



**HAL**  
open science

# Dopamine et dégénérescence des neurones striataux dans la maladie de Huntington : vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques

Delphine Charvin

► **To cite this version:**

Delphine Charvin. Dopamine et dégénérescence des neurones striataux dans la maladie de Huntington : vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00069699v2

**HAL Id: tel-00069699**

**<https://theses.hal.science/tel-00069699v2>**

Submitted on 17 Jul 2006

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

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

Thèse de doctorat de l'Université Paris VI

Spécialité : Neurosciences

Delphine Charvin

**Dopamine et dégénérescence des neurones striataux  
dans la maladie de Huntington :  
vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques**

Soutenue le 5 Décembre 2005

devant le jury composé de :

Mme le Dr Jocelyne Caboche,  
M. le Dr Emmanuel Brouillet,  
M. le Dr Frédéric Saudou,  
Mme le Dr Alexandra Dürr,  
M. le Dr Philippe Vernier,  
M. le Pr Jean Mariani,

Directrice de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Examineur

Thèse de doctorat de l'Université Paris VI

Spécialité : Neurosciences

Delphine Charvin

**Dopamine et dégénérescence des neurones striataux dans  
la maladie de Huntington :  
vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques**

Soutenue le 5 Décembre 2005

devant le jury composé de :

Mme le Dr Jocelyne Caboche,	Directrice de thèse
M. le Dr Emmanuel Brouillet,	Rapporteur
M. le Dr Frédéric Saudou,	Rapporteur
Mme le Dr Alexandra Dürr,	Examinatrice
M. le Dr Philippe Vernier,	Examineur
M. le Pr Jean Mariani,	Examineur

## Résumé

La maladie de Huntington (MH) résulte d'une expansion de glutamines dans la protéine huntingtine. Cette mutation lui confère de nouvelles propriétés, dont celle de s'agrèger et de produire une neurodégénérescence, qui malgré l'expression ubiquitaire de la huntingtine mutée, est spécifique du striatum. L'objectif de ce travail consistait à explorer le rôle de la dopamine dans cette vulnérabilité striatale. Après avoir démontré que la huntingtine mutée est capable d'activer la voie pro-apoptotique JNK/cJun dans des cultures primaires de neurones striataux (Garcia, Charvin and Caboche, 2004), nous avons étudié l'influence de la dopamine dans ce modèle neuronal. Nous avons alors montré que la dopamine i) active la voie pro-apoptotique JNK/cJun en synergie avec la huntingtine mutée *via* la production de radicaux libres, ii) augmente la formation d'agrégats *via* l'activation des récepteurs D2, iii) augmente la toxicité de la huntingtine mutée à travers ces deux effets combinés. Ainsi, nos résultats suggèrent que la dopamine concourt à la vulnérabilité des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée (Charvin *et al.*, 2005). Nous avons ensuite évalué *in vivo* l'effet thérapeutique d'un traitement précoce avec un antagoniste des récepteurs D2 dans un modèle murin de MH. Chez des rats infectés dans le striatum par des lentivirus exprimant la huntingtine normale ou mutée, nous avons montré que l'halopéridol décanoate retarde la formation des agrégats et protègent les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée (Charvin *et al.*, soumis). Ces travaux mettent en évidence un rôle potentialisateur de la dopamine dans la vulnérabilité des neurones striataux à la huntingtine mutée et ouvrent des perspectives nouvelles de thérapies pour la MH.

Mots clés : vulnérabilité striatale, agrégats, cJun-N terminal Kinase, récepteurs D2, radicaux libres, halopéridol.

---

Dopamine and striatal neurodegeneration in Huntington's disease : towards the identification of new therapeutic targets.

Huntington's disease (HD) is caused by a polyglutamine expansion in the huntingtin protein. This mutation confers new properties on this protein, including the ability to form aggregates and to produce a selective degeneration of striatal neurons, despite a ubiquitous expression of mutated huntingtin. The aim of this work was to explore the role of dopamine in this striatal vulnerability. We first set up an experimental model, using transient transfection in primary cultures of striatal neurons. We showed in that model an activation of the pro-apoptotic JNK/cJun pathway by mutated huntingtin (Garcia, Charvin and Caboche, 2004). In a second step, we combined treatments with low doses of dopamine and showed i) a potentiation, *via* reactive oxygen species (ROS), of JNK/cJun activation induced by mutated huntingtin ; ii) an increase of aggregate formation *via* D2 receptor stimulation, iii) an amplification of neuronal toxicity *via* these two combined effects. Thus, our data strongly support that dopamine is involved in striatal neuron vulnerability in HD (Charvin *et al.*, 2005). Then, we have evaluated *in vivo*, the therapeutic effects of a D2 antagonist treatment in a rat model of HD. Rats were infected into the striatum with lentivirus expressing either normal or mutated huntingtin. An early treatment with haloperidol decanoate showed a protection against both aggregate formation and striatal dysfunction (Charvin *et al.*, soumis). Our results highlight a key role of dopamine in striatal neurons vulnerability in HD, and offer new therapeutic strategies for the treatment of HD.

Key words : striatal vulnerability, aggregates, cJun-N terminal Kinase, D2 receptors, reactive oxygen species, haloperidol.

---

---

## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Dr Emmanuel Brouillet et le Dr Frédéric Saudou d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie pour le temps passé à la lecture critique de mon manuscrit. Je remercie tout aussi vivement le Dr Philippe Vernier et le Dr Alexandra Dürr pour leur disponibilité et l'intérêt accordé à mon travail.

Je tiens à remercier tout spécialement le Pr Jean Mariani, d'une part d'avoir accepté de participer à mon jury, et surtout de m'avoir accueillie dans son unité au début de ma thèse. Merci pour vos qualités humaines et votre grande disponibilité.

Jocelyne, je te remercie de m'avoir fait confiance en m'accueillant dans ton équipe pour réaliser ma thèse. Je me souviendrai toujours de nos premiers moments ensemble, où nous préparions mon oral pour l'allocation ministérielle, au milieu des travaux du 6<sup>ème</sup> étage, avec un ordinateur sur roulettes pour changer de bureau en fonction des coupures d'électricité ! Je te remercie de m'avoir confié un projet de thèse si passionnant, et surtout, je te remercie pour tous les bons moments que nous avons vécus. J'ai adoré nos séances de réflexion autour d'articles, en essayant de tout résoudre par de magnifiques schémas, souvent très compliqués ! Merci de m'avoir soutenue un soir, vers 23h, lorsque je me suis retrouvée coincée au labo, devant la porte close de la pièce culture où je devais faire ma manip... ! Merci également pour ton soutien moral lorsque je devais passer mes journées au microscope, dans le noir, pour prendre, manuellement, mes quelques 48.000 photos (je ne suis pas très loin du compte !) que je devais ensuite analyser une par une... Mais surtout, Jocelyne, je te remercie pour tes grandes qualités humaines, ta compréhension, ton soutien, ton énergie, ton enthousiasme, tes paroles encourageantes et reconfortantes. Tu as le cœur sur la main et le bien-être de tes étudiants est une réelle préoccupation pour toi. Merci pour tout cela. J'ai toujours été admirative de ton parcours professionnel et j'ai beaucoup appris à tes côtés.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe, auprès desquels j'ai vécu cette belle expérience qu'est la thèse. Christiane, je te remercie pour ton amitié et pour notre complicité qui égayaient mes journées. Merci d'avoir partagé avec moi « l'aventure des cerveaux jaunes » ! Je t'avais dit que ce serait une belle aventure, même si elle était loin d'être facile ! Je te remercie pour ton dévouement, ta gentillesse et merci de m'avoir transmis un peu de ton savoir en histologie. Jérémie, nous avons partagé beaucoup de choses pendant ces trois années. Je te remercie pour ta confiance, et merci de m'avoir autant fait rire. Je te préviens, je tiens à être là le jour de ta thèse jéjé ! J'ai beaucoup apprécié toutes nos discussions, nos « pauses » comme tu dis. Tu es un passionné de ton domaine et je te souhaite longue route. Peter, et son inséparable Pierre, je vous remercie pour votre amitié, merci de m'avoir fait rire, de m'avoir conseillée et soutenue. Peter, merci pour ta sérénité et ton écoute. J'ai beaucoup apprécié de partager ton bureau et celui de Jocelyne. Sandrine, je te remercie pour ton soutien au moment de changer de laboratoire, de sujet, de ville après mon DEA. Ton amitié était très importante à ce moment particulier, et merci de m'avoir suivie dans l'aventure des MAP kinases ! Emmanuel, je te remercie pour ta présence et ton soutien dans les moments de doutes pour mes proches. Malheureusement, nous ne nous sommes souvent que croisés cette année. Bon courage pour la suite. Karen, nous n'avons pas eu l'occasion de beaucoup nous connaître, mais j'ai beaucoup apprécié ta sérénité et ta gentillesse.

Je remercie également très amicalement Charlotte et Eve pour leur aide si précieuse au moment de l'étude *in vivo*. Heureusement que je vous avais ! C'était très agréable de passer ces moments avec vous, vous êtes de supers stagiaires !

---

J'aimerais également remercier les personnes que je croisais au quotidien et qui contribuaient à mon envie de venir au labo chaque matin. Je commencerai par Fatiha, que je remercie pour son amitié, et pour notre complicité. J'ai adoré partager notre expérience de monitorat, et tout ce que nous avons en commun dans nos vies respectives. Merci pour tout Fatiha, tu m'as beaucoup apporté pendant cette thèse. Je remercie également Vanessa, notre « chef culture », pour nos discussions malheureusement trop rares mais toujours intéressantes, réconfortantes. Tu fais partie des personnes qui me manqueront le plus au laboratoire. Je remercie également Nicolas, pour ton écoute et ton humour. Merci à Rosine pour ton incroyable gentillesse, ta disponibilité et ton grand savoir que tu n'hésites pas à partager. Merci à mes copines Emeline et Nathalie, avec lesquelles j'ai découvert Fréjus et Vandôme mais surtout avec lesquelles j'ai partagé mon vécu de la thèse. Merci à Isabelle, Marie-Christine et Kim pour votre écoute, vos conseils et votre humour. Merci à Fred et Daniel d'avoir égayé mes journées ; merci à Eric pour ta gentillesse. Merci à tous pour vos sourires, Marie-Pierre, Coralie, Caroline, Géraldine, Nathalie, Ivrick, Julie et Thomas. Merci Bernard pour ta gentillesse et ton humour, et merci Alain, que je ne savais pas aussi avare de ragots !

Je remercie également Nicole Déglon, qui m'a permis de réaliser l'étude *in vivo* qui me tenait tant à cœur. Merci pour ton efficacité, ta confiance, et ton soutien à Lausanne. Je suis sûre que nous nous y recroiserons.

Je tiens enfin à remercier ma famille, et tout d'abord mes parents et mon frère, Sébastien, sans lesquels je ne serai peut-être pas parvenue à réaliser mes rêves. Merci à vous trois d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenue toutes ces années, et d'avoir partagé avec moi mes satisfactions et mes appréhensions. Moi aussi je suis fière de vous. Papa et maman, je vous dédie cette thèse car sans vous, je ne serai pas arrivée là. Sébastien, je te remercie encore pour cette très belle couverture. Je remercie sincèrement et profondément Béatrice, pour ton écoute et ton soutien dans les moments difficiles comme les moments de joie. Je remercie également ma belle famille, Marie-Claire, Akli, Sabrina, Viviane et René, pour l'intérêt que vous avez toujours porté à ce que je fais, au métier de la recherche, et merci pour vos encouragements constants.

Je remercierai pour terminer Sofiane, sans qui je ne me serai certainement pas épanouie à ce point. Je te remercie pour ton amour quotidien, et pour notre complicité qui ensoleille mes journées. Merci d'avoir écouté, chaque soir, mes petites histoires d'agrégats, de « pi-ci-djoun » et de t'être toujours intéressé à mes préoccupations scientifiques et métaphysiques ! Je te remercie enfin pour la belle preuve d'amour que tu me fais en me suivant en Suisse...

à mes parents...

## Table des matières

- Résumé ~ Abstract .....	i
- Remerciements .....	ii
- Liste des abréviations .....	1
- Avant-propos .....	3
- Introduction .....	5
1. La maladie de Huntington .....	5
1.1. Des sorcières de Salem à la Chorée de Huntington .....	5
1.2. Découverte de la huntingtine et épidémiologie de la maladie de Huntington .....	8
1.3. Aspects cliniques de la maladie de Huntington .....	12
1.4. Neuropathologie de la maladie de Huntington .....	15
1.5. Lien entre la chorée et la dégénérescence striatale .....	18
2. La huntingtine .....	21
2.1. A la recherche de fonctions pour la huntingtine .....	21
2.1.1. <i>La huntingtine, régulatrice de la transcription</i> .....	25
2.1.2. <i>La huntingtine, protéine d'endocytose et de transport des vésicules à clathrine</i> .....	27
2.1.3. <i>La huntingtine, plateforme protéique</i> .....	30
2.2. Huntingtine mutée : quand la taille prend de l'importance .....	32
3. Maladie de Huntington : perte ou gain de fonction d'une protéine ubiquitaire...	
<i>Pourquoi le striatum ?</i> .....	35
3.1. Diminution de la libération de BDNF par les neurones corticaux .....	35
3.2. Excitotoxicité et dysfonctionnement mitochondrial .....	37
3.3. Stress oxydatif et rôle de la dopamine : une piste encore peu explorée .....	41
3.4. Activation de voies de signalisation neurotoxiques dans le striatum .....	42
3.5. Formation d'agrégats insolubles .....	43
3.5.1. <i>La formation d'agrégats, une stratégie neuroprotectrice déployée en réponse à un stress cellulaire</i> .....	46
3.5.2. <i>La présence d'agrégats insolubles perturbe le fonctionnement cellulaire dans tous les compartiments neuronaux</i> .....	47
3.5.3. <i>Les agrégats, marqueurs directs ou indirects de stress cellulaire</i> .....	53
4. JNK et les maladies neurodégénératives .....	56
4.1. Qui est JNK ? .....	56
4.2. Implication de JNK dans les maladies neurodégénératives .....	63
4.2.1. <i>JNK impliquée dans la maladie d'Alzheimer</i> .....	63

---



4.2.2. <i>JNK impliquée dans la maladie de Parkinson</i> .....	64
4.3. JNK et maladie de Huntington .....	66
5. Dopamine : un neuromodulateur important dans le système nerveux central, qui peut devenir neurotoxique .....	68
5.1. Présentation de la dopamine : rôles physiologiques, distribution .....	68
5.2. Diversité des récepteurs dopaminergiques .....	70
5.3. Régulation des voies de signalisation intracellulaire par les récepteurs D1 et D2 dans le striatum .....	76
5.3.1. <i>Les récepteurs D1</i> .....	76
5.3.2. <i>Les récepteurs D2</i> .....	77
5.4. La dopamine, impliquée dans des conditions pathologiques .....	82
5.5. Dopamine et maladie de Huntington ? .....	84
- Résultats .....	88
Objectifs et stratégies de cette thèse .....	88
1. Article 1 .....	90
1.1. Présentation de l'étude et de ses objectifs .....	90
1.2. Apport de l'étude .....	104
1.2.1. <i>Caractérisation et validation de notre modèle in vitro de MH</i> .....	104
1.2.2. <i>Analyse de l'influence de la huntingtine sur l'activation de la voie                 JNK/c-Jun et implication de cette voie dans la toxicité de la huntingtine                 mutée</i> .....	105
1.3. Conclusion .....	105
2. Article 2 .....	106
2.1. Présentation de l'étude et de ses objectifs .....	106
2.2. Apport de l'étude .....	114
2.2.1. <i>Adaptation de notre modèle cellulaire permettant l'analyse de                 l'influence de la dopamine sur les effets de la huntingtine mutée dans                 les neurones striataux</i> .....	114
2.2.2. <i>Analyse de l'effet de la dopamine sur des neurones striataux exprimant                 la huntingtine mutée</i> .....	114
2.3. Conclusion et perspectives .....	116
3. Article 3 .....	118
3.1. Présentation de l'étude et de ses objectifs .....	118
3.2. Apport de l'étude .....	139
3.2.1. <i>Effet de l'halopéridol décanoate sur la formation d'agrégats de                 huntingtine mutée</i> .....	139
3.2.2. <i>Effet de l'halopéridol décanoate sur la dysfonction neuronale</i> .....	139

