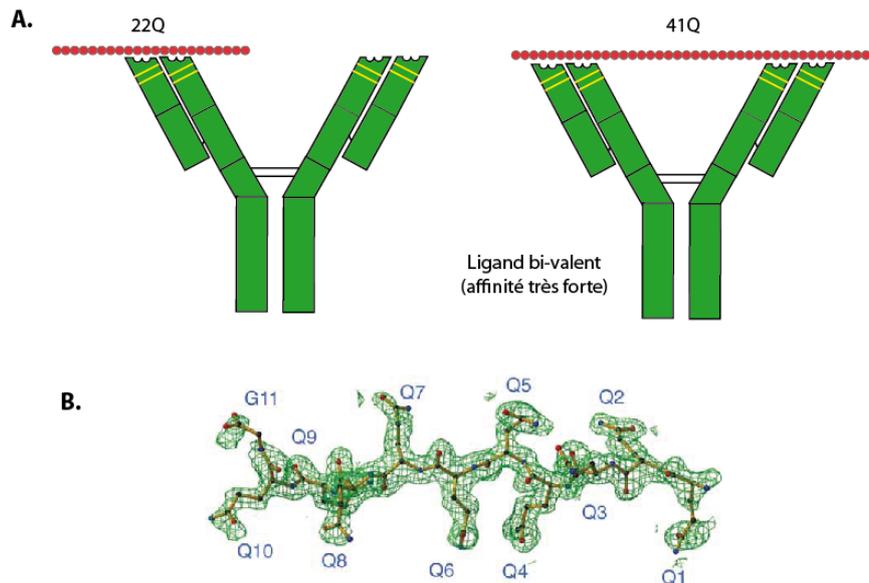


Figure 17. Structure linéaire des polyQs en interaction avec un anticorps. A/ Modèle de bivalence de l'anticorps (1C2 ou MW1) pour une séquence courte (22Q) ou longue (41Q) de polyQ (adapté de Bennett et al., 2002). B/ Structure du polyQ GQ10QG avec l'anticorps MW1 adapté de(Li et al., 2007).

Les polyQs semblent avoir une structure flexible (linéaire, hélice α ou non structuré) (*voir chapitre 2.2.3*). Des études approfondies sur les propriétés structurales des polyQ nous amènent à penser que les polyQs n'adoptent pas de conformations différentes selon leur taille et qu'un autre mécanisme moléculaire doit expliquer l'existence d'un seuil de toxicité dans les maladies à polyQ.

Modèle de seuil toxique dépendant du contexte cellulaire

Comment expliquer alors le seuil de toxicité si les polyQs longs (pathogéniques) comme les polyQs courts (non pathogéniques) ont les mêmes propriétés structurales ? La distinction majeure entre petits et longs polyQs consiste en leur cinétique d'agrégation : ce processus est en effet d'autant plus rapide que l'expansion est longue. Un autre modèle expliquant le seuil de toxicité observé dans les maladies à polyQ a été proposé : le "modèle de seuil toxique contexte dépendant" (**Figure 18**). Ce modèle propose que la toxicité des polyQs augmente graduellement en fonction de leur taille et que l'apparition du seuil de toxicité dépende de la taille de la polyQ, de son contexte protéique et cellulaire. Ainsi, l'apparition d'un seuil apparent de toxicité découlerait à la fois d'une cinétique accrue d'agrégation de fragments de protéines mutées en fonction de la taille de la polyQ, et de l'incapacité croissante de la cellule à dégrader ces entités toxiques. La déclaration tardive des formes non juvéniles de ces maladies pourrait donc résulter d'une accumulation lente de ces entités toxiques,

combinée à une capacité cellulaire d'élimination de ces entités progressivement réduite lors du processus naturel de vieillissement. Enfin, les facteurs propres à chaque protéine, comme leur séquence en a.a., leur niveau et lieu d'expression, leurs modifications post-traductionnelles, leurs interactions et leur demi-vie influenceraient le seuil apparent de toxicité dans chacune des maladies à polyQ.

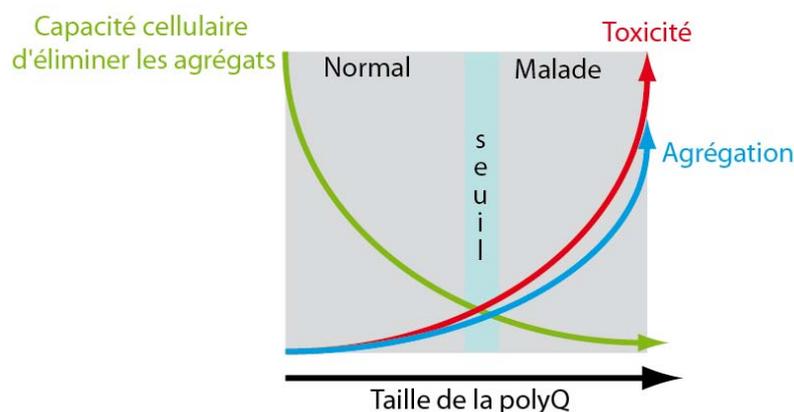


Figure 18 : Modèle de seuil toxique dépendant du contexte cellulaire. L'augmentation de la taille de la polyQ (flèche noire) entraîne respectivement une augmentation de la cinétique d'agrégation (flèche bleue), une diminution de la capacité cellulaire à éliminer les agrégats (flèche verte) et une augmentation de la toxicité (flèche rouge). Le seuil apparent de toxicité (rectangle bleu) résulterait de l'inhérente toxicité des polyQ qui s'accumulent dans le contexte cellulaire, et des capacités de la cellule à prévenir la toxicité de ces entités et les dégrader.

3.4.2 Le clivage de la Htt mutée

L'analyse des inclusions nucléaires, découvertes dans le cerveau de patients MH, a montré qu'elles contiennent un fragment N-ter de la Htt portant l'expansion de polyQ. Ce fragment a été retrouvé à la fois dans les inclusions nucléaires et dans les neurites dystrophiques présentes dans le cortex et le striatum de patients MH (DiFiglia et al., 1997). La Htt mutée subit donc un clivage protéolytique qui pourrait participer au processus d'agrégation. Le clivage protéolytique des protéines mutées a également été mis en évidence dans d'autres maladies à polyQ incluant plusieurs SCAs, SBMA et DRPLA (Tarlac and Storey, 2003).

Des sites de clivages pour la caspase-3 et les calpaïnes ont été identifiés à l'intérieur des 600 premiers a.a. de la Htt (**Figure 19**). Ce clivage protéolytique semble dépendant de l'expansion de polyQ. En effet, des études ont montré que la présence d'une longue expansion de polyQ augmente la protéolyse des protéines qui la contiennent (Gafni and Ellerby, 2002; Goldberg et al., 1996; Kim et al., 2001; Sun et al., 2002).

D'autre part, Deux sites de coupures de la Htt mutée ont été mis en évidence dans des modèles de culture de exprimant la Htt mutée (Lunkes et al., 2002) (Ratovitski et al., 2007). Les fragments N-ter de Htt mutée ainsi générés, qui pourraient résulter de l'action d'endopeptidases de type aspartyl, s'accumulent dans les régions nucléaires et cytoplasmiques avant d'induire une toxicité cellulaire. Récemment un des sites de clivage a été identifié; il s'agit de arginine 167 générant un fragment nommé cp-2 (cleavage product-2) (Ratovitski et al., 2009). L'autre site serait localisé entre les acides aminés 81-129, générant un fragment cp-1 ((cleavage product-1) d'une taille proche de l'exon-1 de la Htt (Lunkes et al., 2002; Ratovitski et al., 2009). Il est intéressant de noter que tous ces "points-chauds" de protéolyse sont regroupés dans des zones de faible complexité structurale encadrant la zone HEAT1 de la Htt.

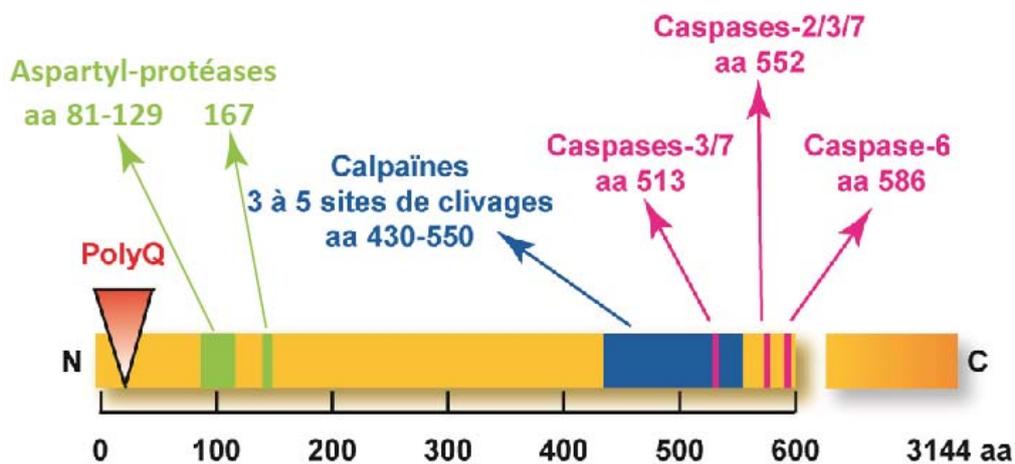


Figure 19 : Sites de clivages protéolytiques identifiés au sein de la Htt. La Htt contient plusieurs sites de clivages pour diverses protéases de la famille des caspases (rose), des calpaïnes (bleu) et des aspartyl-protéases (vert). L'expansion de polyglutamine (polyQ) est représentée par un triangle rouge.

Une étude a mis en évidence un rôle de la caspase-6, capable de cliver la Htt à l'a.a. 586, dans la dégénérescence neuronale. Dans cette étude, deux modèles murins de la MH ont été générés. Ces souris exprimaient la Htt mutée, soit résistante au clivage par la caspase-3, soit résistante au clivage par la caspase-6. À l'inverse des souris exprimant la Htt mutée non clivable par la caspase-3, les souris exprimant la Htt mutée résistante au clivage par la caspase-6 n'ont développé aucune dégénérescence striatale et aucune dysfonction neuronale (Graham et al., 2006). Ces résultats suggèrent donc que la protéolyse de la Htt mutée par la caspase-6 est un événement important dans la dégénérescence neuronale dans la MH. Un mécanisme permettant d'expliquer le rôle de la caspase-6 dans la pathologie a été proposé tout dernièrement par la même équipe. Les auteurs montrent que, contrairement

aux fragments de Htt générés par les caspases-2/3 qui sont localisés dans la région périnucléaire, les fragments de Htt générés par la caspase-6 sont enrichis dans le noyau des cellules striatales où ils co-localisent avec la caspase-6 active. La localisation différentielle des fragments de Htt mutée pourrait donc fournir une explication sur la toxicité sélective des fragments de Htt clivée à l'a.a. 586 par la caspase-6 (Warby et al., 2008).

3.4.3 Modifications post-traductionnelles de la Htt et agrégation

La Htt peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles. Certaines de ces modifications vont moduler la capacité de la Htt mutée à former des agrégats. En effet, plusieurs études indiquent que la phosphorylation de la Htt serait neuroprotectrice car elle permettrait d'empêcher son clivage et donc, son agrégation. La Htt peut être phosphorylée sur la sérine 421 par la protéine kinase Akt (Serine/threonine protein kinase) et SGK (Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase). Cette phosphorylation diminue la toxicité de la Htt mutée *in vitro* (Humbert et al., 2002; Rangone et al., 2004). De plus, la phosphorylation endogène de la sérine 421 de la Htt mutée est significativement réduite dans le striatum de souris transgéniques modélisant la MH (Warby et al., 2005). La Htt peut également être phosphorylée sur la sérine 434 par Cdk-5 (Cyclin-dependent kinase-5). Cette phosphorylation réduit le clivage protéolytique de la Htt par les caspases à l'a.a. 513 (**Figure 19**), atténuant ainsi la formation d'agrégats et la toxicité cellulaire induite par la Htt mutée (Luo et al., 2005). Enfin, une étude récente a permis d'identifier plus de six nouveaux sites de phosphorylation. La mutation de l'un des sites (sérine 536) présents dans le domaine de clivage des calpaïnes (**Figure 19**) inhibe le clivage par les calpaïnes et diminue la toxicité induite par la Htt mutée (Schilling et al., 2006).

En plus de la phosphorylation, la Htt subit d'autres modifications pouvant également moduler la toxicité de la Htt mutée. Ainsi, la Htt peut être sumoylée. La sumoylation correspond à l'établissement d'une liaison covalente entre des protéines SUMO et la protéine modifiée. Cette modification post-traductionnelle entraîne des changements de propriétés des protéines, en modifiant les interactions intra et/ou intermoléculaires, modulant ainsi leur localisation subcellulaire, leur activité et leur stabilité. La sumoylation de la Htt a été mise en évidence dans un modèle drosophile de la MH. Dans ce modèle, la sumoylation d'un fragment pathogénique de la Htt sur des résidus lysines augmente la neurodégénérescence. A l'inverse, la mutation de ces lysines, qui empêche la sumoylation,

réduit la pathologie MH dans ce modèle. De même dans des neurones striataux immortalisés, la sumoylation d'un fragment pathogénique de la Htt le stabilise et réduit sa capacité à former des agrégats (Steffan et al., 2004).

La Htt peut également être modifiée par palmitoylation, qui correspond à l'addition de l'acide palmitique sur la protéine. Une équipe a montré que cette modification se produit sur la cystéine 214 de la Htt normale. La protéine qui réalise cette palmitoylation est la palmitoyl transférase HIP14 (**Htt Interacting Protein 14**). Lorsque la Htt contient l'expansion de polyQ, son interaction avec HIP14 est altérée, entraînant ainsi une diminution de son niveau de palmitoylation. La mutation du site de palmitoylation de la Htt ainsi que la diminution de l'expression de la protéine HIP14 conduisent à une augmentation de la formation des inclusions nucléaires et de la toxicité neuronale *in vitro*. A l'inverse, la surexpression de HIP14 réduit la présence des inclusions, suggérant que l'inhibition de la palmitoylation pourrait contribuer à la formation des inclusions (Yanai et al., 2006).

3.4.4 Importance des séquences entourant la polyQ sur le processus d'agrégation

Rappelons que la cinétique d'agrégation est d'autant plus rapide que la taille de polyQ est longue (**chapitre 3.1.4**) et que de nombreuses études ont étudié l'agrégation de polyQ seuls, démontrant que les séquences entourant les polyQ ne sont pas essentiels à leur agrégation. Cependant, de plus en plus d'études démontrent que les séquences bordant la polyQ de la Htt ont une influence capitale sur la cinétique d'agrégation de l'exon 1. Dans ce sens, en 2009, l'équipe de Wetzel a travaillé sur les 17 premiers a.a. de la Htt décrits dans le **chapitre 2.1**. Il a ainsi été démontré que les 17 premiers a.a. de la Htt accélèrent drastiquement l'agrégation de l'exon 1 de la Htt (Thakur et al., 2009), phénomène qui avait déjà été observé en 2007 (Rockabrand et al., 2007). De plus, il a été proposé que ces a.a initient l'agrégation de l'exon 1 en générant des structures de types « micelles » qui forment, par nucléation, des agrégats fibrillaires précédant les structures de types amyloïdes (Thakur et al., 2009) (**Figure 20**).

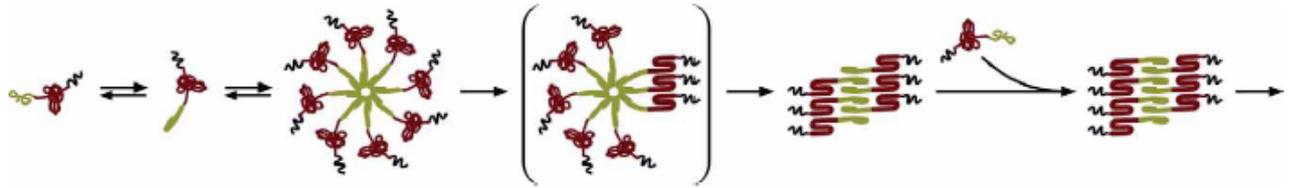


Figure 20 : Modèle illustrant comment les 17 premiers acides aminés de la Htt (Htt-NT) pourraient initier le processus d'agrégation. Le domaine Htt-NT (en jaune) devient non structuré quand la taille de la polyQ augmente. Non structuré, il s'agrège générant ainsi des oligomères qui exposent leur polyQ (rouge) et domaine PRD (noir). Dans un premier temps, les polyQ ne s'associent pas entre eux. Dans un deuxième temps, ils s'associent et forment des feuillettes β pour générer ultimement des fibres et agrégats de types amyloïdes (Thakur et al., 2009).

Le même groupe a également étudié le rôle du domaine riche en proline adjacent à la PolyQ du côté C-ter de l'exon 1 de la Htt. Ils ont démontré que l'ajout d'une séquence de 6 à 10 prolines du côté C-ter d'un peptide synthétique de 40 glutamines, ralentit et déstabilise la formation d'agrégats de types amyloïdes *in vitro* (Bhattacharyya et al., 2006). De plus, la toxicité des agrégats est plus élevée en l'absence du domaine PRD (Dehay and Bertolotti, 2006; Duennwald et al., 2006). D'un autre côté, il a été démontré que la suppression des séquences prolines de l'exon 1 de la Htt diminue la taille des corps d'inclusions et le recrutement de partenaires interagissant avec ce PRD dans les agrégats. Ces résultats suggèrent que les protéines interagissant avec le domaine proline de la Htt, auparavant séquestrées dans les corps d'inclusion, sont libres d'établir leur fonction dans la cellule (Qin et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la présence du PRD de la Htt diminue la formation et la toxicité des agrégats, mais est responsable du recrutement de certains partenaires dans les corps d'inclusion.

Nous avons vu que les polyQs étendus conféraient un gain de fonction toxique aux protéines porteuses. En effet l'expansion de polyQs est la seule caractéristique commune des différentes protéines impliquées dans les maladies à polyQ, et entraîne des pathologies neuronales à partir d'un seuil pathologique. De plus, les peptides de polyQ sont suffisants pour induire une toxicité (Marsh et al., 2000; Yang et al., 2002).

D'autre part, le processus d'agrégation a une fonction pathologique majeure dans ces maladies. Le contexte protéique dans lequel se trouve l'expansion de polyQ, spécifique dans chacune de ces maladies, joue un rôle clef dans les propriétés de l'agrégation. Par

exemple, les séquences entourant la polyQ ou les modifications post-traductionnelles de la Htt influencent l'agrégation de fragments de la protéine. De plus, la Htt a une fonction cellulaire essentielle et un nombre considérable d'interacteurs. Dans un contexte pathologique, le processus d'agrégation pourrait empêcher la Htt de réaliser ses fonctions cellulaires normales, soit en séquestrant ses partenaires dans des compartiments cellulaires inappropriés, soit en perturbant les interactions avec ses partenaires. Ce phénomène entraînerait une perte de fonction de la Htt. Cette perte de fonction n'est sans doute pas la cause principale de la pathologie, mais elle pourrait néanmoins participer à exacerber les symptômes et à expliquer certaines spécificités propres à chaque maladie à polyQ.

Ainsi, le chapitre suivant présentera quelques exemples de dysfonctions de la Htt impliquant des perturbations cellulaires importantes.

4. Corrélation entre dysinteraction et dysfonction de la Htt

Altération de l'expression des gènes dans la MH

L'idée selon laquelle le noyau pourrait être un site de toxicité majeur dans les cellules exprimant la Htt mutée, vient du fait que la Htt est majoritairement cytoplasmique tandis que les fragments N-ter issus du clivage de la Htt sont nucléaires (Martindale et al., 1998). De plus, la localisation nucléaire de la Htt mutée augmente la toxicité des cellules *in vitro* et *in vivo* (Schilling et al., 2004).

Ainsi, il n'est pas surprenant de constater que dans la MH et dans de nombreux modèles de la maladie, la dérégulation de l'expression d'une multitude de gènes a été observée. En altérant l'expression de gènes codant pour des protéines essentielles à la physiologie des neurones, la Htt mutée entraînerait leurs dysfonctions.

La régulation de l'expression des gènes fait intervenir une multitude de mécanismes impliquant une grande variété de protéines. Ainsi, la transcription des gènes est hautement régulée par les facteurs de transcription, qui sont soit spécifiques de l'expression de certains gènes, soit impliqués dans la machinerie basale de la transcription. Mais elle serait également régulée par des co-régulateurs et des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. La régulation de l'expression des gènes implique aussi des mécanismes liés à la stabilité et à l'épissage des ARNm. Dans les maladies à polyQ, l'activité des protéines

impliquées dans ces différents processus serait altérée par la protéine mutée, entraînant une dérégulation de l'expression des gènes (Riley and Orr, 2006).

La cause majeure de la dérégulation transcriptionnelle des gènes dans la MH semble être due aux interactions aberrantes de la Htt mutée avec de nombreuses protéines qui ont un rôle essentiel dans ce processus (**Tableau 2**). Selon le type d'interaction, l'activité des protéines est diminuée ou augmentée, induisant une dérégulation de l'expression des gènes.

Nom	Fonction	Région de la htt impliquée dans l'interaction	Effet de l'expansion polyQ sur l'interaction
CA150	Activateur	inconnue	aucun
CBP	Co-Activateur	NT (aa 1-588)	↗
CtBP	Co-Répresseur	aa 182-186	↘
HYP-C	Facteur de transcription	PolyP	↗
N-CoR	Récepteur nucléaire co-répresseur	NT (aa 1-171)	↗
NF-κB	Facteur de transcription	Répétitions HEAT	inconnu
p53	Facteur de transcription	PolyP	aucun
PQBP-1	Répresseur transcriptionnel	PolyQ	↗
NRSF	Répresseur transcriptionnel	aa 1-548	↘
Sin3a	Répresseur transcriptionnel	NT (aa 1-171)	↗
SP1	Facteur de transcription	NT (aa 1-171)	↗
TAFII-130	Facteur de transcription	NT (aa 1-480)	aucun
TBP	Facteur de transcription	inconnue	↗

Tableau 2 : Protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle et interagissant avec la Htt. La région de la Htt impliquée dans l'interaction avec ces protéines est indiquée. (NT : N-terminale). Les flèches indiquent si les interactions sont augmentées ou diminuées par l'expansion de polyQ. D'après (Borrell-Pages et al., 2006).

Parmi les mécanismes régulant l'expression des gènes, un défaut d'acétylation des histones a été rapporté dans la MH. Une hypoacétylation des histones a ainsi été mise en évidence dans de nombreux modèles de la MH (Sadri-Vakili and Cha, 2006). Cette hypoacétylation des histones est associée à l'inhibition de la transcription des gènes. Donc, un défaut d'acétylation des histones dans la MH pourrait expliquer la répression transcriptionnelle de gènes observée dans la pathologie. Ainsi, une première étude a montré que la Htt mutée

interagit avec le domaine acétyltransférase de deux protéines, CBP (cAMP response element **B**inding **P**rotein) et P/CAF (p300/CBP-associated factor), diminuant de ce fait leur activité acétyltransférase et par conséquent l'acétylation des histones (Steffan et al., 2001). Les auteurs ont alors suggéré qu'une inhibition de l'activité enzymatique des HDACs (histone **d**eacetylase) permettrait de restaurer l'expression des gènes. Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont utilisé des inhibiteurs pharmacologiques des HDACs qui ont permis de restaurer, *in vitro*, le niveau d'acétylation des histones. *In vivo*, dans des modèles drosophiles de la MH, ces inhibiteurs réduisent la dégénérescence induite par la Htt mutée et augmentent la viabilité des drosophiles. Depuis cette étude, de nombreux inhibiteurs de HDACs ont été testés dans d'autres modèles de la MH, montrant un effet neuroprotecteur similaire à celui observé dans les modèles drosophiles (Kazantsev and Hersch, 2007).

Dysfonction de la Htt mutée et impact sur le transport vésiculaire

Saudou et ses collaborateurs ont démontré que contrairement à la Htt normale, la Htt mutée contenant une grande expansion de polyQ (100Q) est incapable, dans un temps court (120 minutes), d'assumer sa fonction au niveau de l'organisation du réseau de microtubules, (Pardo et al., 2010).

D'autre part, il a été démontré par immuno-précipitation que l'exon 1 de la Htt mutée interagit plus fortement avec la β -tubuline que la Htt normale. Il est proposé que cette interaction aberrante soit responsable, en partie, des dérégulations du transport vésiculaire (Smith et al., 2009). En parallèle, il est connu que l'ajout de fragment N-ter de la Htt (correspondant à l'exon 1 de la Htt) dans le calamar est suffisant pour diminuer le transport vésiculaire dans les 2 sens (Szebenyi et al., 2003). D'autres expériences ont confirmé cette observation chez la drosophile, dans des cultures primaires de striatum provenant de souris modèle de la MH et dans des extraits de cerveaux de patients. Ces expériences ont démontré que la quantité de protéines solubles impliquées dans le transport vésiculaire (dynéine, dynactin et kinésine) diminue, du fait de leur recrutement dans les agrégats formés à partir de l'exon 1 de la Htt (Gunawardena et al., 2003; Trushina et al., 2004).

Il semble que la Htt normale ait une fonction régulatrice dans le transport vésiculaire (Colin et al., 2008). Cependant, le mécanisme moléculaire à l'origine de la dysfonction de ce transport dans la MH reste obscur. En effet, certains groupes proposent qu'en l'absence d'agrégation, la Htt mutée est suffisante pour induire une dysfonction du transport

vésiculaire (Pardo et al., 2010). Néanmoins, les dernières données présentées ci-dessus suggèrent au contraire que le mécanisme d'agrégation de l'exon-1 de la Htt ait un rôle dans la dysfonction du transport vésiculaire (Gunawardena et al., 2003; Smith et al., 2009; Trushina et al., 2004).

Dysfonction de la Htt mutée et impact sur l'endocytose

En 2009, le groupe de Difiglia a comparé des cultures de fibroblastes issus de patients à ceux issus de personnes saines. Leur groupe a ainsi identifié des difficultés à constituer des vésicules à partir d'endosomes chez les fibroblastes de patients. Ceci suggère que le recyclage des membranes et des récepteurs après l'endocytose est altéré en présence de la Htt mutée (Li et al., 2009) (**Figure 21**).

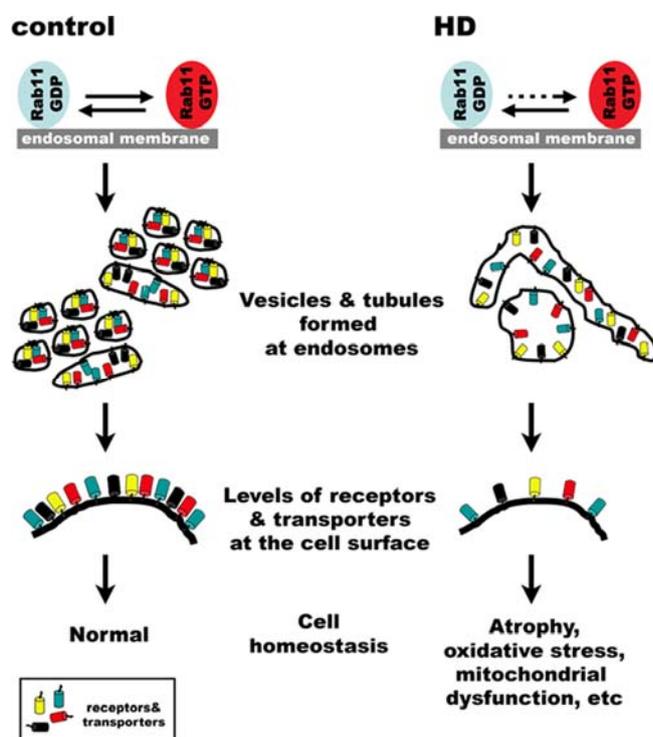


Figure 21 : Représentation schématique de l'activation de Rab11 dans des cellules contrôles et des cellules modèles de la MH : conséquences fonctionnelles sur l'homéostasie cellulaire. À gauche, l'activité normale de Rab11 sur les membranes d'endocytose : Rab11-GDP est recruté aux membranes d'endocytose. Sous forme Rab11-GTP il devient actif et peut ainsi recruter une série d'effecteurs. L'activateur de Rab11 n'est pas encore connu mais la Htt a une fonction dans cette activation. Au final l'activation de Rab11 entraîne la formation de petites vésicules et de courts tubules permettant de recycler les endosomes et de maintenir un niveau normal de récepteurs et transporteurs à la surface de la cellule. Le groupe de Difiglia a proposé un modèle (à droite) dans lequel la Htt mutée perturberait l'activation de Rab11. En effet, la Htt mutée inhiberait la conversion de Rab11-GDP en

Rab11-GTP (comme indiqué par les pointillés). Par conséquent, Rab11 serait moins actif, ce qui conduirait à la formation de larges vésicules et de longs tubules au niveau des endosomes de recyclage. Au final, ceci entraînerait une diminution du niveau de récepteur et de transporteurs à la surface de la cellule. Ceci implique une dysfonction précédant une atrophie cellulaire.

SH3GI3 est un interacteur intéressant de la Htt. En plus d'être impliqué dans le processus d'endocytose, il est exprimé spécifiquement dans le cerveau et les testicules, là où la Htt est la plus exprimée. Il est dommage de constater que son rôle précis dans le processus d'endocytose n'a pas encore été élucidé. Cependant, il a été rapporté que son interaction

avec la Htt est renforcée en présence de la mutation (Sittler et al., 1998). De façon plus importante, l'agrégation des fragments N-ter de la Htt, contenant soit 51Q soit 93Q, est accélérée lorsqu'ils sont co-exprimés avec SH3GL3 (Sittler et al., 1998). Ce processus d'agrégation accéléré contribue à la dysfonction neuronale en séquestrant des protéines participant au transport vésiculaire (Qin et al., 2004). D'autre part, l'interaction de SH3GL3 avec la Htt est bien caractérisée puisqu'en plus des caractérisations biochimiques classiques démontrant que SH3GL3 interagit *via* son domaine SH3 avec le PRD de la Htt, des études biophysiques et notamment la RMN ont caractérisé l'interaction de ce domaine SH3 avec des peptides du PRD de la Htt. Cette étude a permis de connaître la zone d'interaction exacte ainsi que l'affinité (de l'ordre du millimolaire) de ce domaine SH3 avec la Htt à partir de peptides et de domaines purifiés, solubles et dépourvus de fragments agrégés (Gao et al., 2006).

Dérégulation de l'homéostasie du calcium due à des interactions aberrantes de la Htt mutée : une première hypothèse pour expliquer la spécificité de la dégénérescence dans la MH

Des dysfonctions de signalisation du calcium ont été observées dans la MH. Il a été proposé que la Htt puisse avoir une fonction dans la régulation du calcium (Tang et al., 2003). En effet, HAP1 qui interagit avec la Htt et qui est impliqué dans le transport vésiculaire axonal dépendant des microtubules (**voir chapitre 2.5.5**) participe également à la régulation du calcium (Engelender et al., 1997; Li et al., 1995).

HAP1 interagit avec un canal calcique du réticulum endoplasmique abondant dans le système nerveux central, nommé IP3R1 (pour **Récepteur aux Inositol-(1,4,5) Triphosphate (InsP₃) de Type 1**). De façon intéressante, il a été montré que la fonction de cet interacteur de HAP1 est affectée par la taille de la polyQ de la Htt. Il est proposé que le complexe HAP1/IP3R1 présente une affinité anormalement forte pour la Htt mutée, ce qui a pour conséquence d'induire une sensibilité accrue du récepteur pour son ligand InsP₃, résultant ainsi en une ouverture du canal bien plus fréquente qu'à la normale, et donc à un déséquilibre du taux de calcium intracellulaire (Tang et al., 2003). Le calcium est un messenger secondaire contrôlant de nombreux processus physiologiques, dont la compartimentalisation spatiale et temporelle est cruciale. Son déséquilibre est une source connue de stress pouvant induire la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Berridge et al.,

2000). D'autre part, il est connu que l'inactivation génétique de IP3R1 est responsable de phénotypes ataxiques sévères dans des modèles murins (Matsumoto et al., 1996; Street et al., 1997).

L'observation d'une hypersensibilisation de IP3R1, causée par son interaction anormalement forte avec la Htt mutée, permet d'envisager un premier modèle expliquant comment la dysfonction de la Htt mutée pourrait mener à une dégénérescence spécifique du striatum, *via* un mécanisme de type excitotoxique. En effet, ce phénomène toxique est déclenché par le glutamate qui opère, entre autres, par une altération des flux calciques. Les MSNs du striatum pourraient être soumis à ce stress étant donné qu'ils reçoivent d'important influx glutamatergique en provenance du cortex (**voir chapitre 1.3.3.2 et Figure 7**).

Ce processus pathologique est intéressant car il permettrait d'expliquer, en partie, la spécificité de la dégénérescence. De plus, un article récent a suggéré que le rétablissement des interactions normales entre la Htt et certains partenaires permettant de restaurer la signalisation du calcium intracellulaire améliorerait les symptômes de modèles de la MH (Dai et al., 2009). En effet, l'injection d'un AAV (**Adeno-Associated Virus**) contenant le fragment 76-121 de la calmoduline, directement dans le striatum de souris modèle de la MH, améliore drastiquement le phénotype de ces souris. Ces expériences ont été reproduites dans des cellules différenciées issues de neuroblastome et exprimant de façon stable la Htt mutée (Dudek et al., 2010). Il a été proposé que l'expression du fragment de calmoduline diminue l'interaction anormale de la Htt mutée avec la calmoduline. Ce rétablissement des interactions permettrait de rétablir un niveau intracellulaire de calcium proche de la normale (Dudek et al., 2008) et de diminuer les symptômes de la MH dans des modèles souris.

Cependant, d'autres équipes ont également essayé de restaurer un niveau normal de calcium intracellulaire en agissant sur la capacité de stockage du calcium par les mitochondries. Ces expériences ont été infructueuses. En effet, il n'y a pas eu d'amélioration du phénotype des souris modèles de la MH (Perry et al., 2010).

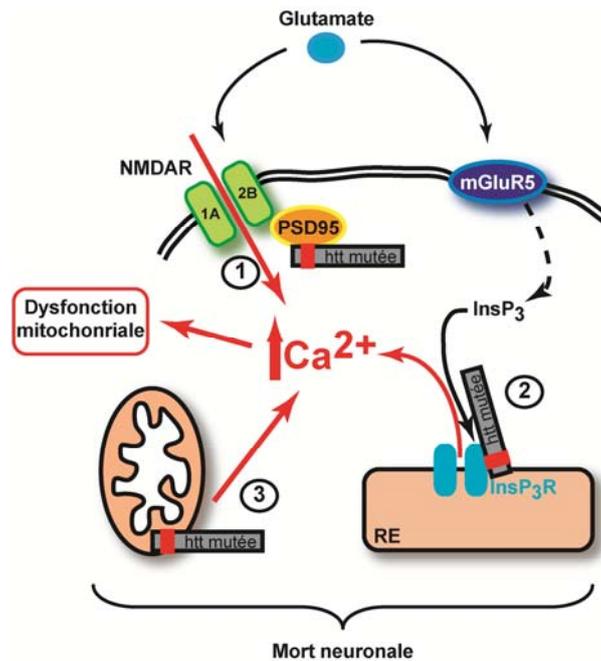


Figure 22 : Modèle d'excitotoxicité des neurones épineux du striatum, lié à des interactions aberrantes de la Htt mutée. La membrane plasmique des neurones épineux du striatum est riche en deux types de récepteurs du glutamate : NMDAR (un complexe protéique de composition hétérogène dont les sous-unités NR1/NR2B sont abondantes dans le striatum) et mGluR5 particulièrement présent dans le striatum. NMDAR, qui est aussi un canal calcique, est régulé négativement par PSD95, un interacteur de la Htt. mGluR5 est un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G qui régule l'activité de la phospholipase C (PLC), enzyme catalysant la synthèse de l'inositol 3 phosphate (InsP3), ligand des canaux calciques de la famille des IP3Rs. Selon le modèle actuel (Bezprozvanny and Hayden, 2004) la Htt mutée, en réponse à des taux normaux de glutamate, perturberait les flux calciques *via* plusieurs mécanismes moléculaires synergiques :

- (1) la protéine mutée rendrait NMDAR hypersensible au glutamate en diminuant l'interaction des sous-unités NR1A/NR2B du récepteur avec leur répresseur PSD95.
- (2) la Htt mutée modulerait l'activité du récepteur IP₃R₁ le rendant sensible à des taux normaux d'InsP3 générés par l'activité de mGluR5.
- (3) la dérégulation combinée de NMDAR et IP3R1 mènerait à une élévation anormale du taux de calcium cytoplasmique qui s'accumulerait dans les mitochondries et altérerait ses fonctions. L'accumulation excessive du calcium entraînerait l'ouverture du pore mitochondrial PTP (permeability transition pore) et la libération de cytochrome C conduisant à la mort des MSNs par apoptose. Adapté d'après (Bezprozvanny and Hayden, 2004).

Nous avons vu que des interactions aberrantes (dysinteractions) de la Htt mutée peuvent avoir des conséquences graves au niveau du fonctionnement cellulaire. Ceci met en évidence qu'une perte de fonction de la Htt mutée participerait aux mécanismes pathologiques observés dans la MH, et pourraient expliquer les spécificités de cette maladie face aux autres maladies à polyQ.