---

3.2.3. <i>Corrélation entre la formation d'agrégats de huntingtine mutée et la dysfonction neuronale</i> .....	139
3.3. Conclusion et perspectives .....	140
- Discussion générale .....	141
1. La dopamine : un neuromodulateur qui peut devenir toxique .....	141
2. La dopamine crée un stress oxydatif qui rend les neurones striataux plus vulnérables à la huntingtine mutée : implication de la voie JNK/c-Jun .....	143
3. L'activation des récepteurs dopaminergiques de type D2 rend les neurones striataux plus vulnérables à la huntingtine mutée .....	148
3.1. Récepteurs D2 et mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée .....	149
3.2. Récepteurs D2 et agrégats de huntingtine mutée .....	153
3.3. Effets des récepteurs D2 sur la mort et sur la formation d'agrégats : une relation de cause à effet ? .....	154
4. Traitement neuroleptiques : une « nouvelle » thérapie pour la maladie de Huntington ? .....	156
4.1. Suivi des personnes porteuses de la mutation MH .....	158
4.2. Détermination du stade pré-symptomatique à partir duquel il faudrait agir .....	158
4.3. Traitement à long terme avec l'halopéridol .....	159
- Conclusion & Perspectives .....	161
- Annexes .....	164
Annexe 1 :	
Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant Neuronal protein localized in the nucleus. Charvin <i>et al.</i> , <i>Hum.Mol.Gen.</i> , 2003 .....	164
Annexe 2 :	
Dopamine, dégénérescence striatale et maladie de Huntington. Charvin <i>et al.</i> , <i>Ass.Neuro-Psycho-Pharmacologie</i> , 2004 .....	172
Annexe 3 :	
A la recherche d'un rôle de la Dopamine dans la maladie de Huntington. Charvin et Caboche, <i>Médecine&amp;Sciences</i> , 2005 .....	178
- Références bibliographiques .....	183

---

## Liste des abréviations

3-NP :	acide 3-nitropropionique
6-OHDA :	6-hydroxydopamine
AMPC :	adénosine monophosphate cyclique
AP-1 :	activator protein-1
AP2 :	adaptor protein 2
ASK1 :	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF :	activating transcription factor
BDNF :	brain-derived neurotrophic factor
CA150 :	co-activator 150
CBP :	cAMP response-element binding protein (CREB)-binding protein
CBS :	cystathione $\beta$ -synthétase
CIP-4 :	Cdc42-interacting protein 4
CtBP :	C-terminal-binding protein
DOPAC :	acide 3,4-dihydroxyphenylacétique
FIP2 :	for 14,7K interacting protein
GABA :	acide gamma-aminobutyrique
GAPDH :	glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogenase
GPe/i :	globus pallidus externe/interne
GPCR :	G protein-coupled receptor
Grb2 :	growth factor receptor-binding protein 2
GRK :	G protein-coupled receptor kinases
GSK3 :	glycogène synthase kinase 3
GSTp :	glutathione S-transferase Pi
HAP1 :	huntingtin-associated protein 1
HEAT :	huntingtine, facteur d'Elongation 3, sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 2A et TOR1
HIP :	huntingtin-interacting protein
HIP1R :	HIP1-related protein
HSP :	heat shock protein
htt :	huntingtine
HYP :	huntingtin-yeast partner
IP <sub>3</sub> -R1 :	inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor type 1
IT15 :	interesting transcript 15
JIP :	JNK-interacting protein
JIV :	jour <i>in vitro</i>
JNK :	c-Jun N-terminal Kinase
KO :	knock-out, déficient pour un gène

MAO-B :	monoamine oxydase B
MAP2 :	microtubule-associated protein 2
MAPK :	mitogen activated protein kinase
MAP2K :	MAPK kinase
MAP3K :	MAP2K kinase
MEK :	mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase
MEKK :	MEK kinase
MH :	maladie de Huntington
MKK4/7 :	MAP kinase kinase 4/7
MLK :	mixed lineage kinase
MPTP :	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NcoR :	nuclear receptor co-repressor
NF- $\kappa$ B :	nuclear factor $\kappa$ B
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
NRSE :	neuron-restrictive silence element
PACSN1 :	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1
pcJun :	phospho-cJun, c-Jun phosphorylé
pJNK :	phospho-JNK, JNK phosphorylé
PKC :	protéine kinase C
PLC :	phospholipase C
polyQ :	répétition de glutamines
PP1 :	protéine phosphatase-1
PSD-95 :	post-synaptic density protein 95
RasGAP :	Ras GTPase-activating protein
REST :	RE1 silencer transcription factor
REST-NRSE :	repressor element-1 transcription factor-the neuron restrictive silencer element
RTK :	receptor tyrosine kinase
SAPK :	stress activated protein kinase
SDH :	succinate déshydrogénase
SH3GL3 :	SH3-containing GRB2-like protein 3
Shc :	src homology 2 domain containing
Sos :	son of sevenless
Sp1 :	specificity protein 1
SynGAP :	synaptic GTPase-activating protein
TAF <sub>II</sub> 130 :	TBP associated factor II 130
TAK1 :	TGF $\beta$ -activating kinase 1
TBP :	TATA box binding protein
TGF $\beta$ :	transforming growth factor $\beta$
TNF $\alpha$ :	tumor-necrosis factor $\alpha$
Trx :	thioredoxine

---

## Avant-propos

Conscience, émotions, usage du langage, mémoire, créativité, pensées abstraites... Les facultés donnant à l'homme sa spécificité dépendent de la plus complexe et la plus fascinante structure de notre corps : le cerveau. Les dysfonctionnements observés lors de maladies neurodégénératives mettent en évidence les capacités et l'organisation du cerveau. L'augmentation de la durée de vie de la population a fait émerger des maladies neurodégénératives qui prennent une place importante dans notre société. Parmi celles-là, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson comptent parmi les plus fréquentes. La maladie de Huntington est une autre de ces maladies neurodégénératives qui se déclarent le plus fréquemment chez l'adulte. Toutes ces pathologies sont caractérisées par une neurodégénérescence spécifique dans des structures cérébrales définies, les bases moléculaires de ces atteintes sélectives n'étant pas totalement élucidées.

La Chorée de Huntington est une maladie héréditaire incurable, caractérisée par des troubles moteurs de type mouvements anormaux, des troubles cognitifs et psychiatriques. Les symptômes se déclarent généralement entre trente-cinq et quarante-deux ans et le décès survient après quinze à vingt ans d'évolution. L'origine de cette maladie est une expansion de triplets CAG dans l'exon 1 du gène *HTT*, qui se traduit par une expansion de glutamines dans la partie N-terminale de la protéine huntingtine.

La huntingtine est une grosse protéine dont la fonction est toujours inconnue et qui possède de nombreux partenaires protéiques. Elle est exprimée de façon ubiquitaire et se localise aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme des cellules. La mutation à l'origine de la maladie de Huntington confère à la huntingtine de nouvelles propriétés, dont celle de former des agrégats intra-neuronaux. Bien que la huntingtine mutée soit exprimée dans toutes les cellules de l'organisme, la maladie de Huntington se caractérise principalement par la perte de neurones dans le striatum. Cette neurodégénérescence est progressive et constitue la base des symptômes de cette maladie, dont les mécanismes pathophysiologiques restent inconnus et les traitements symptomatiques.

L'origine de la vulnérabilité préférentielle des neurones striataux à la toxicité de la huntingtine mutée demeure une question à laquelle il semble difficile de trouver une réponse. L'environnement de ces cellules pourrait contribuer à cette situation. Ainsi, l'apport de BDNF par les afférences corticales, de même que l'innervation glutamatergique, pourraient être impliqués dans la vulnérabilité des neurones striataux. Ces neurones pourraient également comporter des éléments intrinsèques les rendant plus vulnérables que les autres cellules. En effet, les neurones striataux semblent souffrir d'un déficit énergétique qui leur est propre dans la maladie de Huntington. Ce sont également les

---

premières cellules dans lesquelles se forment les agrégats de huntingtine mutée. Enfin, ce sont les seules cellules qui activent la voie pro-apoptotique de JNK/c-Jun dans un modèle pharmacologique de la maladie de Huntington. Le module JNK/c-Jun est impliqué dans divers processus neurodégénératifs et pourrait participer à la mort des neurones striataux dans la maladie de Huntington.

Le striatum est la structure cérébrale qui reçoit la plus dense innervation dopaminergique. La dopamine est un neuromodulateur qui assure de multiples fonctions cérébrales, mais qui peut également devenir neurotoxique dans diverses situations pathologiques. Nous avons émis l'hypothèse que la massive innervation dopaminergique du striatum pourrait contribuer à la vulnérabilité préférentielle des neurones striataux dans le cadre de la maladie de Huntington.

## 1. La maladie de Huntington

### 1.1. Des sorcières de Salem à la Chorée de Huntington

En 1692, les habitants de Salem, un petit village situé dans le Massachusetts, aux États-Unis, observent, horrifiés, les étranges mouvements « danseurs » et les accès de colère de certains de leurs voisins. L'examen médical ne révèle aucun trouble physique et les traitements se montrent inefficaces. On en déduit que de tels comportements si anormaux sont l'œuvre de sorcières agissant au nom du diable, et l'on donne à ces troubles le nom de « Danse de Saint Guy ». Une véritable chasse aux sorcières commence alors dans ce village (Figure 1).



Figure 1 : Tableau représentant l'examen d'une « sorcière » pendant le procès des sorcières de Salem. T.H. Matteson, 1853.

Deux siècles plus tard, George Huntington (Figure 2), un jeune médecin de 22 ans, décrit pour la première fois la maladie dont souffraient certaines victimes de la chasse aux « sorcières ». Le 13 avril 1872, il publie dans une revue médicale un article fondateur intitulé « *On Chorea* » (De la Chorée) (Huntington, 2003). Le terme de « chorée » vient du grec « *khoreia* », la danse, évoquant les mouvements incontrôlés et convulsifs des personnes atteintes. La description faite par George Huntington est alors remarquablement précise et concise et permet une très juste introduction à la maladie qui portera son nom.

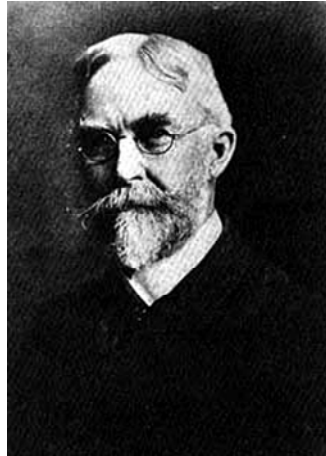


Figure 2 : Portrait du Dr George Huntington (1850-1916).

George Huntington définit ce nouveau type de chorée par trois particularités : « 1. *Son caractère héréditaire.* 2. *Une tendance à la démence et au suicide.* 3. *Son apparition en tant que maladie grave seulement à l'âge adulte.* » Il fait également une très juste description des symptômes de cette chorée et de son évolution.

#### La maladie de Huntington (MH) est héréditaire

« *Quand l'un ou les deux parents ont montré des manifestations de la maladie, et plus spécialement quand ces manifestations ont été d'une nature sérieuse, presque inévitablement un ou plusieurs descendants souffrent de la maladie, s'ils vivent à l'âge adulte. Mais si par chance ces enfants vivent leur vie sans cela, le fil est rompu et les petits-enfants et arrière-petits-enfants [...] peuvent être assurés d'être libérés de la maladie.* »

George Huntington décrit ainsi la transmission héréditaire à caractère autosomique dominant de la maladie. Cette description est remarquable à une époque où les connaissances en génétique sont encore minces, le support de l'hérédité (les chromosomes) n'étant pas encore connu, et les travaux de Mendel sur les lois de l'hérédité étant passés inaperçus (Mendel, 1865).

#### La MH mène à la démence

« *Au fur et à mesure que la maladie progresse, l'esprit s'altère plus ou moins, menant à la démence pour beaucoup, alors que chez d'autres l'esprit et le corps faiblissent tous deux graduellement jusqu'à ce que la mort les délivre de leurs souffrances.* »

Le deuxième aspect de la maladie que George Huntington décrit est l'apparition d'une démence et un changement de personnalité. Les changements d'humeur sont souvent les premiers signes perçus par l'entourage des patients atteints de MH.



### La MH est une maladie de l'adulte

« Sa troisième particularité est son apparition, du moins en tant que maladie grave, à l'âge adulte uniquement. Je ne connais pas un seul cas qui a montré quelque signe de chorée avant l'âge de trente ou quarante ans, alors que ceux qui ont passé la quarantième année sans aucun symptôme de la maladie, sont rarement atteints. »

La MH est généralement une maladie de l'adulte. Les premiers symptômes apparaissent en moyenne entre 35 et 42 ans (Quinn and Schrag, 1998). Cependant, la maladie peut se déclarer à n'importe quel âge et 7% des cas concernent une forme juvénile de MH, dont les symptômes apparaissent avant l'âge de 21 ans (Figure 3).

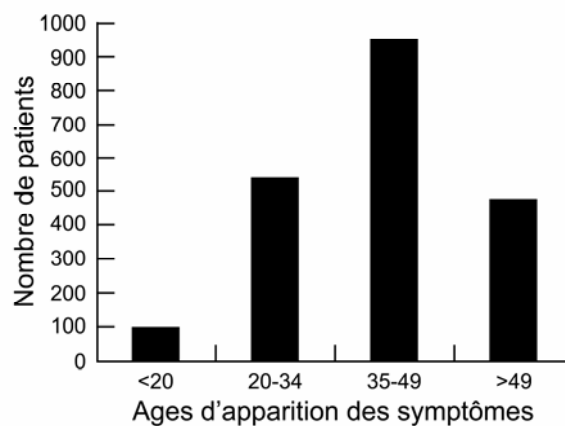


Figure 3 : Distribution de l'âge d'apparition des symptômes de la MH. Données obtenues d'après un échantillon de 2068 patients, collectées dans le cadre de la « *National Research Roster for Huntington Disease Patients and Families* », Indiana University. D'après (Foroud et al., 1999).

### La MH se caractérise par des mouvements anormaux

« Cela commence comme une chorée ordinaire peut commencer, par l'activité irrégulière et spasmodique de certains muscles, comme ceux du visage, des bras, etc. Ces mouvements augmentent graduellement, lorsque les muscles jusqu'ici non affectés adoptent l'activité spasmodique, jusqu'à ce que tous les muscles du corps soient affectés (à l'exception des muscles involontaires), et le pauvre patient présente un spectacle qui est tout sauf plaisant pour celui qui en est témoin. »

Le commencement de la MH est défini par la survenue des symptômes moteurs. Le plus souvent, l'affection qui amène les malades à consulter un médecin est l'apparition « d'une maladresse », « d'un tremblement », « d'un trouble de l'équilibre » ou « de tics ». La première anomalie de mouvement involontaire, et souvent le premier symptôme, est la chorée, qui correspond à des mouvements continus et désordonnés (Margolis and Ross, 2003). C'est à cause de ces mouvements involontaires qu'au XVIIème siècle, ces malades

étaient considérés comme possédés par le diable et qu'ils étaient brûlés, comme le furent les « sorcières » de Salem.

La MH est une maladie fatale et incurable

« *Je n'ai jamais connu de rétablissement ni même d'amélioration des symptômes dans cette forme de chorée [...]. Aucun traitement ne semble être d'aucune utilité, et effectivement de nos jours sa fin est si bien connue par le souffrant et ses amis, qu'un avis médical est rarement recherché. Elle semble enfin être l'une des maladies incurables.* »

Malheureusement, plus d'un siècle après cette description de la maladie par George Huntington, et plus de dix ans après la découverte du gène en cause dans la MH, il n'existe toujours pas de traitement efficace et cette maladie conduit inexorablement à la mort.

## 1.2. Découverte de la huntingtine et épidémiologie de la maladie de Huntington

La MH est exceptionnellement fréquente dans un village du Venezuela

En 1972, l'histoire de la MH prend un nouveau tournant lorsque, à l'occasion d'une conférence médicale, un médecin vénézuélien, Americo Negrette, montre un film qu'il a réalisé sur les rives du lac Maracaibo, au Venezuela. Ce film montre un village de pêcheurs où des familles entières sont touchées par « *le mal de San Vito* », comme l'appellent les habitants, et qu'il identifia comme étant la MH (Okun and Thommi, 2004). Il s'agit de la plus grande concentration connue de cette maladie. C'est alors que Nancy Wexler, chercheuse américaine dont la mère est atteinte de MH, décide d'étudier cette population. Elle reconstitue les pedigrees des familles atteintes de MH dans cette région (Figure 4), ce qui lui permet d'identifier 18.149 individus à travers 10 générations, dont 15.409 sont vivants. Cette population compte 83 familles indépendantes (sans ancêtre commun) qui sont toutes touchées par la MH. Parmi ces familles, l'une d'entre elles comprend 14.761 individus qui sont tous descendants d'une seule et même personne : Maria Concepción, qui vivait au début du XIX<sup>ème</sup> siècle (Wexler A., 1996).

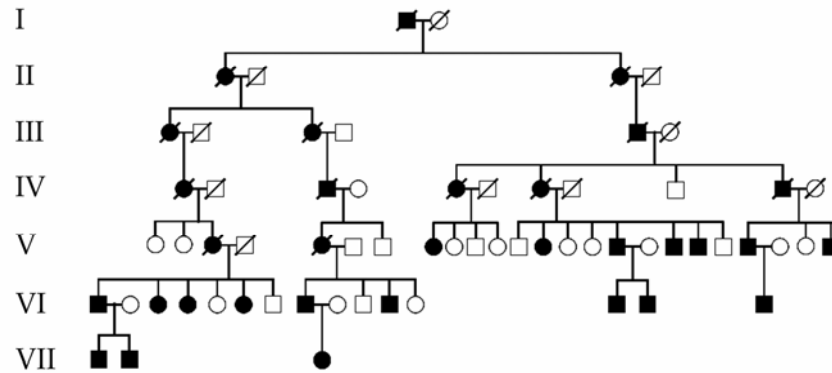


Figure 4 : Pedigree partiel d'une famille vénézuélienne dont de nombreux membres sont affectés par la MH. D'après (Gusella *et al.*, 1983).