Cependant, il est étonnant de voir que la caractérisation de ces dysinteractions a été très succincte, dans le sens où elles ont été réalisées avec des techniques classiques de

biochimie comme des PD, IP et Y2H (Li and Li, 2004). Ces techniques sont peu quantitatives, et elles ont été employées dans des conditions où le processus d'agrégation n'est pas contrôlé. C'est la raison majeure pour laquelle très peu d'éléments permettent d'expliquer les mécanismes moléculaires à l'origine de ces dysinteractions. Ce manque d'information est regrettable car la compréhension de l'origine des dysinteractions de la Htt est un axe thérapeutique potentiellement intéressant pour diminuer l'impact pathogénique de la Htt dans son contexte cellulaire.

1. Contexte de la recherche

Nous avons vu précédemment qu'une dérégulation des interactions de la Htt avec ses partenaires pourrait avoir un rôle majeur dans la pathogénèse de la MH. En effet, les « dysinteractions » de la protéine mutée avec ses partenaires naturels pourraient causer des dysfonctions cellulaires précédant la mort sélective des neurones. De plus, le fait que la Htt mutée interagisse de façon aberrante avec ses partenaires constitue une hypothèse très séduisante qui pourrait expliquer les mécanismes pathologiques spécifiques impliqués dans la MH.

Cependant, le mécanisme moléculaire de ces dysinteractions n'a jamais été étudié. Il a été proposé, sans toutefois le démontrer, que la Htt mutée adopte une conformation structurale particulière qui participerait aux dysinteractions observées (Li et al., 1995; Sittler et al., 1998; Trottier et al., 1995b). Cette hypothèse de changement conformationnel de la polyQ étendue fait écho au modèle de "seuil structural" mentionné précédemment (**chapitre 2.1.3 et 3.1.4**). Cependant, les travaux de notre laboratoire ne supportent pas ce modèle et démontrent au contraire que des polyQ de tailles pathologique et non-pathologique ont des propriétés structurales très proches. D'autre part, les dysinteractions publiées de la Htt ont été étudiées au moyen de techniques peu quantitatives (pull-down, immuno-précipitation, double hybride chez la levure), dans des conditions où le processus d'agrégation de la Htt mutée n'a pas été contrôlé (**Chapitre 2.5.2**). Or, il est connu que la surexpression de protéines porteuses de polyQ mutées génère des agrégats, lesquels peuvent influencer voire séquestrer des protéines endogènes, y compris la Htt soluble (**chapitre 3.2.2**).

Dans ce contexte, notre hypothèse est que la présence de formes agrégées de polyQ pourrait influencer les interactions de l'extrémité N-ter de la Htt, qui contient la polyQ, avec ses partenaires. Ceci pourrait expliquer les nombreuses dérégulations d'interaction rapportées entre Htt mutée et ses partenaires. En effet, la présence d'agrégats de Htt mutée a pu compliquer l'interprétation de données obtenues par ces méthodes. Par exemple, des partenaires de la Htt ont pu être séquestrés dans les agrégats et enrichis dans les fractions analysées après pull-down.

L'objectif principal de mon travail de thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires responsables des dysinteractions de la Htt mutée, avec des techniques quantitatives et dans des conditions où le processus d'agrégation est strictement contrôlé. Si comme nous le suspectons le mécanisme d'agrégation joue un rôle sur les interactions aberrantes de la Htt, traiter l'agrégation permettrait à la fois de supprimer les effets toxiques liés au processus d'agrégation et de rétablir la fonction normale de la Htt.

Par ailleurs, mon étude sur les mécanismes d'interaction de la Htt m'a conduit à m'intéresser, grâce à un projet annexe, à un nouvel interacteur potentiel de la Htt : le récepteur aux ryanodines (RyR). Ce dernier est un canal calcique du réticulum endoplasmique jouant un rôle crucial de contrôle de l'homéostasie du calcium. Notre laboratoire a en effet identifié une importante homologie entre le domaine C-ter d'IP3R, responsable de son interaction avec HAP1, et le domaine C-ter de RyR. Rappelons que l'interaction aberrante de la Htt mutée avec HAP1 et IP3R pourrait être responsable des dérégulations localisées de l'homéostasie du calcium dans les neurones épineux du striatum. La forte homologie entre le domaine C-ter de RyR et celui de IP3R suggère que RyR pourrait également interagir avec la Htt via HAP1, et qu'une éventuelle dysinteraction Htt-HAP1-RyR pourrait également jouer un rôle dans la spécificité de la MH. En collaboration avec le Dr. Katrin Lindenberg et le Pr. Bernhard Landwehrmeyer (Universitätsklinik Ulm - Allemagne), j'ai participé à la caractérisation de ce nouveau partenaire de la Htt.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à la Htt et à ses interacteurs. Comme présenté dans l'Introduction, il est proposé que la dysfonction de la Htt mutée soit due à son interaction inadéquate avec certains partenaires, dont l'affinité serait altérée par l'expansion polyQ. Malgré leur importance biologique dans la pathogénèse de Huntington, les mécanismes moléculaires à l'origine de ces dysinteractions sont mal compris. En effet, il a été proposé que la Htt adopte un changement conformationnel en fonction de la taille de sa polyQ qui serait la cause de ses interactions aberrantes, toutefois, cette hypothèse n'a jamais été démontrée (Li et al., 1995; Sittler et al., 1998; Trottier et al., 1995a).

Mécanismes moléculaires à l'origine des dysinteractions de la Htt

Mon projet de thèse principal a été de clarifier le mécanisme par lequel la Htt mutée interagit de façon aberrante avec ses partenaires cellulaires. Pour ce faire, j'ai apporté 2 modifications méthodologiques:

- (1) Les études précédentes utilisant des techniques comparatives (PD, Y2H, IP), j'ai décidé pour la première fois de quantifier l'affinité précise de fragments de Htt pour divers partenaires, au moyen d'une technique biophysique dédiée : la résonance plasmonique de surface (SPR).
- (2) L'influence de la polyQ sur l'interaction de la Htt, dans des conditions où la présence d'agrégats est strictement contrôlée, n'a jamais été étudiée auparavant. Dans le but de déterminer si le processus d'agrégation de la Htt mutée avait influencé les résultats précédents sur l'affinité de la Htt, j'ai utilisé des protéines (Htt et partenaires) très bien caractérisées, et notamment dépourvues de toute forme agrégée ou multimérique soluble.

Pré-requis de l'étude

Pour réaliser cette étude, il a fallu sélectionner des interacteurs pertinents de la Htt. La majorité des partenaires identifiés interagissent avec la partie N-Ter de la Htt : soit le premier HEAT (H1), soit le PRD. Ce PRD est le domaine de la Htt qui participe au plus grand nombre d'interactions rapportées de la Htt, par exemple : la protéine kinase C, PACSIN1 (Modregger et al., 2002), HYP A/FBP11 (Faber et al., 1998), PSD-95 (Sun et al., 2001), RasGAP (Liu et al., 1997) ou encore CA150 (Holbert et al., 2001). Dans la plupart des cas, l'interaction de ces partenaires avec la Htt est dérégulée en présence d'une polyQ étendue. Par exemple, l'interaction de la Htt avec PSD-95 est diminuée tandis que celle avec PACSIN1 ou HYP A est augmentée (Li and Li, 2004). Enfin, le PRD est immédiatement en aval de la séquence polyQ. Cette proximité pourrait faciliter l'étude de l'influence de la taille de la polyQ sur les dysinteractions de la Htt. Enfin, le partenaire et son interaction avec la Htt devaient remplir trois pré-requis majeurs :

- (1) L'interaction Htt/partenaire doit être aberrante en présence de Htt mutée.
- (2) L'interaction Htt/partenaire doit être bien caractérisée aux niveaux biochimique et fonctionnel. Un intérêt particulier sera attribué au partenaire impliqué dans des fonctions cellulaires importantes, dérégulées dans la MH.

(3) Les domaines d'interactions du partenaire et de la Htt doivent pouvoir être purifiés en quantité et qualité suffisantes pour procéder aux analyses par SPR.

HAP1, HIP1 et SH3GL3 ont été mes premiers choix.

Pourquoi HAP1 ?

HAP1 est le partenaire le mieux caractérisé de la Htt. Il est impliqué dans des fonctions cellulaires capitales comme le transport vésiculaire axonal dépendant des microtubules, et la régulation du calcium. Ces 2 fonctions sont altérées en présence de la Htt mutée (Bezprozvanny and Hayden, 2004; Engelender et al., 1997; Rong et al., 2006; Tang et al., 2003). Il est proposé que ces dysfonctions soient la conséquence d'une plus forte interaction entre HAP1 et la Htt muté (Li and Li, 2004; Li et al., 1995).

Pourquoi HIP1 ?

Contrairement à HAP1, l'interaction de HIP1 avec la Htt diminue lorsque la taille de la polyQ augmente (Wanker et al., 1997). HIP1 est une protéine impliquée dans l'endocytose, qui est dérégulée dans la MH. De plus, il est intéressant de noter que des altérations de niveau d'expression de HIP1 ont des effets neurotoxiques (Hackam et al., 2000). Ces observations appuient bien l'hypothèse qu'une altération fonctionnelle de l'interaction Htt/HIP1 pourrait avoir des effets toxiques contribuant à la MH.

Pourquoi SH3GL3 ?

SH3GL3 (endophiline 3) est une protéine qui interagit avec le PRD de la Htt. De plus, SH3GL3 est impliquée dans le processus d'endocytose, fonction dérégulée dans la MH, et semble influencer le processus d'agrégation. En effet, l'agrégation de fragments N-Ter de la Htt s'accélère lorsqu'ils sont co-exprimés avec SH3GL3 (Sittler et al., 1998). Ce processus d'agrégation accéléré pourrait contribuer à la dysfonction neuronale en séquestrant des protéines participant au transport vésiculaire (Qin et al., 2004). Enfin, SH3GL3 est exprimée spécifiquement dans le cerveau et les testicules, zones où la Htt semble plus exprimée (Giachino et al., 1997; Ringstad et al., 1997).

Au-delà de son intérêt biologique, l'interaction de ce partenaire avec la Htt est bien caractérisée. Tout d'abord, les domaines minimaux d'interaction de SH3GL3 avec la Htt ont

été identifiés : le domaine « SH3 » de SH3GL3 interagit avec le PRD de la Htt (**Figure 30**). De plus, il a été rapporté que son interaction avec la Htt est renforcée en présence de la mutation (Sittler et al., 1998). De façon importante, cette interaction de la Htt est l'une des seules à avoir été caractérisée par des techniques biophysiques comme la RMN. Ainsi, la zone d'interaction exacte entre un peptide représentant une dizaine d'a.a. du PRD et ce domaine SH3 est connue, et l'affinité entre SH3 et ce peptide est de l'ordre du millimolaire (Gao et al., 2006). L'utilisation du domaine SH3 par RMN indique que ce domaine produit chez la bactérie est soluble et monomérique, peut être produit en grandes quantités et serait donc idéal pour entreprendre nos analyses par SPR.

RyR : un nouvel interacteur de la Htt ayant un impact potentiel sur la pathogénèse de Huntington

J'ai également entrepris la caractérisation *in vitro* d'un nouvel interacteur potentiel de la Htt : le récepteur au ryanodine (RyR). RyR est un canal calcique du réticulum endoplasmique abondant dans le système nerveux central, impliqué dans la régulation de l'homéostasie du calcium (Ogawa et al., 2000). Notre laboratoire a noté une importante homologie entre RyR et un autre canal calcique interacteur HAP1 et de la Htt, le récepteur aux inositols triphosphate (IP3R), suggérant une interaction potentielle Htt/HAP1/RyR. IP3R/HAP1 présente une affinité anormalement forte pour la Htt mutante, ce qui affecterait l'activité d'IP3R et induirait un déséquilibre chronique du taux de calcium intracellulaire pouvant expliquer la spécificité striatale dans la MH (Tang et al., 2003). Une interaction anormale entre la Htt mutante et HAP1/RyR pourrait donc également participer à la dégénérescence striatale spécifique. Ce projet s'effectue en collaboration avec le Dr. Katrin Lindenberg et le Pr. Bernhard Landwehrmeyer (université d'Ulm, Allemagne).

Méthodologie utilisée pour ces projets

Ces deux projets sont centrés sur l'analyse *in vitro* des interactions entre diverses protéines. J'ai donc suivi une méthodologie commune pour ces deux projets, centrée sur la biologie moléculaire, la biochimie, la caractérisation des protéines purifiées et l'analyse d'interactions (**Figure 23**).

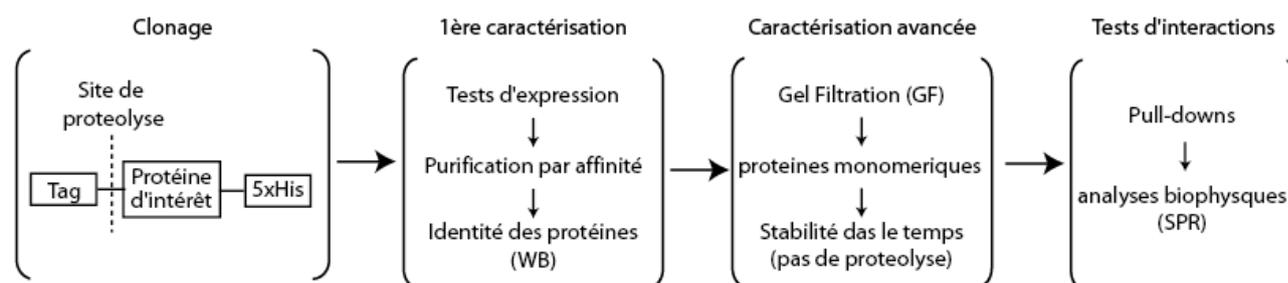


Figure 23 : Méthodologie suivie pour réaliser les différents tests d'interactions de la Htt (de gauche à droite). La biologie moléculaire a été la première étape pour cloner les différents domaines d'intérêt avec différents tags ; la première caractérisation biochimique a consisté à réaliser des tests d'expression, des purifications par affinité et des WB ; pour la deuxième caractérisation avancée, j'ai utilisé la Gel Filtration (GF) et procédé à des tests de stabilité des protéines sur le temps ; enfin 2 tests d'interaction principaux ont été utilisés en fonction de la question biologique posée.

Toutes les protéines recombinantes dans ce projet sont produites chez la bactérie. Les domaines les mieux exprimés ont été purifiés par affinité, puis caractérisés avec une méthode biochimique : la chromatographie par exclusion de taille (**Gel Filtration : GF**). Celle-ci permet de distinguer et d'isoler les formes monomériques solubles de toutes autres formes multimériques ou agrégées. Dans les cas où les formes monomériques ont été observées, j'ai reproduit plusieurs étapes de GF à différents intervalles de temps pour suivre la stabilité des protéines conservées à 4°C ou -20°C. Une fois ces étapes validées, ma stratégie fut d'utiliser la résonance plasmonique de Surface (SPR) pour quantifier l'affinité de chaque partenaire avec le domaine N-Ter de la Htt.

Mes résultats seront présentés selon trois axes majeurs :

- 1. Aspects méthodologiques : biologie moléculaire et biochimie**
- 2. Etude de la polyQ-dépendance des interactions entre Htt et partenaires: quel mécanisme moléculaire explique les interactions aberrantes reportées?**
- 3. RyR : un nouvel interacteur de la Htt ayant un impact potentiel sur la pathogénèse de Huntington**

2. Aspects méthodologiques : biologie moléculaire et biochimie

L'objectif principal de ma thèse a été d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions aberrantes de la Htt avec ses partenaires. Cette étude ambitieuse a nécessité un travail important en amont des études d'interactions. Ainsi, une première partie de mon travail a consisté à sélectionner les protéines et domaines d'intérêts pour les différentes études, générer un ensemble de vecteurs d'expression à l'aide du système **Gateway** (GW) dans le but de produire des protéines recombinantes adaptées aux différents tests d'interaction et enfin, faire une première analyse qualitative de la production de ces protéines recombinantes chez la bactérie.

2.1 Le choix de la méthode de clonage : le système Gateway (GW)

Notre stratégie a été de construire et générer plusieurs domaines des protéines d'intérêts, et de les caractériser afin d'obtenir les interacteurs les plus solubles pour effectuer les tests d'interaction. Sachant que le système d'expression ainsi que les tags fusionnés aux domaines jouent un rôle important sur la solubilité des domaines, nous avons choisi un système de clonage flexible : le système « Gateway ». Ce système offre l'avantage de faciliter le clonage des séquences d'intérêt dans un ensemble de vecteurs d'expression, assurant la synthèse de protéines recombinantes couplées à différents domaines de fusion qui facilitent leur solubilité et leur purification (**Figure 24**).

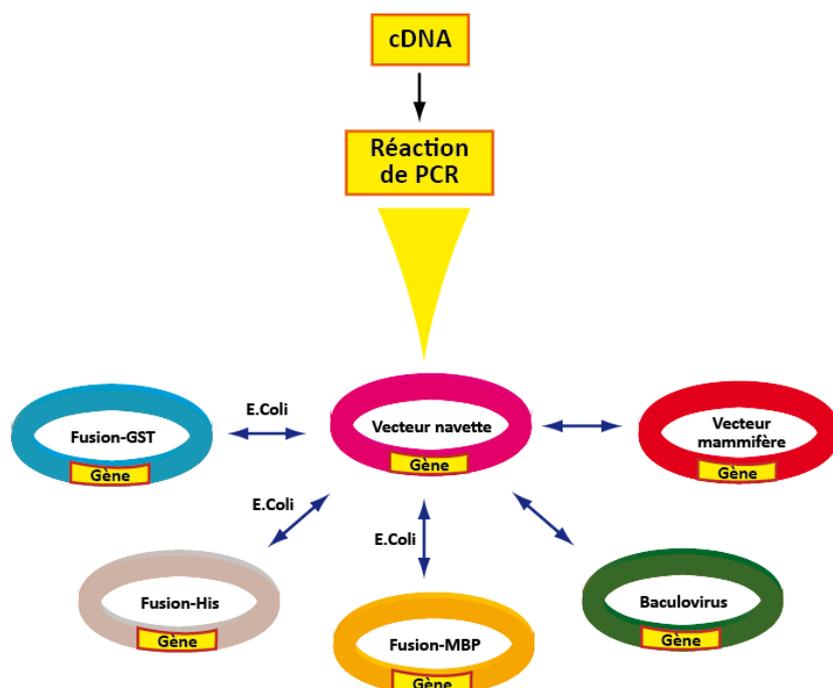


Figure 24 : Principe du système de clonage GW. Dans ce système, le domaine d'intérêt est amplifié par PCR puis inséré par recombinaison dans un vecteur dit « navette ». Ce vecteur est utilisé afin de transférer les domaines d'intérêts dans des vecteurs de destination contenant différents tags, et permettant l'expression des domaines d'intérêt dans différents systèmes (bactérie, cellules d'insecte ou de mammifère).

2.2 Sélection des domaines

Compte tenu de la taille importante de la Htt et de certains de ses partenaires, notre stratégie a consisté à cloner les domaines susceptibles de participer aux interactions (**Figure 25**). Les limites de ces domaines ont été définies sur la base de données publiées et par une approche bioinformatique visant à prédire les domaines structuraux conservés au sein de chaque protéine. Cette étude sur la sélection des domaines avait été réalisée avant mon arrivée au laboratoire par F. Klein. Enfin, par souci d'homogénéité, nous avons souhaité réaliser toutes nos études sur des protéines humaines (la source des ADNc utilisés est décrite dans le **Matériels et Méthodes**).

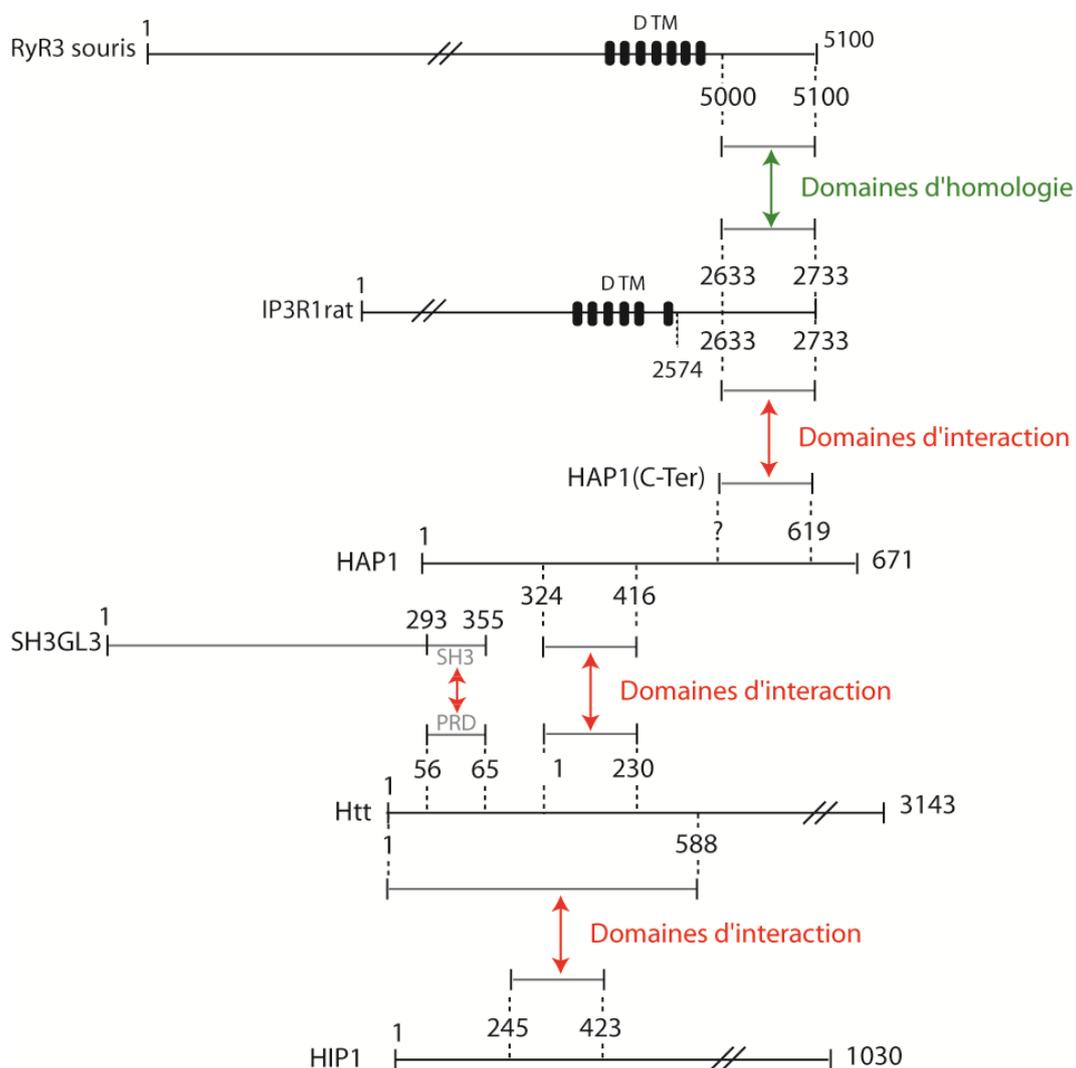


Figure 25 : Représentation schématique des domaines d'intérêt de la Htt et de ses partenaires. Les limites en a.a de la Htt sont basés sur la Htt-Q23; les domaines d'interaction (en rouge) se distinguent des domaines d'homologie (en vert). Pour les canaux calciques IPR1 et RyR3, les domaines transmembranaires (DTM) sont indiqués en noir.

2.3 Construction d'une bibliothèque de vecteurs

Un grand nombre de domaines ont été clonés pour réaliser mes études d'interaction. En effet, en comptant les vecteurs navettes (indispensables au système GW), j'ai construit plus de 120 clones. La diversité des clones repose sur des choix stratégiques : le choix des tags, la nécessité de nouveaux clonages, dû à une expression inadéquate de certains clones et du type de système d'expression. Cette bibliothèque de clones constitue une véritable bibliothèque de vecteurs navettes et/ou d'expression de domaines de la Htt et de ses interacteurs, utile pour notre laboratoire ou pour d'autres (**Tableau 3**).

	Limites des domaines en a.a.	Tag N-Ter	Tag C-Ter	Système d'expression
RyR3	5000-5100	GST ou MBP	His	Bactérien
	5000-5100		His	Bactérien
IP3R1	2574-2733	GST ou MBP	His	Bactérien
	2574-2733		His	Bactérien
HAP1	62-619	GST ou MBP	His	Bactérien
	62-619		His	Bactérien
	62-619	GST	His	Cellules d'insecte
	143-619	GST ou MBP	His	Bactérien
	143-619		His	Bactérien
	143-425	GST ou MBP	His	Bactérien
	143-425		His	Bactérien
	307-425	GST ou MBP	His	Bactérien
	307-425	GST	His	Cellules d'insecte
HIP1	245-630	MBP	His	Bactérien
	245-630		His	Bactérien
	245-423	MBP	His	Bactérien
	245-423		His	Bactérien
	293-346	MBP	His	Bactérien
	293-346		His	Bactérien
SH3GL3	22-355	GST ou MBP	His	Bactérien
	29-355	GST ou MBP	His	Bactérien
	293-355	GST ou MBP	His	Bactérien
Htt	1-333 (Q17)	GST ou MBP	His	Bactérien
	1-333 (Q17)		His	Bactérien
	75-241	GST ou MBP	His	Bactérien
	75-241		His	Bactérien
	75-241	GST	His	Cellules d'insecte
	75-197	GST ou MBP	His	Bactérien
	75-197		His	Bactérien
	197-410	GST ou MBP	His	Bactérien
			His	Bactérien
	12-80 (Q10, Q17, Q24, Q42, Q80)	GST ou MBP	His	Bactérien
	12-80 Δ PRD (Q17)	GST ou MBP	His	Bactérien
1-86 PEI (Q16, Q46)	GST ou MBP	His	Bactérien	

Tableau 3 : Liste des clones GW générés pour RyR3, IP3R1, HAP1, HIP1, SH3GL3 et Htt. Limites des domaines clonés en a.a (1^{ère} colonne) ; les tags N-Ter ou C-Ter fusionnés aux domaines (3^{ème} et 4^{ème} colonnes) ; Système d'expression utilisé (4^{ème} colonne). Les limites en a.a. de la Htt sont basées sur la Htt-Q17. Δ PRD : délétion du PRD, PEI : séquence d'adressage dans le périplasme.

Clonage des partenaires de la Htt

J'ai rencontré de nombreuses difficultés à obtenir des domaines suffisamment solubles de la protéine HAP1. Ceci m'a conduit à effectuer un grand nombre de clonages. Ainsi, 2 systèmes d'expressions ont été utilisés pour HAP1 : les bactéries (BL-21) et les cellules d'insecte. Pour tous les partenaires de la Htt, une grande variété de tags ont été fusionnés en N-Ter ou C-Ter des domaines pour faciliter les expériences de tests d'interactions, et pour les raisons mentionnées précédemment.

Clonage de la Htt

Le nombre de clonages réalisés pour la Htt a été très important pour plusieurs raisons. Tout d'abord, nous avons eu des difficultés à amplifier les domaines N-Ter riches en GC de la Htt, obtenant plusieurs clones avec des délétions de certaines parties du PRD (Δ PRD). D'autre part, nous voulions avoir différentes tailles de polyQ pour pouvoir étudier l'impact de cette expansion sur les interactions de la Htt. Enfin, nous avons eu des difficultés à obtenir des protéines codées à partir de l'exon 1 de la Htt de qualité optimale pour nos études.

2.4 Exemples d'analyse d'expression dans la bactérie

Les homogénats bactériens totaux (ET : **Ex**traints **T**otaux) ont d'abord été analysés sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie afin de tester leur capacité à produire la protéine recombinante désirée (voir **Matériels et Méthodes**). Ceci a permis de vérifier que les protéines recombinantes ont été produites et de déterminer dans quelles proportions. Les protéines définies comme étant correctement produites sont celles pour lesquelles une bande de taille attendue est clairement identifiée par rapport aux autres protéines bactériennes. Un exemple d'un test de production des protéines, avec une expression réalisé à 37°C pendant 4h, est présenté ci-après (**Figure 26**).

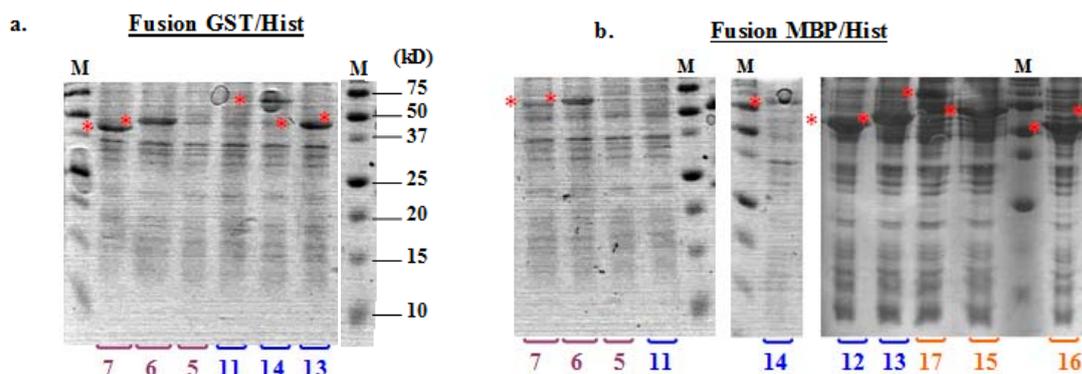


Figure 26 : Exemples d'analyse d'expression des protéines recombinantes pour HAP1, HIP1 et la Htt. Protéines de fusion avec GST (N-Ter) et polyhistidine (Hist) (C-ter) (a) ou à la MBP (N-ter) et la Hist (C-ter) (b). Les numéros correspondent à des domaines différents de la Htt (en violet), de HAP1 (en bleu) et de HIP1 (en orange). Les gels SDS/PAGE sont colorés au bleu de Coomassie. Les différents domaines produits sont indiqués par une marque rouge. 5 : Htt (197-410) ; 6 : Htt (75-241) ; 7 : Htt (75-197) ; 11 : HAP1 (143-619) ; 12 : HAP1 (143-264) ; 13 : HAP1 (307-425) ; 14 : HAP1 (143-425) ; 15 : HIP1 (245-423) ; 16 : HIP1 (293-346) ; 17 : HIP1 (245-630).

Par la suite, le surnageant (ES : **Extrait Soluble**) a été purifié par affinité puis caractérisé par WB et GF. Les conditions d'expression et les méthodes de purification ont été optimisées pour chacun des domaines :

- (1) Les conditions de production, 16°C ou 37°C respectivement, pendant 16h ou 4h.
- (2) Le volume de culture de cellules bactériennes utilisé a été adapté en fonction de la quantité de protéines recombinantes produites (différentes pour chaque vecteur et domaine) et des concentrations de protéines nécessaires pour chaque expérience. Ces volumes ont varié de 200ml à 18L de cultures bactériennes pour une purification.
- (3) Suivant la qualité des premières purifications par affinité, j'ai choisi une purification *via* le tag N-ter et/ou C-ter de la protéine recombinante et adapté la lyse cellulaire par sonication, french press ou choc osmotique.
- (4) J'ai utilisé différentes autres méthodes chromatographiques (GF, échange d'ion) pour arriver à une pureté et une qualité suffisantes pour les études d'interaction.

Un grand nombre de domaines ont été produits et purifiés, c'est pourquoi je ne présenterai que certains exemples de ces caractérisations dans les sections suivantes. D'une façon plus générale sur l'ensemble des domaines clonés, ces premiers tests d'expression ce sont révélés positifs dans environ 90% des cas. Cependant, une majorité de ces protéines se sont avérées être peu solubles.

3. Étude de la polyQ dépendance des interactions

Comme explicité précédemment, nous avons sélectionné 3 partenaires de la Htt : HAP1, HIP1 et SH3GL3, qui sont impliqués dans des fonctions cellulaires cruciales et dérégulées dans la MH. D'autre part, ces partenaires interagissent avec différents domaines de la Htt, le premier HEAT (H1) et le PRD respectivement. De plus, ils ont des propriétés d'interaction différentes en présence de la Htt mutée, qui sont soit augmentées (pour HAP1 et SH3GL3), soit diminuées (HIP1). Ainsi ces partenaires remplissent les premiers pré-requis de notre étude.

Un dernier pré-requis à remplir est d'obtenir des domaines d'interactions, de ces partenaires et de la Htt, purifiés en quantité et qualité suffisantes pour procéder aux analyses par SPR.

Concernant l'interaction de la Htt avec HAP1 ou HIP1, il était nécessaire d'obtenir le premier HEAT (H1), ainsi que les domaines d'interaction de HAP1 et HIP1, bien produits, sans fragment de protéolyse et monomériques. Pour étudier l'interaction de SH3GL3 avec la Htt, il était primordial d'obtenir les mêmes qualités de protéine pour l'exon1 de la Htt (contenant au minimum la polyQ et le PRD) et le domaine SH3 de SH3GL3.

Je présenterai dans un premier temps les études d'interaction entre la Htt-HEAT, HAP1 et HIP1. Dans cette partie, nous avons rencontré des difficultés au cours des caractérisations des protéines qui ne nous ont pas permis d'atteindre nos pré-requis. Ainsi cette étude n'a pas pu être finalisée. Dans un deuxième temps, j'exposerai les résultats obtenus sur l'interaction de SH3GL3 et la Htt, et les raisons qui nous amènent à proposer un mécanisme moléculaire expliquant les dysinteractions de la Htt.

3.1 L'interaction de la Htt avec HAP1 est difficile à analyser en absence d'agrégation.

Notre premier intérêt s'est dirigé vers l'interaction de HAP1 avec la Htt. La **Figure 27** représente en détails les domaines impliqués dans cette interaction (Bertaux et al., 1998; Li et al., 1998; Li et al., 1995).

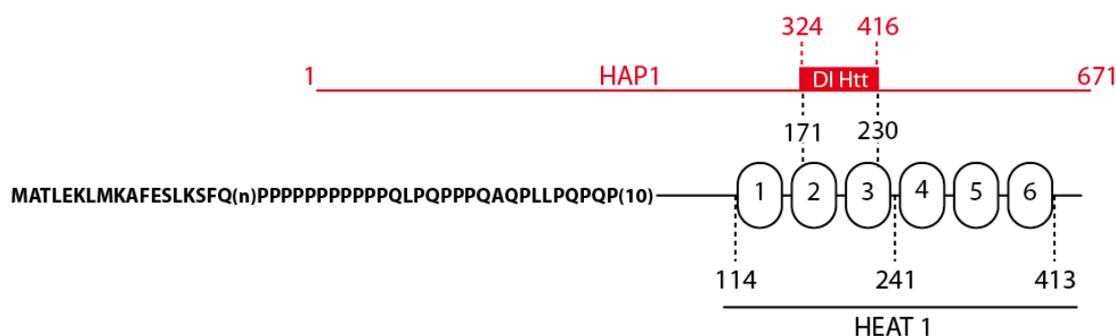


Figure 27 : Représentation schématique de l'interaction de HAP1 (en rouge) avec la Htt (en noir). Le domaine 171-230 incluant les hélices 2 et 3 du premier HEAT (114-413) de la Htt interagit avec le domaine 324-416 de HAP1.

Caractérisation des domaines de HAP1

Après clonage, nous avons obtenu 13 domaines de HAP1 s'exprimant avec différents tags (GST, MBP ou polyhistidine) (**Tableau 3**). Parmi ces domaines, 12 sont correctement exprimés (**Figure 26**) avec des rendements de production variables. Cependant, la majorité de ces domaines se sont révélés mal produits et peu solubles.

La Figure 28 illustre la caractérisation d'un domaine de HAP1 : GST-HAP1(307-425)-His de 45KDa. Ce domaine contient le domaine d'interaction avec la Htt et est présenté schématiquement (**Figure 28 A**). L'observation du profil d'élution de ce domaine sur GF (**Figure 28 B**), ainsi que l'analyse des fractions de GF sur gel dénaturant, indiquent que la majorité de la protéine purifiée est exclue dans les premières fractions de la GF. Néanmoins, les fractions (F7-F8) contiennent des protéines monomériques. Il s'agit du domaine de HAP1 parmi les mieux exprimés dans la bactérie et le plus soluble, pourtant ce domaine n'a pas pu être concentré et n'était pas suffisamment stable pour des études biophysiques. Un autre exemple de caractérisation d'un domaine de HAP1 moins soluble est présenté dans la **Figure S1 B** du manuscrit.

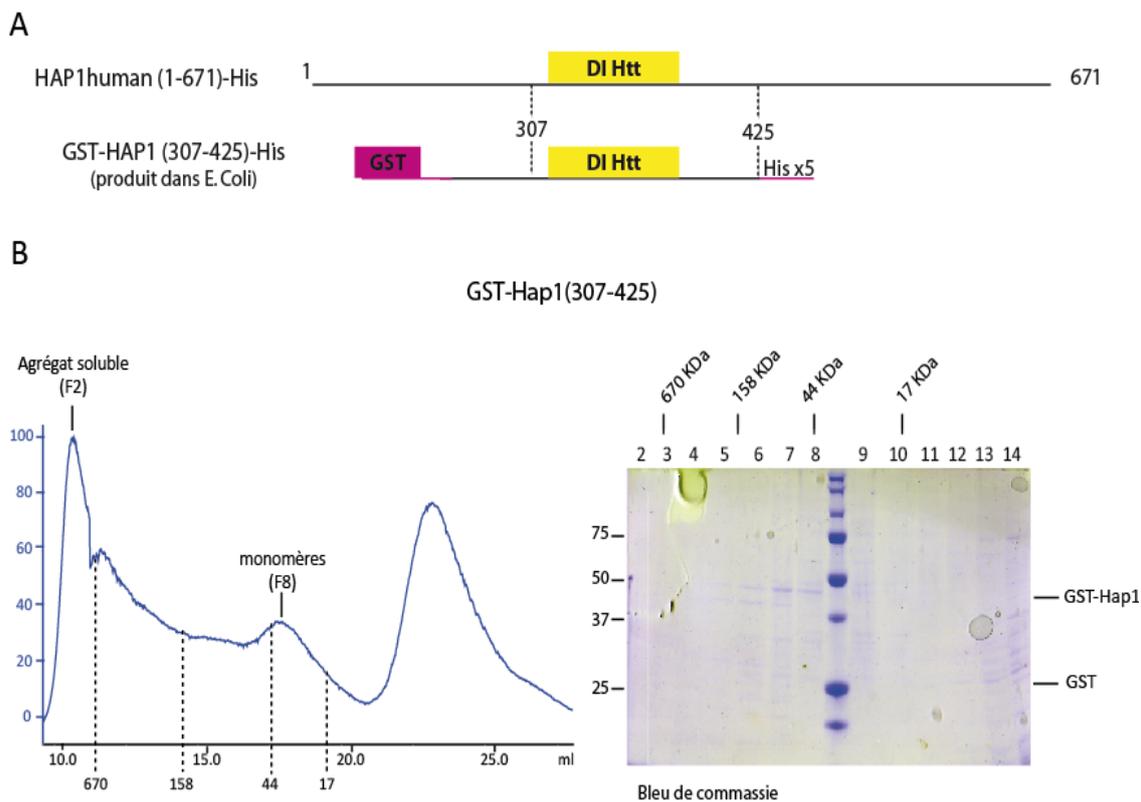


Figure 28 : Exemple de caractérisation d'un domaine de HAP1. A/ Représentation schématique de HAP1 et des limites du domaine de HAP1 fusionnés avec « GST » (violet), et « 5 x His ». En jaune : Domaine d'Interaction (DI) de HAP1 avec la Htt (DI Htt). B/ A gauche : Profil de GF (Gel filtration) de GST-HAP1 (307-425) (MW: 45KDa), après purification par affinité, chargée sur colonne GF-S200 (10/300) ; à droite : gel SDS-PAGE (15%) coloré au bleu de coomassie avec les fractions de la GF.

Caractérisation des domaines HEAT de la Htt

Après clonage, nous avons obtenu 8 domaines de la Htt contenant les domaines HEAT et s'exprimant avec différents tags (GST, MBP ou polyhistidine). J'ai concentré mes premiers efforts sur 4 domaines ne contenant pas la polyQ, mais uniquement les domaines HEAT. Ces domaines ayant été convenablement exprimés (**Figure 26**), j'ai donc procédé à leur purification par affinité (Voir **Figure du manuscrit S1, D** pour exemple). Cependant, tous ces domaines se sont révélés non monomériques, voire insolubles.

La Figure 29 illustre une caractérisation d'un de ces 4 domaines de la Htt : MBP-Htt(75-241)-His de 65KDa. Cette protéine contient le domaine minimal d'interaction avec HAP1 (Bertaux et al., 1998; Li et al., 1998; Li et al., 1995) et est exprimé dans des cellules bactériennes (BL-21) (**Figure 29 A**). L'observation du profil d'exclusion de ce domaine sur GF, ainsi que l'analyse des fractions de GF déposées sur gel d'acrylamide en condition dénaturante (**Figure 29 B**), indiquent que la majorité de la protéine purifiée est contenue dans les premières fractions de la GF (F5) correspondant à un poids moléculaire en solution > 158KDa, pour une

protéine ne pesant que 65KDa d'après le calcul théorique et la migration de la protéine en condition dénaturante. De plus, la faible quantité de fractions monomériques de cette protéine se mélangent aux fractions contenant de l'agrégat soluble, rendant la séparation des monomères solubles des autres agrégats solubles très difficile à réaliser, même en utilisant d'autres conditions de GF. Il est donc difficile de contrôler l'état d'agrégation de la protéine. De plus, cette protéine était instable à 4°C (protéolyse et agrégation, donnée non montrée). Un autre exemple de caractérisation d'un domaine de la Htt est présenté dans la **Figure S1 C** du manuscrit.

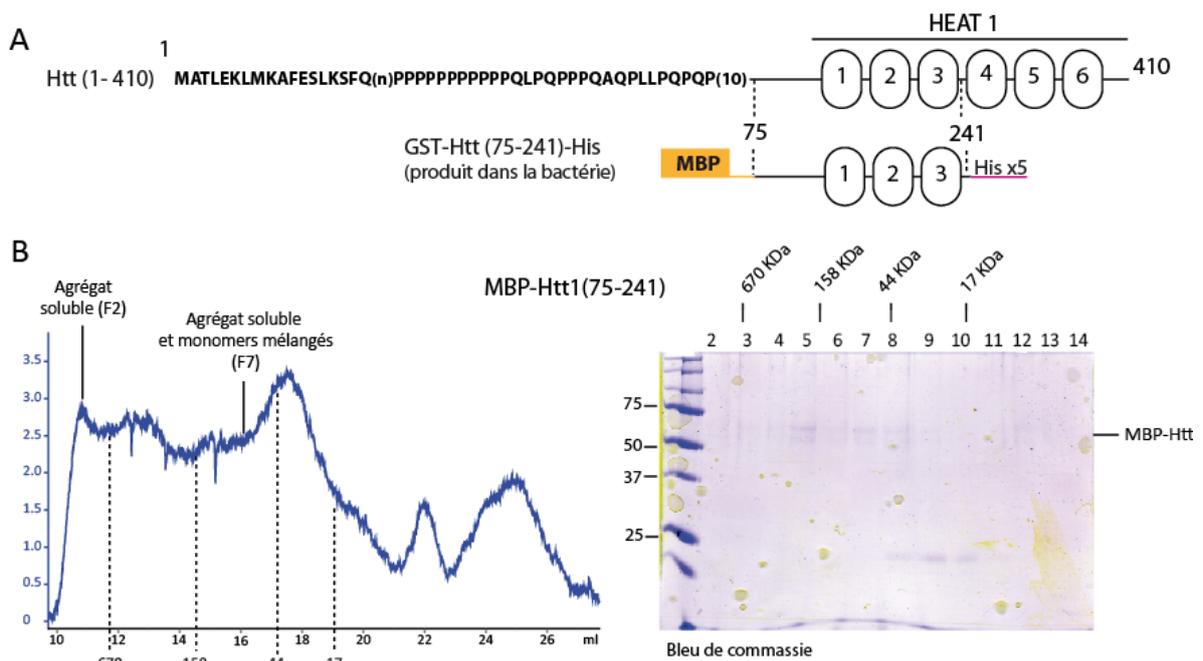


Figure 29 : Exemple de caractérisation d'un domaine de la Htt. A/ Représentation schématique de la Htt N-ter (1-410) et des limites du domaine de la Htt fusionné avec la « MBP » (orange), et « 5 x His » B/ A gauche : profil de GF de la Htt (75-241) (MW=65KDa), après purification par affinité, chargée sur une résine S200 d'une colonne (10/300) ; à droite : gel SDS PAGE (15%) coloré au bleu de coomassie, des fractions de la GF de B.

Les résultats de la caractérisation par GF des domaines HEAT de la Htt n'ayant pas été concluants, nous n'avons pas essayé de caractériser ces domaines contenant en plus du domaine N-ter de la Htt, une taille normale ou pathogénique de polyQ.

La qualité des protéines Htt-HEAT et HAP1 ne correspond pas à nos pré-requis, nous n'avons donc pas poursuivi l'étude de leur interaction. D'autre part, nous n'avons pas caractérisé davantage les domaines de HIP1 qui interagissent également avec le HEAT (H1) de la Htt, à cause de la faible qualité des domaines Htt-HEAT. En effet les études

d'interaction de HIP1, comme HAP1, avec la Htt n'auraient pas pu être réalisées dans des conditions où l'agrégation est contrôlée, paramètre que nous voulions absolument contrôler dans nos expériences SPR.

D'autre part, cette caractérisation m'a permis de constater à quel point il était difficile d'obtenir des protéines monomériques, suggérant que des formes agrégées de la Htt ou de HAP1 pouvaient être présentes lors des précédents tests d'interaction entre HAP1 et la Htt.

Notre intérêt s'est donc porté sur l'interaction du PRD de la Htt avec SH3GL3, dont l'interaction est accrue en présence de polyQ étendue. Comme nous le verrons, ces protéines ont pu être purifiées en quantité et qualité adaptées aux études biochimiques et biophysiques que nous souhaitons entreprendre.

3.2 SH3GL3 : un partenaire de choix pour étudier les dysinteractions de la Htt mutée

Par la suite, nous nous sommes donc intéressés à l'interaction de SH3GL3 avec la Htt. La **Figure 30** représente en détails les domaines impliqués dans cette interaction.

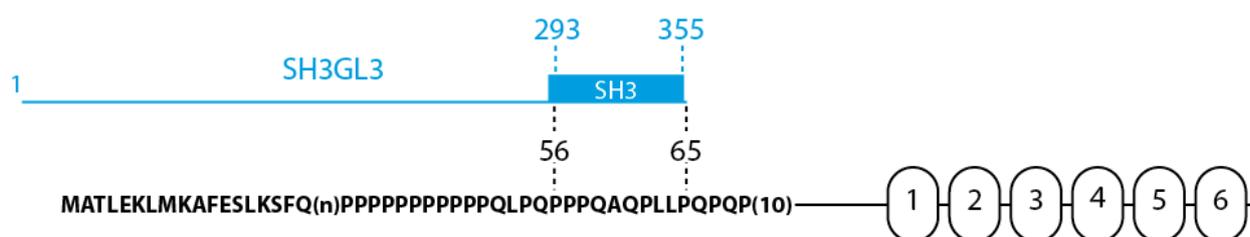


Figure 30 : Représentation schématique de l'interaction de SH3GL3 (en bleu) avec la Htt (en noir). Le domaine 56-65 de la Htt23Q incluant une partie du domaine PRD de la Htt interagit avec le domaine SH3 (293-355) de SH3GL3.

Nous avons sélectionné le domaine SH3 en C-ter de SH3GL3 (293-355) utilisé en RMN (Gao et al., 2006) et qui constitue la région minimale d'interaction de SH3GL3 avec la Htt (Sittler 1998). Nous avons également utilisé la protéine SH3GL3 quasi-pleine longueur à partir de l'ADNc dont nous disposons, et qui commence à l'a.a. 22 de la protéine (cet ADNc provient du groupe d'E.Wanker et est identique à celui utilisé par Sittler et al. 1998) (**Tableau3**). Les

sections suivantes présentent nos résultats selon la démarche chronologique que nous avons suivie. Cependant, nous avons regroupé les résultats les plus pertinents au sein d'un manuscrit qui se trouve en section 2.2.8.

Toutes les constructions utilisées pour cette étude sont décrites dans le manuscrit (**Figure S2**), de même que la caractérisation des protéines par SDS-PAGE et GF (**Figure 1 C et F, S3 B et C**).

3.2.1 Les domaines d'interaction de la Htt avec SH3GL3

Pourquoi la Htt-exon1 serait-elle de meilleure qualité que le domaine HEAT ?

Le domaine minimal d'interaction de la Htt avec SH3GL3 correspond à une dizaine d'a.a. au centre du PRD, un petit domaine de la Htt (seulement 38 a.a. au total), immédiatement adjacent au polyQ (**Figure 30**). Les données de la littérature indiquent que la partie N-ter de la Htt correspondant à la Htt-exon1 fusionnée à un tag (N-ter) s'exprime bien dans la bactérie, même lorsqu'elle comporte des expansions de polyQ de taille pathogénique. De telles constructions normales et/ou mutantes ont par ailleurs été étudiées par RMN, SPR ou Xray dans plusieurs études (Bennett et al., 2002; Georgalis et al., 1998; Kim et al., 2009), ce qui atteste du fait qu'il est possible d'exprimer le domaine N-ter de la Htt en quantité et qualité adaptées à nos besoins. Pour notre étude, nous avons donc sélectionné cette partie N-ter contenant un polyQ pathogénique ou non pathogénique pour déterminer l'influence de la polyQ sur les interactions de la Htt avec SH3GL3.

Clonages des domaines de Htt-exon1

Au minimum, pour étudier la polyQ dépendance de l'interaction SH3GL3/Htt, les 17 premiers a.a. de la Htt, connus pour initier le processus d'agrégation (Thakur et al., 2009), ne sont pas nécessaires et une portion de la Htt de type Qn-PRD pourrait suffire. Ainsi, nous avons généré des protéines recombinantes commençant à l'a.a. 12 de la Htt et se terminant à la fin du PRD. Ces fragments sont appelés « GST-Htt(12-80)-Qn » ou « MBP-Htt(12-80)-Qn ». Au total, 10 constructions ont été générées avec différents tags N-ter (GST ou MBP) et des tailles variables de polyQ (Q10, Q17, Q24, Q42 ou Q80). Contrairement aux autres clonages effectués à partir de l'ADNc envoyés par nos collaborateurs, j'ai réalisé ces clonages à partir de l'ADN extrait de différentes lignées cellulaires provenant de lymphoblastes de patients.

Caractérisation en condition dénaturante des protéines GST-Htt(12-80)-Qn

La **Figure 31** illustre la caractérisation des protéines recombinantes GST-Htt(12-80)-Qn en condition dénaturante. Beaucoup de fragments intermédiaires et notamment de la GST, ont été constatés après purification. Le rendement de la purification est inversement proportionnel à la taille du polyQ. Néanmoins, toutes les protéines de fusion sont visibles après coloration au bleu de coomassie (**Figure 31A**). La caractérisation de l'identité des protéines m'a conduit à comparer les bandes visibles en bleu de coomassie avec celles révélées par WB avec l'@-2B4 (**Figure 31B**). Pour GST-Htt(12-80)-Q24, la bande majoritaire vue en bleu de coomassie correspond à la protéine pleine longueur, et sur ce blot, le signal est tellement intense que la membrane en est "brûlée" (en 5 sec). De plus pour cette protéine, une bande additionnelle est détectée sur le WB, au dessus du marqueur 75KDa. Cette bande correspond à un dimère et est visible dans toutes les protéines suffisamment concentrées portant des polyQ (mutants ou non, dans le contexte de l'exon1 de la Htt ou non) utilisés au laboratoire. Pour GST-Htt(12-80)-Q42, la bande majoritaire vue en bleu de coomassie ne correspond pas à la protéine pleine longueur. En effet, l'immunodétection révèle une bande légèrement au dessus de la bande majoritaire visualisée en bleu de coomassie, suggérant que la bande visible en bleu ne correspond pas à la protéine pleine longueur. Enfin, les protéines se conservent très mal à 4°C. En effet après 8 jours, il ne reste plus aucune protéine pleine longueur pour GST-Htt(12-80)-Q42 et GST-Htt(12-80)-Q80 (**Figure 31C**), malgré la présence d'inhibiteur de protéolyse. Toutefois, la GST-Htt(12-80)-Q24 reste légèrement visible après 8 jours.

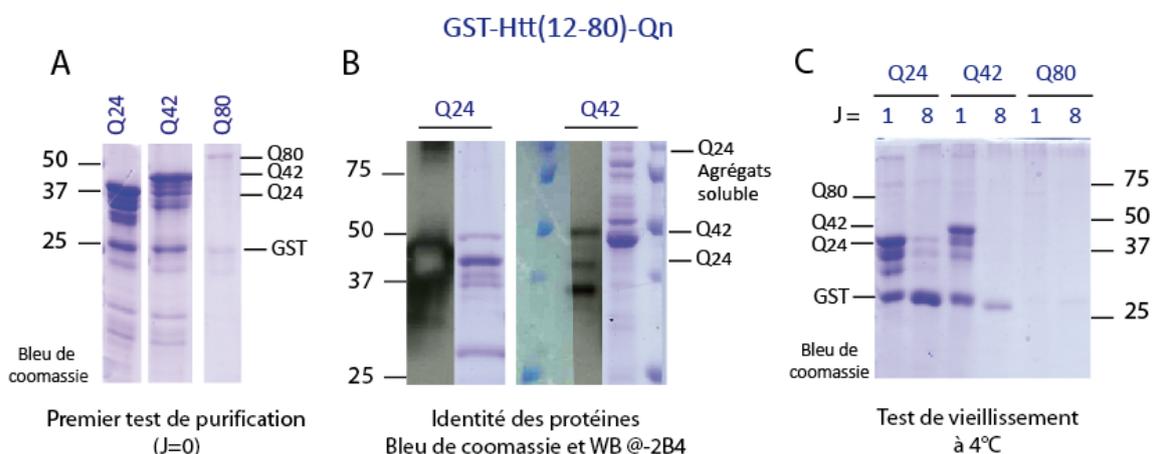


Figure 31 : Caractérisation biochimique en condition dénaturante de GST-Htt(12-80)-Qn. A/ Purification par affinité : les protéines éluées sont immédiatement chargées sur gel SDS-PAGE puis coloré au bleu de coomassie ; B/ Comparaison du marquage par bleu de coomassie et par immunodétection par WB avec l'@-2B4; C/ Suivi du vieillissement des protéines, chargées sur gel SDS-PAGE 1 ou 8 jours après purification par affinité.

Caractérisation en condition native des protéines GST-Htt(12-80)-Q24

La caractérisation plus précise de GST-Htt(12-80)-Q24 a également été effectuée (**Figure 32**). Une GF par affinité a été effectuée immédiatement après purification par affinité, et a majoritairement révélé la présence d'agrégats solubles (fraction 2 : F2) et de multimères (fraction 5 : F5) supérieurs à 158KDa. Le gel dénaturant de ces fractions a également révélé la présence de multimères (F4-6). Cependant, très peu de traces d'agrégats solubles ont été observées dans les fractions 1 à 3. Une fois isolées, il est probable que ces espèces se soient agrégées, le temps de faire le gel dénaturant. Enfin et de façon intéressante, une population soluble est visible en fraction 7 du gel coloré au nitrate d'argent (**Figure 32 A**). Le comportement de cet échantillon est peu affecté par sa congélation, et il subsiste toujours une portion de protéines solubles après congélation (**Figure 32 B**).

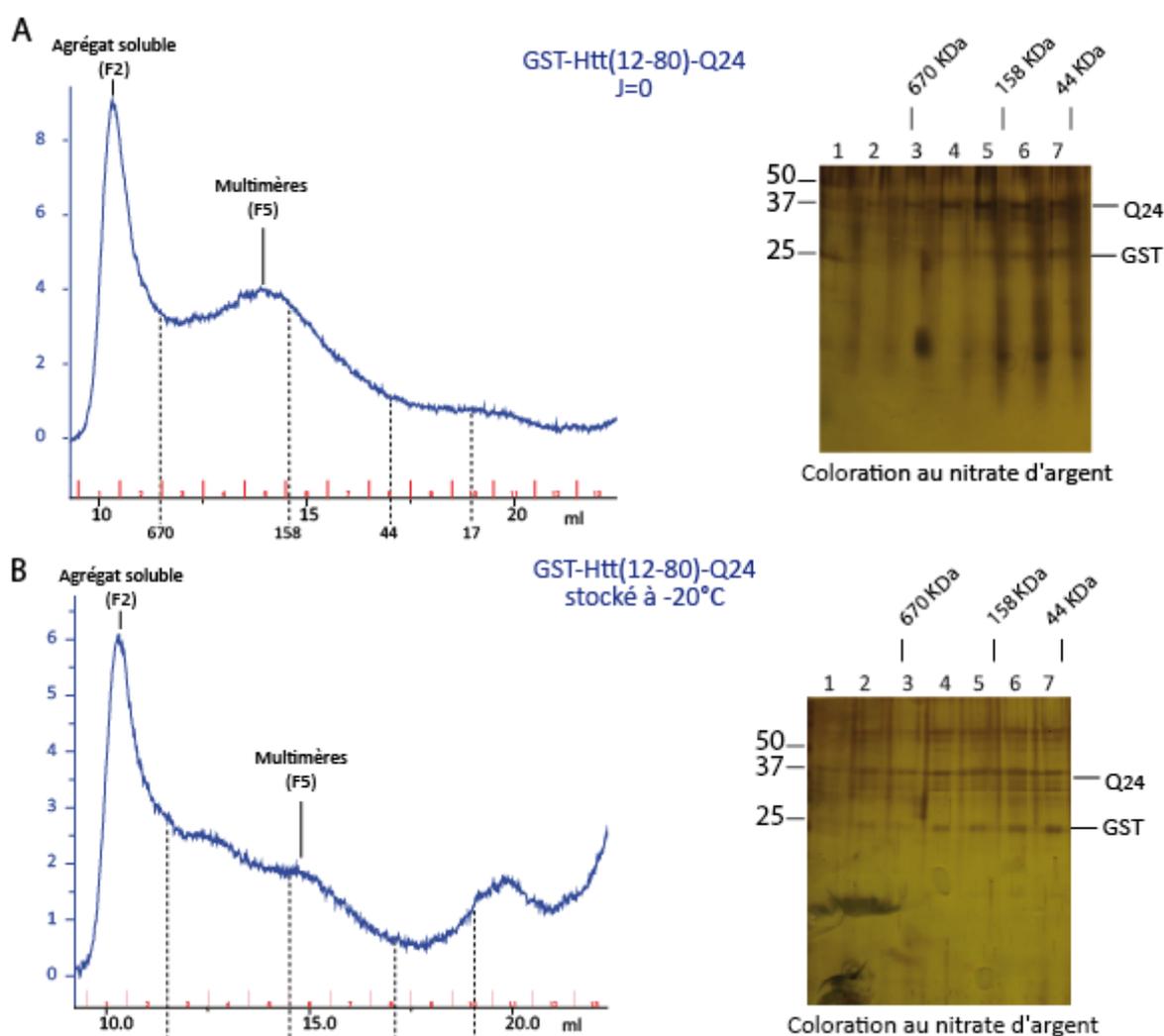


Figure 32 : Caractérisation biochimique avancée de GST-Htt(12-80)-Q24. A/ Caractérisation de GST-Htt(12-80)-Q24 non congelé ; à gauche : profil de GF où la protéine est chargée sur une résine S200 d'une colonne (10/300) ; à droite : analyse des fractions de la GF sur SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent B/ Caractérisation de GST-Htt(12-80)-Q24 congelé avec les mêmes légendes que dans A.

Caractérisation en condition native des protéines GST-Htt(12-80)-Q42

J'ai également procédé à la caractérisation avancée de GST-Htt(12-80)-Q42 (**Figure 33**). Une GF a été effectuée immédiatement après purification par affinité, et révèle majoritairement la présence de deux populations d'agrégats solubles (fraction 1 : F1 et fraction 3 : F3). Le gel dénaturant de ces fractions a révélé la présence de multimères (F4-6). Comme précédemment, très peu de traces d'agrégats solubles ont été observées dans les fractions 1 à 3. Enfin et de façon intéressante, une population soluble est visible en fraction 6 et 7 du gel coloré au nitrate d'argent (**Figure 33 A**), et il subsiste toujours une portion de protéines solubles après congélation (**Figure 33 B**).

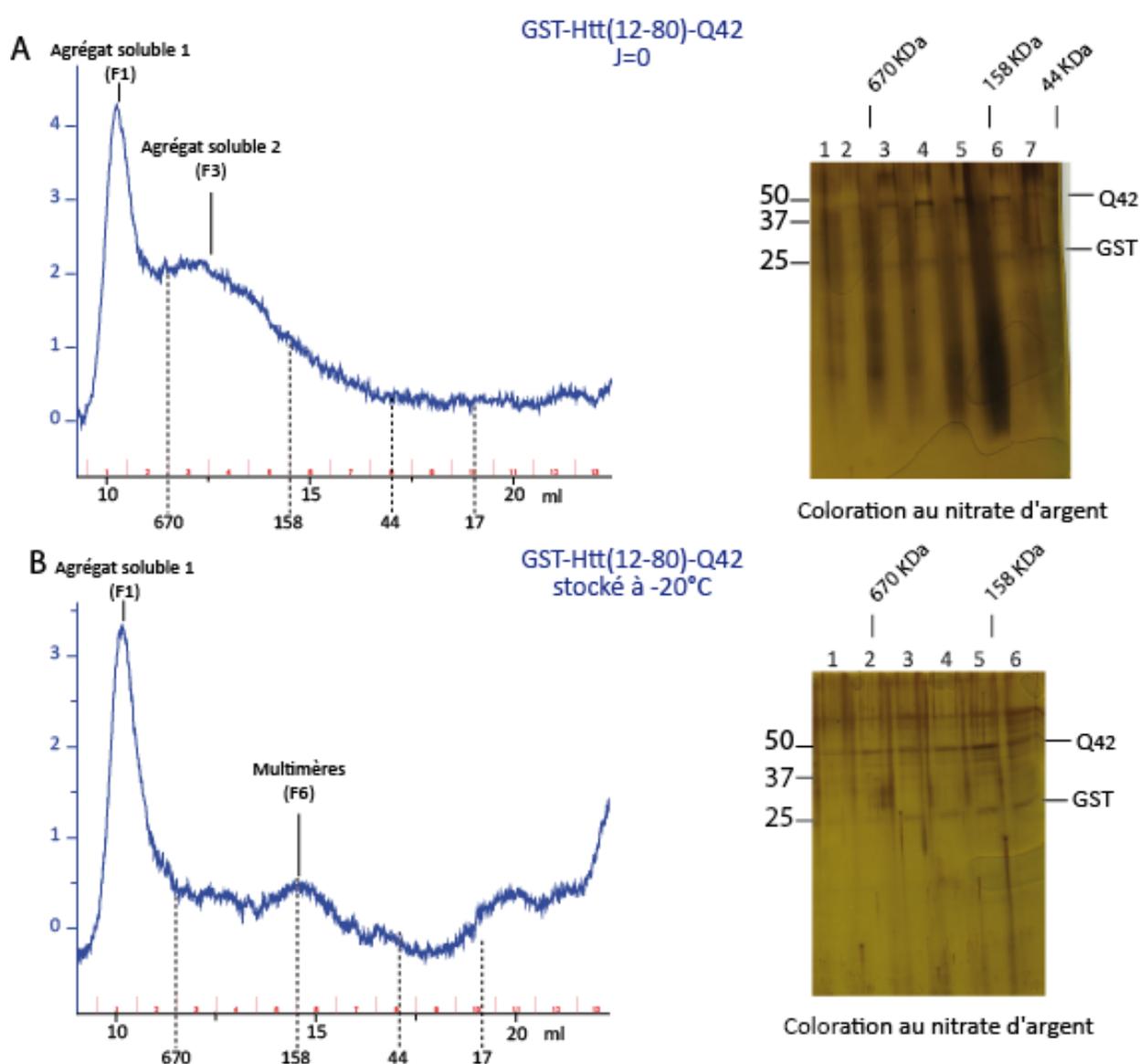


Figure 33 : Caractérisation biochimique avancée de GST-Htt(12-80)-Q42. A/ Caractérisation de GST-Htt(12-80)-Q42 non congelé ; à gauche : profil de GF où la protéine est chargée sur une résine S200 d'une colonne (10/300) ; à droite : analyse des fractions de la GF sur SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent. B/ Caractérisation de GST-Htt(12-80)-Q42 congelé avec les mêmes légendes que dans A.

La qualité des protéines GST-Htt(12-80)-Qn a été moins bonne qu'attendue. En effet dans une étude précédente de notre laboratoire, des polyQ fusionnés en N-ter à un tag GST se sont révélés être extrêmement solubles et à l'état de monomère après GF (Klein et al., 2007; Masino et al., 2002). De plus, l'exon 1 de la Htt fusionné en N-ter à un tag GST s'est révélé être bien produit (Bennett et al., 2002; Georgalis et al., 1998; Scherzinger et al., 1997). Dans mon cas, beaucoup de fragments de protéolyses sont visibles après purification. L'analyse comparative des protéines (visibles en bleu) et par WB ont indiqué que la quantité de GST-Htt(12-80)-Q42 pleine longueur était très faible. Ces protéines ne peuvent pas être conservées longtemps à 4°C car elles subissent une protéolyse, même en présence d'inhibiteurs de protéolyse. Enfin, l'analyse en condition native par GF révèle la présence d'une grande quantité d'agrégats solubles et de multimères.

Cependant et de façon très intéressante, des fractions monomériques de GST-Htt(12-80)-Q24 et GST-Htt(12-80)-Q42 ont été obtenus après GF et visualisés sur gel dénaturant, avant et après congélation. Ainsi au terme de cette caractérisation, même si la quantité de protéines GST-Htt(12-80)-Qn est réduite, il paraissait raisonnable d'utiliser les protéines purifiées et monomériques pour nos premiers tests d'interactions du PRD de la Htt par SPR, avec un anticorps interagissant spécifiquement avec Htt-PRD.

En effet, notre laboratoire, en collaboration avec celui d'Anne Bertolotti à Cambridge, a produit et caractérisé un anticorps, le 2B4, qui interagit avec la même région du domaine PRD que le domaine SH3 de SH3GL3 (Dehay et al., 2007; Lunkes et al., 2002). Cet anticorps, déjà utilisé dans les WB précédents, permet de détecter des quantités très faibles de Htt et nous pensions donc qu'il aurait une très bonne affinité pour la Htt. De plus, notre laboratoire a également caractérisé un anticorps qui interagit avec la polyQ de la Htt : le 1C2. Cet anticorps est couramment utilisé dans l'étude de protéines à expansion de polyQ car il a la particularité de détecter les polyQs mutants avec une meilleure avidité que les polyQs normaux. Ainsi, si on utilise uniquement le fragment Fab de cet anticorps, il détecte avec la même affinité les polyQs longs comme les polyQs courts (Klein et al., 2007). Ces 2 anticorps, ainsi que leurs fragments Fab, représentaient de bons outils pour mettre au point nos expériences et valider notre approche expérimentale.

Ainsi, malgré la faible quantité et qualité des protéines GST-Htt(12-80)Qn, il était envisageable d'étudier leur interaction avec les anticorps 1C2 et 2B4 par SPR. La question centrale de cette étude préliminaire était de vérifier dans quelle mesure l'affinité de 2B4 pour GST-Htt(12-80)Qn varie en fonction de la taille de la polyQ. Avant de présenter les résultats de cette étude, qui sont rapportés chapitre 3.2.3, j'introduirai brièvement la technique de SPR.

3.2.2 La technique de résonance plasmonique de surface (SPR)

La SPR est un phénomène physique utilisé comme méthode de mesure de liaison d'un « analyte » sur un « ligand ». Ce ligand est fixé de façon covalente ou via un anticorps (@-GST ou @-MBP, voir **Matériels et Méthodes** du manuscrit) sur une couche de dextrose à la surface d'une plaque d'or : cet ensemble constitue la « puce » SPR. Durant l'expérience, un flux continu de tampon salin est appliqué, l'analyte est injecté (en général entre quelques secondes et plusieurs minutes) sur les différents canaux de la puce (**Flow Channels : FCs**), qui ont été préalablement chargés de ligands différents (**Figure 34**). La technique de détection SPR mesure la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface quand l'analyte injecté se fixe aux ligands. De façon plus technique, le plasmon de surface est une onde. La fixation de molécules sur la puce SPR va modifier l'information contenue dans l'onde, tant au niveau de sa phase que de son amplitude. Ainsi, la différence entre l'onde réfléchie et l'onde émise joue le rôle de sonde du milieu biologique (ligand et analyte). L'information acquise en temps réel est recueillie sous forme de courbes indiquant les variations de l'indice de réfraction (ou résonance) en unité relative (**Relative Unit : R.U.**). La quantité de R.U. mesurée ne permet pas de déduire visuellement l'affinité, il est nécessaire d'utiliser un programme informatique dédié à l'analyse des signaux SPR (« BiaevalTM »). Ce logiciel analyse le profil des courbes correspondant aux constantes d'association et de dissociation et nous permet d'attribuer une constante d'affinité précise entre un ligand et un analyte, lorsque ce dernier est injecté à des concentrations variables (**Figure 34**).

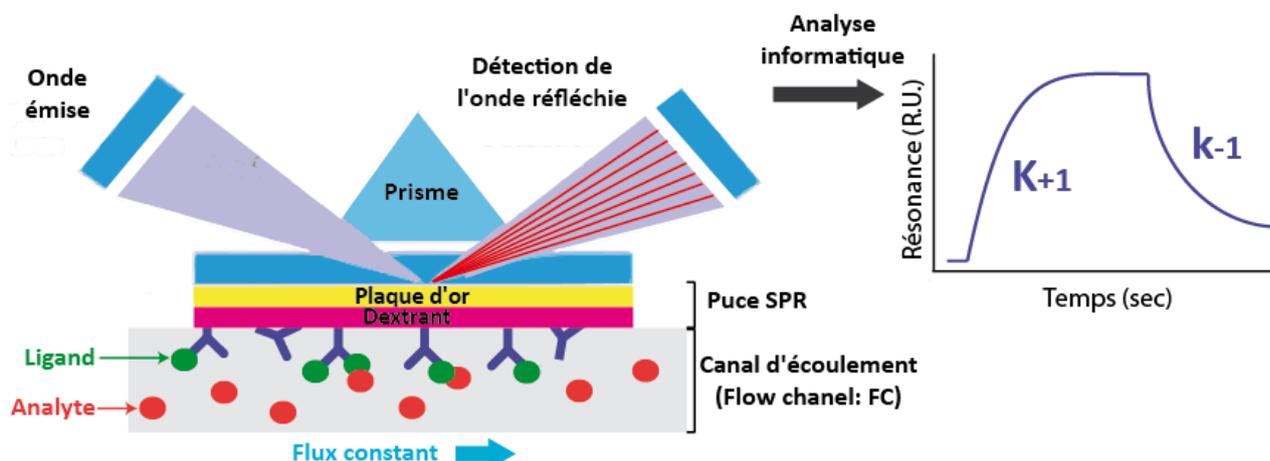


Figure 34 : Représentation schématique d'une étude d'interaction par SPR. La figure est décrite dans le texte ci-dessus. $K+1$: constante d'association, $K-1$: constante de dissociation, R.U. : unité relative, sec : seconde. Inspiré de (<http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/spr.gif>).

3.2.3 Premiers tests d'interaction par SPR du domaine N-ter de la Htt portant des polyQs de taille variable avec des anticorps

Après GF, nous avons isolé les fractions solubles de la GST-Htt(12-80)-Q24 et GST-Htt(12-80)-Q42, ainsi que la GST-Q22. Cette dernière a été utilisée dans une étude antérieure de notre laboratoire (Klein et al., 2007) et est dénuée de PRD de la Htt. GST-Q22 a donc été utilisée comme contrôle négatif dans nos expériences d'interaction avec 2B4, mais aussi de contrôle positif lors de test d'interaction avec 1C2.

Tests d'interaction du domaine N-ter de la Htt avec le 1C2 et un interacteur modèle du PRD : l'anticorps 2B4

Comme ce qui avait déjà été observé auparavant sur les GST-Qn (Klein et al., 2007), l'anticorps 1C2 interagit plus fortement avec les polyQs étendus qu'avec les polyQs courts de nos constructions GST-Htt(12-80)-Qn, et cette association est forte **Figure 35 partie de gauche**. De plus, nous avons pour la première fois testé l'interaction de l'anticorps 2B4 avec l'exon 1 de la Htt en SPR. L'interaction de cet anticorps est similaire à celle du 1C2 : l'association est lente et la dissociation difficile, indiquant que l'affinité de cet anticorps pour la Htt est forte. De plus, cet anticorps est spécifique au PRD puisqu'il n'interagit pas avec la GST-Q22 utilisée comme contrôle négatif (**Figure 35 partie de droite**). Notons toutefois, que ces derniers résultats avec le 2B4 ont été obtenus avec 12 fois plus de Htt fixée que pour ceux avec le 1C2.

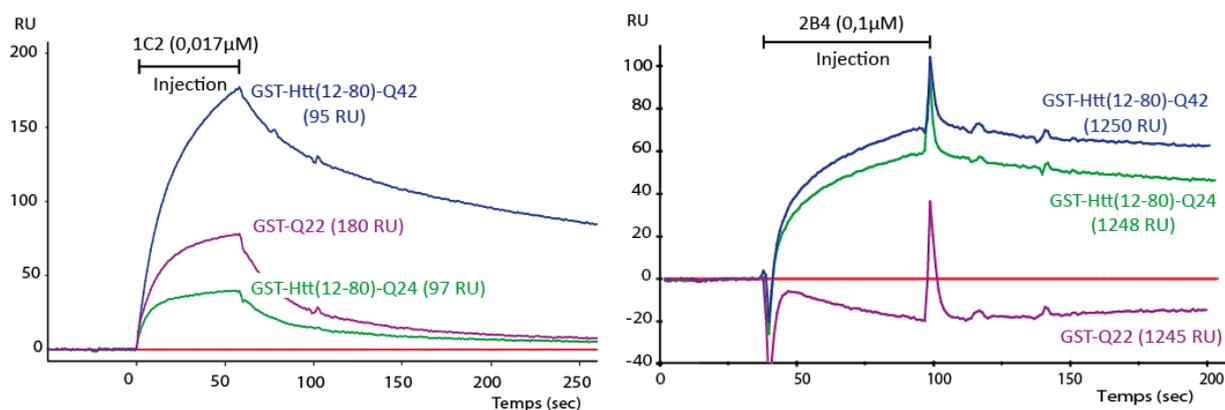


Figure 35 : Profils d'interaction en SPR des anticorps 1C2 et 2B4 sur GST-Htt(12-80)-Qn. GST-Htt(12-80)-Q24, GST-Htt(12-80)-Q42 et GST-Q22 fixées sur la puce SPR, et profil de l'interaction sur ces 3 FCs de l'anticorps 1C2 (à gauche) et 2B4 (à droite). Le nombre de RU capturés sur chaque FC est indiqué à côté des courbes.