La forte occurrence de la MH dans cette population conduit à la fondation du « *U.S.-Venezuela Collaborative Research Project* », un consortium international d'équipes de recherche dont Nancy Wexler est la principale investigatrice. Les échantillons sanguins des familles vénézuéliennes permettent à cette fondation de localiser, en 1983, le gène associé à la MH sur le bras court du chromosome 4 (Gusella *et al.*, 1983). Il faudra attendre dix ans pour que ce gène, et la mutation responsable de la pathologie soient identifiés, en 1993 (Group, 1993). Le gène de la MH fut appelé *IT15*, pour « *Interesting Transcript 15* ». Il est localisé sur le locus 4p16.3 (Figure 5) et code une protéine, appelée « huntingtine », dont les fonctions sont inconnues.

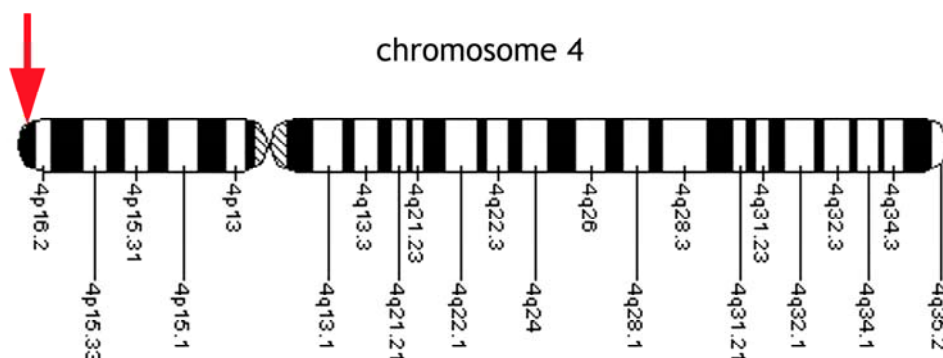


Figure 5 : Localisation du gène *IT15*, associé à la MH, sur le locus 4p16.3 (chromosome humain). La flèche indique la localisation du gène, à l'extrémité du bras court du chromosome 4 (Gene ID : 3064).

### La MH est une maladie à expansion de triplets

Le gène *IT15* contient une répétition de codons CAG qui est polymorphe et instable (Group, 1993). Cette répétition est située dans l'exon 1 du gène *IT15* et est donc traduit en une répétition de glutamines dans la partie N-terminale de la protéine huntingtine. La

mutation de ce gène qui entraîne la pathologie est une expansion de cette répétition dépassant le nombre de 40 triplets CAG.

### Epidémiologie de la MH

La prévalence de la MH en Europe de l'ouest et Amérique du nord est de 5 à 10 pour 100.000 personnes. Il s'agit de la plus fréquente des maladies neurodégénératives engendrées par une expansion de glutamines (Naarding *et al.*, 2001). En France, la MH touche 4 à 8 personnes sur 100.000, ce qui représente environ 6.000 malades et plus de 12.000 porteurs de la mutation provisoirement indemnes de signes cliniques (France, 2002).

Cette maladie monogénique se transmet par un mode autosomique dominant. L'homozygotie est très rare dans la MH, et le lien entre la dose de huntingtine mutée exprimée et les signes phénotypiques est donc difficile à établir. Quelques études suggèrent que, contrairement à la plupart des maladies génétiques, la MH présenterait une dominance complète, les homozygotes et les hétérozygotes présentant les mêmes phénotypes (âge d'apparition, sévérité et progression des symptômes) (Durr *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2002). Une autre étude suggère au contraire que chez les homozygotes, la MH progresse plus rapidement que chez les hétérozygotes, mais que l'âge d'apparition des symptômes serait équivalent (Squitieri *et al.*, 2003).

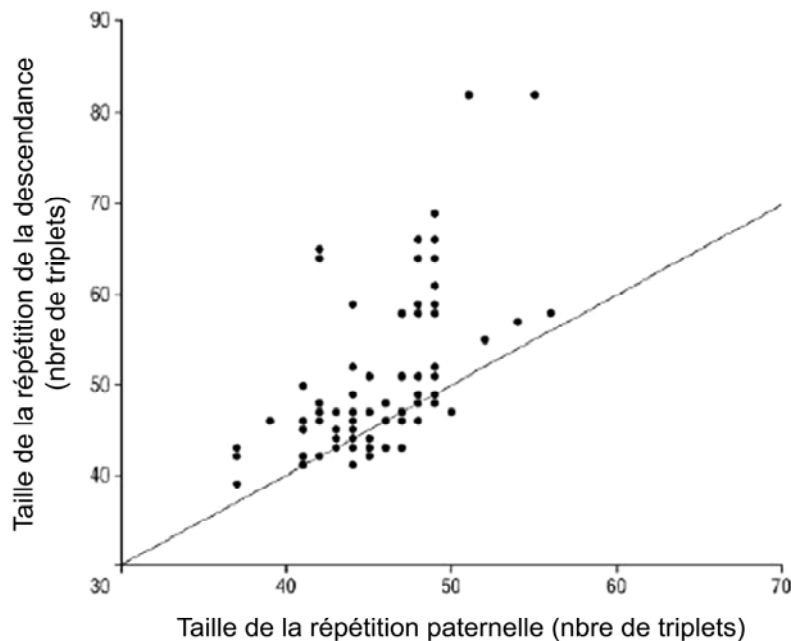


Figure 6 : Phénomène d'anticipation dans la MH.

Corrélation entre le nombre de triplets chez le descendant et le nombre de triplets chez son père. Les points au-dessus de la diagonale représentent les cas où la taille de la répétition de triplets augmente au cours de la transmission d'un père à son enfant. Notez la tendance de la taille de la répétition CAG à augmenter avec la transmission paternelle de la MH. Données obtenues d'après un échantillon de 84 couples père-enfant, collectées par le centre « *Huntington's Disease* » de Baltimore. D'après (Margolis and Ross, 2003).

L'expansion de triplets CAG rend les chromosomes instables, particulièrement lors de la méiose des gamètes mâles. Le nombre de répétitions CAG tend alors à augmenter au cours des générations successives, décrivant ainsi le phénomène d'anticipation qui caractérise la MH, et qui est d'avantage marqué lorsque la maladie est transmise par le père (Trottier *et al.*, 1994; Kremer *et al.*, 1995; Ranen *et al.*, 1995) (Figure 6).

Il existe une forte corrélation inverse entre la taille de la répétition CAG dans le gène *IT15* et l'âge d'apparition des symptômes : plus la répétition CAG est longue, plus les symptômes se déclarent précocement (Figure 7) (Kiebertz *et al.*, 1994; Wexler N. S. *et al.*, 2004).

Ainsi, l'âge d'apparition des symptômes de la MH dépend en partie de l'origine parentale de la transmission de la mutation : à cause du phénomène d'anticipation, la transmission paternelle de la MH favorise un âge d'apparition précoce par rapport à la transmission maternelle de la MH. Outre le nombre de répétitions CAG et l'origine parentale de la transmission de la mutation, il existe d'autres facteurs influençant l'âge d'apparition des symptômes de la MH, de nature génétique, tels que le génotype du gène codant le récepteur au glutamate GluR6 (Rubinsztein *et al.*, 1997), ou le polymorphisme de gènes modificateurs dont la ségrégation est liée à celle du gène *IT15* (Li *et al.*, 2003; Djousse *et al.*, 2004), ou de nature environnementale (Wexler N. S. *et al.*, 2004).

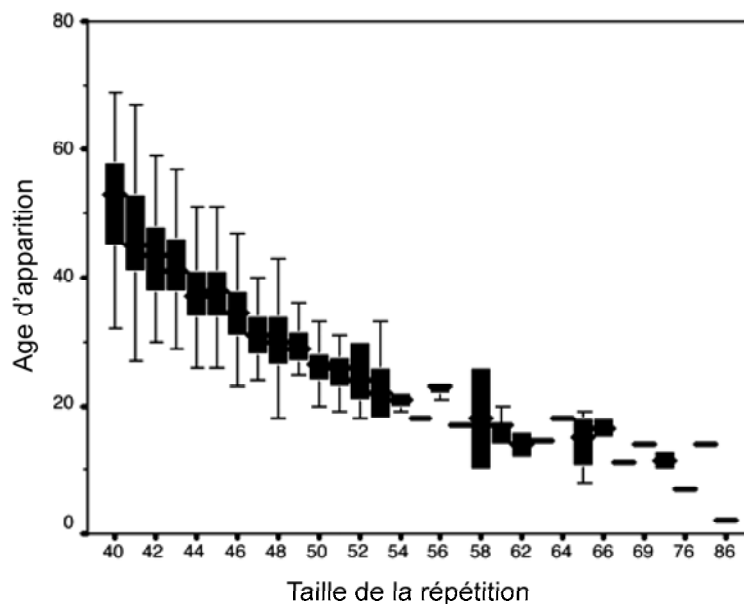


Figure 7 : Corrélation entre l'âge d'apparition des symptômes de la MH et la taille de la répétition de glutamines dans la protéine huntingtine. Notez la relation curviligne entre les deux variables. Notez également la large variabilité de l'âge d'apparition des symptômes, y compris pour une longueur de répétition donnée. D'après (Wexler N. S. *et al.*, 2004).

### 1.3. Aspects cliniques de la maladie de Huntington

La MH est une maladie neurodégénérative qui se déclare généralement entre 35 et 42 ans et qui conduit à la mort après 15 à 20 ans d'évolution. Comme George Huntington le décrivit initialement, cette maladie se caractérise par des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques qui évoluent de manière continue au fil du temps.

#### Changements de personnalité : apathie, agression, irritabilité

Caractérisée par l'indifférence ou la léthargie, l'apathie est l'un des troubles de la personnalité les plus fréquents dans la MH. Une personne apathique semble ne plus avoir d'intérêt pour ce qui en avait pour elle jusque là. Elle perd son enthousiasme et sa spontanéité. Certains patients atteints de MH perdent également la capacité à contrôler leurs émotions. L'instabilité émotionnelle devient évidente lors d'épisodes de colère ou de grande irritabilité. Le patient est facilement frustré et peut rapidement tomber dans une grande colère puis se calmer tout aussi rapidement.

Ces symptômes apparaissent souvent avant les signes moteurs et sont difficiles à vivre pour l'entourage des malades, qui a l'impression de ne plus avoir la même personne à ses côtés (<http://www.wemove.org/>) (Dewhurst *et al.*, 1970; Burns *et al.*, 1990; Jensen *et al.*, 1993 ; Naarding *et al.*, 2001).

#### Dépression

Les tentatives de suicide et le taux de dépression sont supposés être plus fréquents chez les porteurs de la mutation de la MH par rapport à la population générale, avant même l'apparition des troubles moteurs. Toutefois, une étude menée par Shiwach et Norbury montre qu'il n'y a pas d'augmentation de fréquence de désordres psychiatriques chez les porteurs de la mutation par rapport aux non-porteurs de la mutation dont les parents souffrent de MH (Shiwach and Norbury, 1994). Par contre, cette étude révèle que les personnes à risque connaissent souvent des épisodes de troubles psychiatriques qui sont probablement associés à l'incertitude d'avoir hérité de la mutation. Les auteurs concluent alors que la dépression n'est pas un indicateur significatif de la maladie.

#### Troubles cognitifs

Les troubles cognitifs apparaissent généralement sous la forme d'un ralentissement des processus intellectuels. Contrairement à la maladie d'Alzheimer, les patients atteints de MH ont des déficits dans la récupération des souvenirs mais pas dans le processus de mémorisation (Ho *et al.*, 2001).

Les patients atteints de MH ont des troubles du langage : troubles du décours temporel de la parole, dysarthrie, troubles de la syntaxe (Teichmann *et al.*, 2005). A un stade tardif, ils souffrent de troubles de compréhension (Bachoud-Levi *et al.*, 2001).

Les pertes cognitives s'accroissent progressivement et aux stades tardifs de la MH, les patients sont atteints d'une profonde démence (Ho *et al.*, 2001).

#### Troubles moteurs : mouvements anormaux

Il est difficile de déterminer précisément à quel moment la MH se déclare. On considère généralement qu'elle apparaît avec les premiers symptômes persistants d'anomalies motrices, qui peuvent être de différentes natures. Des troubles oculomoteurs, notamment de la saccade oculaire, sont souvent observés chez les patients aux stades précoces de la MH et peuvent être utilisés pour tester l'apparition de la maladie (Penney *et al.*, 1990; Berardelli *et al.*, 1999). D'ailleurs, dans la population vénézuélienne du lac Maracaibo, les familles disent que « la maladie entre par les yeux » (Quinn and Schrag, 1998). D'autres symptômes moteurs peuvent apparaître en premier et déterminer le début de la MH : des mouvements involontaires de la face, des doigts, des pieds ou du thorax.

Les troubles moteurs caractéristiques de la MH sont des mouvements choréiques typiques : involontaires, imprévisibles, brefs, irréguliers, arythmiques, assez stéréotypés, de grande amplitude, associés à une hypotonie et à une incoordination motrice à l'origine de troubles de l'équilibre et de difficultés de la marche. Ces mouvements caractéristiques sont présents chez 90% des patients. Ils se développent graduellement : ils sont initialement très discrets et difficiles à détecter, puis évoluent jusqu'à priver les malades de leur autonomie. Rigidité musculaire, bradykinésie et dystonie apparaissent progressivement et prédominent au stade final de la MH.

#### Particularité des formes juvéniles

Certains malades développent les premiers symptômes de MH avant l'âge de 21 ans. Ces formes juvéniles concernent environ 7% des malades MH. Elles sont caractérisées par des répétitions CAG dans le gène *IT15* exceptionnellement longues, atteignant généralement 60 triplets ou plus, sont pratiquement toujours transmises par le père et présentent un tableau clinique particulier. En effet, dans les formes juvéniles de MH, les patients présentent des symptômes moteurs proches de ceux de la maladie de Parkinson, souffrant de rigidité musculaire et de bradykinésie, en l'absence de chorée (Nance and Myers, 2001). Cette forme de la maladie est également appelée « variante Westphal » de la MH. Les signes typiquement associés aux formes juvéniles de MH sont un déclin soudain des performances scolaires, des changements dans l'écriture, des problèmes de comportements et

des crises d'épilepsie (<http://www.mdvu.org/library/disease/hd/>). Les formes juvéniles de MH présentent une progression relativement rapide comparée à celle des adultes.

### Complications de la MH

La perte de poids est l'une des caractéristiques des stades avancés de MH et n'est pas liée à une prise alimentaire insuffisante (Popovic *et al.*, 2004).

A cause de la profonde démence et de la dysfonction motrice progressive, les patients à un stade avancé de MH peuvent ne plus être capables de marcher, se nourrissent peu, cessent éventuellement de parler et deviennent incapables de s'occuper d'eux-mêmes. Les malades ne meurent pas de la MH elle-même mais de complications qui résultent de blessures engendrées par des chutes, d'une nutrition insuffisante, d'infection, d'étouffement, d'inflammation des poumons ou de défaillance cardiaque (Reed and Chandler, 1958) (Table 1).

Cause principale de décès	Pourcentage
Pneumonie	51,1
Autre maladie respiratoire	2,7
Infarctus du myocarde	2,7
Autre défaillance cardiaque	15,9
Autre maladie cardio-vasculaire	1,1
Cause non spécifiée	12,6
Lésions vasculaires du système nerveux central	5,5
Lésions non-vasculaires du système nerveux central (ex : méningite)	2,2
Maladies génito-urinaires (ex : défaillance rénale)	2,7
Maladies gastro-intestinales (ex : cancer du pancréas)	1,6
Suicide	1,6

Table 1 : Causes principales de décès des malades atteints de MH.

Les patients atteints de MH ont une durée de vie plus courte à cause de complications de la MH. Pneumonie et défaillance cardiaque sont les deux causes les plus fréquentes de mort chez ces malades. De plus, ces derniers ont un risque plus élevé d'étouffement et de complications respiratoires, de maladies gastro-intestinales et de suicide que la population générale. D'après (Reed and Chandler, 1958).



## 1.4. Neuropathologie de la maladie de Huntington

La MH est principalement une maladie du striatum

Le processus neurodégénératif de la MH commence dans le striatum, d'abord dans le noyau caudé puis dans le putamen. La neurodégénérescence évolue progressivement et touche, aux stades tardifs de la maladie, le cortex cérébral, au niveau des couches III, V et VI, dont les neurones se projettent sur le striatum (Hedreen *et al.*, 1991; Peschanski *et al.*, 1995). D'après les études réalisées en imagerie cérébrale, la durée de la maladie est fortement corrélée à l'atrophie du striatum, alors que la lésion du cortex cérébral est liée à l'âge du patient (Peschanski *et al.*, 1995).

Les cerveaux post-mortem de patients à des stades avancés de MH sont caractérisés par la dilatation des ventricules latéraux résultant de l'atrophie du striatum (Figure 8). La dégénérescence neuronale s'accompagne d'une forte réaction astrogliale (Robitaille *et al.*, 1997).