Tests d'interaction avec le fragment Fab de l'anticorps 1C2

J'ai utilisé le Fab du 1C2 (1C2-Fab) qui contient le site de reconnaissance à l'antigène (ici la polyQ). Le 1C2-Fab a une affinité similaire pour nos constructions, quelque soit la taille de la polyQ (**Figure 36**), en accord avec nos travaux démontrant que l'anticorps 1C2 interagit avec les polyQs selon un mode bivalent, mais ne reconnaît pas une conformation particulière des polyQs longs *versus* courts (Klein et al., 2007).

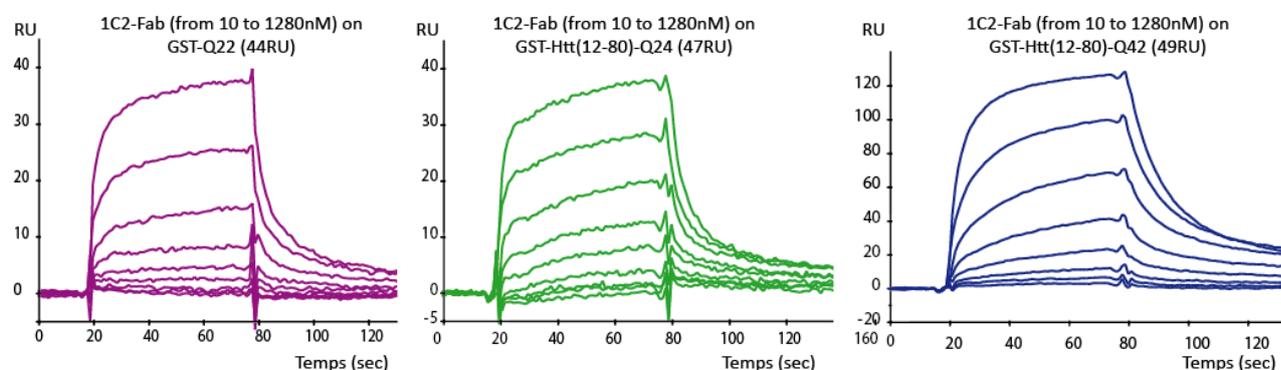


Figure 36 : Cinétique d'interaction en SPR du Fab 1C2 sur GST-Htt(12-80)-Qn. Cinétique d'interaction de 10 à 1280nM du Fab 1C2 sur 3 FCs contenant les mêmes protéines de fusion qu'en Figure 35. Le nombre de RU capturés sur chaque FC est indiqué au dessus des courbes.

Ces résultats confirment que :

- (1) le PRD est présent dans nos constructions GST-Htt(12-80)Qn puisqu'il est spécifiquement détecté par 2B4.
- (2) suffisamment de protéines "pleine longueur" GST-Htt(12-80)Qn sont retenues sur la surface SPR pour pouvoir détecter une interaction spécifique avec 2B4.

(3) la différence de longueur des polyQs (Q24 vs Q42) des GST-Htt(12-80)Qn est clairement détectée par 1C2 pleine longueur, en accord avec nos résultats précédents (Klein et al. 2007).

(4) l'utilisation de 1C2-Fab monovalent confirme qu'aucune différence structurale n'est détectable par 1C2 entre Q24 et Q42, en accord avec nos résultats précédents (Klein et al. 2007).

Le système était donc adapté à la réalisation d'une première expérience visant à déterminer l'affinité du fragment Fab de l'anticorps 2B4 (2B4-Fab) avec les protéines GST-Htt(12-80)Qn, afin d'observer dans quelle mesure la taille de la polyQ influence l'interaction entre ces protéines. J'ai généré des fragments de l'anticorps 2B4 et utilisé le Fab qui contient le site de reconnaissance au PRD. Le 2B4-Fab a une affinité similaire d'environ 80nM pour nos constructions GST-Htt(12-80)-Qn, quelque soit la taille de la polyQ (**Figure 37**).

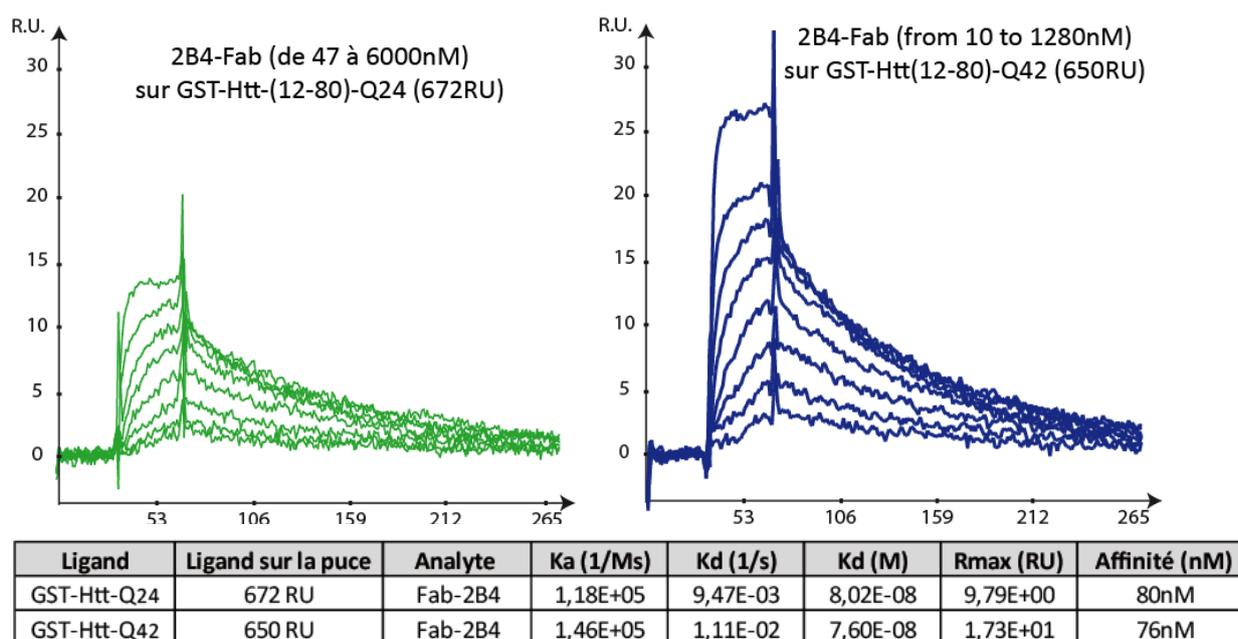


Figure 37 : Cinétique d'interaction en SPR du Fab 2B4 sur GST-Htt(12-80)-Qn. Cinétique d'interaction de 47 à 6000nM du Fab 2B4 sur 2 FCs contenant soit GST-Htt(12-80)-Q24, soit GST-Htt(12-80)-Q42. Le nombre de RU capturé sur chaque FC est indiqué au dessus des courbes. Le tableau détaille les paramètres de l'association mesurés au cours de l'expérience (GST-Htt-Q24 pour GST-Htt(12-80)-Q24 et GST-Htt-Q42 pour GST-Htt(12-80)-Q42).

Ces premiers résultats par SPR indiquent qu'après GF, ces constructions GST-Htt(12-80)-Qn sont utilisables en SPR pour caractériser des interactions avec la polyQ, ou avec le PRD. Après capture sur un anticorps GST, ces constructions sont accessibles et contiennent à la fois la polyQ et le PRD, puisqu'elles interagissent à la fois avec le 1C2 et le 2B4. Cependant,

pour arriver à des résultats avec le 2B4 ou le 2B4-Fab, nous avons dû capturer une grande quantité de GST-Htt(12-80)-Qn avec des concentrations élevées d'anticorps (pour une technique aussi sensible que la SPR) (**Figure 35**). L'analyse approfondie des signaux de réponse a révélé que moins de 5% des protéines GST-Htt(12-80)-Qn capturées contiennent le PRD, quelle que soit la taille de la polyQ (24 ou 42).

Ceci est en accord avec notre caractérisation biochimique des protéines GST-Htt(12-80)Qn (**Figure 31**). En effet, les produits intermédiaires contaminants, de taille intermédiaire entre la GST et les GST-Htt(12-80)Qn sont visibles sur gel (**Figure 31**). Même si la quantité de GST-Htt(12-80)Q24 obtenue est plus importante que celle de GST-Htt(12-80)Q42, la quantité de produits intermédiaires contaminants est aussi plus importante. Comme le nombre de R.U. fixé correspond à la quantité de protéines de fusion GST retenues par l'anticorps @-GST, une relative faible quantité de protéine GST-Htt(12-80)Q24 pleine longueur sont donc présentes sur la CHIP. Enfin, des tests d'interaction entre les domaines GST-Htt(12-80)-Qn et le domaine SH3 et SH3GL3 ont été entrepris sans succès (données non montrées). Ceci n'est pas étonnant étant donné la faible quantité de domaines PRD présents sur la puce. En effet, l'affinité du Fab-2B4 est de l'ordre du nM (affinité forte) alors que celle calculée entre le domaine SH3 et un peptide du PRD est de l'ordre du mM (Gao et al., 2006). Ainsi pour pouvoir observer l'interaction, il est important d'avoir le maximum de sites PRD disponibles sur la puce de SPR et une concentration importante de domaine SH3. Il a donc été impossible d'observer une telle interaction avec ces constructions GST-Htt(12-80)-Qn.

Au terme de ces expériences, et pour pouvoir quantifier une interaction entre le domaine SH3 ou SH3GL3 avec l'exon1 de la Htt, il aurait fallu avoir des protéines Htt-exon1 pleine longueur et contenant le PRD (C-ter) fixées sur la puce en SPR en quantité importante. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à améliorer la qualité de ces domaines à un niveau biochimique. D'autre part, j'ai caractérisé d'autres protéines de fusion les MBP-Htt(12-80)-Qn avec la même méthode que précédemment (données non montrées). Au terme de cette caractérisation, les quantités de protéines pleine longueur (et contenant le PRD) ne se sont pas révélées de meilleure qualité que pour les constructions GST-Htt(12-80)-Qn. Je n'ai donc pas procédé à de nouveaux tests par SPR avec ces constructions. Pour contourner ce problème, nous avons utilisé d'autres constructions de la Htt-exon1 fusionnée à divers tags, ainsi que d'autres méthodes de purification.

3.2.4 Utilisation de protéines de fusion TRX-Htt-Qn

« Une petite séquence qui fait tout la différence »

Une différence majeure entre notre méthode de purification et celle des autres laboratoires ayant réussi à purifier des quantités convenables de Htt-exon fusionné à un tag N-Ter, est la technique de lyse cellulaire. Nous utilisons en effet la technique validée de sonication, alors que d'autres utilisent soit la « french press », soit un choc osmotique. Nous avons donc suspecté que notre méthode de lyse cellulaire par sonication soit la cause de la faible quantité de protéines pleine longueur récupérées en fin de purification. Pour cette raison, nous avons utilisé de nouvelles constructions, TRX-Htt-Qn permettant de récupérer les protéines d'intérêt par une autre méthode, basée sur l'adressage des protéines d'intérêt dans le périplasme de la bactérie (Bennett et al., 2002). Lors d'un choc osmotique, ces protéines sont expulsées dans le milieu extracellulaire. Nous avons comparé les rendements et la qualité de la purification de protéines TRX-Htt-Qn exprimées dans la bactérie, en utilisant soit une étape de sonication, soit d'expulsion par choc osmotique.

Lyse par sonication

Pour vérifier notre hypothèse sur l'impact de la sonication sur la qualité des purifications, nous avons d'abord lysé par sonication les bactéries (BL-21) exprimant les protéines de fusion TRX-Htt-Qn (Bennett et al., 2002) et contenant différentes tailles de polyQ (Q16, Q25, Q39, Q46). Après purification par affinité, aucune protéine recombinante à la taille attendue n'a pu être observée en coloration bleu de coomassie (**Figure 38**). En effet, toutes les protéines visibles sont des contaminants bactériens et ont le même poids moléculaire, quelle que soit la taille de la polyQ. Cependant, ces protéines sont identifiables après WB et en utilisant le 1C2 (donnée non montrée). Ce résultat indique que les protéines recombinantes sont présentes en très faible quantité dans l'éluat après expression, sonication et purification par affinité.

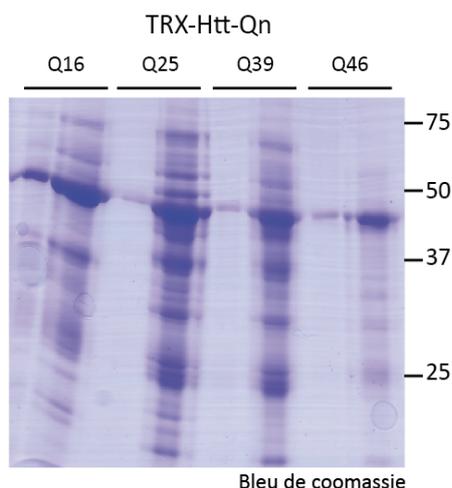


Figure 38 : Test de purification des protéines de fusion TRX-Htt-Qn. Gel SDS PAGE (12%) des protéines purifiées TRX-Htt-Qn (Q16, Q25, Q39, Q46), coloré en bleu de coomassie.

Expulsion par choc osmotique

Après choc osmotique et purification par affinité de la même quantité de bactéries, les protéines de fusion TRX-Htt-Qn sont au contraire facilement identifiables en coloration bleu de coomassie (**Figure 39 à gauche**). En conclusion, l'adressage de la Htt dans le périplasma améliore la qualité des protéines de fusion contenant le domaine N-ter de la Htt-Qn et une caractérisation complète a pu être effectuée.

Caractérisation des protéines de fusion TRX-Htt-exon1

La première étape de la caractérisation a été de les analyser en condition dénaturante. Ces protéines sont très bien purifiées et une protéine unique correspondant à la protéine pleine longueur est visible en bleu de coomassie (**Figure 39 à gauche**). De plus, ces protéines sont révélées avec divers anticorps, l'@-2B4, l'@-1C2 ou l'@-TRX, confirmant la présence des domaines PRD (C-ter), polyQ et TRX (N-ter) respectivement (**Figure 39 de gauche à droite**). De plus, cette protéine a été analysée par MALDI-TOF (donnée non montrée) ; les résultats indiquent que la protéine est complète et correspond exactement à la séquence souhaitée (voir **Figure S2** du manuscrit). Enfin, notons que sur l'immunodétection avec le 1C2, les longs polyQs sont mieux révélés que les petits polyQs, conformément aux observations de Bennett et al. 2002.

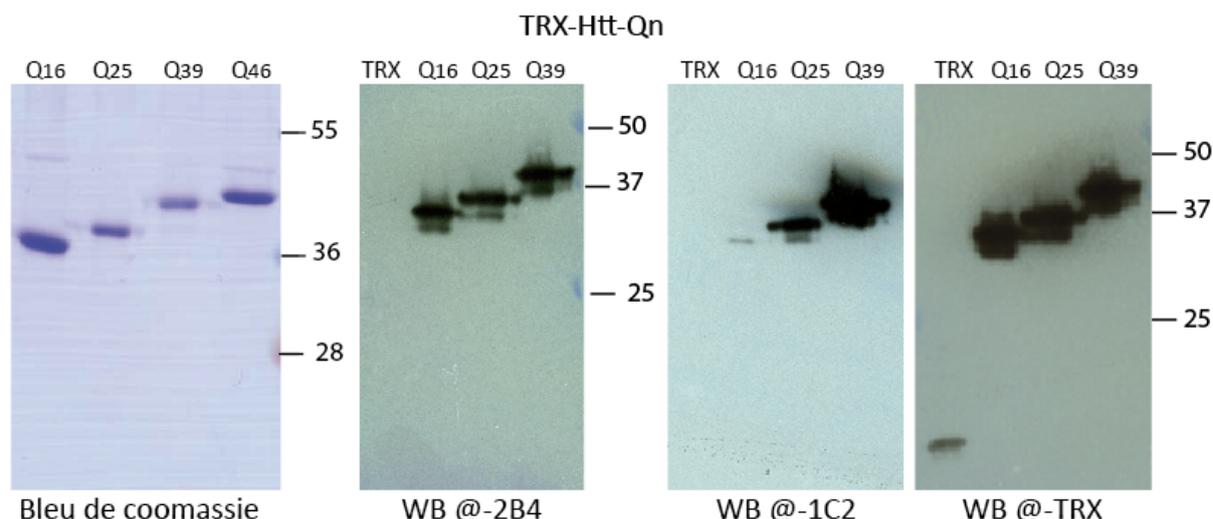


Figure 39 : Caractérisation en conditions dénaturantes des protéines de fusion TRX-Htt-Qn. De gauche à droite, gel SDS PAGE (15%) des protéines purifiées TRX-Htt-Qn (Q16, Q25, Q39, Q46), coloré en bleu de coomassie, ou révélé avec @-2B4, @-1C2, @-TRX.

La deuxième caractérisation s'est faite en condition native par GF, et les fractions ont été analysées sur gel dénaturant coloré en bleu (**Figure 40**). Après GF, seules des populations monomériques ont été observées pour TRX-Htt-Q16 (**Figure 40 A**), TRX-Htt-Q25 (**Figure 40 B**) et TRX-Htt-Q39 (**Figure 40 C**), même après avoir conservé les protéines plus d'une semaine à 4°C (avec inhibiteur de protéase). La caractérisation de TRX-Htt-Q46 est présentée dans le manuscrit (**Figure S 3 A**). Notons toutefois que sur le gel SDS-PAGE des fractions de TRX-Htt-Q16, il y a une bande contaminante inférieure à 37kDa. Cette protéine n'est pas un fragment de protéolyse, mais une contamination bactérienne fréquemment observée lors de mes purifications par affinité (**Figure 40 A**). Pour la suite des expériences, ce contaminant a été exclu en purifiant à nouveau la protéine TRX-Htt-Q16 (donnée non montrée).

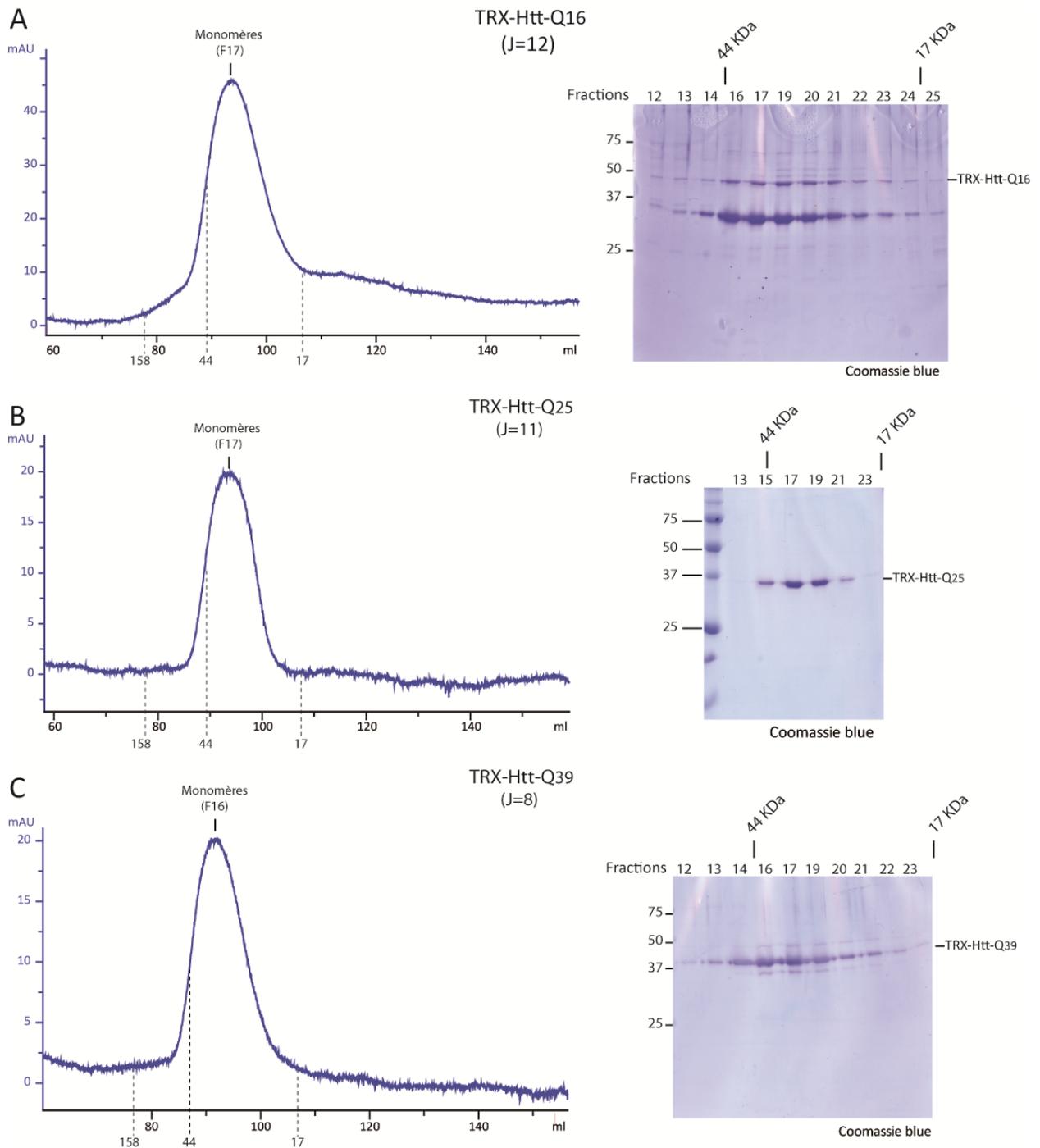


Figure 40 : Caractérisation avancée des protéines de fusion TRX-Htt-Qn. Les protéines après purification par affinité TRX-Htt-Qn, Q16, Q25, Q39 respectivement de A à C, sont chargées sur une résine S75 d'une colonne (16/900); à droite : analyse des fractions de la GF sur SDS-PAGE colorée au Bleu de coomassie. Le nombre de jour (J) où la protéine a été conservée à 4°C avant la GF est indiqué au dessous de l'identité de la protéine.

Enfin, la dernière caractérisation a été de déterminer si ces protéines restaient stables après congélation. J'ai donc effectué des GF sur ces domaines après congélation. Un exemple est présenté (**Figure 41**). Des traces d'agrégation sont visibles à l'œil nu après décongélation.

Cependant, après centrifugation et injection du surnageant sur GF, aucun agrégat soluble n'est visible. Cela signifie que la population soluble de TRX-Htt-Q46 est non agrégée après congélation. Cette bonne résistance à la congélation nous a permis de préparer et conserver les TRX-Htt-Qn, aliquotées en petit volume, pour des analyses ultérieures. Ceci nous a permis une plus grande flexibilité et une meilleure reproductibilité, sachant que le comportement des protéines d'une même préparation nous était connu.

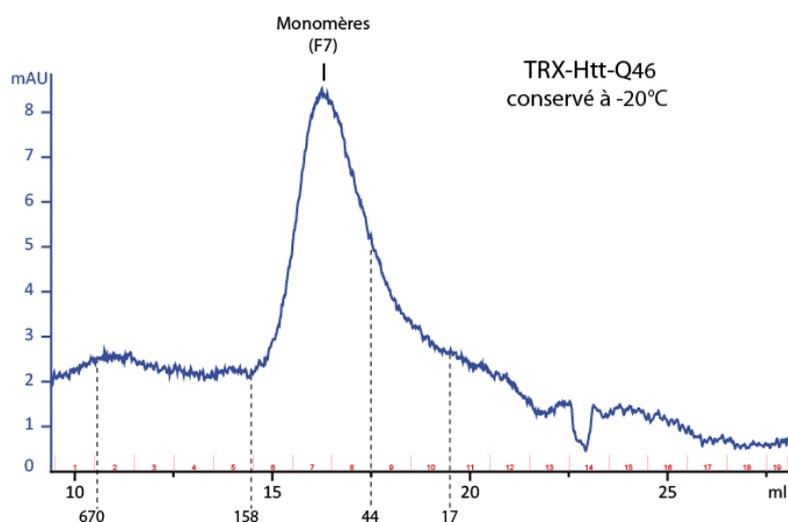


Figure 41 : Test de congélation de TRX-Htt-Q46. TRX-Htt-Q46, après avoir été purifiée par affinité et décongelée, est chargée sur une résine S200 d'une colonne (10/300).

Au terme de la caractérisation, ces protéines se sont révélées être d'excellente qualité. Elles sont en effet bien purifiées, aucun fragment de protéolyse n'est présent, elles se conservent bien à 4°C et peuvent être congelées. Nous avons donc envisagé de les utiliser en SPR pour mesurer l'interaction du domaine SH3 et de SH3GL3 avec l'exon-1 de la Htt.

3.2.5 Tests d'interaction par SPR de TRX-Htt-Qn portant des polyQs de taille variable avec SH3 et SH3GL3

Pré-requis pour la SPR

Pour réaliser nos tests d'interaction par SPR, les protéines nécessitent d'être fixées par un anticorps qui les capture sur la puce SPR, sans se décrocher lorsqu'on applique le flux de tampon salin. Nous avons commandé un anticorps @-TRX qui correspondait aux critères requis pour la SPR. Cependant, cet anticorps n'était pas assez affin pour retenir nos constructions sans pertes (données non montrées). Ainsi, nous avons été contraints de fixer les protéines TRX-Htt-Qn de façon covalente sur la surface de dextran. Cette méthode est couramment utilisée en SPR mais présente le désavantage de capturer le ligand de façon

non-orientée, ce qui résulte en une perte d'activité de nombreuses protéines liées de façon covalentes dans une conformation non favorable à la détection de l'interaction (voir *Matériels et Méthodes du manuscrit*).

Malgré ce désavantage, de bons résultats ont été obtenus en SPR, et nous avons pour la première fois pu quantifier l'affinité du domaine SH3 pour l'exon1 de la Htt avec plusieurs tailles de polyQ (Figure S4 A du manuscrit). De plus, nous avons pu observer l'interaction de SH3GL3 avec ces domaines TRX-Htt-Qn de façon qualitative. Cette interaction ne semble pas être influencée par la taille de la polyQ lorsque l'agrégation de la Htt est contrôlée (Figure S4 C du manuscrit). D'autre part, afin de consolider nos données, nous avons décidé d'utiliser une autre technique biophysique qui permet de quantifier des interactions entre deux partenaires en solution : la technique de Titration Calorimétrique Isotherme (ITC).

3.2.6 Tests d'interaction par ITC de TRX-Htt-Qn portant des polyQs de tailles variables avec SH3 et 2B4-Fab

La technique d'ITC

Nous avons utilisé une autre technique biophysique et quantitative pour renforcer les résultats d'interaction entre le domaine SH3 et l'exon1 de la Htt (Q16 ou Q46). En effet, bien que la SPR soit une technique très sensible et très précise, elle nécessite qu'un des partenaires soit fixé sur la puce. La technique ITC est basée sur le fait que 2 protéines vont dégager ou absorber de la chaleur en interagissant. Elle permet de mesurer les variations d'enthalpie (ΔH) au cours d'une interaction entre 2 partenaires. L'analyse des variations d'enthalpie (ΔH) en fonction de la stœchiométrie de liaison (n) permet de calculer l'affinité de deux protéines en solution. Ainsi, cette méthode présente l'avantage majeur de ne pas nécessiter qu'une des protéines soit fixée.

L'appareil ITC est principalement composé d'un dispositif chauffant, d'une sonde thermosensible et deux cuves identiques faites d'un matériau hautement thermoconducteur. Pendant l'expérience, la sonde thermosensible est utilisée pour détecter des

différences de température entre la cuve de référence (remplie de tampon) et la cuve contenant l'échantillon protéique à tester. Le partenaire à tester (analyte) est injecté de manière progressive dans ces deux cuves. La puissance nécessaire pour maintenir une température égale entre la cuve contenant l'échantillon, et la cuve de référence en fonction du temps, sont enregistrées. Par conséquent, les données brutes d'une expérience sont représentées sous forme d'une série de pics de flux de chaleur (puissance), où chaque pic correspond à une injection d'analyte au cours du temps.

Les mesures ITC

Dans un premier temps, nous avons tenté de mesurer l'interaction entre le 2B4-Fab (100 μ M) et l'exon1 de la Htt, en utilisant les constructions TRX-Htt-Qn (6 μ M) que nous savions être extrêmement solubles et monomériques (voir section précédente). Les résultats obtenus n'ont pas été interprétables, dû à l'aspect biphasique atypique des réponses observées (**Figure 42**).

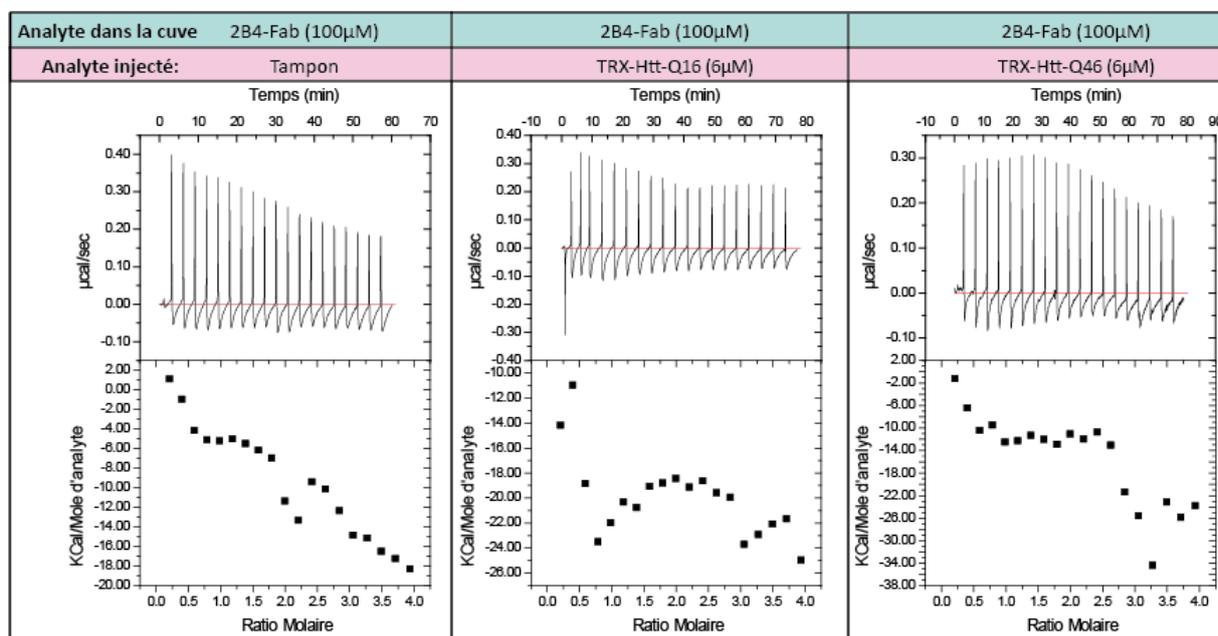


Figure 42 : Profil ITC de l'interaction de 2B4-Fab avec TRX-Htt-Q16. Le 2B4-Fab (100 μ M) est placé dans la cuve pour les 3 expériences. Le tampon, TRX-Htt-Q16 (6 μ M) et TRX-Htt-Q46 (6 μ M) sont injectés dans 3 expériences indépendantes (de gauche à droite). Les réponses sont indiquées soit en μ cal/sec en fonction du temps (min) (en haut) ; soit en Kcal/Mole d'analyte en fonction du ratio molaire (en bas).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre MBP-SH3 et TRX-Htt-Qn. Les aspects thermodynamiques de l'interaction de l'exon1 de la Htt avec un

domaine SH3 ne sont pas connus. Ainsi au début de l'expérience, nous ne savions pas si l'échange de chaleur allait être important et donc facilement mesurable. Pour augmenter les échanges de chaleur dans la cuve et améliorer leur détection, il est classiquement conseillé d'augmenter la concentration des partenaires à analyser. Nous avons donc progressivement augmenté la concentration de TRX-Htt-Qn (le jour de l'expérience) pour pouvoir détecter un échange de chaleur avec MBP-SH3 ou Fab-2B4. Cet échange de chaleur n'a pas été observé en utilisant de faibles concentrations de Htt ou de MBP-SH3. Il est possible que l'échange de chaleur lors de l'interaction entre SH3 et le PRD soit très faible et donc difficilement mesurable. Nous avons donc concentré ces protéines TRX-Htt-Qn jusqu'à plus d'1mM (soit 30mg/ml) et MBP-SH3 jusqu'à 3mM (soit 150mg/ml), sans observer de résultats significatifs (données non montrées). J'ai également essayé cette expérience en utilisant MBP-SH3 comme analyte dans la cuve et en l'injectant sur TRX-Htt-Qn et *vice-versa*. En concentrant ces protéines de façon très importante pour les besoins de cette expérience (30mg/ml pour Htt-Qn et 150mg/ml pour MBP-SH3), nous avons observé la présence d'agrégats au fond des tubes, provoquant des échanges de chaleurs et masquant ainsi les échanges de chaleurs dus à l'interaction avec le domaine SH3. Les données ont donc été ininterprétables.

Au terme de cette session d'ITC, nous souhaitons confirmer les résultats quantitatifs obtenus précédemment par SPR. L'ITC n'étant pas une technique adaptée pour visualiser nos interactions, nous avons décidé d'optimiser les mesures par SPR, en utilisant un mode de fixation non-covalent pour fixer nos constructions Htt-exon1 sur la puce SPR. N'ayant pas trouvé d'anticorps anti-TRX adapté à la SPR, nous avons décidé de cloner à nouveau la Htt-exon1 dans un vecteur exprimant la MBP, pour pouvoir fixer cette construction via un anti-MBP sur la puce SPR.

3.2.7 Utilisation de nouvelles protéines de fusion MBP-Htt-Qn

Clonage du domaine N-ter de la Htt-Qn dans un nouveau vecteur

Pour cloner ces nouvelles constructions, nous avons utilisé l'ADNc des constructions de (Bennett et al., 2002). Ceux-ci présentent exactement la même séquence en a.a. codée par l'exon1 de la Htt, mais avec une alternance de CAG/CAA codant la polyQ. Ceci présente l'avantage de faciliter les étapes d'amplification par PCR. Nous avons également utilisé un

vecteur exprimant la MBP en N-ter et rajouté un signal de localisation périplasmique en amont de cette séquence MBP, pour faciliter leur purification (voir **Matériels et Méthodes du manuscrit pour les détails du clonage**). Les séquences exactes en a.a. des domaines de la Htt clonés sont présentées en **Figure S2** du manuscrit.

Lyse par sonication

Comme pour les protéines TRX-Htt-Qn, les protéines de fusion MBP-Htt-Qn contenant différentes tailles de polyQ (Q16 et Q46) n'ont pas pu être observées en coloration bleu de coomassie, après une lyse cellulaire par sonication et purification par affinité. Cependant, après WB et en utilisant le 2B4 (dirigé contre le PRD des MBP-Htt-Qn), les protéines de fusion ont été détectées après un temps de révélation long (15 min) (**Figure 43**). Ce résultat indique que les protéines recombinantes sont présentes en très faible quantité dans l'éluat après expression, sonication et purification par affinité.

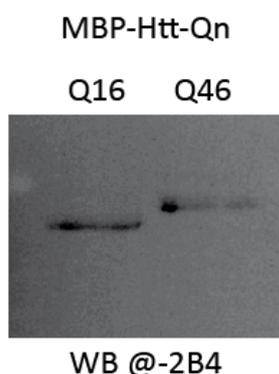


Figure 43 : Caractérisation des protéines MBP-Htt-Qn après sonication. Gel SDS-PAGE et immunodétection avec @-2B4 de MBP-Htt-Q16 de MBP-Htt-Q46 après sonication et purification par affinité.

Expulsion par choc osmotique

Après choc osmotique et purification par affinité de la même quantité de bactéries, les protéines de fusion MBP-Htt-Qn sont au contraire facilement identifiables en coloration bleu de coomassie et WB. La caractérisation biochimique avancée de ces constructions après choc osmotique est présentée dans le manuscrit (**Figure 1 C, D, E**). Ainsi dans tous les cas, la séquence d'adressage dans le périplasme des protéines recombinantes MBP-Htt-Qn et TRX-Htt-Qn ont permis d'améliorer la qualité de la purification.

De façon générale, ces nouvelles protéines recombinantes MBP-Htt-Qn se sont révélées être de très bonne qualité. En effet, un grand nombre de protéines pleine longueur (contenant le PRD C-Ter) a été obtenu. De plus après GF, ces domaines se sont révélés entièrement à l'état de monomère soluble, idéales pour entreprendre nos expériences de SPR.

3.2.8 Manuscrit provisoire

Wild-type and mutant Huntingtin have similar affinity for protein partners:
a potential role for huntingtin exon-1 aggregates in mediating huntingtin's
abnormal interactions

3.2.9 Caractérisation du clivage de la TRX-Htt-Q46

Dans le manuscrit, il est démontré que le 2B4-Fab et le 2B4 sont recrutés dans des agrégats insolubles d'exon1 de la Htt après clivage de TRX-Htt-Q46 par l'entérokinase (**Figure 3 du manuscrit**). Ce résultat est l'aboutissement d'une caractérisation importante des produits résultant du clivage de TRX-Htt-Q46.

Pour que cette expérience de recrutement puisse être utilisée, il fallait :

- (1) que la protéolyse puisse être faite rapidement pour avoir une libération aussi rapide que possible et simultanée de Nter-Htt, qui commençaient alors à s'agréger.
- (2) être certains que le clivage par la protéase soit suffisamment spécifique pour libérer des fragments contenant à la fois le polyQ, et le PRD.

Quel temps est nécessaire pour que le clivage soit complet ?

La première étape a été de déterminer le nombre de fragments générés après protéolyse. Après des temps variables d'incubation avec la protéase (entérokinase : ENK), les échantillons ont été migrés sur gel dénaturant (**Figure 44**). Rappelons que les agrégats de polyQ sont insolubles et résistants au traitement au SDS. Ils ne peuvent donc pas être détectés après migration sur gel SDS PAGE : seuls les fragments de polyQ encore solubles sont visibles. On distingue la protéine TRX-Htt-Q46 entière à gauche ainsi que les fragments libérés au cours de la protéolyse. Après 5min avec la protéase, la protéolyse TRX-Htt-Q46 est quasi complète et complètement finie au bout de 10min car la protéine pleine longueur n'est plus visible. Notons que pour être certains que le clivage par la protéase soit complet, nous avons choisi un temps de protéolyse de 30min pour nos tests de recrutement dans le manuscrit (**Figure 3 du manuscrit**).

Au bout de combien de temps TRX-Htt-Q46 s'agrège-t-il ?

Après protéolyse, deux peptides principaux sont générés (p1 et p2). De façon intéressante, 5 à 6h après clivage, ces peptides ne sont plus visibles sur le gel SDS-PAGE. Ces peptides contiennent l'exon 1 de la Htt (vérifié par WB @1C2 et @2B4, donnée non montrée) et 5 à 6h sont nécessaires pour qu'ils forment des agrégats de polyQ insolubles au traitement SDS. Ces agrégats sont nettement visibles à l'œil nu au fond du tube et leur identité a été

confirmée par spectrométrie de masse (**Figure 45**). Notons encore une fois que pour être certains que les peptides contenant l'exon 1 de la Htt soient agrégés lors de nos tests de recrutements, ces expériences ont été réalisées 24h après protéolyse. Les peptides p3 et p4 correspondent à la taille du tag TRX libéré. Après un temps court de protéolyse, p3 semble majoritaire, puis avec le temps il doit subir un clivage aspécifique générant ainsi un peptide plus petit : p4.

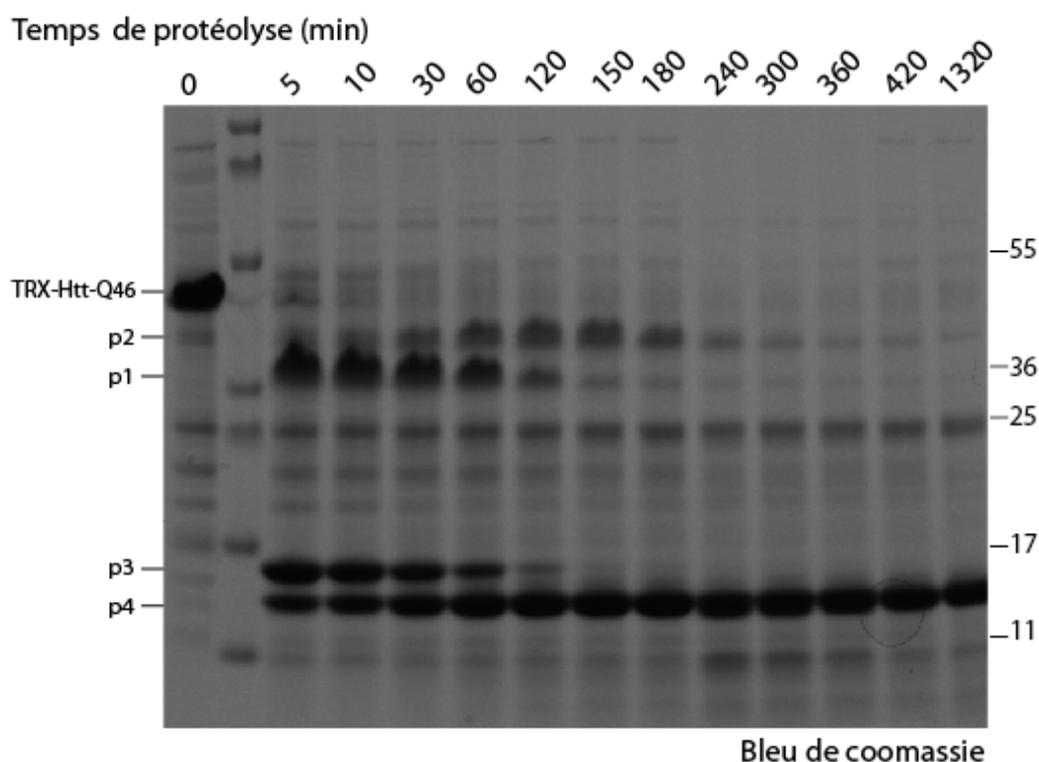


Figure 44 : Analyses des fragments solubles de TRX-Htt-Q46 après différent temps de protéolyse avec l'entérokinase. Gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie ; les différents peptides générés après clivage sont nommés p1, p2, p3 et p4.

Ces observations suggèrent que la protéase ENK clive TRX-Htt-Q46 à plusieurs sites, au lieu d'un site spécifique attendu. Pour déterminer l'identité des peptides générés et vérifier qu'ils contiennent bien la partie Qn-PRD, nous avons complété cette expérience par une analyse par ESI-TOF des agrégats re-solubilisés.

Identification par ESI-TOF des peptides présents dans les agrégats générés

Pour utiliser la technique d'ESI-TOF, il a été nécessaire de re-solubiliser ces agrégats de Htt-Q46 dans de l'acide formique. Deux peptides uniques ont été identifiés dans les agrégats (**Figure 45**). Le premier, de 13,9KDa, correspond exactement à l'exon 1 de la Htt. Le second,

de 12,1kDa, correspond à l'exon 1 de la Htt sans les 15 premiers a.a, ce qui montre l'existence d'un site secondaire reconnu par l'enterokinase après la lysine K15.

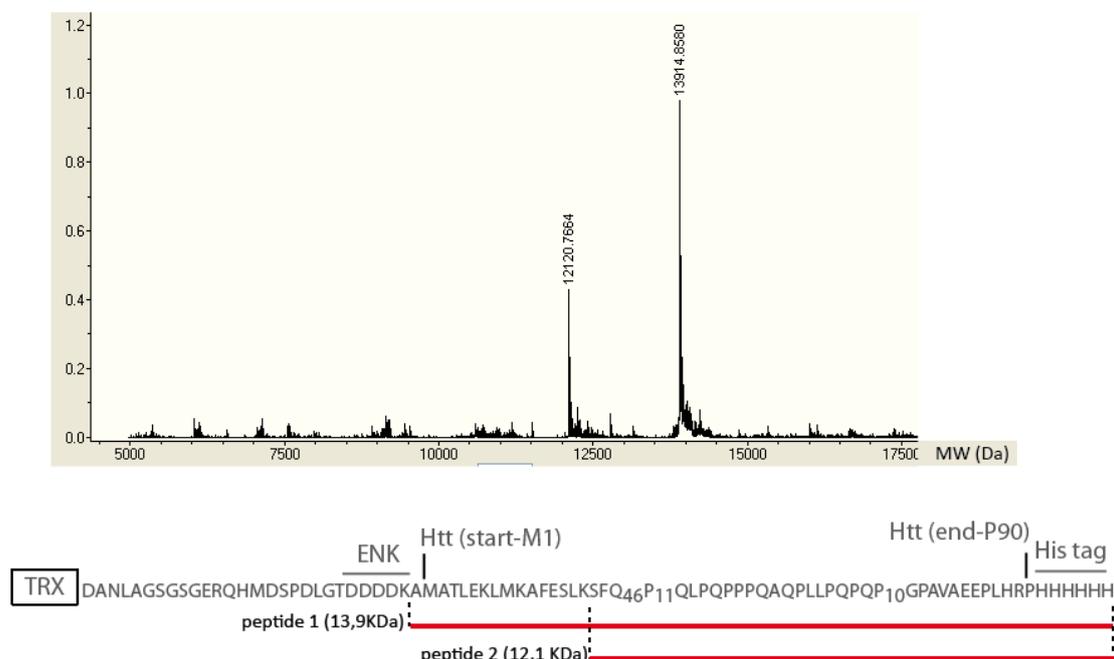


Figure 45 : Analyses ESI-TOF de l'agrégat de TRX-Htt-Q46 après clivage à l'entérokinase. Le spectre ESI-TOFF est présenté dans la partie supérieure. Les séquences des peptides présents dans l'agrégat sont représentées en rouge par rapport à la séquence de TRX-Htt-Q46.

Au terme de cette caractérisation, nous avons pu constater que l'exon 1 de la Htt avec ou sans les 17 premiers a.a. sont les seules peptides présents dans les agrégats insolubles de la Htt. Ainsi, le domaine PRD et la polyQ entière sont présents lors de l'agrégation, validant ainsi notre approche sur le test de recrutement.

L'ensemble de ces résultats sera discuté plus loin, je vais maintenant présenter les résultats que j'ai obtenu concernant la caractérisation d'un nouvel interacteur potentiel de la Htt et de HAP1: le récepteur au ryanodine (RyR).

4. RyR : un nouvel interacteur de la Htt ayant un impact potentiel sur la pathogénèse de Huntington

Dans cette dernière partie de résultats, je vais vous présenter une autre étude à laquelle j'ai contribué, en collaboration avec Dr. Katrin Lindenberg et Pr. Bernhard Landwehrmeyer (Universitätsklinik Ulm - Allemagne).

Nous avons vu dans l'**Introduction** qu'une dérégulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire pourrait expliquer la spécificité de la dégénérescence striatale dans la MH (Tang et al., 2003). En effet, HAP1, qui est entre autres impliquée dans la régulation du calcium, exerce une meilleure interaction avec la Htt mutée. Il a été montré qu'un interacteur de HAP1 est affecté par la taille de la polyQ de la Htt : il s'agit du canal calcique IP3R1 du réticulum endoplasmique, abondant dans le système nerveux central. Ainsi, une hypersensibilisation de IP3R1 permet d'envisager un modèle expliquant comment la dysfonction de la Htt mutée mènerait à une dégénérescence spécifique du striatum, via un mécanisme de type excitotoxique (**Chapitre 4 de l'Introduction**).

Le domaine minimal d'interaction d'IP3R1 avec HAP1 contient une centaine d'a.a. à peine, et se situe après les domaines **TransMembranaires** (TM). Les prédictions de structure secondaire et l'analyse de la complexité de ce fragment C-ter suggéraient que ce domaine soit structuré (données non montrées). Compte tenu de l'importance régulatrice de ce domaine et de son interaction avec Htt/HAP1, nous avons recherché si d'autres protéines portent un tel domaine, lesquelles pourraient être des partenaires potentiels de HAP1 et de la Htt.

Approche bio-informatique

F. Klein a mené une étude bioinformatique (voir **Matériels et Méthodes**) et identifié un domaine fortement homologue à C-ter-IP3R en position C-ter de RyR (**Figure 46**). Nous observons d'une part une très bonne conservation du domaine C-ter entre les 3 isoformes d'IP3R1. D'autre part, l'alignement révèle l'existence d'une importante zone d'homologie dans le domaine C-ter des IP3Rs et des RyRs. Cette homologie recouvre presque totalement

le domaine d'interaction d'IP3R1 avec HAP1 (Tang et al., 2003). Le domaine C-ter des IP3Rs, qui représente la partie cytosolique C-ter de la protéine, est très court et ne possède aucune homologie avec d'autres domaines connus, sa fonction la plus probable étant de recruter des partenaires comme HAP1 et la Htt, régulant l'activité du canal (Tang et al., 2003).

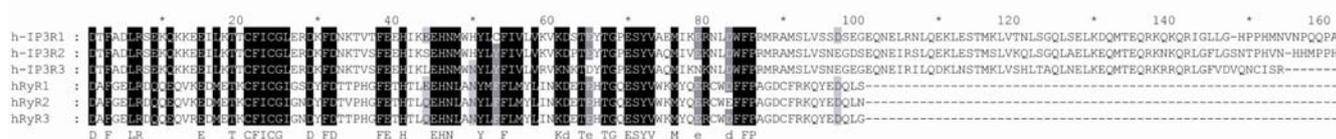


Figure 46 : Alignement des domaines C-terminaux des IP3Rs et des RyRs. Les extrémités C-ter des différents isoformes de canaux calciques de type IP₃R et RyR ont été alignés au moyen du logiciel ClustalX. La séquence consensus est indiquée en dessous de l'alignement (les lettres majuscules représentent les séquences parfaitement conservées, les lettres minuscules celles conservées à plus de 83%).

Les RyRs

Les RyRs constituent une autre famille de canaux calciques du réticulum endoplasmique qui porte le nom de l'alcaloïde dont ils sont la cible spécifique : le ryanodine. Il en existe trois isotypes (RyR1, 2 et 3), chacun étant codé par un gène différent (Rossi and Sorrentino, 2002), mais dont le domaine C-ter est très conservé. Sous forme de tétramères, les RyRs forment des canaux calciques qui assurent la libération du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. La structure du tétramère RyR1 par cryo-microscopie électronique est connue (Serysheva et al., 2008) (**Figure 47**).

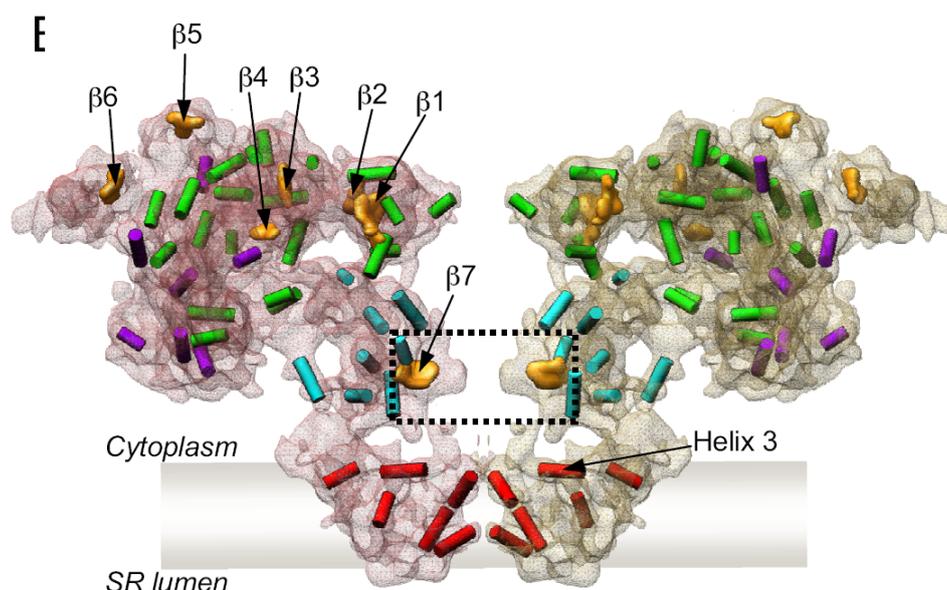


Figure 47 : Structure secondaire de deux sous-unités du tétramère RyR1 insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Les hélices α sont indiquées par des cylindres de couleurs différentes en fonction de leur localisation: rouge, dans la région TM ; vert, violet et cyan dans le cytoplasme ; les feuillets β sont indiqués en jaune ; la connexion entre les feuillets β et le domaine TM est encadrée en pointillés noirs. Repris de (Serysheva et al., 2008).

Notons que IP3R1 forme également un canal calcique sous forme de tétramère et que sa structure a récemment été résolue en EM (Wolfram et al., 2010). De plus dans les neurones, l'activité des RyRs, comme des IP3Rs, est étroitement couplée à celle des récepteurs au glutamate de la membrane plasmique. Il est aujourd'hui couramment admis qu'IP3Rs et RyRs jouent un rôle majeur dans la neurotransmission (Berridge et al., 2000; Fagni et al., 2000). Ainsi, compte tenu des grandes homologues de séquence, de structure et de fonction entre IP3Rs et RyRs, nous avons envisagé que HAP1 et Htt puissent directement interagir avec le domaine C-ter du RyR, et moduler ainsi son activité. Ceci pourrait expliquer la dégénérescence spécifique du striatum. Mon rôle dans ce projet a été d'observer l'interaction HAP1/RyR *in vitro*. Nous avons choisi, dans un premier temps, de caractériser cette interaction par pull-down (PD) en utilisant des protéines recombinantes produites chez la bactérie. Dans un deuxième temps et si la qualité des protéines le permet, ces protéines recombinantes nous permettraient de mesurer leur affinité par SPR.

4.1 Les domaines utilisés pour notre étude

Pourquoi est-il difficile d'étudier l'interaction directe Htt/RyR ?

Sachant qu'une interaction directe entre la Htt et le domaine C-ter d'IP3R1 a déjà été démontrée par PD (Tang et al., 2003), pourquoi ne pas tester l'interaction directe entre la Htt et RyR ? La raison principale est que les domaines minimaux d'interaction de la Htt pour IP3R1 n'ont pas été identifiés. De plus, il est difficile de produire et purifier la Htt pleine longueur. Nous avons donc décidé, dans un premier temps, de focaliser notre travail sur l'interaction de RyR avec HAP1 plutôt que sur l'interaction directe entre la Htt et RyR.

Sélection des domaines d'étude de HAP1, IP3R1 et RyR3

Nous avons utilisé le domaine C-ter de IP3R1, la zone d'homologie (C-ter) de RyR3 et la protéine Hap1 presque pleine longueur. Tous les domaines sélectionnés ont été fusionnés en N-ter, soit avec un Tag GST, soit un tag MBP, et avec un tag polyhistidine en C-ter. Les protéines recombinantes sont représentées sur la **Figure 48**.

HAP1

Le domaine minimal d'interaction de HAP1 avec IP3R1 n'a pas clairement été identifié. Cependant, seul l'isoforme de rat HAP1B, et non l'isoforme HAP1A, interagissait avec le domaine C-ter d'IP3R1. La seule différence entre ces 2 isoformes est leur domaine C-ter (à partir de K578) ; ainsi il est probable que le domaine minimal d'interaction de HAP1 soit son domaine C-ter (Tang et al., 2003). Cependant, la partie C-ter de HAP1 est peu conservée (entre l'homme, la souris et le rat) et nous avons décidé de réaliser cette étude d'interaction en utilisant de larges portions de HAP1, comme cela a été réalisé pour l'étude de l'interaction IP3R/HAP1 (Tang et al. 2003). Ainsi, nous avons utilisé le domaine (143-619) de HAP1. Il contient à la fois le domaine d'interaction de HAP1 avec la Htt (324-416) et contient la partie C-ter susceptible d'interagir avec le canal calcique IP3R1 (**Figure 48 A**).

RyR

La protéine RyR est très grande (>5 000 a.a.). Par ailleurs, il s'agit d'une protéine qui s'insère dans les membranes et possède donc des domaines TM hydrophobes. C'est pourquoi il nous a paru raisonnable de travailler avec des domaines de cette protéine. Le domaine minimal d'interaction d'IP3R1 avec HAP1 a été identifié comme étant son domaine C-ter (2627-2731) (Tang et al., 2003). De plus, le domaine C-ter d'IP3R1 a une forte homologie avec le domaine C-ter de RyR, qui serait alors le plus susceptible d'interagir avec HAP1. Nous avons donc sélectionné ce domaine C-ter de RyR pour nos études. D'autre part, RyR3 étant l'isoforme de RyR le plus présent dans le cerveau, nous avons travaillé avec une séquence de RyR3 de souris qui est identique (au niveau de son domaine C-ter) à la séquence humaine (voir **Matériels et Méthodes**) (**Figure 48 B**).

IP3R1

L'interaction publiée entre IP3R1 et HAP1 constitue un bon contrôle positif. Pour notre étude, nous avons donc également sélectionné le domaine d'interaction d'IP3R1 (Tang et al., 2003) (**Figure 48 C**).

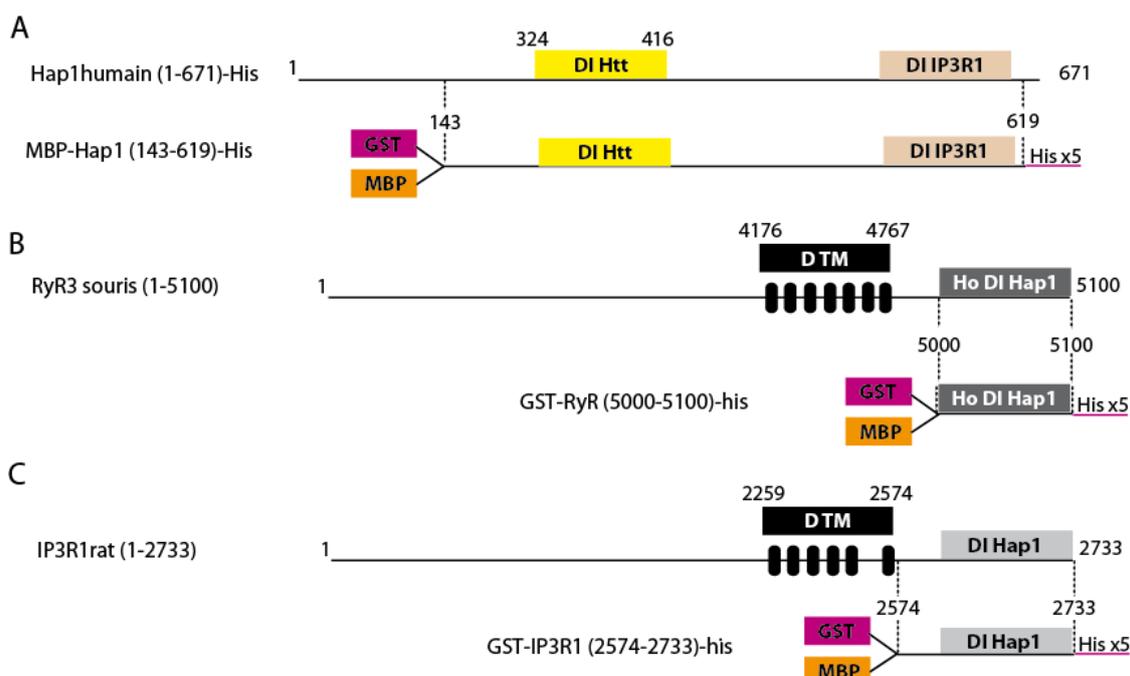


Figure 48 : Construction des protéines de fusion HAP1, IP3R1 et RyR3. A/ HAP1 avec en jaune et en marron clair le **Domaine d'Interaction (DI)** de HAP1 avec la Htt (DI Htt) et IP3R1 (DI IP3R1) respectivement. B/ RyR3 avec en noir les **Domaines TransMembranaires (D TM)**, en gris foncé son domaine d'homologie avec le domaine d'IP3R1 qui interagit avec HAP1 (Ho DI HAP1) (voir **Figure 45** pour les détails de l'homologie). C/ IP3R1 avec en noir les DTMs et en gris clair son domaine d'interaction avec HAP1 (DI HAP1). Les tags rajoutés : « GST », « MBP » et « 5 x His » sont indiqués.

4.2 Caractérisations biochimiques des domaines de l'étude

Les domaines IP3R1 et RyR3

La première étape de la caractérisation se fait sur gel dénaturant. Les protéines MBP-IP3R1 (65KDa) et MBP-RyR3 (58KDa) sont très bien exprimées et se purifient bien par affinité (**Figure 49**). Cependant, elles sont très difficilement éluées et restent fixées en grande proportion de façon aspécifique à la résine. L'identité de ces domaines a été confirmée par MALDI-TOFF (donnée non montrée).

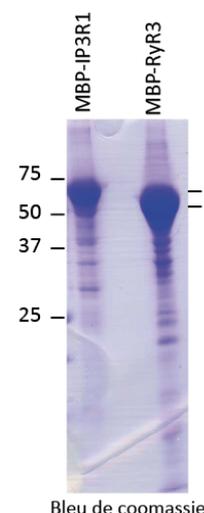


Figure 49 : Purification par affinité de MBP-IP3R1 et MBP-RyR3. Gel SDS-PAGE de MBP-IP3R1 (65KDa) et MBP-RyR3 (58KDa), coloré en bleu de coomassie.

Nous avons également caractérisé ces domaines dans des conditions natives par GF. MBP-IP3R1 (**Figure 50 A**), comme MBP-RyR3 (**Figure 50 B**), est sous forme d'agrégats solubles.

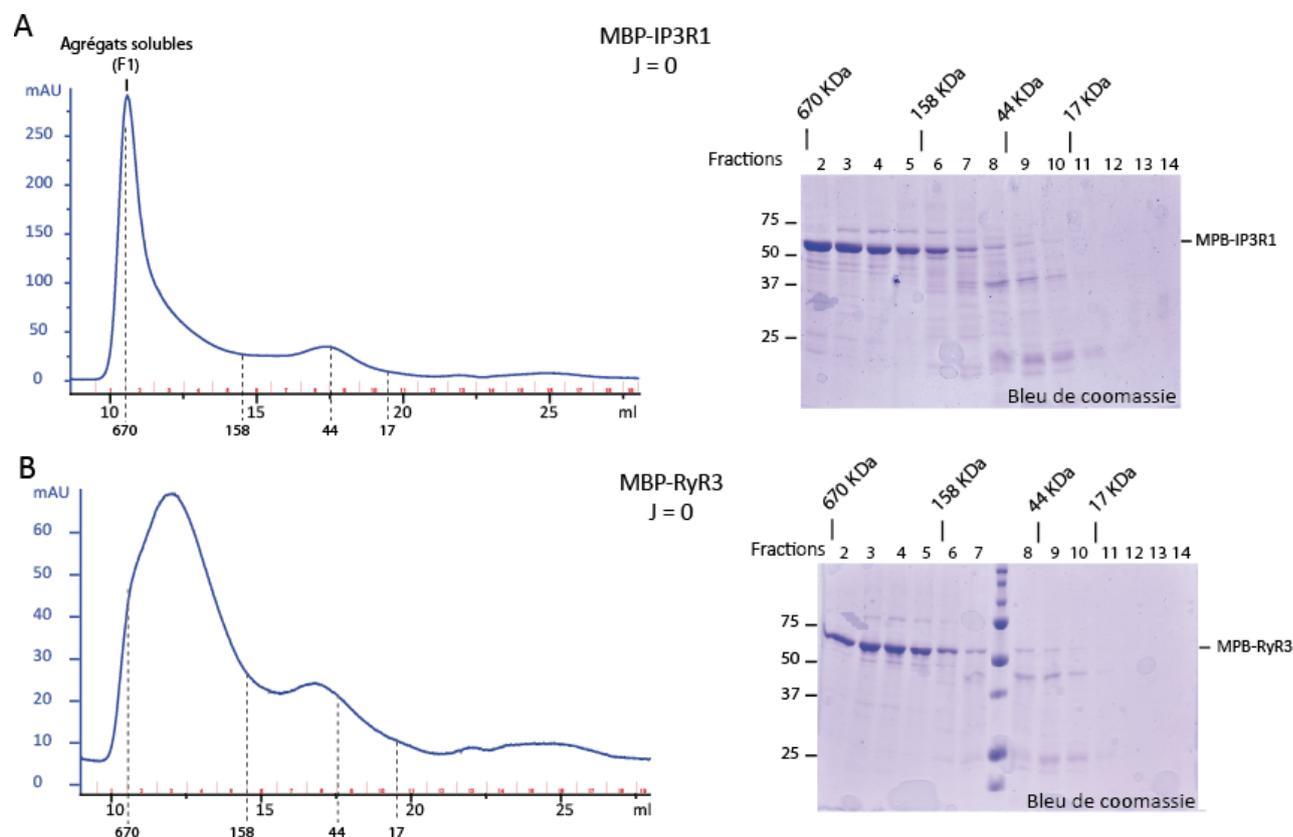


Figure 50 : Caractérisation de MBP-IP3R1 et MBP-RyR3 en GF. Les protéines après purification par affinité : MBP-IP3R1 et MBP-RyR3 respectivement en A et B, sont chargées le jour même sur une résine S200 d'une colonne (10/300); à droite : analyse des fractions de la GF sur SDS-PAGE coloré au Bleu de coomassie.

La dernière étape de la caractérisation a été d'évaluer si après congélation ces protéines (même sous forme d'agrégats solubles) étaient toujours présentes. MBP-IP3R1 (**Figure 51 A**), comme MBP-RyR3 (**Figure 51 B**), reste sous forme d'agrégats solubles. Les protéines après congélation étant similaires aux protéines n'ayant pas été congelées, il nous a semblé approprié de les conserver à -20°C .

La caractérisation de ces protéines de fusion MBP a donné des résultats très similaires aux protéines de fusion GST avec IP3R1 (50kDa) et RyR3 (43kDa). Une migration de ces protéines sur gel SDS-PAGE est visible en **Figure 53**.

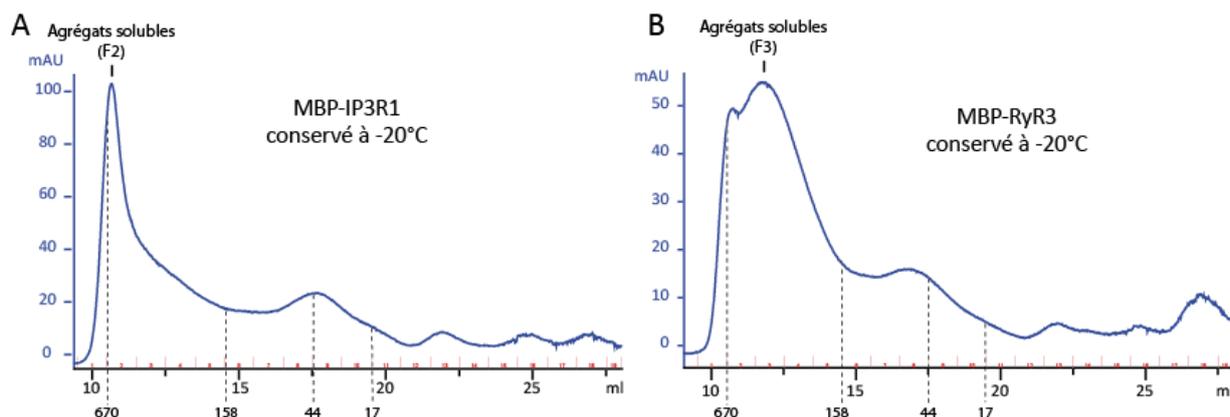


Figure 51 : Test de congélation de MBP-IP3R1 et MBP-RyR3 en GF. Après avoir été purifiées par affinité puis décongelées, MBP-IP3R1 et MBP-RyR3 (en A et B respectivement) sont chargées sur une résine S200 d'une colonne (10/300).

Le domaine de HAP1

Le domaine de HAP1 est mal exprimé lorsqu'il est produit par la bactérie, certainement dû à sa taille importante de 101KDa (**Figure 26**). Ainsi, il n'est pas visible en bleu de coomassie après purification par affinité (donnée non montrée). L'immunodétection du surnageant bactérien par WB révèle de nombreux fragments de protéolyse ou de synthèse incomplète de la protéine. Une faible quantité de protéine HAP1 pleine longueur est néanmoins détectée (**Figure 52**).

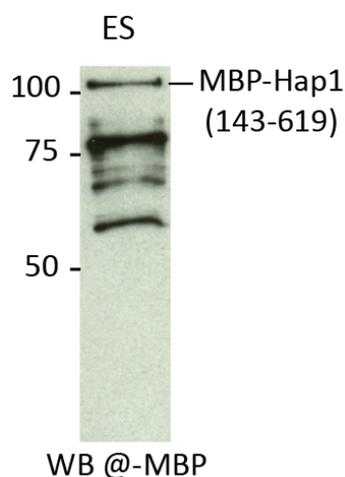


Figure 52 : WB de MBP-HAP1 (143-619). Gel SDS-PAGE de l'Extrait Soluble (ES) de bactérie ayant surexprimé MBP-HAP1(143-619) (poids moléculaire 101KDa), détectée avec un @MBP.

4.3 Identification d'un nouvel interacteur de HAP1

Pour déterminer si HAP1 interagit directement avec RyR3, j'ai réalisé un PD avec la protéine GST-RyR3(C-ter) fixée sur la résine glutathion sépharose, en utilisant la protéine GST-IP3R1(C-ter) comme témoin positif. Le résultat de l'interaction est présenté par WB (**Figure 53**). Dans cette expérience, la protéine MBP-HAP1(143-619) est préférentiellement retenue sur les résines contenant les domaines C-ter de IP3R1 et RyR3 fusionnées à un tag N-ter GST, suggérant que RyR3 est un nouvel interacteur de la HAP1.

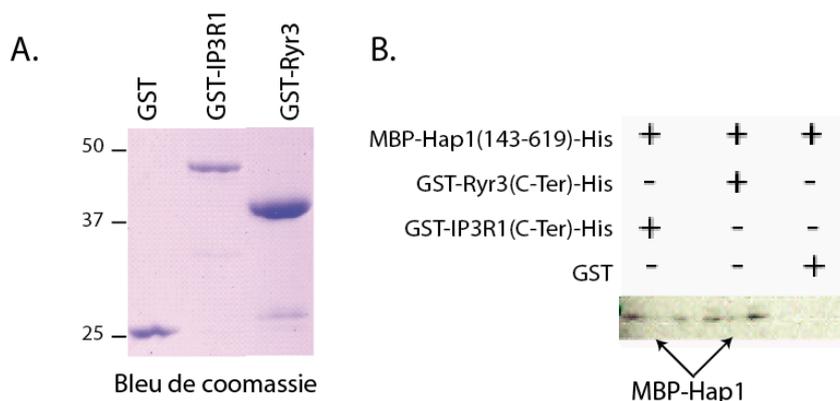


Figure 53 : Identification d'une nouvelle interaction entre RyR3 et HAP1. A/Gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie, résine glutathion sépharose bouillies contenant les protéines purifiées utilisées pour le pull-down GST (27KDa) (ligne 1), GST-IP3R1(C-ter)-His (50KDa) (ligne 2) et GST-RyR3(C-ter)-His (43KDa) (ligne 3). B/ Immuno-détection avec @-MBP après pull-down.

Bien que l'interaction soit spécifique, très peu de protéine HAP1 est retenue sur les résines contenant un canal calcique. Ce problème pourrait être dû à la faible qualité de HAP1 pleine longueur purifiée. En améliorant la qualité de HAP1 produit, il pourrait être envisageable d'observer une interaction plus quantitative entre les deux partenaires, voire de mesurer leur affinité par SPR.

Les résultats d'analyse bioinformatique de notre laboratoire ont permis de suspecter une nouvelle interaction entre HAP1 et RyR3. Cette hypothèse a été confirmée par le PD présenté ci-dessus et par les résultats de nos collaborateurs (résultats non montrés). Toutefois, la qualité des protéines utilisées ne permet pas d'étudier si cette interaction est modifiée en fonction de la taille de la polyQ de la Htt, ou si elle est influencée par la présence d'agrégats de la Htt. De plus avec ces protéines de fusion, ce PD ne peut être réalisé que dans un sens car les domaines des canaux calciques sont aspécifiquement retenus sur les résines.

4.4 Optimisation du pull-down (en cours)

L'interaction observée par le PD précédent est faible, certainement en raison de la faible qualité du domaine de HAP1 (143-619). Nous avons supposé que la faible proportion de protéine pleine longueur comparé aux fragments intermédiaires soit due, soit à une synthèse incomplète, soit à une protéolyse importante de la protéine (ou éventuellement les 2) et ceci, malgré les précautions standards de travail à 4°C avec des inhibiteurs de protéases. Le système d'expression bactérien n'est visiblement pas optimal pour exprimer ce domaine de HAP1. Pour résoudre ce problème majeur, j'ai décidé de tester l'expression d'un domaine plus grand de HAP1 (62-619) dans des cellules d'insecte système d'expression qui présentent l'avantage de permettre un meilleur repliement des domaines.

Analyses en conditions dénaturantes

L'utilisation de ce système d'expression a nettement amélioré la qualité de la protéine recombinante exprimée. En effet après purification par affinité, GST-HAP1 (62-619) de 109KDa est facilement détectable en bleu de coomassie (**Figure 54 A à gauche**). De plus, en comparant en WB la protéine exprimée chez la bactérie MBP-HAP1(143-619) (**Figure 50**) à la protéine GST-HAP1(62-619) exprimée en cellule d'insecte (**Figure 54 A à droite**), on constate que le domaine produit dans les cellules d'insecte contient très peu de fragments intermédiaires. Ceci confirme la meilleure qualité du domaine produit dans les cellules d'insecte.

Analyses en conditions natives (par GF)

Malgré la qualité prometteuse des domaines de HAP1 (en conditions dénaturantes), la GF du domaine de GST-HAP1(62-619) de 109KDa indique qu'il est entièrement à l'état d'agrégat soluble car il est exclu dans les premières fractions de la colonne (**Figure 54 B**). Cependant, ce domaine est de meilleure qualité que lorsqu'il était produit chez la bactérie.