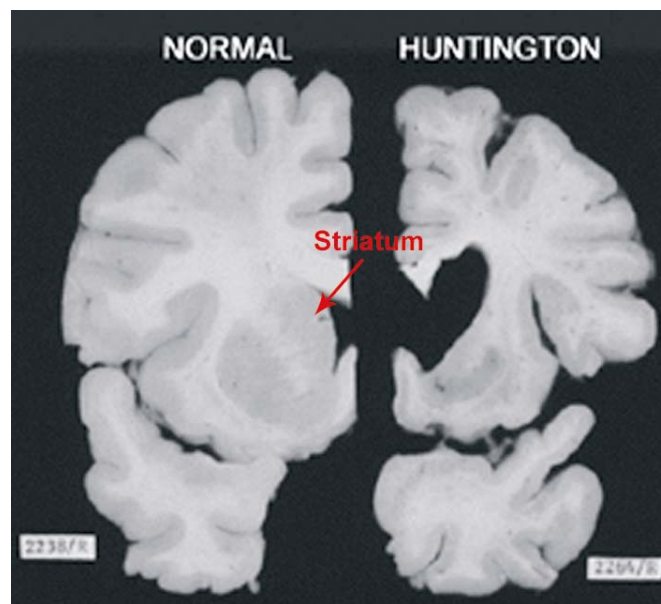


Figure 8 : Coupes frontales de demi-cerveaux *post-mortem* d'un individu contrôle (à gauche) et d'un patient atteint de MH (à droite).

Notez que le striatum (noyau caudé et putamen) est sévèrement atrophié sur le cerveau MH. Notez que le cortex cérébral est également atrophié à ce stade de la maladie.

En 1985, Vonsattel *et al.* proposent un système de gradation de la sévérité de l'atteinte neuropathologique reposant sur des critères macro- et micro-scopiques (Vonsattel *et al.*, 1985). Cinq grades ont été définis, du grade 0 (aucune anomalie neuropathologique discernable) au grade 4 (perte de 95% des neurones dans le noyau caudé). Les changements neuropathologiques dans le striatum progressent suivant les axes antéro-postérieur, latéro-médian, et ventro-dorsal au cours des grades 1 à 3, avec une dégénéres-

cence très sévère de tout le striatum au grade 4. Ces grades dans la MH qui sont définis par la neuropathologie du striatum sont étroitement corrélés à l'évolution des symptômes cliniques, ce qui associe effectivement la MH à une maladie du striatum (Myers *et al.*, 1988; Peschanski *et al.*, 1995).

La MH est caractérisée par la dégénérescence sélective des neurones épineux de taille moyenne

Le striatum n'est pas affecté de manière uniforme dans la MH. Les neurones de projection, qui sont des neurones épineux GABAergiques de taille moyenne et qui représentent plus de 95% des neurones striataux (Mitchell *et al.*, 1999), sont particulièrement vulnérables dans la MH (Graveland *et al.*, 1985). Au contraire, les interneurons sont préservés, y compris aux stades tardifs de la maladie (Ferrante *et al.*, 1985; Mitchell *et al.*, 1999). En 2000, Glass *et al.* montrent, par une étude de liaison de neurotransmetteur, que parmi les neurones de projection, ce sont les neurones qui expriment les récepteurs dopaminergiques de type D2 qui dégèrent les premiers dans la MH (Glass *et al.*, 2000) (Figure 9).

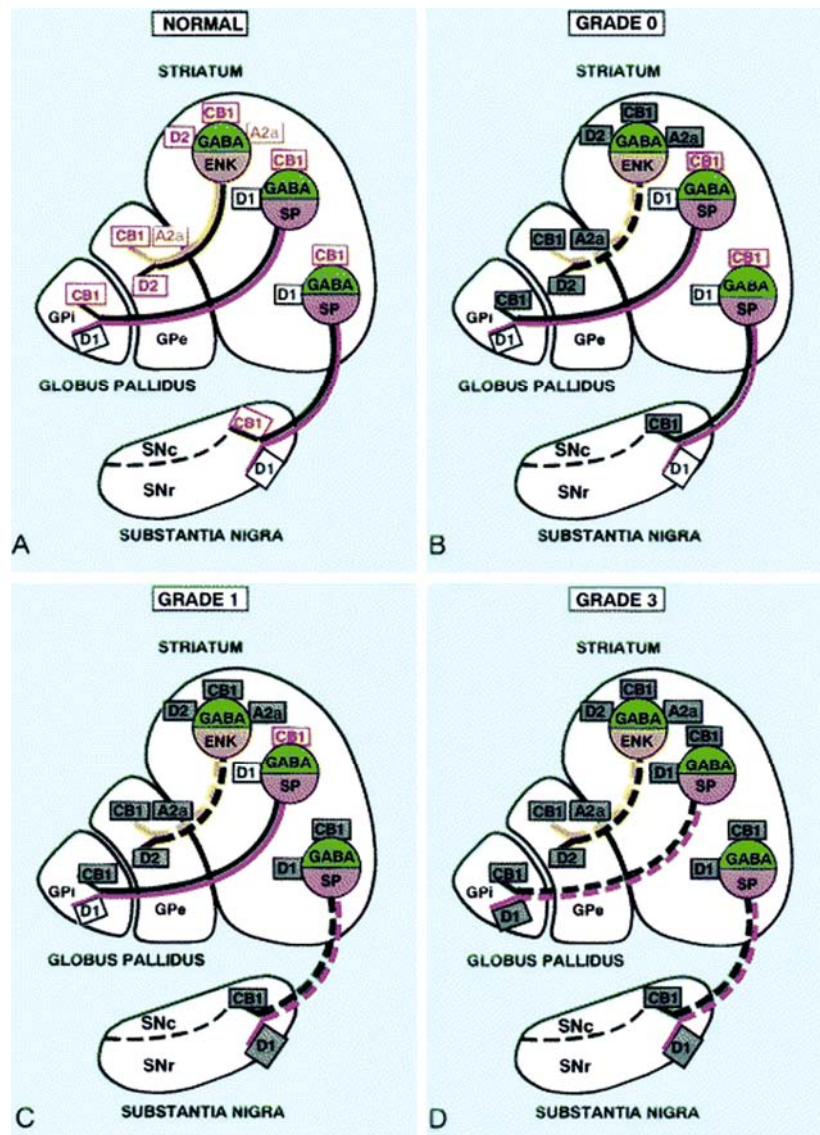


Figure 9 : Schéma résumant la relation entre le grade de la MH défini par Vonsattel et la dégénérescence des neurones striataux en fonction de leurs récepteurs membranaires. (A) Régionalisation des récepteurs membranaires neuronaux dans le striatum d'un individu contrôlé. (B) Grade 0 : début de dégénérescence des neurones striataux exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D2. (C) Grade 1 : début de dégénérescence des neurones striataux exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D1 et les récepteurs cannabinoïdes (CB1). (D) Grade 3 : dégénérescence de toutes les sous-populations de neurones épineux de taille moyenne dans le striatum. D'après (Glass *et al.*, 2000).

La MH est caractérisée par la présence d'agrégats intraneuronaux

Les cerveaux de patients atteints de MH sont caractérisés par la présence d'agrégats protéiques insolubles. Les maladies à expansion de glutamines sont typiquement associées à la présence de ce type d'agrégats, comme d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et ses corps de Lewy, la maladie d'Alzheimer et ses plaques amyloïdes ou encore la sclérose latérale amyotrophique et ses corps de Bunina (Bertram and Tanzi, 2005) (Figure 10).

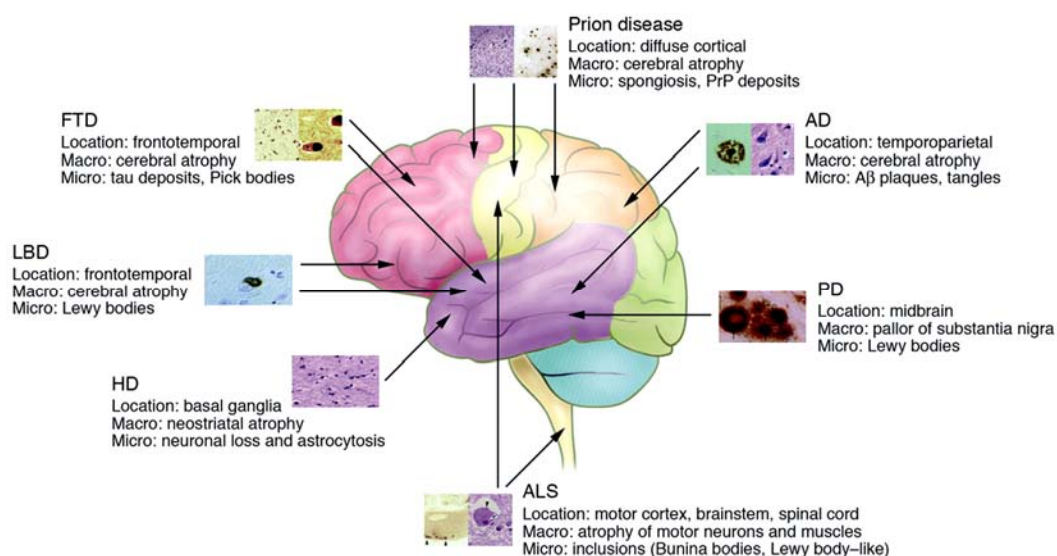


Figure 10 : Schéma récapitulatif de la localisation anatomique et des changements macro- et microscopiques caractéristiques de quelques maladies neurodégénératives marquées par la présence d'agrégats.

*HD* : maladie de Huntington, *LBD* : démence à corps de Lewy, *FTD* : démence fronto-temporal, *AD* : maladie d'Alzheimer, *PD* : maladie de Parkinson, *ALS* : sclérose latérale amyotrophique. D'après (Bertram and Tanzi, 2005).

Dans la MH, ces agrégats sont ubiquitinés et sont localisés dans le noyau ou le cytoplasme (soma et neurites) des neurones (DiFiglia *et al.*, 1997; Gutekunst *et al.*, 1999). Ils sont principalement présents dans le noyau caudé, le putamen et le cortex cérébral (Hoffner *et al.*, 2005).

### 1.5. Lien entre la chorée et la dégénérescence striatale

Le striatum est le plus large composant des ganglions de la base et en est la cible majeure des afférences corticales. Les ganglions de la base sont un ensemble de noyaux sous-corticaux qui ont un rôle direct dans le système moteur (Figure 11).

Cette anatomie place les ganglions de la base au premier plan pour influencer les fonctions exécutives du cortex frontal, telles que la planification des mouvements mais également certains comportements cognitifs (Graybiel, 2000). Les informations en provenance des aires frontales, préfrontales et pariétales du cortex traversent les ganglions de la base et retournent à l'aire motrice supplémentaire (AMS) via le thalamus (Figure 12).

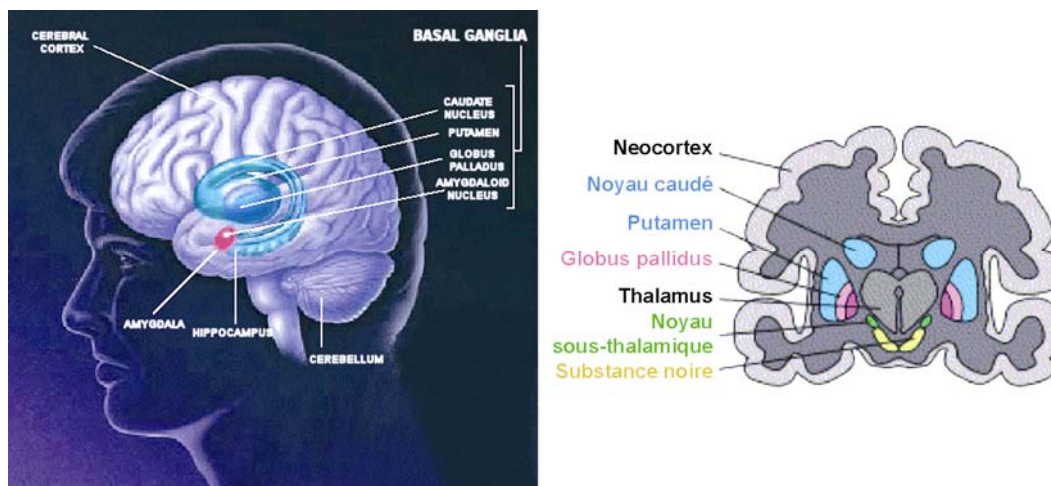


Figure 11 : Anatomie simplifiée du cerveau présentant les structures majeures des ganglions de la base : le striatum (noyau caudé + putamen), globus pallidus (segments externe et interne), noyau sous-thalamique et substance noire. D'après (Graybiel, 2000).

Albin *et al.* ont développé, en 1989, un modèle classique décrivant deux voies neuronales motrices majeures qui agissent en opposition et qui est, théoriquement, en accord avec les troubles moteurs observés dans la MH (Albin *et al.*, 1989). La « *voie directe* » provoque les mouvements par le relai de deux synapses inhibitrices successives : l'une entre le striatum et le globus pallidus interne (GPi), puis l'autre entre le GPi et le thalamus (Figure 12). Par cette voie, les afférences excitatrices du cortex désinhibent ainsi les neurones thalamiques. La « *voie indirecte* » inhibe les mouvements par quatre connections successives : synapse inhibitrice entre le striatum et le globus pallidus externe (GPe), puis synapse inhibitrice entre le GPe et le noyau sous-thalamique, synapse excitatrice entre le noyau sous-thalamique et le GPi, et enfin synapse inhibitrice entre le GPi et le thalamus. Cette voie maintient donc l'inhibition des neurones thalamiques. Par ce système, le striatum exerce une action facilitatrice sur le mouvement en focalisant les informations en provenance de différentes régions corticales sur l'AMS, via la voie directe. Il agit également comme un filtre bloquant la réalisation des mouvements lorsque ceux-ci sont inadaptés, via la voie indirecte.

Bien que les récepteurs dopaminergiques de types D1 et D2 soient colocalisés sur certains neurones striataux (Surmeier *et al.*, 1996), les récepteurs D1 sont principalement exprimés sur les neurones striataux de la voie directe et stimulent ainsi cette voie. Au contraire, les récepteurs dopaminergiques de type D2 sont principalement exprimés sur les neurones striataux de la voie indirecte et inhibent ainsi cette voie. Par ses afférences dopaminergiques, la substance noire joue alors un rôle régulateur de ce système moteur, via le striatum.

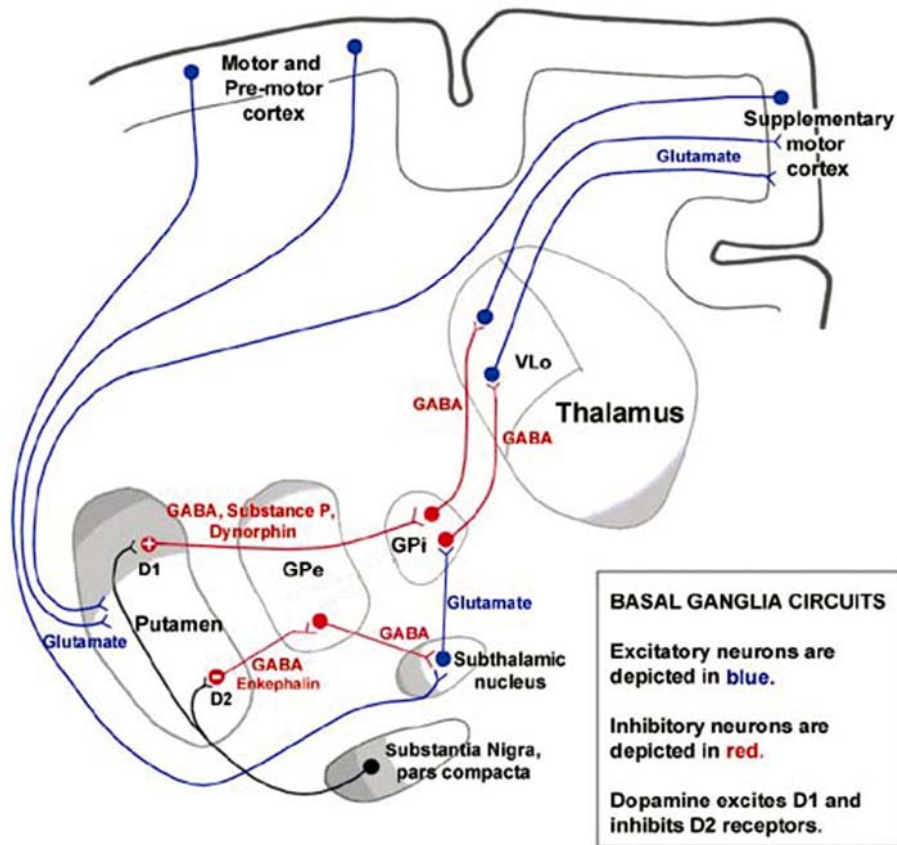


Figure 12 : Connexions neuronales motrices impliquant le striatum (putamen).