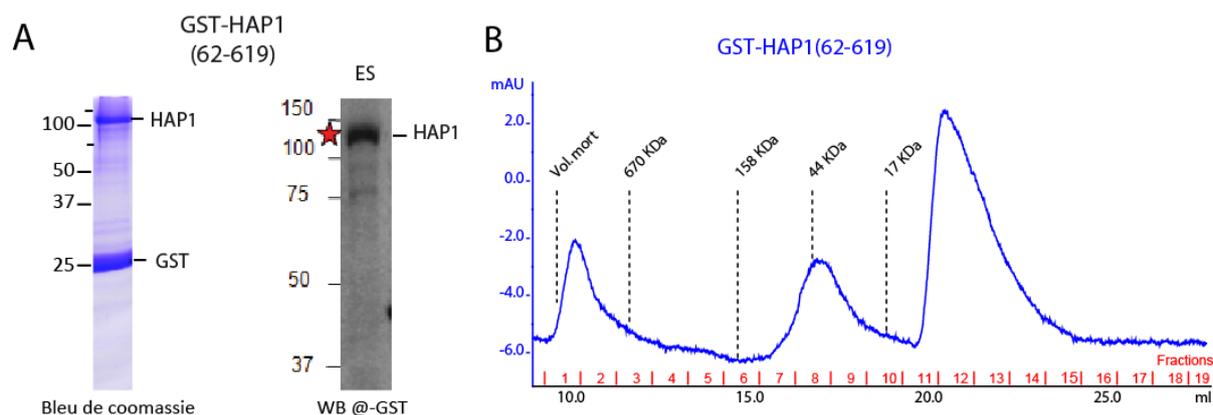


Figure 54 : Caractérisation de GST-HAP1(62-619) exprimée dans les cellules d'insecte. A/ Gel SDS-PAGE de la protéine HAP1 (109KDa): purifiée par affinité et colorée au bleu de coomassie (à gauche) et Extrait soluble (ES) immunodéetecté avec l'@-GST ; B/ Après avoir été purifiée par affinité, HAP1 est chargée sur une résine S200 d'une colonne (10/300).

Cette protéine GST-HAP1(62-619) semble adaptée pour permettre d'améliorer le PD entre HAP1, RyR et IP3R1. En effet, le changement de système d'expression a beaucoup amélioré la qualité de GST-HAP1(62-619) purifiée. Ceci pourrait nous permettre d'améliorer la qualité d'autres domaines, auparavant mal produits chez la bactérie. Le dernier résultat présenté en est un bon exemple.

4.5 Utilisation d'autres systèmes d'expression que la bactérie

Au début de l'étude, nous avons pris la précaution de choisir un système de clonage flexible : le système « Gateway ». Ce système offre l'avantage de faciliter le clonage des séquences d'intérêt dans un ensemble de vecteurs d'expression assurant la synthèse de protéines recombinantes couplées à différents domaines de fusion, qui facilitent leur solubilité et leur purification.

J'ai testé l'efficacité de ce changement de vecteur d'expression pour le domaine de HAP1 (307-425) qui était mal produit chez la bactérie (**Figure 28**). La **Figure 55** illustre la caractérisation de ce même domaine de HAP1 produit dans les cellules d'insecte. Il se produit très bien et après purification par affinité, une grande quantité de protéines pleine longueur est constatée et aucun fragment de dégradation n'est visible (**Figure 55 à gauche**). Les analyses par GF et des fractions correspondantes sur gel dénaturant, indiquent que contrairement au même domaine produit en bactérie, ce domaine de HAP1 ne contient que

très peu d'agrégats solubles, et principalement des protéines solubles sous forme de trimères (F9) (**Figure 55 au centre et à droite**).

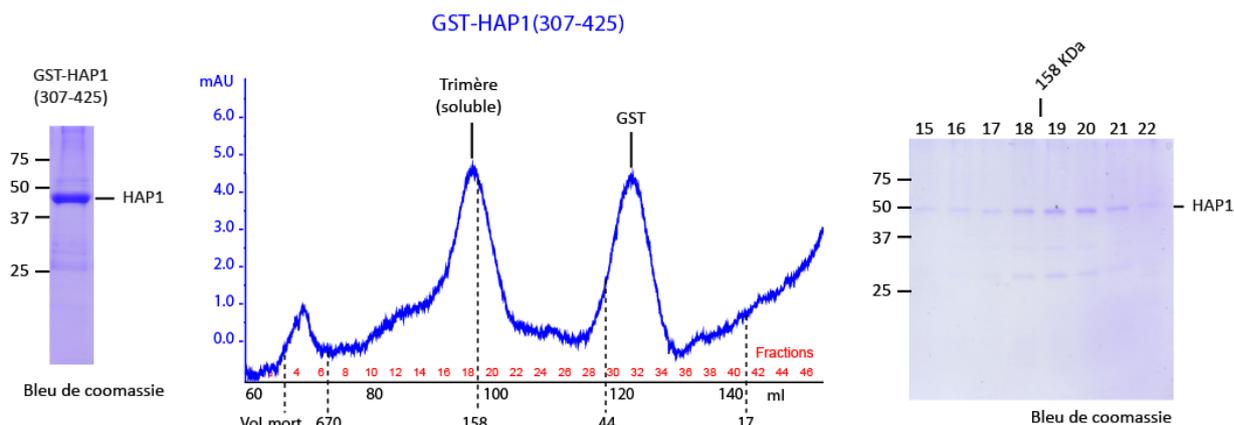


Figure 55 : Caractérisation de GST-HAP1(307-425) exprimée dans les cellules d'insecte. À gauche : gel SDS-PAGE de la protéine HAP1 (45KDa) purifiée par affinité et colorée au bleu de coomassie ; au centre : Après avoir été purifiée par affinité, HAP1 est chargée sur une résine S200 d'une colonne (16/900) ; à droite : analyse des fractions de la GF sur SDS-PAGE coloré au Bleu de coomassie.

Au cours de ma thèse, j'ai constitué une véritable bibliothèque de vecteurs d'expression bactériens, mais également de vecteurs navettes (*via* le système GW). Ainsi, ces derniers vont permettre d'exprimer tous les domaines clonés dans de nouveaux systèmes d'expression comme les cellules d'insecte. Par manque de temps, je n'ai pas pu exploiter la totalité des possibilités de ce système, mais cela pourrait se révéler très utile pour aller plus loin dans les études d'interactions, voire structurales de la Htt et de ses partenaires.

Une caractéristique commune à toutes les maladies à polyQ est le processus d'agrégation des fragments de protéines mutées (Perutz, 1995; Trottier et al., 1995b). Dans la MH, le processus d'agrégation de fragments de la Htt est en grande partie responsable de la toxicité cellulaire observée (Kayed et al., 2003; Scherzinger et al., 1999; Yang et al., 2002). Après clivage de la Htt mutée, des fragments contenant des polyQs étendues (>35Q) s'agrègent (Hands and Wyttenbach, 2010). Les travaux de notre laboratoire ne soutiennent pas le modèle proposant qu'un changement conformationnel des polyQs étendues les rende toxiques et soit responsable de l'agrégation des fragments de la Htt mutée. Nous avons proposé un autre modèle dans lequel la toxicité des polyQs augmente proportionnellement à leur taille et ce, de façon différentielle en fonction du contexte protéique pour chaque maladie à polyQ. La toxicité apparaîtrait lorsque la machinerie cellulaire, qui a pour fonction d'inhiber la toxicité induite par les polyQs, est dépassée (Klein et al., 2007).

De plus, en présence de Htt mutée, des agrégats cytoplasmiques et nucléaires sont observés *in vivo*, dans le cerveau des patients (Ross and Poirier, 2004). Les zones contenant des corps d'inclusion ne correspondent pas aux premières zones cérébrales de dégénérescence chez les patients. Ainsi, les techniques disponibles pour identifier les agrégats *in vivo* ont laissé un doute sur la toxicité réelle des agrégats (Saudou et al., 1998). C'est grâce à l'étude *in vitro* des processus d'agrégation que l'identification d'espèces intermédiaires générées durant ce processus a été possible (Caughey and Lansbury, 2003). Ainsi, il a été proposé que les corps d'inclusion soient un mécanisme protecteur, qui recrutent des intermédiaires d'agrégation solubles suspectés d'être les formes les plus toxiques pour la cellule (Arrasate et al., 2004) ; les oligomères sont des formes solubles d'agrégats de la Htt qui pourraient être la source majeure de la toxicité cellulaire (Hands and Wyttenbach, 2010; Kayed et al., 2004). Aujourd'hui, il devient possible d'observer ces intermédiaires d'agrégation *in vivo* (Mukai et al., 2005; Sathasivam et al., 2010; Takahashi et al., 2007; Weiss et al., 2008). Cependant, beaucoup de travail reste à faire pour déterminer comment ils induisent la toxicité cellulaire (Hands and Wyttenbach, 2010).

Ce mécanisme d'agrégation est retrouvé dans toutes les maladies à polyQ (Bates, 2005; Paulson et al., 1997). Cependant, les zones de dégénérescence sont différentes dans ces pathologies. Cette observation donne une première indication sur l'importance capitale du

contexte protéique des polyQs dans la pathogénèse de ces maladies. Dans un premier temps, il a été démontré que les séquences entourant la polyQ, les modifications post-traductionnelles ainsi que la localisation cellulaire de la Htt, influencent le processus d'agrégation (Hands and Wyttenbach, 2010). D'autre part, un grand nombre de fonctions cellulaires régulées par la Htt sont dérégulées dans la MH. Il a été proposé que ces dysfonctions soient dues à des interactions aberrantes de la Htt mutée avec ses partenaires (Harjes and Wanker, 2003). Toutefois, les techniques utilisées pour identifier ces « dysinteractions » sont des techniques peu quantitatives (Li and Li, 2004) qui peuvent être influencées par le processus d'agrégation de la Htt mutée. Mon travail a été d'étudier avec des techniques plus précises ces « dysinteractions » de la Htt mutée, dans des conditions où la présence d'agrégats était strictement contrôlée.

D'autre part, je me suis intéressé aux processus altérés dans le contexte de la Htt mutée, et plus particulièrement la dérégulation de l'homéostasie du calcium. J'ai ainsi caractérisé une nouvelle interaction *in vitro* de la Htt/HAP1 avec RyR. Cette nouvelle interaction est très intéressante car une dysinteraction de ces partenaires en présence de la Htt mutée est susceptible d'avoir un impact sur la dérégulation du calcium observée dans la MH, et d'expliquer la dégénérescence spécifique du striatum selon un mécanisme similaire à la dysinteraction constatée entre IP3R1 et la Htt (Tang et al., 2003).

J'ai suivi une méthodologie commune pour ces deux projets, centrée sur la biologie moléculaire, la biochimie et la biophysique, nécessitant la construction d'un grand nombre d'outils biologiques.

1. Construction d'outils biologiques

1.1 Le clonage

La première étape de notre étude a été de définir une stratégie de clonage nous permettant de générer une grande quantité de clones en un minimum de temps. Le clonage de type Gateway (GW) s'est révélé très efficace pour notre étude. En effet, un même domaine protéique peut être fusionné à différents tags et, le cas échéant, peut être changé de vecteur d'expression pour avoir un rendement maximal de protéine soluble dans chaque cas (**Figure 24**). Toutes ces constructions constituent un important patrimoine d'ADNc clonés dans un système de clonage flexible pour notre groupe et pour d'autres collaborateurs qui

seraient intéressés pour mener de plus amples études, comme par exemple des études structurales sur la Htt et ses partenaires (**Tableau 3**). En effet, les vecteurs GW disponibles permettent d'exprimer plusieurs protéines simultanément dans la bactérie, mais aussi dans les cellules d'insecte et/ou de mammifères.

1.2 La caractérisation des protéines recombinantes

Caractérisations des protéines (chez la bactérie) en conditions dénaturantes

La première caractérisation des domaines clonés s'est effectuée par de simples appréciations de la quantité de protéine recombinante surexprimée. Cette première caractérisation s'est révélée positive pour tous les domaines protéiques ayant un poids moléculaire inférieur à 100KDa, avec des rendements allant de « médiocre » à « excellent » (**Figure 26**).

À la suite de cette première appréciation sur la proportion de protéines produites, j'ai purifié ces domaines par affinité et identifié leur nature par diverses techniques incluant coloration au bleu de coomassie, WB et MALDI-TOF. Les protéines se sont révélées bien purifiées et entières dans la majorité des cas (exemples **Figures 39, 49 et 53**). Cependant dans certains cas, ces protéines se sont aussi révélées fortement dégradées, générant un nombre limité de protéines pleine longueur pour réaliser nos études, comme par exemple HAP1 et GST-Htt(12-80)-Qn (**Figures 31 et 52**). Ces productions incomplètes et/ou la dégradation rapide des protéines pleine longueur ont été handicapantes pour deux études : l'interaction par SPR de GST-Htt(12-80)-Qn avec SH3 et SH3GL3, ainsi que le pull-down réalisé entre IP3R1, RyR et HAP1.

Caractérisations des protéines (chez la bactérie) en conditions natives (GF)

La caractérisation plus avancée par GF de ces domaines a démontré que même des domaines très bien exprimés pouvaient être entièrement à l'état d'agrégats solubles (exemples **Figures 28, 29, 32, 33 et 49**). Cette observation démontre la difficulté du projet abordé, dans lequel il m'était indispensable d'exclure toute forme agrégée pour entreprendre les mesures d'interaction. D'autre part, ces résultats montrent que la bactérie n'est pas adaptée à l'expression de certains domaines de la Htt ou de certaines protéines d'intérêt interagissant avec la Htt.

Le système d'expression en cellules d'insecte

Je me suis servi des avantages du système de clonage GW pour cloner certains domaines dans un système baculovirus, et ainsi exprimer des domaines dans les cellules d'insectes. L'analyse du domaine de HAP1 (62-619) produit dans les cellules d'insecte a complètement changé la proportion de protéines pleine longueur produites par rapport aux fragments de dégradations observés pour un domaine plus petit de HAP1 (143-619) mais produit chez la bactérie (**Figure 52 et 54 A**).

L'analyse par GF de ces nouveaux domaines produits dans les cellules d'insecte démontre une nette amélioration de la qualité des protéines, et notamment de HAP1 (307-425) (**Figure 55**). En effet, la majorité des agrégats solubles visualisés en GF se sont retrouvés sous forme de trimères solubles. Néanmoins lors de l'expression de grands domaines de HAP1 (62-619) ou de la Htt (75-241), ce système ne permettait pas d'empêcher la formation d'agrégats solubles (**Figure 54 B et donnée non montrée**). L'expression de divers domaines en cellule d'insecte permet cependant d'améliorer considérablement à la fois la quantité et la qualité des protéines testées.

Perspectives pour améliorer la qualité de production des domaines d'étude

Une des perspectives envisagées pour les projets futurs est de tester l'expression de ces domaines dans des cellules de mammifère. En effet, étant donné la différence observée entre l'expression de domaines chez la bactérie et chez les cellules d'insecte, il est fort probable que ces mêmes domaines soient encore mieux produits dans des cellules de mammifères. Nos domaines maintenant clonés dans des vecteurs « navettes » (pEntr) peuvent être recombinaisonnés, en une étape, dans des vecteurs d'expression mammifère pour être ensuite exprimés dans des cellules mammaliennes. Des protéines de meilleure qualité et dénuées d'agrégats solubles, permettraient de continuer l'étude entreprise sur l'influence de la polyQ sur les interactions de la Htt avec ses partenaires. En effet, il serait alors possible de mesurer l'affinité (par SPR) de la Htt normale et mutée avec d'autres partenaires que ceux de l'étude présente.

2. Étude de la polyQ dépendance des interactions

Les tests d'interaction *in vitro* pour déterminer si la taille de la polyQ influence les interactions de la Htt mutée avec ses partenaires ont été systématiquement effectués avec

les mêmes techniques semi-quantitatives (Y2H, IPs et/ou PD) (Li et al., 1995; Sittler et al., 1998; Wanker et al., 1997). Dans la plupart des cas, il est rapporté que ces interactions sont influencées par la taille de la polyQ (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004).

Cependant, la Htt mutée ou ses fragments N-ter, surexprimées dans ces systèmes d'expression, sont connus pour subir une protéolyse, s'accumuler et s'agréger. Ainsi, des agrégats de fragments de la Htt pourraient avoir été présents dans la majorité des cas et auraient pu avoir un impact sur l'interaction de la Htt avec ses partenaires. Il est possible que le processus précoce d'agrégation des fragments de la Htt observé *in vivo* (Landles et al., 2010; Weiss et al., 2008) puisse influencer les interactions de la Htt, plutôt qu'un hypothétique changement de conformation de la Htt dépendant de la polyQ mutée (Li et al., 1995; Sittler et al., 1998).

Un moyen de clarifier le mécanisme impliqué dans ces dysinteractions est de déterminer si dans un système où le processus d'agrégation est contrôlé, une dysinteraction de la Htt mutée pour des partenaires (rapportés comme interagissant de façon aberrante avec la Htt mutée) est toujours constatée.

J'ai donc réalisé un important travail de caractérisation des protéines utilisées, pour exclure toute forme d'agrégat de Htt mutée. Après avoir contrôlé l'agrégation, j'ai pour la première fois mesuré avec une technique quantitative (la SPR) les interactions de fragments N-ter de Htt normale et mutée, avec des partenaires pour lesquels une interaction aberrante de la Htt mutée a été constatée.

Pour mener à bien cette étude, nous avons sélectionné 3 partenaires de la Htt : HAP1, HIP1 et SH3GL3. Notre choix s'est basé sur le fait que :

(1) leur interaction avec la Htt était bien caractérisée dans la littérature (Gao et al., 2006; Gervais et al., 2002; Hackam et al., 2000; Kalchman et al., 1997; Li et al., 1995; Sittler et al., 1998; Wu and Zhou, 2009).

(2) ils sont impliqués dans des fonctions cellulaires cruciales, dérégulées dans la MH (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004).

(3) ils interagissent avec différents domaines de la Htt, le premier HEAT (H1) et le PRD respectivement (Bertaux et al., 1998; Kalchman et al., 1997; Sittler et al., 1998).

(4) ils ont des propriétés d'interaction différentes en présence de la Htt mutée, qui sont soit augmentées (pour HAP1 et SH3GL3), soit diminuées (HIP1) (Li and Li, 2004).

Ces interacteurs répondaient à tous nos critères de sélection, néanmoins, nous ne savions pas dans quelle mesure il allait être possible de les produire sous forme de monomères solubles, afin de contrôler le processus d'agrégation. Ainsi, j'ai dû cloner, exprimer et caractériser ces domaines pour contrôler ce paramètre.

2.1 Les difficultés rencontrées pour caractériser les interactions entre la Htt et HAP1 ou HIP1

HAP1

Notre intérêt s'est tout d'abord dirigé vers HAP1, qui est un interacteur de la Htt impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires dérégulées dans la MH (Wu and Zhou, 2009). Le but de notre étude était de caractériser les dysinteractions entre HAP1 et la Htt, lorsque l'agrégation des domaines de ces protéines est complètement contrôlée.

Malgré le fait que HAP1 soit un des interacteurs de la Htt les plus étudiés, j'ai rencontré des difficultés majeures, dans E.Coli, à produire des domaines monomériques et solubles de cette protéine, quelque soit le tag utilisé. Les tests d'expression dans des cellules d'insecte montrent que certains domaines de HAP1 peuvent être mieux exprimés dans ce système, sans toutefois empêcher la formation d'agrégats solubles (exemple **Figure 54 B**). Ainsi, il est possible que des agrégats de HAP1, exprimés dans la levure, aient été présents lors d'études d'interaction avec la Htt rapportant une interaction accrue avec la Htt mutée (Li et al., 1995). Cette hypothèse est appuyée par l'observation d'une interaction de HAP1 avec lui-même lors des tests d'interaction effectués chez la levure (**Yeast Two Hybrid**), montrant sa capacité à former des multimères (Engelender et al., 1997).

Les domaines HEAT de la Htt

Je n'ai pas pu produire des domaines monomériques et solubles de la Htt comprenant des parties du premier domaine HEAT (H1) (exemples **Figure 29 et Manuscrit Figure S1 C**). Cette observation démontre encore une fois comme il est délicat de travailler avec des protéines susceptibles de s'agréger.

HIP1

La qualité des protéines de la Htt ne remplissant pas nos pré-requis, nous n'avons pas caractérisé les domaines de HIP1 qui interagissent également avec le HEAT (H1) de la Htt. En effet, les études d'interaction de HIP1 comme HAP1 avec la Htt n'auraient pas pu être réalisées dans des conditions où l'agrégation est contrôlée, paramètre crucial dans la définition de nos objectifs pour nos expériences SPR.

Au terme de cette caractérisation, ces domaines n'ont donc pas pu être utilisés pour des études plus fines d'interaction. Il est probable que la production de ces domaines dans des cellules de mammifère permette d'obtenir des protéines surexprimées de meilleure qualité (Li et al., 2006; Seong et al., 2010). Cependant, d'autres domaines de la Htt et d'autres interacteurs, produits dans E. Coli, se sont avérés être de qualité suffisante aux études SPR que nous souhaitons réaliser, et nous ont permis de vérifier dans quelle mesure la présence d'une polyQ étendue modifie l'affinité d'un partenaire pour la Htt.

2.2 Les interactions de la Htt avec ses partenaires ne sont pas influencées par la taille de la polyQ : la perturbation de l'interactome et de la fonction de la Htt est elle liée à la présence d'agrégats d'exon 1 de la Htt mutée ?

Après les difficultés rencontrées avec HAP1 et le domaine d'interaction de la Htt avec ce partenaire, j'ai concentré mes efforts sur un autre partenaire de la Htt : SH3GL3 (Sittler et al., 1998). Le domaine d'interaction de ce partenaire de la Htt présente l'avantage majeur d'avoir été utilisé dans des études biophysiques auparavant (Gao et al., 2006). Ainsi, nous savions que ce domaine pourrait être produit chez la bactérie avec une qualité suffisante pour mener à bien notre étude.

Caractérisation de SH3

La caractérisation du domaine SH3 a révélé qu'il était produit à l'état de monomère et d'agrégats solubles, lorsqu'il était fusionné à un tag MBP ou polyhistidine (**Figure du manuscrit S3 B**). La séparation des agrégats solubles a été réalisable par GF, et une population stable de monomères de MBP-SH3-His a été utilisée pour la suite de nos

expériences. De plus, après clivage du tag GST de GST-SH3-His, nous avons purifié SH3-His qui s'est révélée monomérique et soluble en GF (**Figure du manuscrit 1 E**).

Caractérisation de l'exon1 de la Htt

Le domaine d'interaction de la Htt avec ce partenaire, correspondant à l'exon-1 de la Htt fusionné à un tag en N-ter de ce domaine, a également été utilisé dans des études biophysiques auparavant (Bennett et al., 2002; Georgalis et al., 1998). Néanmoins dans nos mains, il a été difficile dans un premier temps d'obtenir ce domaine de la Htt complet (**Figure 31**) et à l'état de monomère soluble (**Figure 32**). L'incorporation d'un signal de localisation périplasmique en N-ter de ce domaine (fusionné à un tag TRX ou MBP), nous a permis, après choc osmotique, d'obtenir des quantités suffisantes de monomères solubles et stables à la congélation (**Figure 39-41**). Les raisons pour lesquelles sans choc osmotique, les domaines produits se sont majoritairement révélés mal produits et à l'état d'agrégats solubles, restent mal comprises même si nous suspectons l'étape de sonication d'en être à l'origine.

2.2.1 L'interaction de deux partenaires interagissant avec le PRD de l'exon1 de la Htt n'est pas influencée par la polyQ

Une fois ces domaines purifiés et caractérisés, j'ai pu entreprendre les tests d'interaction en utilisant une méthode biophysique : la résonance plasmonique de surface (**Surface Plasmon Resonance : SPR**).

L'interaction du domaine SH3 avec l'exon1 de la Htt n'est pas influencée par la taille de la polyQ lorsque l'agrégation de la Htt est absente.

De façon importante, les premiers tests d'interaction entre MBP-SH3-His et TRX-Htt-Qn ont révélé une interaction d'une affinité similaire, quelle que soit la taille de la polyQ (16Q ou 46Q). Il s'agit d'une interaction de faible affinité caractéristique des interactions entre les domaines SH3 et les domaines riches en proline (Gao et al., 2006) (**Figure Manuscrit 2 A et S4 A**).

Cette expérience a été reproduite plusieurs fois avec d'autres protéines de fusion de l'exon 1 de la Htt (MBP-Htt-Qn ou TRX-Htt-Qn) et du domaine SH3 (SH3-His, MBP-SH3-His ou GST-SH3-His). En effet en l'absence d'agrégation, l'interaction Htt/SH3 a démontré une fois encore que la polyQ de la Htt n'influence pas cette interaction (**Figure Manuscrit 2 A, S4 A et B**). Toutefois, une influence du tag N-ter de ces protéines a été constatée, et nous suspectons que le tag N-ter du domaine SH3 ait une influence sur l'affinité de son interaction avec la Htt. En effet, l'affinité du domaine SH3 pour la Htt est plus faible pour la Htt (16Q ou 46Q) lorsqu'il est fusionné à un tag MBP en N-ter (**Figure Manuscrit S4 A**). Mais, lorsqu'il est fusionné à un tag GST, le domaine produit dimérise, comme l'indique le profil de GF de cette protéine (donnée non montrée). Ceci résulte en une interaction plus forte de ce domaine avec la Htt (16Q ou 46Q), due au phénomène d'avidité (**Figure Manuscrit S4 B**). Un phénomène d'avidité similaire a été observé en utilisant le 2B4 entier ou le 2B4-Fab (**Figure 35 et 37**). De façon importante et dans tout les cas, il n'y a pas d'influence de la polyQ sur cette interaction en l'absence d'agrégation.

L'anticorps 2B4 un partenaire modèle interagissant avec le PRD de la Htt

D'autre part, notre laboratoire en collaboration avec celui d'Anne Bertolotti à Cambridge, a produit et caractérisé un anticorps qui interagit avec le même domaine de la Htt que le domaine SH3 : il s'agit du 2B4 (Dehay et al., 2007). Nous avons utilisé la SPR pour caractériser l'affinité de cet anticorps pour la Htt-exon1.

L'interaction du 2B4 et 2B4-Fab n'est pas influencé par la taille de la polyQ lorsque l'agrégation de la Htt est absente.

Nous avons étudié les interactions par SPR du 2B4 et 2B4-Fab avec le domaine N-ter de la Htt fusionné à différent tag (GST ou TRX) et contenant 2 tailles de polyQ (24 et 42 ou 16 et 46) (**Figure 35, 37 et 2 A du manuscrit**). L'analyse de la cinétique obtenue par SPR nous a permis de quantifier l'interaction du 2B4-Fab pour le domaine N-ter de la Htt qui est d'environ 70nM (**Figure 37 et tableau du manuscrit**). De façon importante, l'affinité du 2B4-Fab est identique, quelle que soit la taille de la polyQ.

2.2.2 L'interaction entre SH3GL3 et l'exon1 de la Htt n'est pas influencée par la polyQ

Lors de la caractérisation de SH3GL3 (protéine pleine longueur), j'ai noté la présence de formes solubles non monomériques de la protéine (**Figure Manuscrit S3 C**). Cependant, le domaine de la Htt étant monomérique, j'ai malgré tout réalisé un test d'interaction par SPR entre l'exon 1 de la Htt (TRX-Htt-Qn) et la protéine SH3GL3 (MBP-SH3GL3-His). De façon similaire au résultat obtenu avec MBP-SH3-His, la réponse obtenue en R.U. est très faible et ne permet pas d'effectuer une analyse cinétique afin de mesurer l'affinité entre ces domaines. Néanmoins, les profils des réponses obtenus par SPR sont très équivalents, quelle que soit la taille de la polyQ de l'exon1 de la Htt (**Figure Manuscrit S4 C**).

Dans un deuxième temps, j'ai réalisé un test d'interaction entre SH3GL3 (MBP-SH3GL3-His) et la Htt-exon1 (TRX-Htt-Qn) par pull-down, technique qui a été utilisée auparavant pour démontrer que la Htt interagit plus fortement avec SH3GL3 (Sittler et al., 1998). Il est important de noter que cette expérience a été réalisée dans des conditions similaires à celles décrites dans la publication de (Sittler et al., 1998) : nous avons utilisé la même technique de PD, des protéines produites en bactérie et les mêmes domaines de SH3GL3 et de la Htt (fusionnés à différents tags). La seule différence importante est que nous avons travaillé dans des conditions où les agrégats de Htt(exon1) ont été strictement exclus. Dans ces conditions, je n'ai pas noté de différence significative d'interaction entre ce domaine de la Htt et SH3GL3 par pull-down (**Figure Manuscrit 2 C**). Cette expérience nécessite d'être reproduite pour être quantifiée.

L'ensemble de nos résultats, obtenus dans des conditions où l'absence d'agrégation est contrôlée, montrent que la taille de la polyQ n'influence pas directement l'interaction entre Htt et ses partenaires. Ceci suggère qu'un changement conformationnel spontané de la polyQ n'est pas à l'origine des dysinteractions rapportées. Un autre mécanisme moléculaire qui expliquerait les différences polyQ dépendantes observées par Y2H, PD ou IP doit donc être envisagé.

Un paramètre qui pourrait influencer les dysinteractions de la Htt mutée pourrait être la présence d'agrégats de fragments N-ter de la Htt. Pour étudier l'influence d'agrégats de ces fragments N-ter, j'ai mis au point une technique biochimique de recrutement de partenaires de la Htt dans les agrégats.

2.2.3 Un partenaire de la Htt est spécifiquement recruté dans des agrégats d'exon1 de la Htt

Le 2B4, en plus de ne pas être influencé par la taille de la polyQ (en l'absence d'agrégation), présente l'avantage d'avoir une affinité forte pour la Htt, contrairement au domaine SH3. Nous en avons tiré parti pour déterminer si ce partenaire est perturbé par la présence d'agrégats d'exon-1 de la Htt.

Recrutement du 2B4 dans des agrégats d'exon 1 de la Htt

Après avoir conçu (**Figure Manuscrit 3 A**) et mis au point (**Figure 44 et 45**) une expérience de recrutement *in vitro* où seul des fragments N-ter de la Htt s'agrègent, j'ai constaté que l'anticorps 2B4 ainsi que le 2B4-Fab étaient recrutés dans cet agrégat (**Figure Manuscrit 3 B et C**). De façon très intéressante, l'ajout d'un peptide contenant le domaine d'interaction de la Htt pour le 2B4 inhibe très fortement le recrutement du 2B4-Fab dans l'agrégat de Htt (**Figure Manuscrit 3 B**). Cette expérience de compétition réalisée avec le peptide démontre que le recrutement du 2B4 est dû à son interaction spécifique avec le domaine PRD de la Htt. De plus, ce recrutement ne semble pas impliquer une séquestration aspécifique par les polyQs mutants, puisqu'un simple traitement des agrégats par chauffage et SDS permet de dissocier le 2B4 des agrégats de Nter-Htt, qui restent quant à eux insolubles après un tel traitement (**Figure Manuscrit 3 C**).

Il est possible que dans cette expérience, l'agrégation de fragments N-ter de la Htt entraîne la concentration d'un grand nombre de site d'interactions PRD dans une petite zone constituant ainsi une « plateforme d'interaction ». L'interaction de cette plateforme avec des partenaires de la Htt (interagissant avec le domaine PRD) serait forte mais spécifique, et les recruterait dans la phase insoluble. Cette expérience *in vitro* reproduit ce

qui avait été observé *in vivo*. En effet, il a auparavant été observé que des protéines sont séquestrées dans les corps d'inclusion. Les études précédentes indiquent que les interacteurs de la Htt sont préférentiellement séquestrés dans ces corps d'inclusion, comparé à d'autres protéines (Busch et al., 2003; Kim et al., 2002; McCampbell et al., 2000; Qin et al., 2004; Schaffar et al., 2004; Sittler et al., 1998).

Quelle est la population d'agrégats de Htt-N-ter responsable de ce recrutement ?

Nous savons que le processus d'agrégation est complexe, débute précocement et génère des intermédiaires d'agrégation (Hands and Wyttenbach, 2010). Cependant plusieurs questions restent ouvertes :

- (1) nous ne savons pas à quel moment du processus d'agrégation se fait ce recrutement.
- (2) Nous ne connaissons pas l'entité des agrégats qui initient ce recrutement

Il est possible que les espèces intermédiaires de l'agrégation, telles que les oligomères, puissent activement participer à ce recrutement. En effet, ils représentent de bons candidats:

- (1) Ils sont solubles (Hands and Wyttenbach, 2010) et pourraient donc être mobiles au sein de la cellule et interagir facilement avec diverses protéines.
- (2) Les oligomères sont suspectés comme étant les formes les plus toxiques pour la cellule (Hands and Wyttenbach, 2010; Kaye et al., 2003). Ainsi, il est possible qu'une partie de leur toxicité soit due au fait qu'ils altèrent la fonction de la Htt.
- (3) Ils sont présents des années avant la déclaration des premiers symptômes de la maladie (Landles et al., 2010). Ils pourraient donc participer aux dérégulations cellulaires précoces.

Il a été démontré que des partenaires interagissant avec le PRD de la Htt étaient séquestrés dans ces agrégats, contribuant ainsi à la dysfonction neuronale (Busch et al., 2003; Sittler et al., 1998), et que cette séquestration impliquait des interactions spécifiques entre Htt et partenaires (Qin et al., 2004). Des expériences supplémentaires sont cependant nécessaires pour observer le rôle des oligomères dans le recrutement de partenaires de la Htt et d'éventuelles dysfonctions associées.

2.2.4 Un nouveau modèle expliquant les dysinteractions de la Htt mutée

La qualité des protéines exprimées de façon recombinante est très variable, et des méthodes analytiques ou séparatives sont nécessaires pour isoler les fractions les mieux repliées et fonctionnelles. En effet, même si une protéine est obtenue en grandes quantités après purification par affinité, elle peut être à l'état d'agrégat soluble ou de multimères, et donc exercer une interaction différente des formes monomériques. Dans la majorité des études rapportant des interactions aberrantes avec la Htt mutée, le contrôle de la solubilité des protéines utilisées n'a pas été effectué (Gervais et al., 2002; Hackam et al., 2000; Kalchman et al., 1997; Li et al., 1995; Sittler et al., 1998; Wu and Zhou, 2009). Ceci suggère la présence possible d'agrégats dans ces études. Les expériences que j'ai réalisées en l'absence d'agrégation et avec une technique quantitative indiquent au contraire que la taille de polyQ n'influence pas l'interaction de la Htt avec deux partenaires du PRD. Au vu de nos résultats, une variation de la conformation de la Htt en fonction de la taille de la polyQ ne peut pas expliquer les dysinteraction de la Htt avec les partenaires étudiés.

Les interactions aberrantes de la Htt mutée semblent être responsables des dysfonctions de la Htt dans la MH, il est par conséquent important de comprendre leurs origines. Ainsi, nous proposons que la présence d'agrégats de fragments N-ter-Htt puisse influencer les résultats des tests d'interaction par Y2H, PD ou IP. Leur présence pourrait non seulement expliquer les dysinteractions observées avec ces méthodes, mais aussi perturber *in vivo* les fonctions de la Htt et de ses partenaires (**Figure 56**). En effet, il est envisageable que l'agrégation de polyQ perturbe directement l'interaction de la Htt avec des partenaires interagissant avec son domaine N-ter qui s'agrège, comme constaté avec l'interaction de la Htt pour le 2B4. D'autre part, il est également possible que cette perturbation soit indirecte. En effet, les agrégats sont capables de recruter des fragments de la Htt normale, suggérant que la Htt pleine longueur se retrouve également séquestrée au cours du processus d'agrégation (Busch et al., 2003). Cette séquestration pourrait alors déréguler les interactions de la Htt pleine longueur avec d'autres partenaires qui interagissent avec des domaines non inclus dans les fragments N-ter de la Htt mutée qui initient l'agrégation.

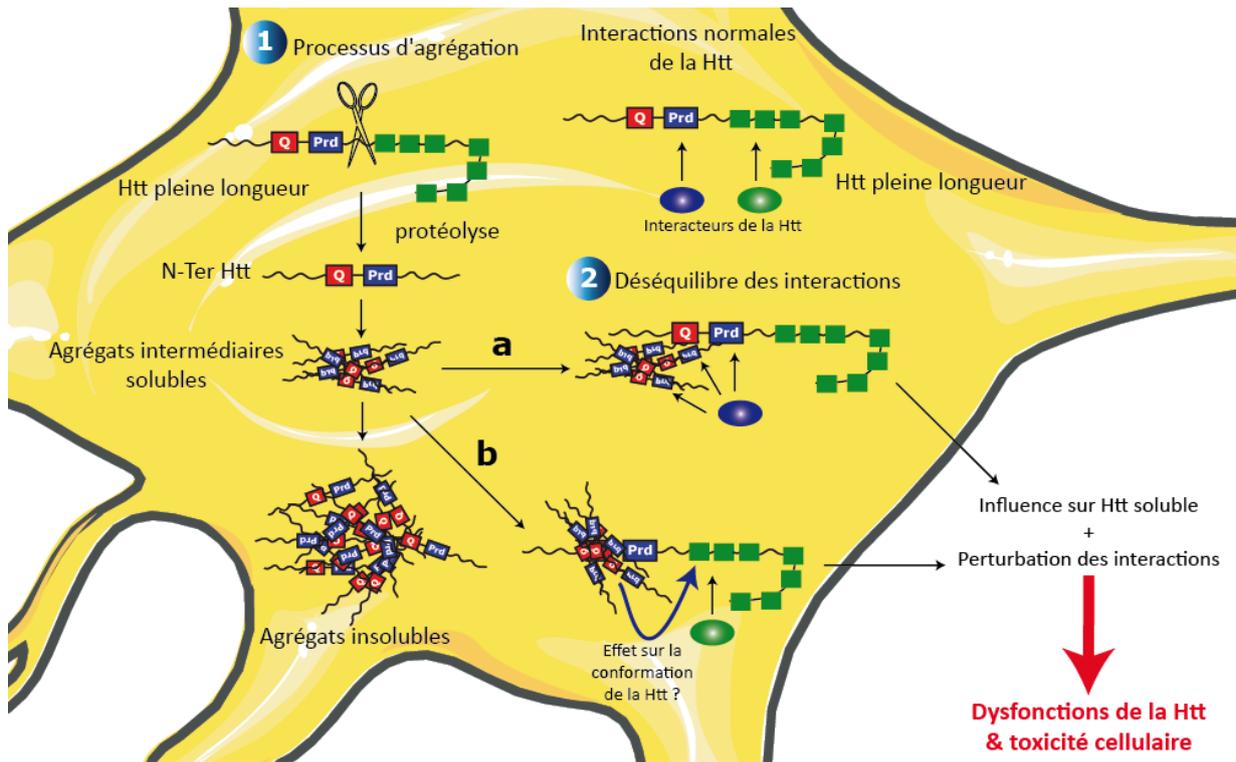


Figure 56 : Modèle permettant d'expliquer les dysinteractions de la Htt dans la MH. (1) Le processus d'agrégation de la Htt mutée se produit après protéolyse de la Htt pleine longueur, générant ainsi des fragments N-ter qui contiennent l'expansion de polyQ. L'agrégation est un processus complexe qui se produit en plusieurs étapes, où sont tout d'abord générées des formes intermédiaires d'agrégats solubles, puis des agrégats « matures » insolubles retrouvés sous forme de corps d'inclusions. La partie N-ter de la Htt, qui s'accumule sous forme de corps d'inclusions, contient notamment la partie polyQ et le PRD. Plusieurs partenaires de la Htt interagissent avec le PRD, et il a été rapporté dans plusieurs cas que ces interactions avec la Htt mutante sont dérégulées. (2) Il est connu que les agrégats de polyQ peuvent séquestrer diverses protéines cellulaires, y compris la Htt et ses partenaires. Les intermédiaires solubles sont suspectés d'être les formes agrégées les plus toxiques. Ces agrégats solubles sont très mal caractérisés, à cause de leur nature transitoire et de leur petite taille, et ils échappent aux techniques d'observation intra-cellulaires classiques. Leur petite taille et leur solubilité pourraient leur permettre de circuler plus aisément et de perturber les interactions Htt-partenaires. Cette perturbation pourrait se faire **(a)** par interaction directe entre l'agrégat et le partenaire, par exemple si le partenaire interagit avec le PRD (interacteur « bleu » sur la figure), **(b)** ou indirectement en perturbant la structure de la Htt pleine longueur, gênant ainsi sa fonction et notamment la régulation de ses interactions avec d'autres partenaires (interacteur « vert » dans cette figure).