La voie directe, qui a pour conséquence le déclenchement d'un mouvement, est composée de deux connexions GABAergiques successives, entre le putamen et le globus pallidus interne (GPi) puis entre le GPi et le thalamus. Par cette voie, les entrées excitatrices (glutamatergiques, en bleu) du cortex vers le putamen désinhibent les neurones thalamiques.

La voie indirecte, qui conduit à l'inhibition d'un mouvement, compte une étape supplémentaire après le globus pallidus externe (GPe) entraînant l'excitation du GPi par le noyau sous-thalamique.

La dopamine module le système, principalement au niveau du striatum, où elle stimule les récepteurs de type D1 et D2.

D'après les ressources de l'université de Floride, USA (<http://medinfo.ufl.edu/>) et (Graybiel, 2000).

Dans la MH, ce sont les neurones striataux qui se projettent sur le GPe qui dégèrent les premiers, dès le grade 0 de la maladie. D'après ce modèle, la perte de ces neurones diminue l'inhibition exercée par la voie indirecte, provoquant un déséquilibre en faveur de la voie directe. Les mouvements sont alors initiés et ne peuvent plus être contrôlés ni stoppés, ce qui se traduit par les mouvements choréiques (Albin *et al.*, 1989). Aux stades plus tardifs de la MH, la perte générale des neurones striataux de projection (y compris ceux de la voie directe) entraîne une dysfonction motrice drastique qui résulte en une bradykinésie.

## 2. La huntingtine

### 2.1. A la recherche de fonctions pour la huntingtine

La structure de la huntingtine ne révèle pas sa fonction biologique

La huntingtine humaine est une grosse protéine de 348 kDa composée de 3144 acides aminés (référence prise avec 23 répétitions de glutamines). Le domaine à répétition de glutamines (polyQ), qui commence à partir du 18<sup>ème</sup> acide aminé, contient généralement entre 10 et 35 résidus glutamines chez les individus sains, et s'étend au-delà de 37 glutamines chez les malades MH. Un domaine riche en prolines (polyP) est adjacent au domaine polyQ. Ces répétitions (polyQ et polyP) ne sont pas conservées entre les espèces (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004) (Figure 13). En effet, alors que la huntingtine humaine comporte normalement entre 10 et 35 glutamines, celles du rat et de la souris n'en possèdent que 8 et 7 respectivement, celle du Tetraodon n'en a que 4 (Figure 13) et la huntingtine de la Drosophile est dépourvue de région riche en glutamines (GenBank Accession number : AF177386). Puisque cette région n'a pas été conservée entre les espèces, cela suggère que la séquence polyQ n'est pas déterminante pour la fonction de la huntingtine normale.

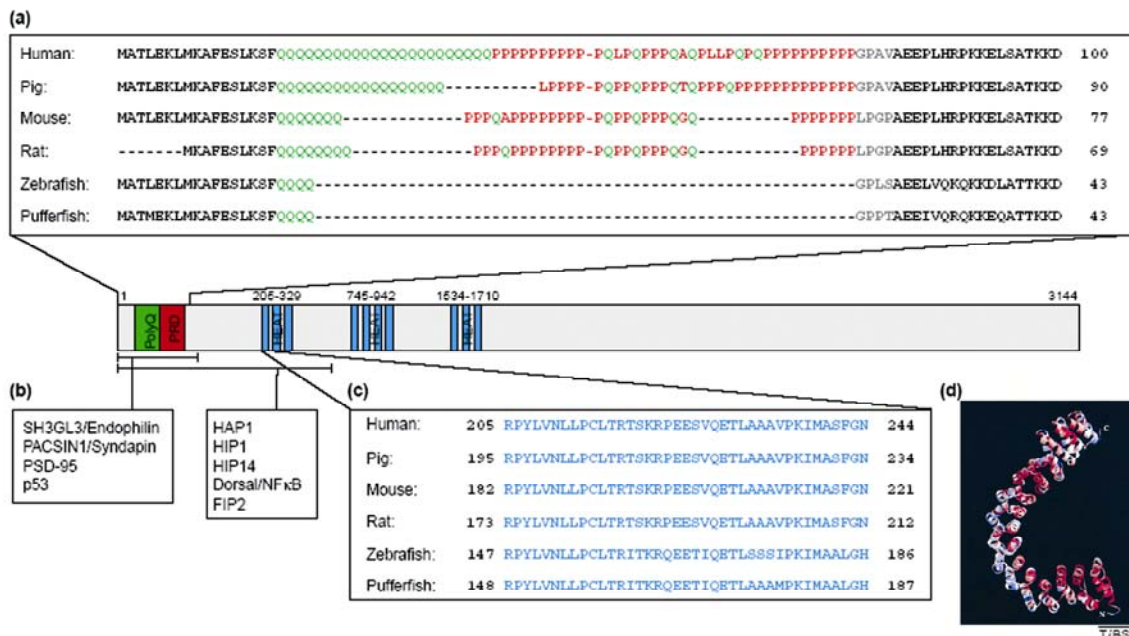


Figure 13 : Domaines structuraux composant la huntingtine et comparaison de séquences entre différentes espèces.

(a) La huntingtine contient une région riche en glutamines (PolyQ, en vert) et en prolines (PRO, en rouge) à l'extrémité N-terminale, et 10 répétitions HEAT réparties en clusters (en bleu). (b) Exemples de partenaires protéiques de la huntingtine interagissant avec les régions polyQ/PRO et/ou le 1<sup>er</sup> cluster de répétition HEAT. Notez que la comparaison de séquences en acides aminés de la huntingtine entre différentes espèces révèle que la région polyQ/PRO est seulement partiellement conservée (a), alors que les répétitions HEAT sont fortement conservées (c). (d) Structure tertiaire

des répétitions HEAT, illustrée par la sous-unité PR65/A de la protéine phosphatase 2A. Les répétitions HEAT forment des hélices  $\alpha$  hydrophobes qui s'assemblent en une super-hélice allongée contenant un sillon favorable aux interactions protéine-protéine. Les clusters de répétitions HEAT de la huntingtine devraient adopter la même structure. D'après (Harjes and Wanker, 2003).

Malgré sa grande taille, la huntingtine contient peu de motifs connus dans sa séquence, ce qui rend difficile l'identification du rôle biologique de cette protéine. L'une des caractéristiques structurales de la huntingtine est la présence de répétitions HEAT (Huntingtine, facteur d'Elongation 3, sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 2A et TOR1), qui sont des séquences de 40 acides aminés organisées en clusters (Figure 13). La fonction des répétitions HEAT n'est pas clairement identifiée, mais elles sont généralement présentes dans des protéines qui sont impliquées dans le transport intracellulaire et la ségrégation des chromosomes (Neuwald and Hirano, 2000).

#### Le profil d'expression de la huntingtine ne dévoile pas non plus sa fonction

La protéine huntingtine est ubiquitaire, à la fois dans le cerveau et les tissus périphériques, avec de forts niveaux d'expression dans le cerveau, et les testicules (Li *et al.*, 1993; Strong *et al.*, 1993; Trottier *et al.*, 1995). Dans le cerveau, la huntingtine est essentiellement exprimée dans les neurones et très faiblement dans les cellules gliales (Landwehrmeyer *et al.*, 1995). Son niveau d'expression reflète généralement la densité neuronale de la structure, qui est la plus élevée dans le cervelet, l'hippocampe et les bulbes olfactifs (Li *et al.*, 1993; Strong *et al.*, 1993). Dans les neurones, la huntingtine est présente dans tous les compartiments cytoplasmiques, que ce soit le soma, les dendrites, l'axone, ou encore les terminaisons synaptiques (Sharp *et al.*, 1995). Elle est également présente dans le noyau (De Rooij *et al.*, 1996; Kegel *et al.*, 2002). Ainsi, l'expression et la localisation sub-cellulaire ubiquitaires de la huntingtine ne permettent pas de déterminer le rôle de cette protéine.

#### La huntingtine joue un rôle dans la survie cellulaire

Afin de comprendre la fonction normale de la huntingtine, plusieurs équipes ont créé des modèles murins knock-out pour le gène homologue du gène codant la huntingtine. Chez tous ces modèles, l'absence de huntingtine entraîne une anomalie de la gastrulation avec mort cellulaire étendue au niveau de l'ectoderme au stade E7,5 et une mort embryonnaire avant le jour E8,5 (Duyao *et al.*, 1995; Nasir *et al.*, 1995; Zeitlin *et al.*, 1995). Ces données convergentes suggèrent fortement que la huntingtine joue un rôle vital au cours du développement embryonnaire.

Pour contourner cette létalité embryonnaire, un modèle murin de KO conditionnel a été créé par Dragatsis *et al.* en utilisant le système Cre/LoxP. La délétion de la huntingtine



à l'âge adulte dans le cerveau et les testicules conduit à une dégénérescence neuronale progressive et à la stérilité des animaux (Dragatsis *et al.*, 2000). Ainsi, la huntingtine semble jouer un rôle important dans la survie cellulaire, que ce soit au cours du développement embryonnaire ou à l'âge adulte.

Chez l'homme, la délétion du gène codant la huntingtine se produit lorsque la partie distale du chromosome 4 est partiellement délétée, au niveau de la région 4p16.3 (Figure 5). Cette délétion provoque le syndrome de Wolf Hirschhorn qui est caractérisé par un retard mental et de croissance, avec un décès prématuré à l'âge de deux ans.

La huntingtine interagit avec de nombreuses protéines qui sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires

Le rôle biologique de la huntingtine n'est toujours pas clairement identifié. Par contre, la liste des protéines qui interagissent avec elle ne cesse d'augmenter. Ces partenaires de la huntingtine peuvent être regroupés en familles fonctionnelles : les plus grandes familles rassemblent des protéines intervenant dans la régulation de la transcription, le transport ou la signalisation intracellulaires. La dernière famille regroupe les protéines impliquées dans le métabolisme (Li and Li, 2004) (Table 2).

Nom du partenaire de la htt	Fonction	Zone d'interaction sur la htt	Effet de l'expansion polyQ
<b>Transcription</b>			
CA150	Activateur	polyP	aucun
CBP	Co-activateur	aa 1-588	↗
CtBP	Co-répresseur	aa 182-186	↘
HYP-A, B	Facteurs d'épissage de l'ARN	polyP	↗
HYP-C	Facteur de transcription	polyP	↗
NcoR	Co-répresseur	aa 1-171	↗
NF-κB	Facteur de transcription	Répétitions HEAT	inconnu
Sin3a	Répresseur	aa 1-171	↗
Sp1	Activateur	aa 1-171	↗
TAFII130	Co-activateur	aa 1-480	aucun
TBP	Facteur de base de la transcription	inconnue	inconnu
p53	Facteur de transcription	polyP	aucun
REST-NRSE	Suppresseur	aa 1-548	↘
Symplekine	Polyadénylation de l'ARNm	N-term	inconnu
<b>Transport intracellulaire et endocytose</b>			
α-adaptine-C	Coating des vésicules	N-term	↘
β-tubuline	Cytosquelette, transport	inconnue	aucun
HAP1	Transport, endocytose	aa 1-230	↗
HIP1	Endocytose, pro-apoptotique	aa 1-540	↘
HIP14	Transport, endocytose	aa 1-150	↘
Optineurine	Exocytose	N-term	inconnu
PACSIN1	Endocytose	polyP	↗
PSD-95	Morphologie synaptique	polyP	↘
SH3GL3	Endocytose et recyclage de vésicules	polyP	↗
<b>Signalisation</b>			
Akt/PKB	Kinase	S421	aucun
Calmoduline	Liaison du calcium	inconnue	↗
Calpaïnes	Clivage protéique	aa 430-550	↗
Caspases (2,3,6,7)	Clivage protéique	aa 500-600	↗ (caspase 2)
CIP-4	Voie de signalisation de cdc-42	polyP	↗
FIP2 (HYP-L)	Partenaire de la GTPase Rab8	aa 1-550	inconnu
GRb2	Voie de signalisation de l'EGF	polyP	inconnu
IP <sub>3</sub> -R1	Canal de libération de calcium	aa 1-158	↗
MLK2	Kinase de la voie JNK	polyP	↘
RasGAP	Activatrice de la GTPase Ras	polyP	inconnu
SGK	Kinase	S421	↘
<b>Métabolisme</b>			
CBS	Enzyme métabolique	aa 1-171	aucun
GAPDH	Enzyme glycolitique	polyP	↗
hE2-25K (HIP2)	Dégradation des protéines mal conformées	N-term	aucun
Sous-unité P31 régulatrice du protéasome 26S	Dégradation des protéines ubiquitinées	N-term	aucun

Table 2 : Protéines interagissant avec la huntingtine.

Les partenaires protéiques de la huntingtine (htt) peuvent être regroupés selon leur fonction : transcription, transport intracellulaire et endocytose, signalisation et métabolisme. Le tableau indique la région de la huntingtine qui interagit avec ces partenaires et l'effet de l'expansion de glutamines sur cette interaction : l'interaction entre la huntingtine et son partenaire est renforcée (↗)

ou au contraire affaiblie (↘) lorsque la huntingtine est mutée. Notez que toutes les interactions identifiées se font avec la partie N-terminale de la huntingtine (aa 1-588). Ce tableau a été adapté et complété d'après (Faber *et al.*, 1998; Li and Li, 2004).

### 2.1.1. La huntingtine, régulatrice de la transcription

La huntingtine interagit avec de nombreux régulateurs de la transcription, tels que p53, les co-activateurs CA150 et la CBP (cAMP response-element binding protein (CREB)-binding protein), et le co-répresseur CtBP (C-terminal binding protein) (Steffan *et al.*, 2000; Holbert *et al.*, 2001; Kegel *et al.*, 2002) (Table 2). Toutefois, le rôle précis de la huntingtine dans la transcription n'est toujours pas clairement identifié. Elle ne possède pas dans sa séquence de site de liaison à l'ADN. En revanche, les régions riches en glutamines sont des interfaces privilégiées pour l'orchestration de l'action des facteurs de transcription. La huntingtine pourrait ainsi agir en tant que régulatrice de la transcription.

#### La huntingtine, activateur de la transcription de certains gènes

La huntingtine se lie à l'activateur de transcription Sp1 (specificity protein 1) et au co-activateur TAF<sub>II</sub>130 (TBP associated factor II 130) (Dunah *et al.*, 2002) (Table 2). Sp1 est ubiquitaire et sa fonction majeure consiste à recruter le facteur de transcription TFIID à l'ADN (Pugh and Tjian, 1990). TFIID est un complexe contenant la TBP (TATA box binding protein) et de multiples facteurs tels que TAF<sub>II</sub>130. Ce dernier interagit directement avec Sp1 et stimule l'activation de la transcription génique. L'interaction de la huntingtine à la fois avec Sp1 et avec TAF<sub>II</sub>130 lui suggère un rôle de plateforme qui relie Sp1 à la machinerie transcriptionnelle de base (Dunah *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). La huntingtine pourrait renforcer le lien entre l'activateur de transcription Sp1 lié à l'ADN et le complexe multi-protéique TFIID et ainsi stimuler la transcription des gènes cibles (Harjes and Wanker, 2003) (Figure 14).

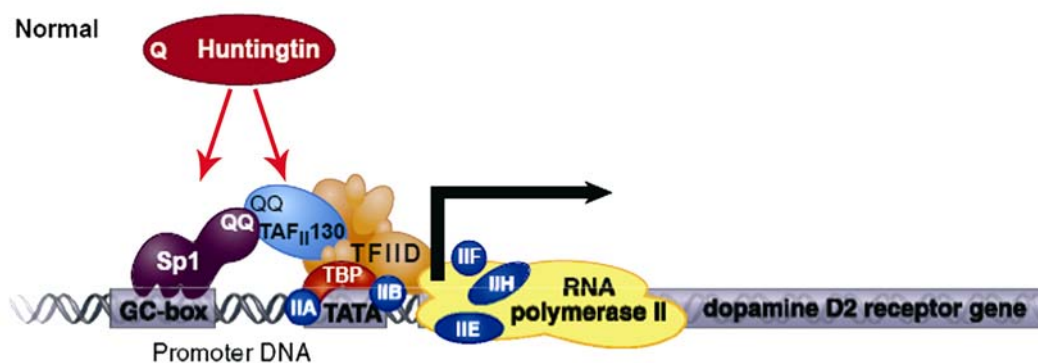


Figure 14 : Modèle représentant l'intervention de la huntingtine dans la transcription médiée par Sp1 et TAF<sub>II</sub>130.

L'activateur de transcription Sp1 se lie à l'ADN au niveau d'une « boîte-GC » dans le promoteur des gènes cibles (par exemple celui du gène codant le récepteur dopaminergique de type D2). Sp1 re-

crute le complexe TFIID par son interaction spécifique avec la région riche en glutamines de la protéine TAF<sub>II</sub>130. L'interface polyQ sert de « pont » entre Sp1 et la machinerie transcriptionnelle requise pour recruter l'ARN polymérase II. La huntingtine permettrait de consolider ce « pont » nécessaire à la transcription de certains gènes. Schéma adapté d'après (Freiman and Tjian, 2002; Harjes and Wanker, 2003).

### La huntingtine, répresseur de la transcription d'autres gènes

La huntingtine pourrait également intervenir dans la répression de la transcription génique. En effet, elle se lie directement au complexe de répresseurs contenant NcoR (Nuclear receptor co-Repressor) et Sin3a (Boutell *et al.*, 1999). Ce complexe inhibe la transcription induite par les récepteurs nucléaires tels que les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) (Nagy *et al.*, 1997). NcoR fait le lien entre les histones déacétylases et les protéines qui se fixent à des séquences spécifiques de l'ADN (Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997). NcoR interagit également directement avec les facteurs de transcription tels que TFIIB (Nagy *et al.*, 1997). Puisque la huntingtine interagit directement avec NcoR, Sin3a et TAF<sub>II</sub>130, il semble possible que la huntingtine relie le complexe répresseur NcoR/Sin3a à la machinerie transcriptionnelle de base et module ainsi la répression de la transcription (Harjes and Wanker, 2003) (Figure 15). Cette hypothèse est confortée par les analyses génomiques par puces à ADN qui indiquent une dérégulation de la transcription par NcoR/Sin3a dans un modèle murin de la MH (Luthi-Carter *et al.*, 2000).

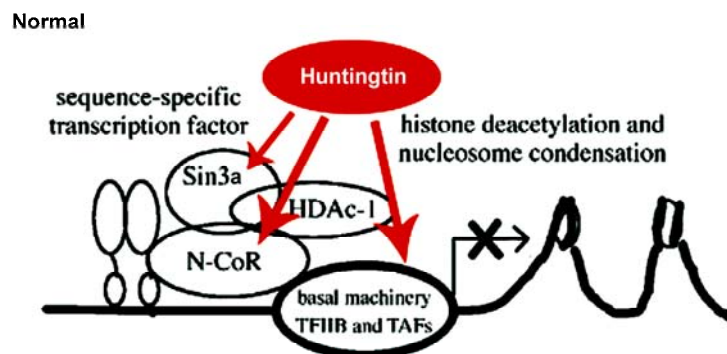


Figure 15 : Modèle simplifié représentant l'intervention de la huntingtine dans la répression de la transcription par NcoR et Sin3a.

Le répresseur NcoR fait le lien entre le facteur de transcription et les histones déacétylases (HDAC) dans le gène cible. NcoR se lie également avec les éléments de la machinerie transcriptionnelle de base, jouant ainsi son rôle de répresseur. La huntingtine, en interagissant à la fois avec Sin3a, NcoR et la machinerie transcriptionnelle, favoriserait la formation de ce complexe répresseur. Schéma adapté d'après (Jones, 1999; Harjes and Wanker, 2003).

### La huntingtine, navette pour facteurs de transcription

L'unique motif structural connu que possède la huntingtine est la répétition HEAT (Figure 13). Ce motif est caractéristique de protéines assurant le transport intranucléaire, telles que les importines qui assurent l'import de protéines dans le noyau (Vetter *et al.*, 1999), ou encore les condensines et les cohesines qui sont impliquées dans la ségrégation des chromosomes (Neuwald and Hirano, 2000). La huntingtine pourrait alors moduler l'activité des facteurs de transcription en leur assurant un rôle de transporteur entre le cytoplasme et le noyau (Cattaneo *et al.*, 2001; Rangone *et al.*, 2004) (Figure 16).

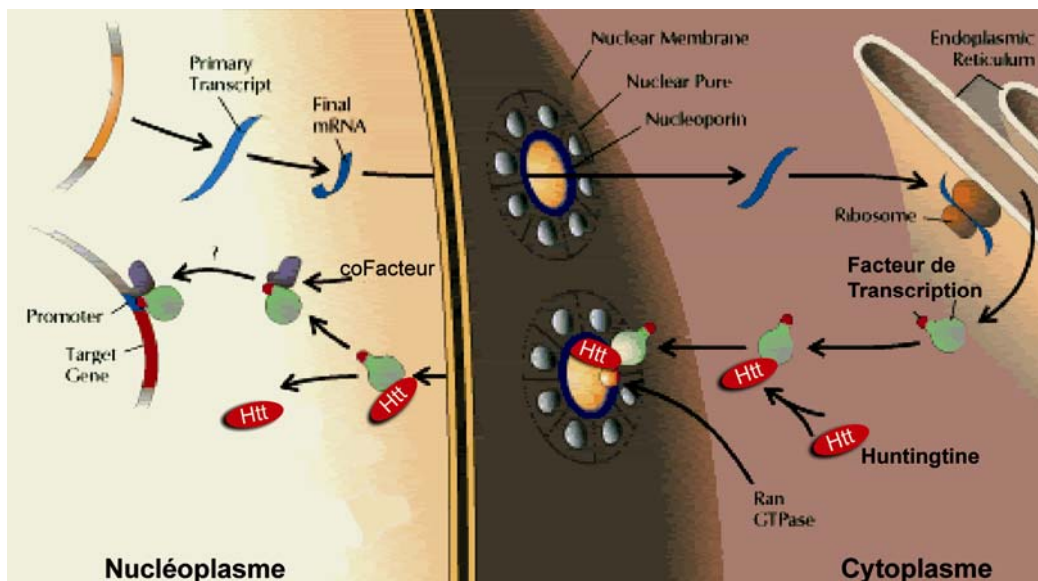


Figure 16 : Modèle représentant l'intervention de la huntingtine dans le transport des facteurs de transcription.

D'après ce modèle, la huntingtine (htt) et le facteur de transcription de lient dans le cytoplasme. L'intervention d'une GTPase permet le passage de ce complexe à travers le pore nucléaire. Une fois dans le cytoplasme, la huntingtine et le facteur de transcription se séparent, rendant ce dernier fonctionnel. Schéma adapté d'après (Brody and Biesecker, 1997).

#### 2.1.2. La huntingtine, protéine d'endocytose et de transport des vésicules à clathrine

##### La huntingtine, régulatrice de la formation des vésicules à clathrine

La huntingtine est à la fois présente dans le noyau et dans le cytoplasme. Elle a de nombreux partenaires protéiques dans les deux compartiments. Dans le cytoplasme, elle interagit avec les endosomes de recyclage, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vésicules recouvertes de clathrine (DiFiglia *et al.*, 1995; Gutekunst *et al.*, 1998; Vellier *et al.*, 1998; Hilditch-Maguire *et al.*, 2000). Ce réseau d'interactions suggère que la huntingtine participe au fonctionnement de la synapse (Figure 17).

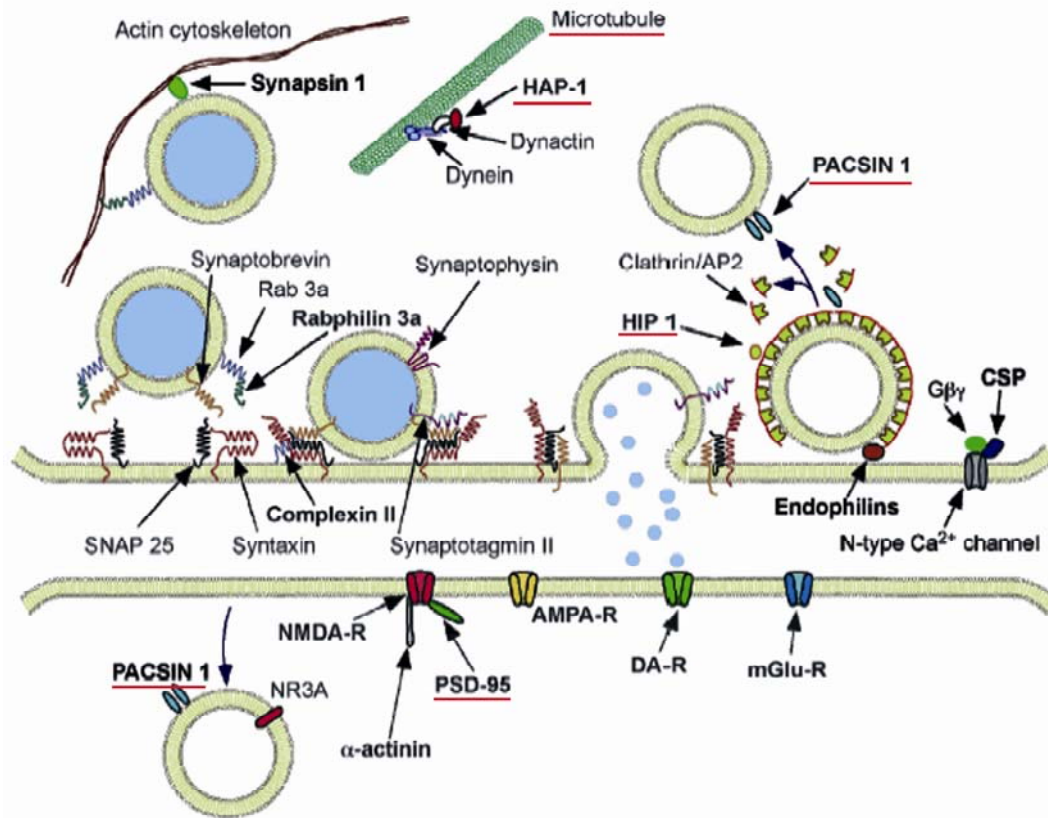


Figure 17 : Schéma présentant les protéines impliquées dans l'exocytose, l'endocytose et la signalisation au niveau de la synapse. Les protéines dont le nom est souligné interagissent avec la huntingtine (Table 2) et celles dont le nom est en caractères gras ont été associées à la MH. D'après (Smith *et al.*, 2005).

La huntingtine interagit avec HIP1 (Huntingtin-Interacting Protein 1), une protéine importante pour la formation de vésicule d'endocytose recouverte de clathrine (Figure 18). HIP1 forme un hétérodimère avec HIP1R (HIP1-related protein) et recrute ainsi la clathrine et la protéine adaptatrice AP2 (Adaptor Protein 2) à la membrane plasmique puis stimule l'assemblage de la clathrine (Engqvist-Goldstein *et al.*, 1999; Engqvist-Goldstein *et al.*, 2001; Metzler *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2001; Waelter *et al.*, 2001). La huntingtine interagit également directement avec la sous-unité  $\alpha$ -adaptin-C de la protéine AP2 (Table 2). Ainsi, AP2, HIP1 et la huntingtine pourraient former un complexe à la surface de la membrane initiant la formation d'une vésicule recouverte de clathrine. La huntingtine pourrait alors moduler l'assemblage de HIP1 avec AP2 et la clathrine et modifier son recrutement à la membrane, régulant ainsi la formation des vésicules à clathrine (Harjes and Wanker, 2003) (Figure 18).

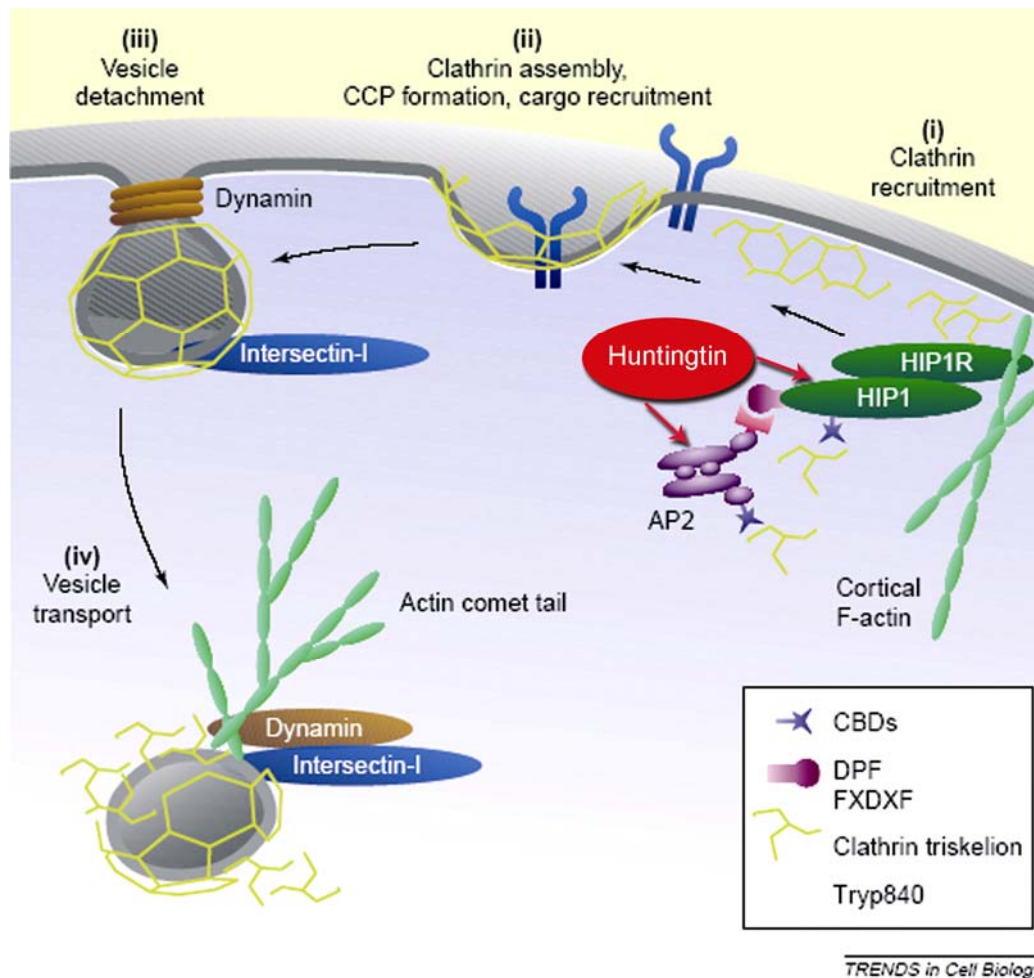


Figure 18 : Modèle représentant l'intervention de la huntingtine dans l'initiation de la formation d'une vésicule d'endocytose.

Le complexe HIP1/HIP1R recrute la clathrine et AP2 à la membrane plasmique et stimule l'assemblage de la clathrine. HIP1R se lie également à l'actine, identifiant ainsi sur la membrane plasmique le site de formation de la vésicule d'endocytose. L'intersectine-1 est recrutée sur la vésicule recouverte de clathrine (CCP : clathrin coated pit) et stimule l'assemblage des filaments d'actine. La dynamine forme des structures en anneau autour du site d'invagination de la vésicule et provoque le détachement de la vésicule de la membrane plasmique.

La huntingtine, en interagissant à la fois avec HIP1 et AP2 régulerait la formation de ce complexe et modulerait ainsi l'étape d'initiation de la formation d'une vésicule. Schéma adapté d'après (McPherson, 2002).

### La huntingtine, facteur de transport optimal

La huntingtine interagit avec les microtubules et la  $\beta$ -tubuline (Hoffner *et al.*, 2002) ce qui suggère qu'elle puisse jouer un rôle dans le transport intracellulaire. En fait, la huntingtine s'associe avec de nombreuses protéines impliquées dans le transport intracellulaire (Table 2). Par exemple, la huntingtine se lie avec HAP1 (Huntingtin-Associated Protein 1) (Table 2). HAP1 est une protéine qui s'associe avec la sous-unité p150<sup>Glued</sup> de la dynactine, elle-même impliquée dans le transport dépendant des microtubules (Engelender

*et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Ainsi, la huntingtine pourrait participer au transport de vésicules le long des microtubules (Harjes and Wanker, 2003).

Cette hypothèse a particulièrement bien été étudiée en ce qui concerne le transport des vésicules contenant du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). En effet, par une technique de vidéomicroscopie rapide qui permet de suivre la dynamique intracellulaire des vésicules contenant du BDNF, les travaux de Gauthier *et al.* ont montré que la huntingtine permet d'optimiser le transport de ces vésicules, en augmentant leur vitesse de déplacement et en diminuant leurs temps de pause (Gauthier *et al.*, 2004). Cet effet est dépendant d'un complexe formé entre la huntingtine et la sous-unité p150<sup>Glued</sup> via HAP1 (Figure 19).

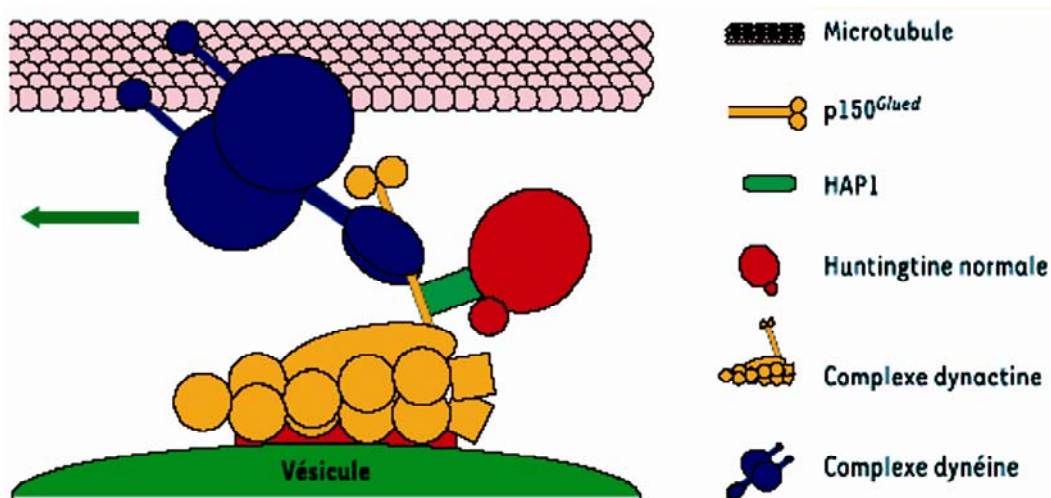


Figure 19 : Modèle représentant la fonction de la huntingtine dans le transport vésiculaire. La huntingtine s'associe au complexe dynéine/dynactine qui est un des moteurs moléculaires responsables du transport de vésicules le long des microtubules. Cette interaction se fait via la protéine HAP1. La huntingtine agit alors comme un facteur optimisateur du transport des vésicules, telles que celles contenant du BDNF. D'après (Humbert and Saudou, 2004).