Étendre le domaine d'étude pour consolider ce modèle

Des preuves restent à apporter pour consolider ce modèle. En effet, j'ai étudié les interactions de la Htt avec 2 partenaires : SH3GL3 et le 2B4. Étant donné les nombreuses difficultés rencontrées, je n'ai pas pu étendre mon étude à d'autres partenaires de la Htt. Il me paraît néanmoins important de confirmer mes résultats en étudiant d'autres partenaires de la Htt, et dans un premier temps d'autres interacteurs du PRD rapportés pour être

influencés par la taille de la polyQ (Burke et al., 1996; Faber et al., 1998; Liu et al., 1997; Modregger et al., 2002). De plus, il a été montré que certains partenaires ont une interaction moins élevée en présence de Htt mutée, comme HIP1 par exemple (Li and Li, 2004). Il est possible qu'au cours du processus d'agrégation, certains domaines de la Htt soient moins accessibles, ce qui se traduirait par une interaction moins facile de certains partenaires pour la Htt. Il serait intéressant de tester par SPR et en l'absence d'agrégation, l'interaction de ce type d'interacteur avec la Htt normale, mutée ou avec différentes formes agrégées de la Htt pour confirmer cette hypothèse.

Une étude *in vitro*

Enfin, notre travail a été réalisé *in vitro* car il est impossible à l'heure actuelle de réaliser une telle étude *in vivo* tout en excluant l'agrégation de fragments de la Htt. Néanmoins, il serait intéressant de déterminer si les mêmes conclusions peuvent être obtenues *in vivo*. En effet, les caractérisations *in vitro* permettent de contrôler un grand nombre de paramètres et notamment l'état d'agrégation des protéines, ainsi que la qualité de production des domaines exprimés. Il pourrait par exemple être envisagé d'étudier la fonction d'IP3R1 dans des bicouches lipidiques artificielles (Tang et al., 2003), en présence ou en l'absence d'agrégation contrôlée d'Htt mutée et de HAP1.

3. Implication thérapeutique de mon étude

Pourquoi cibler le processus d'agrégation ?

Mon travail tend à montrer que les interactions aberrantes de la Htt pourraient être expliquées par l'influence de l'agrégation des polyQs. Ainsi, les « dysinteractions » s'expliqueraient par un phénomène de « séquestration spécifique » de la Htt et de ses interacteurs par des fragments N-ter de la Htt mutée. Si tel est le cas, une des perspectives très intéressantes de cette étude serait de concentrer les efforts thérapeutiques sur le contrôle de l'agrégation de la Htt. Ceci pourrait permettre de minimiser les effets délétères des différentes entités générées au cours de l'agrégation, et de rétablir certaines fonctions de la Htt mutée.

Un outil intéressant

La caractérisation de nos anticorps 2B4 et 1C2 peut s'avérer être intéressante pour développer de nouveaux agents thérapeutiques. En effet, certains anticorps qui ciblent le domaine N-ter de la Htt ont la propriété d'inhiber l'agrégation, par exemple pour la polyQ : 3B5H10, EM48, 1C2 et 1C2-Fab et pour le PRD : MW7 (Gutekunst et al., 1995; Heiser et al., 2000; Legleiter et al., 2009) et (Klein et al., non publié). J'ai également réalisé des expériences préliminaires *in vitro* qui indiquent que notre 2B4-Fab a également des propriétés d'inhibiteurs d'agrégation (donnée non montrée).

De façon intéressante, des domaines d'anticorps conservant leurs spécificités d'interaction peuvent être clonés et manipulés en tant que gènes. Une fois exprimés dans des cellules de mammifère, ces anticorps intracellulaires, ou intrabodies, ont le potentiel de modifier le repliement, les interactions, ou la localisation de la protéine ciblée. Ces intrabodies ont déjà été utilisés comme agents thérapeutiques dans les cancers ou le HIV (Messer and McLearn, 2006). Dans le cas de la MH, cibler la Htt mutée pourrait permettre de diminuer les espèces intermédiaires générées ou de modifier sa localisation cellulaire, et ainsi avoir des vertus thérapeutiques. Dans ce sens, quelques études ont déjà démontré que l'utilisation d'intrabodies, basés sur la séquence de l'anticorps EM48 qui cible la polyQ de la Htt, diminue le nombre d'agrégats formés et augmente la dégradation de la Htt mutée cytoplasmique (Gutekunst et al., 1999; Wang et al., 2008). D'autre part, il a également été montré qu'un intrabody ciblant le PRD de la Htt, Happ 1, réduit la toxicité induite par la Htt mutée et la formation d'agrégats, améliore les capacités motrices et cognitives, et augmente l'espérance de vie de plusieurs souris modèles de la MH (Southwell et al., 2008).

Plusieurs modulateurs d'agrégation utilisés en synergie

Nous avons vu en Introduction que le processus d'agrégation est complexe, et qu'il est composé de plusieurs étapes qui génèrent des espèces intermédiaires, suspectées d'être les plus toxiques (Hands and Wyttenbach, 2010). D'autre part, un grand nombre de molécules inhibent le processus d'agrégation (Bauer and Nukina, 2009). Une stratégie ambitieuse serait de déterminer quelle est l'étape du processus d'agrégation qui est inhibée pour chaque molécule utilisée, afin d'isoler certaines population mais aussi de mieux comprendre ce processus. De plus, si ces différentes molécules, y compris des fragments Fab de nos anticorps (1C2 et 2B4), ont un impact sur différentes étapes du processus d'agrégation, il

semble envisageable de combiner ces molécules pour moduler le processus d'agrégation à plusieurs niveaux dans le but de limiter la génération d'entités toxiques. Notre laboratoire travaille actuellement sur cette piste (Klein et al., non publié).

4. RyR, un nouveau partenaire de la Htt impliqué dans la régulation du calcium

Un deuxième aspect de ma thèse a été l'identification des processus altérés dans le contexte de la Htt mutée, et notamment la dérégulation de l'homéostasie du calcium. Dans ce contexte, notre laboratoire a mis en évidence une forte homologie de séquence entre les domaines C-ter de RyR et IP3R, par une approche bioinformatique. Ce dernier est un canal calcique interagissant avec HAP1 et affecté par la taille de la polyQ de la Htt. Ainsi, une hypersensibilisation d'IP3R1 permet d'envisager un modèle expliquant comment la dysfonction de la Htt mutée mène à une dégénérescence spécifique du striatum, via un mécanisme de type excitotoxique (Tang et al., 2003).

Un nouvel interacteur de HAP1 reliant la Htt à un autre canal calcique

Mon rôle dans ce projet a été de caractériser les interactions *in vitro* entre le RyR, HAP1 et la Htt. Après avoir confirmé que nos domaines de la Htt interagissent avec HAP1 par PD (**Manuscrit Figure S1 D et E**), j'ai démontré que RyR interagit avec HAP1 par PD (**Figure 53**). L'identification de cette nouvelle interaction suggère que RyR suit le même schéma d'interaction qu'IP3R1 avec la Htt. Ceci constitue un premier résultat suggérant une interaction Htt/HAP1 avec RyR.

La présence de la Htt mutée influence-t-elle l'activité du canal calcique RyR et/ou l'intégrité des membranes ?

Notre laboratoire collabore avec celui du Pr. B. Landwehrmeyer (Université de Ulm, Allemagne) pour déterminer si :

- (1) la Htt/HAP1 interagit également avec RyR *in vivo*.
- (2) l'activité de ce canal calcique RyR est influencée par la taille de la polyQ de la Htt en l'absence stricte d'agrégats.

Nos collaborateurs ont démontré que la Htt normale et mutée était co-immunoprécipitée avec quatre anticorps différents dirigés contre RyR. De plus, les domaines C-ter de RyR (en

fusion avec la GFP) et N-ter de la Htt (en fusion avec la RFP) co-localisent *in vivo* dans des cultures de cellule N2a, alors que GFP-RyR(C-ter) ne co-localise pas avec le tag RFP seul. Cette information suggère l'existence d'une interaction directe entre le domaine N-ter de la Htt et RyR-Cter, ce que je pourrai vérifier *in vitro*, notamment afin de déterminer avec quelle séquence de N-ter-Htt le domaine C-ter de RyR interagit. Des analyses par immuno-cytochimie sur des cultures primaires de neurones ont permis de mettre en évidence que les protéines endogènes Htt et RyR co-localisaient. Enfin, des tests d'interaction en utilisant le FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) et le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ont démontré une forte proximité de RyR et de la Htt, dans des cultures primaires de neurones.

Implication que pourrait avoir une interaction aberrante de la Htt mutée avec RyR

Si RyR est dysfonctionnel en présence de mHtt, cela pourrait avoir un intérêt majeur pour comprendre la pathogénèse de Huntington. En effet, les dérégulations de RyR et IP3R1 par la Htt mutée pourraient ensemble altérer les flux calciques intracellulaires des neurones, comme décrit en Introduction. La dérégulation du RyR pourrait également avoir des conséquences aggravant celle d'IP3R1. En effet, de faibles augmentations de la concentration de calcium cytosolique peuvent activer le RyR via un mécanisme de « calcium-induced-calcium release », résultant en une libération importante du calcium du réticulum endoplasmique vers le cytosol (Fagni et al., 2000). Nos collaborateurs vont donc également tenter de déterminer si l'activité de ce canal calcique RyR est influencée par la taille de la polyQ.

Une ouverture thérapeutique

Si la taille de la polyQ de la Htt influence l'activité de ce canal calcique, il serait intéressant de développer des molécules inhibant l'activité de ces canaux calciques (IP3R1 et RyR) qui sont des cibles thérapeutiques de choix, pour rétablir l'homéostasie de calcium intracellulaire dans la MH.

Sources des ADN complémentaires (ADNc) utilisés pour les PCRs

L'ADNc codant pour les protéines d'intérêt a été obtenu auprès de collaborateurs et à nouveau séquencé. Les sources d'ADNc utilisées au cours de cette étude sont :

ADNc humain de HAP1 - XJ-Li : il y a des disparités entre cette séquence et celle publiée (peut-être s'agit-il d'une zone polymorphique), mais la zone d'interaction minimale avec la Htt est présente donc utilisable pour notre étude.

ADNc humain de Htt - M. Hayden: il a une mutation dans le PRD de la Htt mutée et ne peut donc pas être utilisé pour nos clones de l'exon1 de la Htt.

TRX-Htt-Qn - P.J. Bjorkman : commandée sur "Addgene" (origine publique – Bennett et al. 2002).

ADNc humain de HIP1 - E. Wanker.

ADNc humain de SH3GL3 (sans les 21 premiers a.a.) – E. Wanker.

ADNc de rat de IP3R1 - I. Bezprozvanny : Notons que rIP3R1-Cter et hIP3R1-Cter sont identiques.

ADNc de souris de RyR (C-ter) - Cloné par C. Weber (de notre laboratoire), après une RT-PCR sur l'ARNm total extrait de lymphoblastes. Notons que le domaine mRyR1-Cter et hRyR-Cter sont identiques.

Choix des domaines à cloner

Pour définir les limites des domaines minimaux à cloner, les paralogues et orthologues de chaque protéine d'intérêt ont été recherchés en utilisant Blast (Altschul and Lipman, 1990) et Pipealign (Plewniak et al., 2003). Les domaines conservés de ces séquences ont été déterminés en utilisant ClustalX (Thompson et al., 1997). Par ailleurs, les structures secondaires ont été prédites en utilisant les sites Web (Combet et al., 2000; Lupas et al., 1991).

Choix des amorces pour l'amplification par PCR précédant le clonage Gateway

Les amorces ont été conçues de façon à introduire des séquences d'intérêt dans l'amplicon final. Les séquences cibles sont complétées au cours de deux étapes successives d'amplification par PCR (**Figure 57**). Deux sites de recombinaison AttB entourant l'amplicon sont indispensables pour que la recombinaison puisse se produire. D'autre part, deux sites de restriction, ajoutés de part et d'autre de l'amplicon, pourront être utilisés si nécessaire

pour analyser les clonages ou pour cloner à nouveau les domaines par une approche classique. Enfin le site protéolytique TEV permettra de dissocier le domaine protéique d'intérêt de ses tags (GST et MBP) après purification.

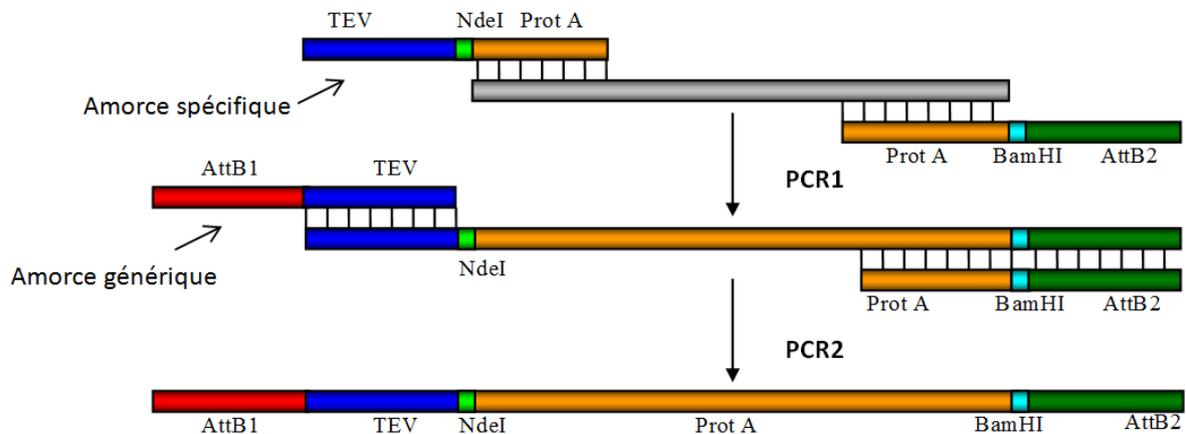


Figure 57 : Exemple d'amorces utilisées pour le processus d'amplification précédent le clonage GW. La séquence cible en gris est amplifiée au cours de 2 réactions de PCR successives. La première amorce sens dite « spécifique », contient un site protéolytique TEV, un site de restriction Nde1, et des nucléotides spécifiques de la cible. L'amorce anti-sens contient des nucléotides spécifiques de la cible, un site de recombinaison « AttB2 » et un site de restriction BamH1. La seconde amorce sens dite « générique » (qui été construite pour être adaptable à tous les fragments) contient un site TEV et la séquence *attB1*.

Amplification des domaines d'intérêts

Deux PCRs successives ont permis d'amplifier chaque fragment:

PCR 1 : La première PCR s'effectue avec 10ng de matrice dans un volume final de 20µl contenant les deux amorces spécifiques à 0,35µM, les quatre dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) à 200nM, un tampon HF (du kit High-fidelity PCR, Finnzymes) avec 1,5mM MgCl₂, et la Phusion DNA polymérase à 0,4U/µl (Finnzymes). Le thermocycler (« PCR express » HYBAID) utilisé pour la PCR est programmé comme suit : 30 sec de dénaturation initiale de l'ADN bicaténaire à 98°C, puis un cycle répété 20 fois composé de 7sec de dénaturation à 98°C, 20 sec d'hybridation des amorces à 55°C et 15 sec d'élongation à 72°C. La réaction est complétée par 7 minutes d'élongation à 72°C.

PCR 2 : La deuxième PCR de 35 cycles s'effectue comme la première, à partir de 1µl du produit de la première PCR et d'amorces sens génériques et anti-sens spécifiques.

Les fragments amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%-2% dans un tampon TAE 1X (40mM Tris base, 1mM EDTA, 20mM acide acétique, pH7,2). Un mélange de 3µl des produits PCR et de 2µl de bleu de charge (40% sucrose, 3% SDS, 0,25% bleu de

bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF, 60mM EDTA) est déposé sur gel parallèlement à 5µl de marqueur de taille « Gene Ruler™ DNA Ladder Mix » (Fermentas). Après la migration (1h à 130V), le gel est incubé 15 minutes dans une solution contenant 50ng/ml de Bromure d'éthidium (BET) et les fragments sont visualisés sous une lampe U.V.

L'amplification de certains fragments codant pour la Htt a été inefficace dans ces conditions, probablement à cause des séquences GC riches au sein des répétitions CAG (gln) et CCG (pro). L'utilisation d'autres polymérases (Expand High Fidelity DNA polymérase ; Pwo DNA polymérase-Roche Diagnostic) et l'ajout de 5% à 10% final de DMSO (pour dissocier d'éventuelles structures secondaires pouvant se former au niveau de l'ADN) a permis de résoudre ce problème.

Purification des domaines d'intérêts

Les amplicons sont séparés des sels, de l'enzyme, du tampon et des amorces en utilisant les solutions du kit NucleoTraP®CR (Macherey-Nagel) avec le robot Nucleofast962. Le volume de l'intégralité de la réaction de PCR est complété à 100µl avec de l'eau distillée puis transféré dans une plaque d'ultra filtration « Nucleofast ». Après avoir fixé les produits PCR sur une membrane de Silice et les avoir lavés trois fois avec le tampon de lavage du kit, les fragments purifiés sont élués dans de l'eau distillée. Les produits purifiés sont ensuite ré-analysés sur gel d'agarose, puis quantifiés avec un spectrophotomètre (NanoDrop® ND-1000).

Préparation de bactéries chimio-compétentes

La compétence des bactéries de la souche DH5α d'*E. coli* est conférée grâce à la méthode « INOUE » avec le protocole suivant : 100ml de milieu de culture stéril (2g de tryptone et 0,5g d'extrait de levure) sontensemencés avec des bactéries DH5-α, et incubés à 37°C sous agitation pendant une nuit. 10ml de cette culture servent à ensemenecer 250ml de milieu enrichi stérile (5g de tryptone et 1,25g d'extrait de levure) qui sont ensuite incubés une nuit sous agitation à 18°C. Lorsque la densité optique (D.O.) mesurée à 600nm atteint 0,4 la culture est centrifugée à 4°C pendant 15min à 3000rpm. Le culot bactérien est repris dans 40ml d'une solution à 4°C contenant du PIPES 10mM à pH7, du MnCl₂ 55mM, du CaCl₂ 15mM et du KCl 250mM, puis centrifugé à 4°C durant 15min à 3 000rpm. Ce culot est

ensuite à nouveau suspendu dans 5ml de la même solution contenant 5% de DMSO, et immédiatement congelé dans de l'azote liquide. Ces tubes sont conservés à -80°C.

Clonage Gateway

Dans ce système le domaine d'intérêt (amplifié par PCR) est inséré par recombinaison dans un vecteur dit « navette ». Ce vecteur, devenu pENTR une fois recombiné, est utilisé afin de transférer les domaines d'intérêts dans des vecteurs de destination différents appelé pDEST (voir Figure 58).

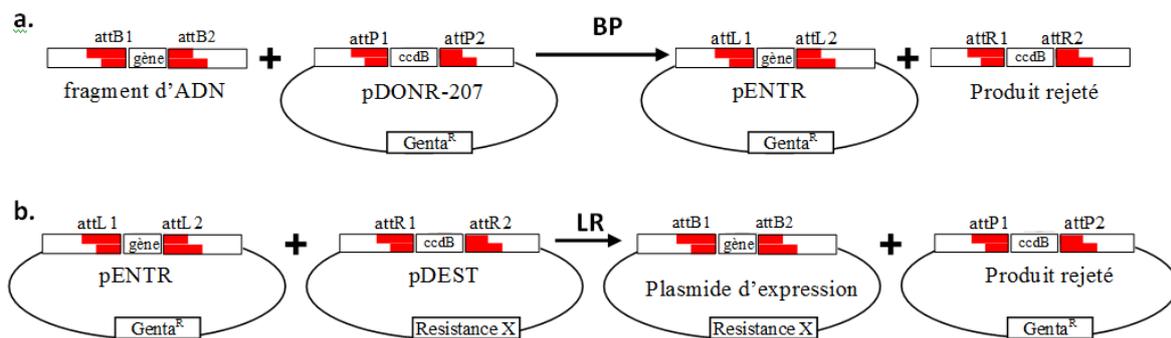


Figure 58 : Principe des réactions BP (a) et LR (b).

a) Le fragment d'ADN amplifié est inséré dans le pDONR-207, à la place du gène ccdB, après la réaction de recombinaison « BP » générant ainsi un pENTR contenant le gène d'intérêt.

b) Le pENTR est recombiné avec le pDEST transférant ainsi le gène d'intérêt vers le pDEST. Lors de cette recombinaison, la résistance au chloramphénicol des pDest est supprimée (sauf pour pCoGWC) au même titre que la protéine ccdB. CcdB est un inhibiteur de croissance bactérien qui doit être éliminé pour obtenir des colonies. D'après le protocole de chez « invitrogen »

Réaction BP

La réaction de recombinaison « BP » a pour but de générer un vecteur d'entrée (pENTR) en remplaçant le gène « ccdB » (qui inhibe la prolifération des bactéries) du plasmide pDONR-207, par l'amplicon purifié suivant le modèle de la (Figure 58).

Cette réaction se fait *in vitro*, durant une nuit, dans une solution de 5µl contenant 2 à 6fmol de produit PCR, 20ng de pDONR-207, un tampon BP (1X au final) et 1µl de BP clonase (Gateway® BP Clonase™ Mix Invitrogen™). Après 10min d'incubation de la réaction à 37°C avec 1,3µg de protéinase K, la totalité de la solution est utilisée pour transformer des bactéries chimio-compétentes DH5-α. La transformation bactérienne se fait par choc thermique en utilisant la méthode suivante : 50µl de bactéries sont incubées 30min sur la glace avec 100ng de plasmide. Après un choc thermique de 1min à 42°C, ces bactéries sont incubées pendant 1h sous agitation avec 150µl de milieu LB (Lennox L Broth Base)

(Invitrogen). Les bactéries transformées sont étalées sur milieu solide LB-Agar contenant 10µg/ml de Gentamycine, et incubées sur la nuit.

Dépistage des colonies positives

Ce criblage est effectué par PCR en utilisant des amorces s'hybridant sur une partie du domaine de recombinaison att retrouvé dans les sites attB. Deux colonies par clone sont repiquées et incubées pendant 1h30 dans 100µl de LB (2X) contenant 1µg de gentamycine. La PCR s'effectue avec 1,5µl de pré-culture comme matrice dans un volume final de 20µl contenant les deux amorces à 0,5µM, les quatre dNTPs à 200nM, un tampon « Thermo Pol » (Roche Diagnostic) avec 1,5mM de MgCl₂, et 0,5unités de Taq DNA polymérase (Roche Diagnostic). Le thermocycler utilisé pour la PCR est programmé comme suit : 4min de dénaturation à 94°C, puis un cycle répété 20 fois composé d'1min de dénaturation à 94°C, 45sec d'hybridation des amorces à 55°C et 1min d'élongation à 72°C, cette réaction étant suivie de 5 minutes d'élongation finale à 72°C. Les fragments amplifiés sont analysés sous U.V. après électrophorèse sur gel d'agarose.

Purification des plasmides

La purification des plasmides consiste à extraire les plasmides recombinés des bactéries. Cette étape se fait avec le kit Nucleospin plasmid® (Macherey-Nagel). 50µl du milieu de pré-culture (des colonies positives) servent à ensemercer 4ml de LB (2X) contenant 40µg de gentamycine. Ce milieu est incubé une nuit sous agitation à 37°C. Après 30sec de centrifugation à 11000rpm, le culot bactérien obtenu est tout d'abord re-suspendu dans une solution, (du kit contenant des RNases). Les bactéries sont ensuite lysées dans une solution de 1% SDS et 200mM NaOH. Une solution de KAc 2,8M, hydrochloride de guanidine (pH5,1) permet de précipiter les débris cellulaires avec l'ADN bactérien, de neutraliser et de préparer l'échantillon à la fixation de l'ADN plasmidique sur la membrane de silice. Toutes les étapes suivantes sont réalisées par centrifugation à 11000rpm. Les débris cellulaires sont éliminés, puis l'ADN plasmidique de la solution aqueuse est fixé sur la membrane, qui est rincée puis séchée suivant le protocole du fournisseur. Enfin, l'ADN de la colonne est élué dans 50µl d'une solution tampon (TRIS 5mM, pH8).

Séquençage

Le laboratoire est équipé de séquenceurs automatiques à capillaires (modèle ABI PRISM® 3100). Chaque réaction nécessite 10µl de plasmides purifiés à une concentration de 100ng/µl et 10µl d'amorces à 2µM. Pour les plus longs fragments d'ADN à séquencer, des amorces internes ont été sélectionnées. Les séquences obtenues sont tout d'abord reformatées et les séquences anti-sens inversées en utilisant un programme interne à l'IGBMC appelé « GCG ». Les séquences sont par la suite alignées en utilisant « SeqLab », puis transférées dans « ClustalX » qui est un programme qui permet d'exporter plus facilement les fichiers obtenus dans « GeneDoc ».

Réaction LR

La réaction LR permet de transférer les fragments d'ADN du vecteur pENTR dans différents vecteurs d'expression (**Figure 55**). Cette réaction se fait *in vitro* (1h30 à température ambiante), dans une solution de 10µl contenant 200ng du plasmide d'entrée (pENTR), 100ng du plasmide de destination (pDEST), un tampon LR (1X au final) et 1µl d'enzyme LR clonase (Gateway® BP Clonase™ Mix Invitrogen™). Après avoir incubé la réaction 10min à 37°C avec 2,6µg de protéinase K, 2µl de la solution sont utilisés pour transformer 50µl de bactéries chimio-compétentes DH5α. Les bactéries transformées sont étalées sur milieu solide LB-Agar contenant le type et la concentration d'antibiotique adapté au plasmide d'expression, et incubées sur la nuit. Les colonies positives sont détectées par PCR avec des amorces s'hybridant sur une partie du domaine de recombinaison att retrouvé dans les sites attB et attL.

Culture et expression des protéines recombinantes

Les vecteurs d'expression pExp sont introduits dans les bactéries BL-21 (chimio-compétentes) par choc thermique d'1 min à 42°C. Les bactéries transformées sont incubées une nuit à 37°C sur boîte LB-Agar contenant l'antibiotique approprié. Les colonies bactériennes obtenues servent à ensemercer 50ml de LB-Agar contenant l'antibiotique adéquat. Cette culture est incubée à 37°C jusqu'à ce qu'une D.O._(600nm) de 0,8 soit atteinte. La production des protéines recombinées est induite avec l'ajout d'IPTG à 0,2mM (concentration finale) et la culture est ré-incubée 2h à 37°C. 10µl de culture sont mis de côté pour un contrôle d'expression, et le reste des bactéries est centrifugé à 4000rpm (centrifugeuse GR-412 JOUAN) à 4°C. Le

surnageant est éliminé et le culot de bactéries est conservé à -20°C. Le volume, la température et le temps d'induction des cultures bactériennes sont variable en fonction des domaines à produire. Par exemple pour certains domaines de la Htt (MBP-Htt(exon1)-His), 9L de culture bactérienne ont été induits pendant 4h à 16°C.

Gel SDS PAGE coloré au bleu de coomassie (utilisé entre autres pour les contrôles d'expression)

Pour tester l'expression des protéines recombinantes, 10 µl de culture bactérienne sont bouillies 2 min en présence de 5µl de tampon Laemli (60mM Tris/HCl; 2% SDS; 0,04% Bleu de bromophénol; 10% Glycérol; 1,5M β-mercapto-éthanol; 44% Glycérol; pH6,8). Le tout est déposé sur gel polyacrylamide 15% (SDS-PAGE) et migré à 250V en conditions dénaturantes. Ce gel est par la suite coloré dans une solution contenant 0,1% de bleu de Coomassie R250, 50% d'éthanol et 10% d'acide acétique, puis décoloré dans une solution composée de 10% d'acide acétique et 30% d'éthanol, de façon à révéler les protéines.

Purification des protéines

Lyse cellulaire par sonication

Les culots bactériens ou cellulaires de cellules d'insecte sont repris dans une solution tampon (Tris 10mM; NaCl 50mM; KCl 50mM; Glycérol (10%); DTT 1mM, pH7) contenant des inhibiteurs de protéases Complete® (Roche Diagnosis) et les cellules en solution sont lysées pendant 10 minutes, en contrôlant la température ($\leq 9^{\circ}\text{C}$) avec un ultra-sonicateur (VibraCell™ 75043, Bioblock Scientific). Les homogénats obtenus sont ensuite centrifugés pendant 10min à 13000rpm à 4°C de façon à séparer les protéines solubles (présentes dans le surnageant) du matériel insoluble.

Lyse cellulaire par choc osmotique

La Htt fusionnée soit à un tag Thioredoxine, soit à la MBP, possède un signal de localisation périplasmique. Ainsi, nous avons pu procéder à une lyse cellulaire par choc osmotique. Les cultures sont réalisées dans 3 L de milieu LB et les culots bactériens sont repris dans 300 ml de tampon de choc osmotique (Tris 15mM ; pH8). Les culots bactériens sont laissés incubés pendant 2h dans le tampon hypotonique à 4°C. Les homogénats obtenus sont ensuite

centrifugés pendant 10min à 25 000rpm à 4°C, de façon à séparer les protéines solubles du matériel insoluble.

1^{er} type de purification par affinité sur colonne Biorad

Les protéines recombinantes sont fusionnées à un domaine tag (GST, MBP ou poly-histidine) permettant leur purification par affinité sur résine glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare), résine Amylose (BioLabs[®] Inc) ou résine au cobalt TALON® (CloneTech) respectivement. 500µl de résine sont lavés avec 10 volumes d'eau et équilibrés au moyen de 10 volumes de tampon de lavage (Tris 10mM ; NaCl 50mM ; KCl 50mM ; Glycérol 10% ; pH7). Puis l'intégralité de l'extrait protéique soluble est chargée sur cette résine qui est ensuite relavée avec 10 volumes de tampon de lavage. Les fragments sont par la suite élués dans une solution tampon contenant 200mM d'imidazole pour la résine TALON®, 50 mM de glutathion pour la résine glutathione Sepharose™ 4B et 10 mM de maltose pour la résine Amylose. Les protéines obtenues sont par la suite séparées sur gel de polyacrylamide à 15%.

2^{ème} type de purification par affinité sur colonne AKTA Basic

Dans la majorité des cas, les volumes d'extraits solubles excèdent 100ml pour atteindre des quantités de protéines recombinantes purifiées satisfaisantes. C'est pourquoi la purification de ces extraits est effectuée en salle froide à 4 °C avec la machine GE Healthcare AKTA Basic. Comme pour les colonnes Biorad, nous possédons 3 types de résines : nickel, glutathione Sepharose™ 4B et Amylose. Ces résines sont contenues dans des colonnes « fast flow » (FF) de 5ml chacune. Grâce à un capteur de D.O._{280 nm} placé à la sortie des colonnes nickel, la quantité de protéines exclues des colonnes est suivie en temps réel, ce qui permet d'obtenir des lavages optimaux, car l'étape de lavage est arrêtée quand il n'y a plus de protéines qui se décrochent de la colonne. Après avoir équilibré les colonnes avec du tampon de lavage (Tris 10 mM ; NaCl 50 mM ; KCl 50 mM ; pH7), l'intégralité de l'extrait protéique soluble est chargé sur ces colonnes qui sont ensuite lavées une première fois avec le tampon de lavage seul. Les conditions d'éluion des résines glutathione Sepharose™ 4B ou Amylose sont les mêmes que pour les colonnes Biorad. Cependant pour les résines nickel, des étapes

supplémentaires de lavages ont été rajoutées : 20 mM puis 40 mM d'imidazole, suivi d'une élution finale, toujours avec le tampon de lavage contenant 200 mM d'imidazole.

Caractérisation par Western Blot (WB)

La qualité des purifications est observée en faisant migrer les extraits protéiques des différentes étapes de purification sur gel SDS PAGE 15%. La qualité des protéines purifiées est observée par WB. Le transfert s'effectue sur une membrane de PVDF (« activée » dans une solution d'éthanol 100%) dans une solution de transfert (Tris-Base 50mM ; Glycine 500mM ; SDS 7mM ; Ethanol 20%) à 200 mA pendant 1 h. La membrane est saturée dans une solution de TBS (Tris-Base 20mM ; NaCl 140mM ; pH 7,6) contenant 10% de lait pendant 20 min. Puis elle est incubée soit 1 h, soit sur la nuit, dans un Ac primaire. Après 3 lavages de 5min dans la solution de TBS, la membrane est incubée dans du TBS contenant 10% de lait et un anticorps secondaire Gam perox (anti-mouse couplé à la peroxydase) ou Gar perox (anti-rabbit couplé à la peroxydase) dilué au 1/10 000^{ème}. Après 3 lavages au TBS, la membrane est révélée après incubation avec le substrat SuperSignal[®] West Pico Luminol/Enhancer Solution et SuperSignal[®] West Pico Stable Peroxide Buffer. La chimioluminescence est observée avec l'appareil Fusion FX-7 ou sur film radiographique.

Matériels et méthodes additionnel dans le manuscrit :

- **Clonage de MBP-Htt-Qn**
- **Gel filtration**
- **Méthode SPR**
- **GST pull-down**
- **Test de recrutement**

Bibliographie

A

(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.

Aiken, C.T., Steffan, J.S., Guerrero, C.M., Khashwji, H., Lukacsovich, T., Simmons, D., Purcell, J.M., Menhaji, K., Zhu, Y.Z., Green, K., et al. (2009). Phosphorylation of threonine-3: Implications for huntingtin aggregation and neurotoxicity. *J Biol Chem*.

Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M., and Wiegand, S.J. (1997). Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856-860.

Altschul, S.F., and Lipman, D.J. (1990). Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5509-5513.

Andrade, M.A., and Bork, P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 11, 115-116.

Andrade, M.A., Petosa, C., O'Donoghue, S.I., Muller, C.W., and Bork, P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J Mol Biol* 309, 1-18.

Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R., and Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431, 805-810.

Atwal, R.S., Xia, J., Pinchev, D., Taylor, J., Epan, R.M., and Truant, R. (2007). Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Hum Mol Genet* 16, 2600-2615.

B

Baquet, Z.C., Gorski, J.A., and Jones, K.R. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 24, 4250-4258.

Bates, G.P. (2005). History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nat Rev Genet* 6, 766-773.

Bauer, P.O., and Nukina, N. (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem* 110, 1737-1765.

Beal, M.F., Ferrante, R.J., Swartz, K.J., and Kowall, N.W. (1991). Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 11, 1649-1659.

Bennett, M.J., Huey-Tubman, K.E., Herr, A.B., West, A.P., Jr., Ross, S.A., and Bjorkman, P.J. (2002). Inaugural Article: A linear lattice model for polyglutamine in CAG-expansion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11634-11639.

Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.

Bertaux, F., Sharp, A.H., Ross, C.A., Lehrach, H., Bates, G.P., and Wanker, E. (1998). HAP1-huntingtin interactions do not contribute to the molecular pathology in Huntington's disease transgenic mice. *FEBS Lett* 426, 229-232.

Bessert, D.A., Guttridge, K.L., Dunbar, J.C., and Carlock, L.R. (1995). The identification of a functional nuclear localization signal in the Huntington disease protein. *Brain Res Mol Brain Res* 33, 165-173.

Bezprozvanny, I., and Hayden, M.R. (2004). Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1310-1317.

Bhattacharyya, A., Thakur, A.K., Chellgren, V.M., Thiagarajan, G., Williams, A.D., Chellgren, B.W., Creamer, T.P., and Wetzel, R. (2006). Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *J Mol Biol* 355, 524-535.

Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S., and Saudou, F. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 63, 2642-2660.

Burke, J.R., Enghild, J.J., Martin, M.E., Jou, Y.S., Myers, R.M., Roses, A.D., Vance, J.M., and Strittmatter, W.J. (1996). Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 2, 347-350.

Busch, A., Engemann, S., Lurz, R., Okazawa, H., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (2003). Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J Biol Chem* 278, 41452-41461.

C

Cabeza, R., and Nyberg, L. (2000). Neural bases of learning and memory: functional neuroimaging evidence. *Curr Opin Neurol* 13, 415-421.

Cancel, G., Duyckaerts, C., Holmberg, M., Zander, C., Yvert, G., Lebre, A.S., Ruberg, M., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E., et al. (2000). Distribution of ataxin-7 in normal human brain and retina. *Brain* 123 Pt 12, 2519-2530.

Carpenter, N.J. (1994). Genetic anticipation. Expanding tandem repeats. *Neurol Clin* 12, 683-697.

Caughey, B., and Lansbury, P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26, 267-298.

Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., and Holzbaur, E.L. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10045-10050.

Chai, Y., Shao, J., Miller, V.M., Williams, A., and Paulson, H.L. (2002). Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9310-9315.

Cicchetti, F., Prensa, L., Wu, Y., and Parent, A. (2000). Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 34, 80-101.

Clabough, E.B., and Zeitlin, S.O. (2006). Deletion of the triplet repeat encoding polyglutamine within the mouse Huntington's disease gene results in subtle behavioral/motor phenotypes in vivo and elevated levels of ATP with cellular senescence in vitro. *Hum Mol Genet* 15, 607-623.

Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pages, M., Li, X.J., Saudou, F., and Humbert, S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J* 27, 2124-2134.

Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25, 147-150.

Coyle, J.T., and Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263, 244-246.

D

Dai, Y., Dudek, N.L., Li, Q., Fowler, S.C., and Muma, N.A. (2009). Striatal expression of a calmodulin fragment improved motor function, weight loss, and neuropathology in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 29, 11550-11559.

David, G., Abbas, N., Stevanin, G., Durr, A., Yvert, G., Cancel, G., Weber, C., Imbert, G., Saudou, F., Antoniou, E., et al. (1997). Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 17, 65-70.

Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537-548.

Dehay, B., and Bertolotti, A. (2006). Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J Biol Chem* 281, 35608-35615.

Dehay, B., Weber, C., Trottier, Y., and Bertolotti, A. (2007). Mapping of the epitope of monoclonal antibody 2B4 to the proline-rich region of human Huntingtin, a region critical for aggregation and toxicity. *Biotechnol J* 2, 559-564.

Deng, Y.P., Albin, R.L., Penney, J.B., Young, A.B., Anderson, K.D., and Reiner, A. (2004). Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 27, 143-164.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J.P., Carraway, R., Reeves, S.A., et al. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14, 1075-1081.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.

Dohmen, R.J. (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* 1695, 113-131.

Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 26, 300-306.

Dudek, N.L., Dai, Y., and Muma, N.A. (2008). Protective effects of interrupting the binding of calmodulin to mutant huntingtin. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 355-365.

Dudek, N.L., Dai, Y., and Muma, N.A. (2010). Neuroprotective effects of calmodulin peptide 76-121aa: disruption of calmodulin binding to mutant huntingtin. *Brain Pathol* 20, 176-189.

Duennwald, M.L., Jagadish, S., Muchowski, P.J., and Lindquist, S. (2006). Flanking sequences profoundly alter polyglutamine toxicity in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11045-11050.

E

Ehrnhoefer, D.E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., and Wanker, E.E. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 15, 558-566.

Einum, D.D., Townsend, J.J., Ptacek, L.J., and Fu, Y.H. (2001). Ataxin-7 expression analysis in controls and spinocerebellar ataxia type 7 patients. *Neurogenetics* 3, 83-90.

Enevoldson, T.P., Sanders, M.D., and Harding, A.E. (1994). Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. A clinical and genetic study of eight families. *Brain* 117 (Pt 3), 445-460.

Engelender, S., Sharp, A.H., Colomer, V., Tokito, M.K., Lanahan, A., Worley, P., Holzbaur, E.L., and Ross, C.A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet* 6, 2205-2212.

F

Faber, P.W., Barnes, G.T., Srinidhi, J., Chen, J., Gusella, J.F., and MacDonald, M.E. (1998). Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet* 7, 1463-1474.

Fagni, L., Chavis, P., Ango, F., and Bockaert, J. (2000). Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23, 80-88.

Faux, N.G., Bottomley, S.P., Lesk, A.M., Irving, J.A., Morrison, J.R., de la Banda, M.G., and Whisstock, J.C. (2005). Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins. *Genome Res* 15, 537-551.

Fennema-Notestine, C., Archibald, S.L., Jacobson, M.W., Corey-Bloom, J., Paulsen, J.S., Peavy, G.M., Gamst, A.C., Hamilton, J.M., Salmon, D.P., and Jernigan, T.L. (2004). In vivo evidence of cerebellar atrophy and cerebral white matter loss in Huntington disease. *Neurology* 63, 989-995.

G

- Gafni, J., and Ellerby, L.M. (2002). Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci* 22, 4842-4849.
- Gao, Y.G., Yan, X.Z., Song, A.X., Chang, Y.G., Gao, X.C., Jiang, N., Zhang, Q., and Hu, H.Y. (2006). Structural insights into the specific binding of huntingtin proline-rich region with the SH3 and WW domains. *Structure* 14, 1755-1765.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., et al. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127-138.
- Georgalis, Y., Starikov, E.B., Hollenbach, B., Lurz, R., Scherzinger, E., Saenger, W., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1998). Huntingtin aggregation monitored by dynamic light scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6118-6121.
- Georgiou, N., Bradshaw, J.L., Chiu, E., Tudor, A., O'Gorman, L., and Phillips, J.G. (1999). Differential clinical and motor control function in a pair of monozygotic twins with Huntington's disease. *Mov Disord* 14, 320-325.
- Gerber, H.P., Seipel, K., Georgiev, O., Hofferer, M., Hug, M., Rusconi, S., and Schaffner, W. (1994). Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 263, 808-811.
- Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., et al. (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hip1. *Nat Cell Biol* 4, 95-105.
- Giachino, C., Lantelme, E., Lanzetti, L., Saccone, S., Bella Valle, G., and Migone, N. (1997). A novel SH3-containing human gene family preferentially expressed in the central nervous system. *Genomics* 41, 427-434.
- Gil, J.M., and Rego, A.C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27, 2803-2820.
- Goldberg, Y.P., Nicholson, D.W., Rasper, D.M., Kalchman, M.A., Koide, H.B., Graham, R.K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., et al. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 13, 442-449.
- Gomez-Tortosa, E., MacDonald, M.E., Friend, J.C., Taylor, S.A., Weiler, L.J., Cupples, L.A., Srinidhi, J., Gusella, J.F., Bird, E.D., Vonsattel, J.P., et al. (2001). Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* 49, 29-34.
- Gong, B., Lim, M.C., Wanderer, J., Wyttenbach, A., and Morton, A.J. (2008). Time-lapse analysis of aggregate formation in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease reveals time-dependent aggregate formation that transiently delays cell death. *Brain Res Bull* 75, 146-157.

Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., Murphy, Z., et al. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* 125, 1179-1191.

Gu, X., Greiner, E.R., Mishra, R., Kodali, R., Osmand, A., Finkbeiner, S., Steffan, J.S., Thompson, L.M., Wetzel, R., and Yang, X.W. (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, L.S., Bruschi, R.G., Laymon, R.A., Niesman, I.R., Gordesky-Gold, B., Sintasath, L., Bonini, N.M., and Goldstein, L.S. (2003). Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40, 25-40.

Gusella, J.F., and MacDonald, M.E. (2000). Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 1, 109-115.

Gusella, J.F., Wexler, N.S., Conneally, P.M., Naylor, S.L., Anderson, M.A., Tanzi, R.E., Watkins, P.C., Ottina, K., Wallace, M.R., Sakaguchi, A.Y., et al. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306, 234-238.

Gutkunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J., and Hersch, S.M. (1995). Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8710-8714.

Gutkunst, C.A., Li, S.H., Yi, H., Mulroy, J.S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R.J., Hersch, S.M., and Li, X.J. (1999). Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 19, 2522-2534.

H

Hackam, A.S., Singaraja, R., Wellington, C.L., Metzler, M., McCutcheon, K., Zhang, T., Kalchman, M., and Hayden, M.R. (1998). The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol* 141, 1097-1105.

Hackam, A.S., Yassa, A.S., Singaraja, R., Metzler, M., Gutkunst, C.A., Gan, L., Warby, S., Wellington, C.L., Vaillancourt, J., Chen, N., et al. (2000). Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *J Biol Chem* 275, 41299-41308.

Hahn-Barma, V., Deweer, B., Durr, A., Dode, C., Feingold, J., Pillon, B., Agid, Y., Brice, A., and Dubois, B. (1998). Are cognitive changes the first symptoms of Huntington's disease? A study of gene carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64, 172-177.

Han, I., You, Y., Kordower, J.H., Brady, S.T., and Morfini, G.A. (2010). Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. *J Neurochem* 113, 1073-1091.

Hands, S.L., and Wyttenbach, A. (2010). Neurotoxic protein oligomerisation associated with polyglutamine diseases. *Acta Neuropathol*.

Harjes, P., and Wanker, E.E. (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28, 425-433.

Harris, G.J., Aylward, E.H., Peyser, C.E., Pearlson, G.D., Brandt, J., Roberts-Twillie, J.V., Barta, P.E., and Folstein, S.E. (1996). Single photon emission computed tomographic blood flow and magnetic resonance volume imaging of basal ganglia in Huntington's disease. *Arch Neurol* 53, 316-324.

Harris, G.J., Pearlson, G.D., Peyser, C.E., Aylward, E.H., Roberts, J., Barta, P.E., Chase, G.A., and Folstein, S.E. (1992). Putamen volume reduction on magnetic resonance imaging exceeds caudate changes in mild Huntington's disease. *Ann Neurol* 31, 69-75.

Heiser, V., Scherzinger, E., Boeddrich, A., Nordhoff, E., Lurz, R., Schugardt, N., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (2000). Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6739-6744.

Helmlinger, D., Hardy, S., Sasorith, S., Klein, F., Robert, F., Weber, C., Miguet, L., Potier, N., Van-Dorselaer, A., Wurtz, J.M., et al. (2004). Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Hum Mol Genet* 13, 1257-1265.

Hirakura, Y., Azimov, R., Azimova, R., and Kagan, B.L. (2000). Polyglutamine-induced ion channels: a possible mechanism for the neurotoxicity of Huntington and other CAG repeat diseases. *J Neurosci Res* 60, 490-494.

Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., et al. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23, 181-192.

Hoffner, G., Kahlem, P., and Djian, P. (2002). Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *J Cell Sci* 115, 941-948.

Holbert, S., Denghien, I., Kiechle, T., Rosenblatt, A., Wellington, C., Hayden, M.R., Margolis, R.L., Ross, C.A., Dausset, J., Ferrante, R.J., et al. (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.

Humbert, S., Bryson, E.A., Cordelieres, F.P., Connors, N.C., Datta, S.R., Finkbeiner, S., Greenberg, M.E., and 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.

J

Jiang, H., Nucifora, F.C., Jr., Ross, C.A., and DeFranco, D.B. (2003). Cell death triggered by polyglutamine-expanded huntingtin in a neuronal cell line is associated with degradation of CREB-binding protein. *Hum Mol Genet* 12, 1-12.

K

Kalchman, M.A., Graham, R.K., Xia, G., Koide, H.B., Hodgson, J.G., Graham, K.C., Goldberg, Y.P., Gietz, R.D., Pickart, C.M., and Hayden, M.R. (1996). Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* 271, 19385-19394.

Kalchman, M.A., Koide, H.B., McCutcheon, K., Graham, R.K., Nichol, K., Nishiyama, K., Kazemi-Esfarjani, P., Lynn, F.C., Wellington, C., Metzler, M., et al. (1997). HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet* 16, 44-53.

Kaltenbach, L.S., Romero, E., Becklin, R.R., Chettier, R., Bell, R., Phansalkar, A., Strand, A., Torcassi, C., Savage, J., Hurlburt, A., et al. (2007). Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet* 3, e82.

Kassubek, J., Bernhard Landwehrmeyer, G., Ecker, D., Juengling, F.D., Mueche, R., Schuller, S., Weindl, A., and Peinemann, A. (2004). Global cerebral atrophy in early stages of Huntington's disease: quantitative MRI study. *Neuroreport* 15, 363-365.

Kay, B.K., Williamson, M.P., and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 14, 231-241.

Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486-489.

Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T.M., Milton, S.C., Hall, J.E., and Glabe, C.G. (2004). Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem* 279, 46363-46366.

Kazantsev, A.G., and Hersch, S.M. (2007). Drug targeting of dysregulated transcription in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 83, 249-259.

Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.H., Chen, J.D., et al. (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.

Kegel, K.B., Sapp, E., Alexander, J., Valencia, A., Reeves, P., Li, X., Masso, N., Sobin, L., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2009a). Polyglutamine expansion in huntingtin alters its interaction with phospholipids. *J Neurochem* 110, 1585-1597.

Kegel, K.B., Sapp, E., Yoder, J., Cuiffo, B., Sobin, L., Kim, Y.J., Qin, Z.H., Hayden, M.R., Aronin, N., Scott, D.L., et al. (2005). Huntingtin associates with acidic phospholipids at the plasma membrane. *J Biol Chem* 280, 36464-36473.

Kegel, K.B., Schewkunow, V., Sapp, E., Masso, N., Wanker, E.E., DiFiglia, M., and Goldmann, W.H. (2009b). Polyglutamine expansion in huntingtin increases its insertion into lipid bilayers. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 472-475.

Kim, M.W., Chelliah, Y., Kim, S.W., Otwinowski, Z., and Bezprozvanny, I. (2009). Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region. *Structure* 17, 1205-1212.

Kim, S., Nollen, E.A., Kitagawa, K., Bindokas, V.P., and Morimoto, R.I. (2002). Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol* 4, 826-831.

Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N., and 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.

Klein, F.A., Pastore, A., Masino, L., Zeder-Lutz, G., Nierengarten, H., Oulad-Abdelghani, M., Altschuh, D., Mandel, J.L., and Trottier, Y. (2007). Pathogenic and non-pathogenic polyglutamine tracts have similar structural properties: towards a length-dependent toxicity gradient. *J Mol Biol* 371, 235-244.

Kuwert, T., Lange, H.W., Langen, K.J., Herzog, H., Aulich, A., and Feinendegen, L.E. (1990). Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain* 113 (Pt 5), 1405-1423.

L

Landles, C., Sathasivam, K., Weiss, A., Woodman, B., Moffitt, H., Finkbeiner, S., Sun, B., Gafni, J., Ellerby, L.M., Trottier, Y., et al. (2010). Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington disease. *J Biol Chem* 285, 8808-8823.

Landwehrmeyer, G.B., Dubois, B., de Yébenes, J.G., Kremer, B., Gaus, W., Kraus, P.H., Przuntek, H., Dib, M., Doble, A., Fischer, W., et al. (2007). Riluzole in Huntington's disease: a 3-year, randomized controlled study. *Ann Neurol* 62, 262-272.

Leavitt, B.R., Guttman, J.A., Hodgson, J.G., Kimel, G.H., Singaraja, R., Vogl, A.W., and Hayden, M.R. (2001). Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet* 68, 313-324.

Legleiter, J., Lotz, G.P., Miller, J., Ko, J., Ng, C., Williams, G.L., Finkbeiner, S., Patterson, P.H., and Muchowski, P.J. (2009). Monoclonal antibodies recognize distinct conformational epitopes formed by polyglutamine in a mutant huntingtin fragment. *J Biol Chem* 284, 21647-21658.

Legleiter, J., Mitchell, E., Lotz, G.P., Sapp, E., Ng, C., DiFiglia, M., Thompson, L.M., and Muchowski, P.J. (2010). Mutant huntingtin fragments form oligomers in a polyglutamine length-dependent manner in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 285, 14777-14790.

Lemiere, J., Decruyenaere, M., Evers-Kiebooms, G., Vandenbussche, E., and Dom, R. (2004). Cognitive changes in patients with Huntington's disease (HD) and asymptomatic carriers of the HD mutation--a longitudinal follow-up study. *J Neurol* 251, 935-942.

Li, P., Huey-Tubman, K.E., Gao, T., Li, X., West, A.P., Jr., Bennett, M.J., and Bjorkman, P.J. (2007). The structure of a polyQ-anti-polyQ complex reveals binding according to a linear lattice model. *Nat Struct Mol Biol* 14, 381-387.

Li, S.H., Gutekunst, C.A., Hersch, S.M., and Li, X.J. (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J Neurosci* 18, 1261-1269.

- Li, S.H., and Li, X.J. (2004). Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20, 146-154.
- Li, S.H., Yu, Z.X., Li, C.L., Nguyen, H.P., Zhou, Y.X., Deng, C., and Li, X.J. (2003). Lack of huntingtin-associated protein-1 causes neuronal death resembling hypothalamic degeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 23, 6956-6964.
- Li, W., Serpell, L.C., Carter, W.J., Rubinsztein, D.C., and Huntington, J.A. (2006). Expression and characterization of full-length human huntingtin, an elongated HEAT repeat protein. *J Biol Chem* 281, 15916-15922.
- Li, X., Standley, C., Sapp, E., Valencia, A., Qin, Z.H., Kegel, K.B., Yoder, J., Comer-Tierney, L.A., Esteves, M., Chase, K., et al. (2009). Mutant huntingtin impairs vesicle formation from recycling endosomes by interfering with Rab11 activity. *Mol Cell Biol* 29, 6106-6116.
- Li, X.J., Li, S.H., Sharp, A.H., Nucifora, F.C., Jr., Schilling, G., Lanahan, A., Worley, P., Snyder, S.H., and Ross, C.A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398-402.
- Liu, Y.F., Deth, R.C., and Devys, D. (1997). SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes. *J Biol Chem* 272, 8121-8124.
- Lunkes, A., Lindenberg, K.S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G.B., Mandel, J.L., and Trottier, Y. (2002). Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 10, 259-269.
- Luo, S., Vacher, C., Davies, J.E., and Rubinsztein, D.C. (2005). Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *J Cell Biol* 169, 647-656.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.

M

- MacDonald, M.E., Cheng, S.V., Zimmer, M., Haines, J.L., Poustka, A., Allitto, B., Smith, B., Whaley, W.L., Romano, D.M., Jagadeesh, J., et al. (1989). Clustering of multiallele DNA markers near the Huntington's disease gene. *J Clin Invest* 84, 1013-1016.
- MacDonald, M.E., Vonsattel, J.P., Shrinidhi, J., Couropmitree, N.N., Cupples, L.A., Bird, E.D., Gusella, J.F., and Myers, R.H. (1999). Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* 53, 1330-1332.
- Marsh, J.L., Walker, H., Theisen, H., Zhu, Y.Z., Fielder, T., Purcell, J., and Thompson, L.M. (2000). Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 9, 13-25.
- Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi-Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S.U., et al. (1998). Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* 18, 150-154.

- Masino, L., Kelly, G., Leonard, K., Trottier, Y., and Pastore, A. (2002). Solution structure of polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins. *FEBS Lett* 513, 267-272.
- Matsumoto, M., Nakagawa, T., Inoue, T., Nagata, E., Tanaka, K., Takano, H., Minowa, O., Kuno, J., Sakakibara, S., Yamada, M., et al. (1996). Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature* 379, 168-171.
- McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G., et al. (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9, 2197-2202.
- McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.H., and Li, X.J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *J Biol Chem* 281, 3552-3559.
- Messer, A., and McLearn, J. (2006). The therapeutic potential of intrabodies in neurologic disorders: focus on Huntington and Parkinson diseases. *BioDrugs* 20, 327-333.
- Mestre, T., Ferreira, J., Coelho, M.M., Rosa, M., and Sampaio, C. (2009). Therapeutic interventions for disease progression in Huntington's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006455.
- Metzger, S., Saukko, M., Van Che, H., Tong, L., Puder, Y., Riess, O., and Nguyen, H.P. (2010). Age at onset in Huntington's disease is modified by the autophagy pathway: implication of the V471A polymorphism in Atg7. *Hum Genet*.
- Modregger, J., DiProspero, N.A., Charles, V., Tagle, D.A., and 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.
- Monoï, H., Futaki, S., Kugimiya, S., Minakata, H., and Yoshihara, K. (2000). Poly-L-glutamine forms cation channels: relevance to the pathogenesis of the polyglutamine diseases. *Biophys J* 78, 2892-2899.
- Morley, J.F., Brignull, H.R., Weyers, J.J., and Morimoto, R.I. (2002). The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10417-10422.
- Morton, A.J., and Edwardson, J.M. (2001). Progressive depletion of complexin II in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 76, 166-172.
- Mukai, H., Isagawa, T., Goyama, E., Tanaka, S., Bence, N.F., Tamura, A., Ono, Y., and Kopito, R.R. (2005). Formation of morphologically similar globular aggregates from diverse aggregation-prone proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10887-10892.

N

- Nance, M.A., and Myers, R.H. (2001). Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7, 153-157.
- Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2000). HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res* 10, 1445-1452.

O

Ogawa, Y., Kurebayashi, N., and Murayama, T. (2000). Putative roles of type 3 ryanodine receptor isoforms (RyR3). *Trends Cardiovasc Med* 10, 65-70.

Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure, L.S.t., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S., et al. (1997). Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell* 91, 753-763.

P

Palidwor, G.A., Shcherbinin, S., Huska, M.R., Rasko, T., Stelzl, U., Arumughan, A., Foulle, R., Porras, P., Sanchez-Pulido, L., Wanker, E.E., et al. (2009). Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Comput Biol* 5, e1000304.

Pardo, R., Molina-Calavita, M., Poizat, G., Keryer, G., Humbert, S., and Saudou, F. (2010). pARIS-htt: an optimised expression platform to study huntingtin reveals functional domains required for vesicular trafficking. *Mol Brain* 3, 17.

Paulsen, J.S., Nehl, C., Hoth, K.F., Kanz, J.E., Benjamin, M., Conybeare, R., McDowell, B., and Turner, B. (2005). Depression and stages of Huntington's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 17, 496-502.

Paulson, H.L., Perez, M.K., Trottier, Y., Trojanowski, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.L., Fischbeck, K.H., and Pittman, R.N. (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19, 333-344.

Perry, G.M., Tallaksen-Greene, S., Kumar, A., Heng, M.Y., Kneynsberg, A., van Groen, T., Detloff, P.J., Albin, R.L., and Lesort, M. (2010). Mitochondrial calcium uptake capacity as a therapeutic target in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*.

Perutz, M.F. (1995). Glutamine repeats as polar zippers: their role in inherited neurodegenerative disease. *Mol Med* 1, 718-721.

Plewniak, F., Bianchetti, L., Brelivet, Y., Carles, A., Chalmel, F., Lecompte, O., Mochel, T., Moulinier, L., Muller, A., Muller, J., et al. (2003). PipeAlign: A new toolkit for protein family analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3829-3832.

Poirier, M.A., Jiang, H., and Ross, C.A. (2005). A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure. *Hum Mol Genet* 14, 765-774.

Poirier, M.A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M., and Ross, C.A. (2002). Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J Biol Chem* 277, 41032-41037.

Q

Qin, Z.H., Wang, Y., Sapp, E., Cuiffo, B., Wanker, E., Hayden, M.R., Kegel, K.B., Aronin, N., and DiFiglia, M. (2004). Huntingtin bodies sequester vesicle-associated proteins by a polyproline-dependent interaction. *J Neurosci* 24, 269-281.

R

Rangone, H., Poizat, G., Troncoso, J., Ross, C.A., MacDonald, M.E., Saudou, F., and 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.

Ratovitski, T., Gucek, M., Jiang, H., Chighladze, E., Waldron, E., D'Ambola, J., Hou, Z., Liang, Y., Poirier, M.A., Hirschhorn, R.R., et al. (2009). Mutant huntingtin N-terminal fragments of specific size mediate aggregation and toxicity in neuronal cells. *J Biol Chem* 284, 10855-10867.

Ratovitski, T., Nakamura, M., D'Ambola, J., Chighladze, E., Liang, Y., Wang, W., Graham, R., Hayden, M.R., Borchelt, D.R., Hirschhorn, R.R., et al. (2007). N-terminal proteolysis of full-length mutant huntingtin in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease. *Cell Cycle* 6, 2970-2981.

Ren, P.H., Lauckner, J.E., Kachirskaja, I., Heuser, J.E., Melki, R., and Kopito, R.R. (2009). Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat Cell Biol* 11, 219-225.

Riley, B.E., and Orr, H.T. (2006). Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 20, 2183-2192.

Ringstad, N., Nemoto, Y., and De Camilli, P. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8569-8574.

Rockabrand, E., Slepko, N., Pantalone, A., Nukala, V.N., Kazantsev, A., Marsh, J.L., Sullivan, P.G., Steffan, J.S., Sensi, S.L., and Thompson, L.M. (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.

Rong, J., McGuire, J.R., Fang, Z.H., Sheng, G., Shin, J.Y., Li, S.H., and Li, X.J. (2006). Regulation of intracellular trafficking of huntingtin-associated protein-1 is critical for TrkA protein levels and neurite outgrowth. *J Neurosci* 26, 6019-6030.

Rosas, H.D., Koroshetz, W.J., Chen, Y.I., Skeuse, C., Vangel, M., Cudkowicz, M.E., Caplan, K., Marek, K., Seidman, L.J., Makris, N., et al. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* 60, 1615-1620.

Rosas, H.D., Tuch, D.S., Hevelone, N.D., Zaleta, A.K., Vangel, M., Hersch, S.M., and Salat, D.H. (2006). Diffusion tensor imaging in presymptomatic and early Huntington's disease: Selective white matter pathology and its relationship to clinical measures. *Mov Disord* 21, 1317-1325.

Ross, C.A. (1995). When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron* 15, 493-496.

Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 Suppl, S10-17.

Rossi, D., and Sorrentino, V. (2002). Molecular genetics of ryanodine receptors Ca²⁺-release channels. *Cell Calcium* 32, 307-319.

Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Chiano, M., Korn, S., Dodge, A., Norbury, G., Rosser, E., and Craufurd, D. (1997). Homozygotes and heterozygotes for ciliary neurotrophic factor null alleles do not show earlier onset of Huntington's disease. *Neurology* 49, 890-892.

S

Sadri-Vakili, G., and Cha, J.H. (2006). Mechanisms of disease: Histone modifications in Huntington's disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 330-338.

Sanchez-Pernaute, R., Kunig, G., del Barrio Alba, A., de Yebenes, J.G., Vontobel, P., and Leenders, K.L. (2000). Bradykinesia in early Huntington's disease. *Neurology* 54, 119-125.

Sathasivam, K., Lane, A., Legleiter, J., Warley, A., Woodman, B., Finkbeiner, S., Paganetti, P., Muchowski, P.J., Wilson, S., and Bates, G.P. (2010). Identical oligomeric and fibrillar structures captured from the brains of R6/2 and knock-in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 19, 65-78.

Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95, 55-66.

Schaffar, G., Breuer, P., Boteva, R., Behrends, C., Tzvetkov, N., Strippel, N., Sakahira, H., Siegers, K., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2004). Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol Cell* 15, 95-105.

Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90, 549-558.

Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G.P., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4604-4609.

Schilling, B., Gafni, J., Torcassi, C., Cong, X., Row, R.H., LaFevre-Bernt, M.A., Cusack, M.P., Ratovitski, T., Hirschhorn, R., Ross, C.A., et al. (2006). Huntingtin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. Modulation of cleavage and toxicity. *J Biol Chem* 281, 23686-23697.

Schilling, G., Savonenko, A.V., Klevytska, A., Morton, J.L., Tucker, S.M., Poirier, M., Gale, A., Chan, N., Gonzales, V., Slunt, H.H., et al. (2004). Nuclear-targeting of mutant huntingtin fragments produces Huntington's disease-like phenotypes in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 13, 1599-1610.

- Seong, I.S., Woda, J.M., Song, J.J., Lloret, A., Abeyrathne, P.D., Woo, C.J., Gregory, G., Lee, J.M., Wheeler, V.C., Walz, T., et al. (2010). Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Hum Mol Genet* 19, 573-583.
- Serysheva, I., Ludtke, S.J., Baker, M.L., Cong, Y., Topf, M., Eramian, D., Sali, A., Hamilton, S.L., and Chiu, W. (2008). Subnanometer-resolution electron cryomicroscopy-based domain models for the cytoplasmic region of skeletal muscle RyR channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9610-9615.
- Shao, J., and Diamond, M.I. (2007). Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2, R115-123.
- Sittler, A., Walter, S., Wedemeyer, N., Hasenbank, R., Scherzinger, E., Eickhoff, H., Bates, G.P., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1998). SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyGln-containing protein aggregates. *Mol Cell* 2, 427-436.
- Slow, E.J., Graham, R.K., Osmand, A.P., Devon, R.S., Lu, G., Deng, Y., Pearson, J., Vaid, K., Bissada, N., Wetzel, R., et al. (2005). Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11402-11407.
- Smith, R., Bacos, K., Fedele, V., Soulet, D., Walz, H.A., Obermuller, S., Lindqvist, A., Bjorkqvist, M., Klein, P., Onnerfjord, P., et al. (2009). Mutant huntingtin interacts with {beta}-tubulin and disrupts vesicular transport and insulin secretion. *Hum Mol Genet* 18, 3942-3954.
- Southwell, A.L., Khoshnan, A., Dunn, D.E., Bugg, C.W., Lo, D.C., and Patterson, P.H. (2008). Intrabodies binding the proline-rich domains of mutant huntingtin increase its turnover and reduce neurotoxicity. *J Neurosci* 28, 9013-9020.
- Squitieri, F., Cannella, M., Simonelli, M., Sassone, J., Martino, T., Venditti, E., Ciammola, A., Colonnese, C., Frati, L., and Ciarmiello, A. (2009). Distinct brain volume changes correlating with clinical stage, disease progression rate, mutation size, and age at onset prediction as early biomarkers of brain atrophy in Huntington's disease. *CNS Neurosci Ther* 15, 1-11.
- Squitieri, F., Frati, L., Ciarmiello, A., Lastoria, S., and Quarrell, O. (2006). Juvenile Huntington's disease: does a dosage-effect pathogenic mechanism differ from the classical adult disease? *Mech Ageing Dev* 127, 208-212.
- Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., et al. (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntingtin's disease pathology. *Science* 304, 100-104.
- Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., et al. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739-743.
- Stoffers, D., Sheldon, S., Kuperman, J.M., Goldstein, J., Corey-Bloom, J., and Aron, A.R. (2010). Contrasting gray and white matter changes in preclinical Huntington disease: an MRI study. *Neurology* 74, 1208-1216.
- Street, V.A., Bosma, M.M., Demas, V.P., Regan, M.R., Lin, D.D., Robinson, L.C., Agnew, W.S., and Tempel, B.L. (1997). The type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene is altered in the opisthotonos mouse. *J Neurosci* 17, 635-645.

Strehlow, A.N., Li, J.Z., and Myers, R.M. (2007). Wild-type huntingtin participates in protein trafficking between the Golgi and the extracellular space. *Hum Mol Genet* 16, 391-409.

Strong, T.V., Tagle, D.A., Valdes, J.M., Elmer, L.W., Boehm, K., Swaroop, M., Kaatz, K.W., Collins, F.S., and Albin, R.L. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5, 259-265.

Sun, B., Fan, W., Balciunas, A., Cooper, J.K., Bitan, G., Steavenson, S., Denis, P.E., Young, Y., Adler, B., Daugherty, L., et al. (2002). Polyglutamine repeat length-dependent proteolysis of huntingtin. *Neurobiol Dis* 11, 111-122.

Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P.H., and Liu, Y.F. (2001). Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 276, 24713-24718.

Suopanki, J., Gotz, C., Lutsch, G., Schiller, J., Harjes, P., Herrmann, A., and Wanker, E.E. (2006). Interaction of huntingtin fragments with brain membranes--clues to early dysfunction in Huntington's disease. *J Neurochem* 96, 870-884.

Swayne, L.A., and Braun, J.E. (2007). Aggregate-centered redistribution of proteins by mutant huntingtin. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 39-44.

Szebenyi, G., Morfini, G.A., Babcock, A., Gould, M., Selkoe, K., Stenoien, D.L., Young, M., Faber, P.W., MacDonald, M.E., McPhaul, M.J., et al. (2003). Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. *Neuron* 40, 41-52.

T

Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2008). Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet* 17, 345-356.

Takahashi, Y., Okamoto, Y., Popiel, H.A., Fujikake, N., Toda, T., Kinjo, M., and Nagai, Y. (2007). Detection of polyglutamine protein oligomers in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* 282, 24039-24048.

Takano, H., and Gusella, J.F. (2002). The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF- κ B/Rel/dorsal family transcription factor. *BMC Neurosci* 3, 15.

Tang, T.S., Tu, H., Chan, E.Y., Maximov, A., Wang, Z., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and 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.

Tarlac, V., and Storey, E. (2003). Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res* 74, 406-416.

Tartari, M., Gissi, C., Lo Sardo, V., Zuccato, C., Picardi, E., Pesole, G., and Cattaneo, E. (2008). Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Mol Biol Evol* 25, 330-338.

Thakur, A.K., Jayaraman, M., Mishra, R., Thakur, M., Chellgren, V.M., Byeon, I.J., Anjum, D.H., Kodali, R., Creamer, T.P., Conway, J.F., et al. (2009). Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 16, 380-389.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.

Trejo, A., Tarrats, R.M., Alonso, M.E., Boll, M.C., Ochoa, A., and Velasquez, L. (2004). Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. *Nutrition* 20, 192-196.

Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E.C., and Mandel, J.L. (1995a). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet* 10, 104-110.

Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., David, G., Tora, L., et al. (1995b). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature* 378, 403-406.

Trushina, E., Dyer, R.B., Badger, J.D., 2nd, Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., et al. (2004). Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 24, 8195-8209.

V

Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P., Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44, 559-577.

W

Wacker, J.L., Zareie, M.H., Fong, H., Sarikaya, M., and Muchowski, P.J. (2004). Hsp70 and Hsp40 attenuate formation of spherical and annular polyglutamine oligomers by partitioning monomer. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1215-1222.

Wang, C.E., Zhou, H., McGuire, J.R., Cerullo, V., Lee, B., Li, S.H., and Li, X.J. (2008). Suppression of neuropil aggregates and neurological symptoms by an intracellular antibody implicates the cytoplasmic toxicity of mutant huntingtin. *J Cell Biol* 181, 803-816.

Wanker, E.E., Rovira, C., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Walter, S., Tait, D., Colicelli, J., and Lehrach, H. (1997). HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet* 6, 487-495.

Warby, S.C., Chan, E.Y., Metzler, M., Gan, L., Singaraja, R.R., Crocker, S.F., Robertson, H.A., and Hayden, M.R. (2005). Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. *Hum Mol Genet* 14, 1569-1577.

Warby, S.C., Doty, C.N., Graham, R.K., Carroll, J.B., Yang, Y.Z., Singaraja, R.R., Overall, C.M., and Hayden, M.R. (2008). Activated caspase-6 and caspase-6-cleaved fragments of huntingtin specifically colocalize in the nucleus. *Hum Mol Genet* 17, 2390-2404.

Weiss, A., Klein, C., Woodman, B., Sathasivam, K., Bibbel, M., Regulier, E., Bates, G.P., and Paganetti, P. (2008). Sensitive biochemical aggregate detection reveals aggregation onset before symptom development in cellular and murine models of Huntington's disease. *J Neurochem* 104, 846-858.

Wexler, N.S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., Marder, K., Penchaszadeh, G., Roberts, S.A., Gayan, J., et al. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3498-3503.

Wexler, N.S., Young, A.B., Tanzi, R.E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J.B., Snodgrass, S.R., Shoulson, I., Gomez, F., Ramos Arroyo, M.A., et al. (1987). Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 326, 194-197.

White, J.K., Auerbach, W., Duyao, M.P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., and MacDonald, M.E. (1997). Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* 17, 404-410.

Wolfram, F., Morris, E., and Taylor, C.W. (2010). Three-dimensional structure of recombinant type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochem J* 428, 483-489.

Wu, L.L., Fan, Y., Li, S., Li, X.J., and Zhou, X.F. (2010). Huntingtin-associated protein-1 interacts with pro-brain-derived neurotrophic factor and mediates its transport and release. *J Biol Chem* 285, 5614-5623.

Wu, L.L., and Zhou, X.F. (2009). Huntingtin associated protein 1 and its functions. *Cell Adh Migr* 3, 71-76.

X

Xia, J., Lee, D.H., Taylor, J., Vandelft, M., and Truant, R. (2003). Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. *Hum Mol Genet* 12, 1393-1403.

Y

Yanai, A., Huang, K., Kang, R., Singaraja, R.R., Arstikaitis, P., Gan, L., Orban, P.C., Mullard, A., Cowan, C.M., Raymond, L.A., et al. (2006). Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nat Neurosci* 9, 824-831.

Yang, W., Dunlap, J.R., Andrews, R.B., and Wetzel, R. (2002). Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet* 11, 2905-2917.

Z

Zala, D., Colin, E., Rangone, H., Liot, G., Humbert, S., and 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, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., and Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11, 155-163.

Zhang, X., Smith, D.L., Meriin, A.B., Engemann, S., Russel, D.E., Roark, M., Washington, S.L., Maxwell, M.M., Marsh, J.L., Thompson, L.M., et al. (2005). A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 892-897.