### 2.1.3. La huntingtine, plateforme protéique

La huntingtine est une grosse protéine, aussi plusieurs études suggèrent qu'elle jouerait un rôle de plateforme, facilitant l'association de partenaires protéiques. Cette configuration a déjà été illustrée à travers l'action de la huntingtine dans le noyau, favorisant l'interaction entre Sp1 et TAF<sub>II</sub>130 (Figure 14) ou entre NcoR, Sin3a et TAF<sub>II</sub>130 (Figure 15), ainsi que dans la synapse, régulant l'interaction entre HIP1 et AP2 (Figure 18). Les travaux de Marcora *et al.* montrent que la huntingtine peut également servir de plateforme protéique dans le soma, facilitant l'interaction de protéines au sein d'une voie de signalisation. Cette étude montre d'une part que la huntingtine interagit avec le facteur de transcription NeuroD via HAP1. D'autre part, la huntingtine interagit directement avec MLK2 (Mixed-Lineage Kinase 2), classiquement décrite comme étant la kinase de MKK4/7 (MAP Kinase



Kinase 4 et 7) et ainsi activatrice de la voie JNK (c-Jun N-terminal Kinase). MLK2 phosphoryle et active NeuroD. Ainsi, en favorisant le rapprochement spatial de la kinase MLK2 et de son substrat NeuroD via HAP1, la huntingtine facilite l'activation de NeuroD par MLK2 (Marcora *et al.*, 2003). Puisque la huntingtine n'a pas d'effet elle-même sur NeuroD mais qu'elle augmente l'activité de NeuroD en présence de HAP1 et MLK2, les auteurs proposent que la huntingtine fonctionne comme une plateforme dans le cytoplasme, permettant d'assembler la kinase MLK2 et son substrat NeuroD (Figure 20). La huntingtine augmenterait ainsi l'efficacité et la spécificité de la transduction du signal.

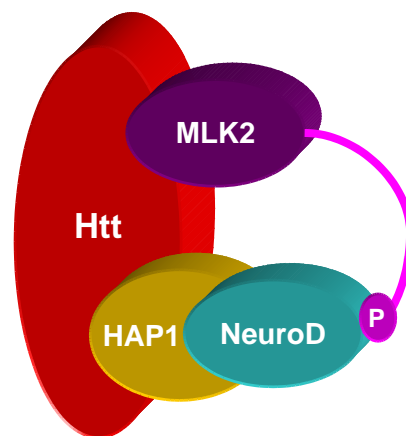


Figure 20 : Modèle représentant la huntingtine en tant que plateforme protéique pour les voies de signalisation.

La huntingtine (Htt) interagit directement avec MLK2 et indirectement avec NeuroD par l'intermédiaire de HAP1. Elle favorise ainsi le rapprochement spatial de la kinase MLK2 et de son substrat le facteur de transcription NeuroD, augmentant alors l'efficacité de la transduction du signal. Schéma réalisé d'après (Marcora *et al.*, 2003).

Il existe d'autres modèles qui suggèrent que la huntingtine pourrait jouer un rôle de plateforme protéique dans le cytoplasme. Par exemple, la huntingtine interagit avec PSD-95 (Post-Synaptic Density Protein) qui est un acteur-clé de la densité post-synaptique (PSD) et de l'activité des synapses excitatrices (Table 2). En étant associée au PSD-95, la huntingtine pourrait fonctionner comme une plateforme protéique dans le PSD, en modulant l'activité de complexes multiprotéiques associés au PSD-95, tels que le multicomplexe protéique lié aux récepteurs NMDA (Harjes and Wanker, 2003; MacDonald, 2003) (Figure 21).

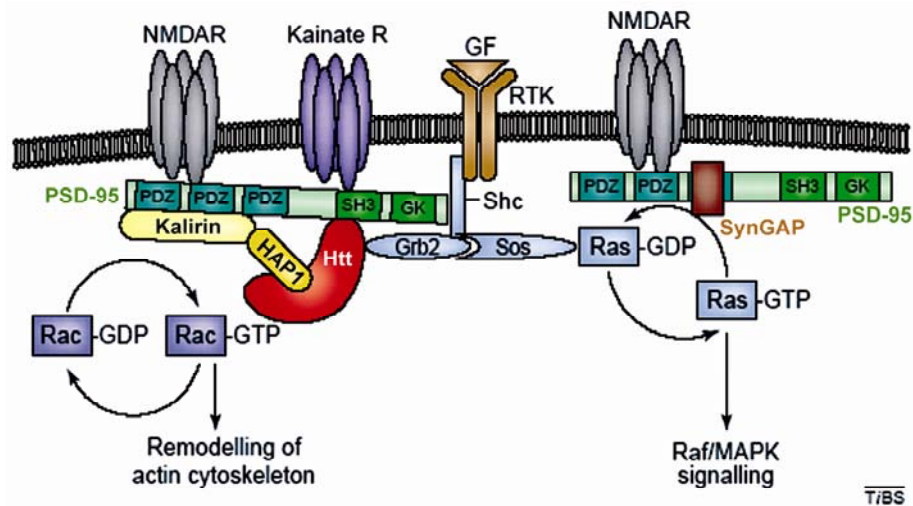


Figure 21 : Modèle représentant l'intervention de la huntingtine dans la densité post-synaptique (PSD).

PSD-95 fait le lien entre les récepteurs au glutamate NMDA (N-Methyl-D-Aspartate) et kainate et les voies de signalisation intracellulaires. PSD-95 se lie à la protéine synaptique GTPase SynGAP (en marron) qui catalyse l'activité GTPase intrinsèque de Ras et régule ainsi la signalisation de Ras dans les synapses excitatrices. La huntingtine (Htt) interagit avec Grb2 (Growth factor receptor-binding protein 2), ce qui pourrait influencer la voie de signalisation de Ras. PSD-95 s'associe également avec la Kalirine, un facteur d'échange GDP-GTP qui régule le remodelage du cytosquelette d'actine en activant Rac1. La huntingtine interagit avec la Kalirine par l'intermédiaire de HAP1, ce qui suggère que la formation d'un complexe entre la Kalirine, HAP1 et la huntingtine pourrait être essentiel à la régulation de la dynamique de l'actine et la morphogenèse des épines dendritiques dans les neurones. D'après (Harjes and Wanker, 2003).

## 2.2. Huntingtine mutée : quand la taille prend de l'importance

Le premier exon du gène *IT15* contient une répétition de triplets CAG qui se traduit en un domaine riche en glutamines dans la partie N-terminale de la huntingtine. Cette répétition est polymorphe et instable. Lorsqu'elle est étendue, elle entraîne la MH. Ainsi, à l'origine de la MH, tout est affaire de taille. Le triplet CAG est normalement répété 10 à 26 fois chez les individus non porteurs de la mutation MH, et les malades possèdent en général entre 40 et 80 répétitions. Les répétitions comprises entre 27 et 35 peuvent être instables lors de la spermatogenèse, et les descendants d'un homme porteurs de ce nombre de répétitions risquent d'hériter d'un nombre de répétitions supérieurs à 40, et développer ainsi la MH (Trottier *et al.*, 1994). Les répétitions comprenant entre 27 et 35 triplets sont peu fréquentes (Figure 22). Celles comprises entre 36 et 39 sont également rares (Figure 22) et sont associées à une pénétrance incomplète, certains individus porteurs de ce nombre de répétitions développant la MH et d'autres non (Myers, 2004). Les répétitions supé-

rieures à 55 triplets sont associées aux formes juvéniles de la MH (apparition des symptômes avant l'âge de 20 ans).

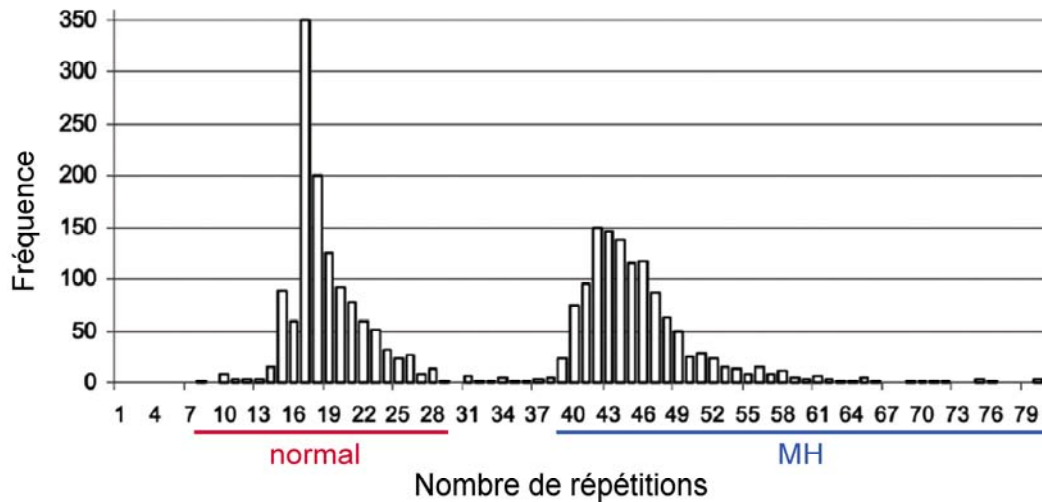


Figure 22 : Fréquence de la taille de la répétition CAG sur un allèle normal ou MH. Les répétitions de moins de 27 triplets sont normales. Les répétitions comprises entre 27 et 35 sont rares et ne sont pas associées à la MH. Par contre, un père avec une répétition comprise dans cet intervalle risque de transmettre à sa descendance une répétition de taille à déclencher la MH. Les répétitions de 36 à 39 triplets ont une pénétrance incomplète. Les personnes porteuses de 40 répétitions ou plus développent la MH. D'après (Myers, 2004).

Il existe à l'heure actuelle 9 maladies dont la cause identifiée est une expansion de triplets CAG dans la partie codante d'un gène, qui est traduite en une expansion de glutamines dans la protéine codée. Il s'agit de l'amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X (SBMA), l'atrophie dentato-rubro-pallidoluysienne (DRPLA) et de nombreuses ataxies spino-cérébelleuses (SCA 1, 2, 3, 6, 7 et 17). La MH est la plus fréquente de ces maladies à expansion de glutamines. Bien que les gènes en cause soient tous différents et n'aient d'autre homologie que l'expansion de triplet CAG, les maladies à expansion de glutamines ont des caractéristiques communes remarquables :

- ce sont toutes des maladies neurodégénératives,
- les mutations en cause sont dominantes,
- la plupart d'entre elles sont caractérisées par la présence d'agrégats insolubles ubiquitinés,
- elles sont caractérisées par la dégénérescence progressive et spécifique d'une région cérébrale donnée, malgré l'expression ubiquitaire de la protéine mutée (Figure 23).

Ces caractéristiques soulèvent deux questions : existe-t-il un mécanisme commun de neurodégénérescence dans les maladies à expansion de glutamines ? Par quel mécanisme la neurodégénérescence est-elle spécifique d'une structure cérébrale donnée ?

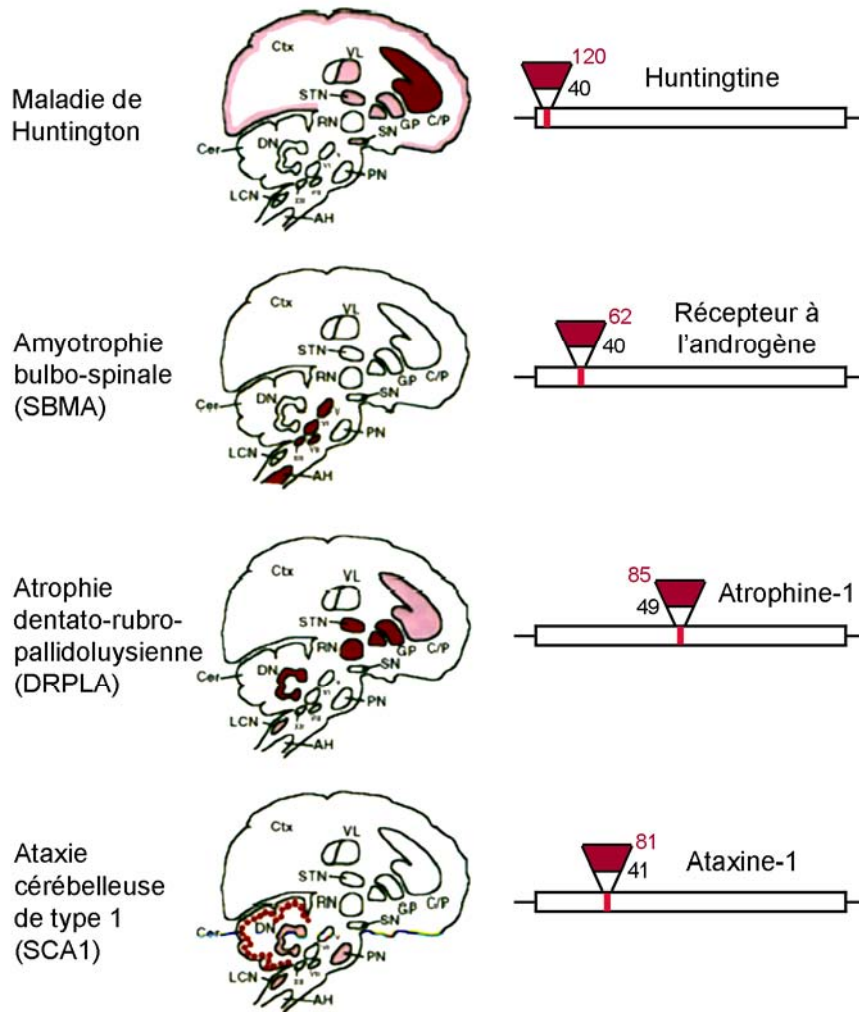


Figure 23 : Exemples de maladies à expansion de glutamines.

Représentation des structures touchées par la neurodégénérescence dans chaque maladie. Le rouge foncé identifie les structures les plus sévèrement touchées et la spécificité de l'atteinte neuronale. Le rose indique les structures faiblement touchées par la neurodégénérescence. A droite de chaque coupe sont représentés le gène responsable de la maladie et l'expansion de répétition de triplets CAG (en rouge). AH : corne antérieure, Cer : cortex cérébelleux, C/P : caudé/putamen, Ctx: cortex cérébral, DN : noyau denté, GP : globus pallidus, LCN : noyau cuneate latéral, PN : noyau pontin, RN : noyau rouge, SN : substance noire, STN : noyau sous-thalamique, VL : noyau thalamique ventro-latéral. Schéma modifié d'après (Ross, 1995).

### 3. Maladie de Huntington : perte ou gain de fonction d'une protéine ubiquitaire... *Pourquoi le striatum ?*

Lorsque la huntingtine est mutée et comporte dans sa partie N-terminale l'expansion de glutamines, ses propriétés changent. Elle n'a plus la même conformation tridimensionnelle, elle forme des inclusions cytoplasmiques et nucléaires, et elle entraîne la dysfonction puis la mort des neurones. Les mécanismes précis qui sont impliqués dans le processus pathogénique de la huntingtine mutée demeurent mal connus, même si plusieurs hypothèses sont proposées. La question pour laquelle il est le plus difficile de trouver une réponse est la suivante : pourquoi, alors que la huntingtine mutée est présente dans toutes les cellules de l'organisme et n'est pas particulièrement fortement exprimée dans le striatum, la mutation MH entraîne-t-elle une vulnérabilité particulière des neurones du striatum ?

Entre perte de fonction de la huntingtine normale et gain de fonctions toxiques de la huntingtine mutée, ce chapitre expose certaines des hypothèses, non mutuellement exclusives, qui ont été proposées pour décrire la toxicité de la mutation MH dans les neurones striataux.

#### 3.1. Diminution de la libération de BDNF par les neurones corticaux

Dans le striatum, les neurones corticaux libèrent du BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), un facteur neurotrophique nécessaire à la survie des neurones striataux. Les travaux de Zuccato *et al.* ont démontré que la huntingtine normale stimule la production de BDNF, mais pas la huntingtine mutée (Zuccato *et al.*, 2001; Zuccato *et al.*, 2003). Le gène qui code le BDNF (noté *Bdnf*) contient dans son promoteur un site NRSE (Neuron-Restrictive Silence Element), site de liaison du répresseur REST (RE1 Silencer Transcription factor). La huntingtine normale se lie à la protéine REST dans le cytoplasme, l'empêchant alors de transloquer au noyau et de réprimer la transcription des gènes porteurs d'un site NRSE. Par conséquent, la présence de la huntingtine normale permet la transcription des gènes contrôlés par un site NRSE, tels que le gène codant le BDNF (Zuccato *et al.*, 2003). Par son expansion de glutamines, la huntingtine mutée perd cette capacité à se lier à la protéine REST. Zuccato *et al.* ont également montré que le niveau de transcription du gène *Bdnf*, et d'autres gènes porteurs de sites NRSE, est directement corrélé à la quantité de huntingtine normale exprimée dans le neurone (Zuccato *et al.*, 2003). Ainsi, chez les individus atteints de MH, les gènes neuronaux porteurs de site NRSE, tels que *Bdnf*, sont sous-exprimés par rapport aux individus non porteurs de la mutation MH, et ceci peut être dû à la présence

d'une demie-dose de huntingtine normale pour les individus hétérozygotes. En l'absence des quantités normales de huntingtine capable de séquestrer REST dans le cytoplasme, une quantité accrue de ce répresseur entre dans le noyau et inhibe la transcription des gènes cibles (Thompson, 2003) (Figure 24).

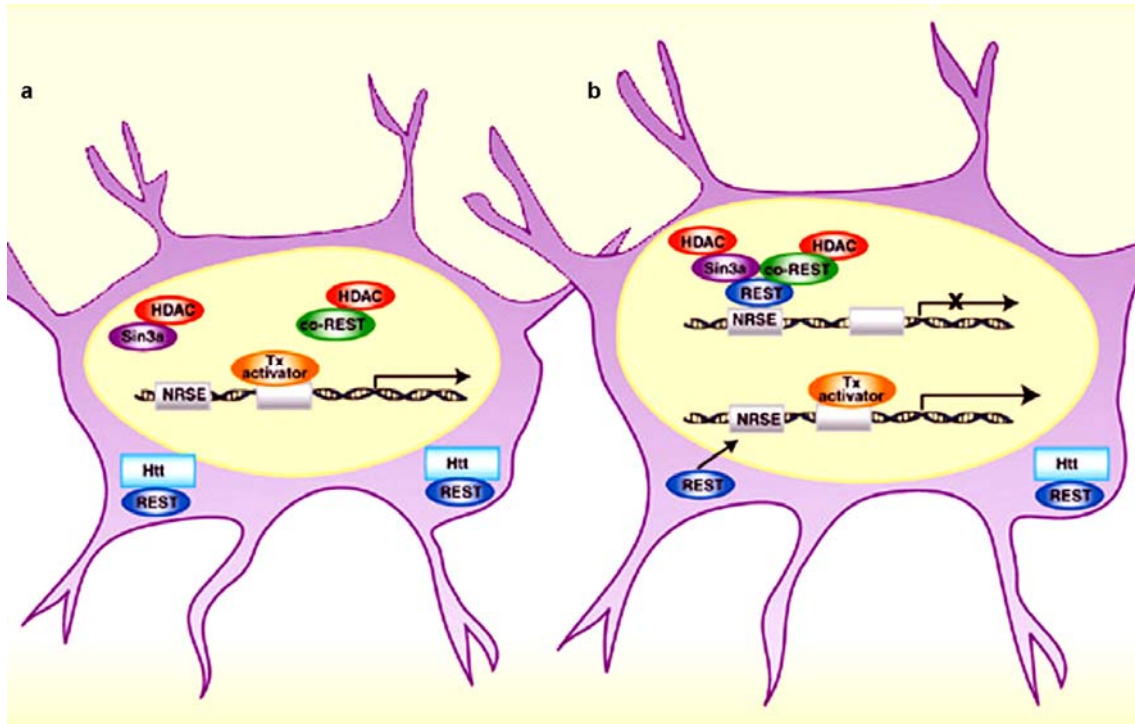


Figure 24 : Séquestration du répresseur REST dans le cytoplasme par la huntingtine. (a) La huntingtine (htt) normale se lie à REST dans le cytoplasme et empêche ainsi la formation du complexe de co-répresseurs (composé de Sin3a, HDAC, co-REST et REST) dans le noyau. De cette façon, la huntingtine augmente la transcription des gènes porteurs de site NRSE. (b) Dans la MH, les neurones contiennent deux fois moins de huntingtine normale. Il y a donc d'avantage de protéines REST qui ne sont pas séquestrées par la huntingtine, qui transloquent au noyau et répriment l'expression des gènes porteurs de site NRSE, tels que le gène *Bdnf*. Schéma d'après (Thompson, 2003).

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, la huntingtine est directement impliquée dans le transport du BDNF depuis le cortex jusqu'au striatum, rendant ce transport plus efficace (Figure 19). Lorsqu'elle est mutée, la huntingtine perd sa capacité à participer au transport du BDNF, ce qui le rend moins efficace (Gauthier *et al.*, 2004). En effet, l'expansion de glutamines augmente l'affinité de la huntingtine mutée avec HAP1 et la sous-unité p150<sup>Glued</sup> de la dynactine, ce qui entraîne le détachement de ce moteur moléculaire des microtubules.

Ainsi, non seulement le BDNF est produit en moins grandes quantités à cause de la perte de fonction de la huntingtine normale sur la transcription de son gène, mais en plus le BDNF produit est transporté de manière moins efficace jusqu'aux synapses cortico-striatales à cause de la perte de fonction de la huntingtine normale dans le transport des

vésicules contenant le BDNF (Figure 25). Recevant moins de BDNF, les neurones striataux sont plus vulnérables, ce qui pourrait expliquer leur susceptibilité spécifique aux effets de la huntingtine mutée. Par contre, ce mécanisme ne permet pas à lui seul d'expliquer la spécificité de l'atteinte neuronale au sein même du striatum : pourquoi les neurones de projection de la voie indirecte sont-ils plus susceptibles que les autres neurones striataux ? De plus, les neurones striataux ne sont pas les seuls neurones à recevoir du BDNF.

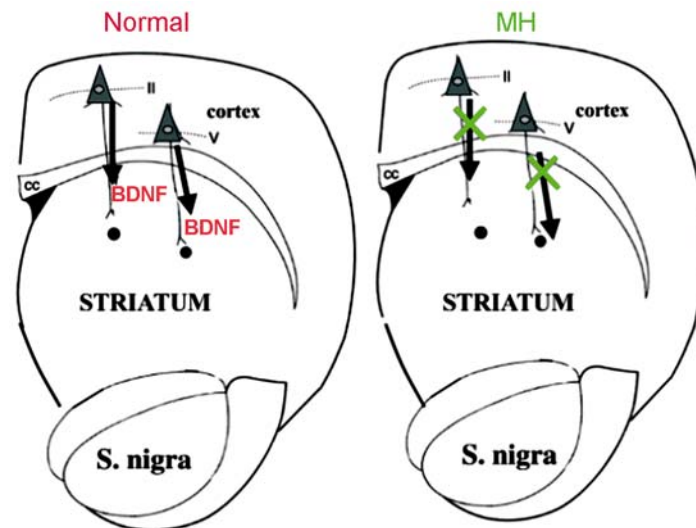


Figure 25 : Diminution de la libération de BDNF par les neurones corticaux dans la MH. (gauche) Le BDNF est produit dans le soma dans le cortex puis il est transporté antérograduellement dans le striatum par les afférences cortico-striatales. (droite) Dans la MH, la perte d'au moins une demie-dose de huntingtine normale résulte en une diminution de production de BDNF d'une part, et en un transport moins efficace du BDNF le long des afférences cortico-striatales. D'après (Cattaneo, 2003).

### 3.2. Excitotoxicité et dysfonctionnement mitochondrial

#### Glutamate et excitotoxicité

Les méfaits du glutamate sont connus dans la vie courante par le « syndrome du restaurant chinois », dont la description fut établie pour la première fois en 1972 par Humar et Ghami. Le glutamate est un additif alimentaire très largement utilisé dans la cuisine chinoise. Il provoque chez certaines personnes sensibles une soudaine migraine, de violentes nausées, des éblouissements, voire une faiblesse confinante à une pseudo-paralysie passagère. Dès 1969, John Olney, neurophysiologiste de l'Université de Washington, constata que le glutamate pouvait passer dans le sang et provoquer des dégâts foudroyant sur les neurones :

« Lorsque le glutamate venu du sang irriguant le cerveau atteint les neurones, ceux-ci laissent soudain entrer massivement du calcium [...], bien au-delà de leurs possibilités physiologiques, provoquant une brutale dépolarisation du neurone, qui en meurt ».

John Olney inventa ainsi le concept d'« excitotoxicité » : propriété qu'ont certains acides aminés (dont le glutamate) à déclencher cette réponse électrique des cellules nerveuses qui conduit à leur « suicide » (Olney, 1994).

### Excitotoxicité dans la MH

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central. Le striatum reçoit une massive innervation glutamatergique provenant de tout le manteau cortical. L'hyper-activation des récepteurs ionotropiques au glutamate, et plus particulièrement de type NMDA, produit une entrée massive de calcium dans la cellule. L'élévation non contrôlée de la concentration intracellulaire en calcium et l'activation des nombreuses voies biochimiques qui en résulte conduit finalement à la mort du neurone (Brouillet *et al.*, 1999) (Figure 26).

L'hypothèse de l'excitotoxicité du glutamate fut pour la première fois illustrée comme mécanisme potentiel à l'origine de maladies neurodégénératives en 1976, au travers de l'étude de modèles animaux de la MH. Deux équipes indépendantes montrent alors que l'administration intrastriatale d'un analogue du glutamate, l'acide kaïnique, provoque des lésions caractérisées par une dégénérescence neuronale sélective (Coyle and Schwarcz, 1976; McGeer and McGeer, 1976). Plusieurs années plus tard, on découvrit qu'un autre analogue du glutamate, l'acide quinolinique, reproduisait encore mieux l'atteinte striatale de la MH puisque la lésion ne touchait que les neurones épineux de taille moyenne et préservait les interneurones (Beal *et al.*, 1986).

La comparaison des caractéristiques anatomiques des lésions excitotoxiques chez l'animal et des lésions striatales observées en *post-mortem* chez les patients atteints de la MH a été directement à l'origine de l'hypothèse excitotoxique dans la MH, hypothèse selon laquelle la dégénérescence striatale progressive observée dans cette maladie serait liée à une anomalie du système glutamatergique (DiFiglia, 1990). Cette anomalie a été mise en évidence dans différents modèles murins de MH, chez lesquels des études électrophysiologiques ont montré une augmentation de l'amplitude des courants calciques dépendants des récepteurs NMDA, ce qui témoigne d'une sensibilité accrue de ces récepteurs au glutamate (Levine *et al.*, 1999; Cepeda *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2002; Zeron *et al.*, 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, la huntingtine normale se lie à PSD-95, une protéine post-synaptique qui régule la signalisation glutamatergique à travers son interaction avec les récepteurs NMDA (Aarts *et al.*, 2002). La sur-expression de la huntingtine normale réduit la



toxicité induite par le NMDA ou le kaïnate dans des lignées de cellules neuronales (Sun *et al.*, 2001). En revanche, lorsque la huntingtine est mutée, son affinité pour PSD-95 diminue et les récepteurs NMDA deviennent hyper-sensibles.

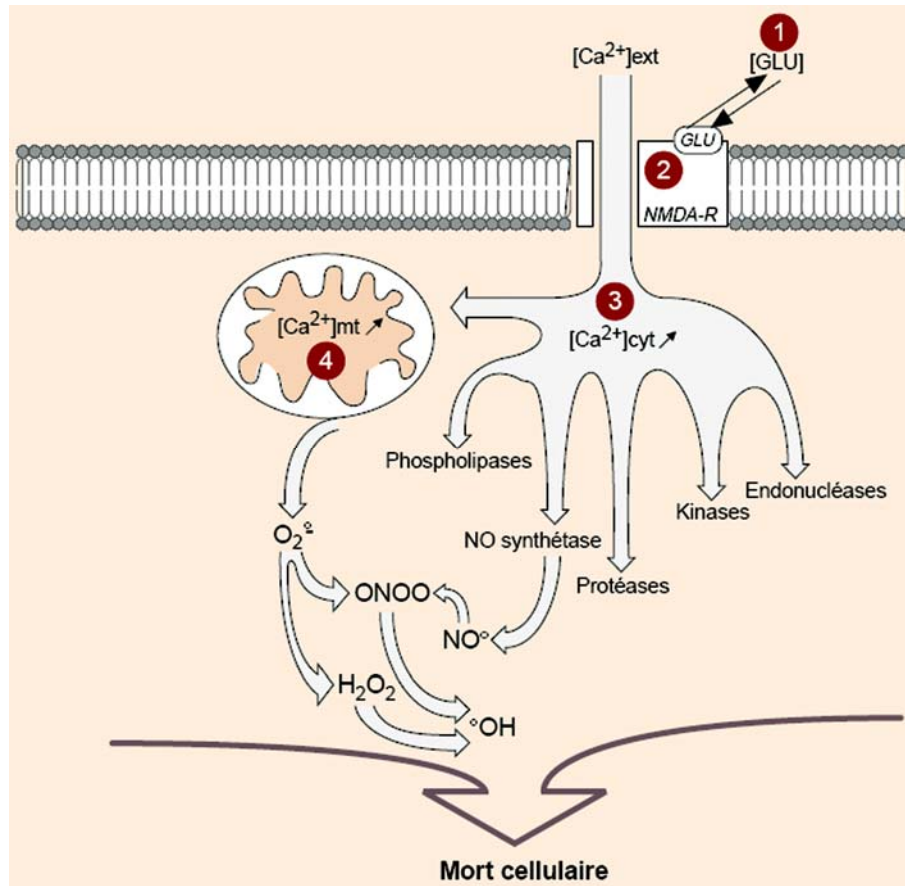


Figure 26 : Excitotoxicité du glutamate.

(1) Lorsque le glutamate est présent dans le milieu extracellulaire à des concentrations anormalement élevées, les canaux calciques couplés aux récepteurs glutamatergiques de type NMDA s'ouvrent (2), produisant une élévation persistante de la concentration intracellulaire de calcium (3). Cette augmentation de calcium active en série différentes enzymes participant à la destruction de la cellule. En parallèle, l'augmentation de la production de molécules oxygénées ( $O_2^-$ ,  $OH^-$ ) et nitrées (NO, ONOO) très réactives (radicaux libres) collabore à la dégénérescence des neurones. Enfin, l'élévation des concentrations intracellulaires en calcium perturbe gravement l'activité mitochondriale et le fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative (4), ce qui conduit à un arrêt progressif de la production d'ATP, fatal pour la cellule. D'après (Brouillet *et al.*, 2000).

Si l'étude des modèles murins de MH suggère un rôle de l'excitotoxicité du glutamate dans la dégénérescence des neurones striataux, aucune étude n'a permis de mettre en évidence l'existence d'anomalies de la transmission glutamatergique chez les patients atteints de MH (Dure *et al.*, 1991; Brouillet *et al.*, 1999).

### Dysfonctionnement mitochondrial et excitotoxicité indirecte

Les premières suspicions d'altération du métabolisme énergétique dans la MH sont nées des observations d'une perte de poids importante des malades, malgré le maintien d'une

prise alimentaire énergétique. La perte de poids n'est pas corrélée à la chorée, ce qui suggère qu'elle n'est pas secondaire à l'hyperactivité des malades mais résulte de la mutation MH (Djousse *et al.*, 2002). D'autres marques d'anomalies du métabolisme énergétique ont été observées dans le striatum de malades MH, notamment la présence de taux élevés de lactate, des concentrations réduites en N-acétylaspartate, créatine et phosphocréatine, une réduction de l'activité des complexes mitochondriaux II et III (Beal, 2000). Toutes ces observations sont les indications d'un dysfonctionnement mitochondrial dans la MH.

Les neurones striataux recevant de nombreuses afférences excitatrices, ils ont besoin d'importants apports en énergie pour maintenir le potentiel de membrane. Le déficit énergétique qui découle de l'atteinte mitochondriale induit alors une dépolarisation partielle de la membrane plasmique neuronale, la levée du blocage par le magnésium du canal calcique associé aux récepteurs NMDA, et ainsi une entrée non contrôlée et massive de calcium dans le neurone (Brouillet *et al.*, 2000). Ce mécanisme est appelé « excitotoxicité indirecte » car il reproduit les effets de l'excitotoxicité du glutamate sans nécessiter de concentrations extracellulaires anormalement élevées en glutamate.

La vulnérabilité des neurones striataux à une atteinte mitochondriale fut découverte par accident après l'intoxication d'enfants Chinois par de l'acide 3-nitropropionique (3-NP), un inhibiteur irréversible de la succinate déshydrogénase (complexe II) (Alston *et al.*, 1977; Coles *et al.*, 1979; Ludolph *et al.*, 1991; Ming, 1995). Ces enfants avaient ingéré de la canne à sucre contaminée par un champignon, l'Arthrimum, qui produit la neurotoxine 3-NP. Les enfants développèrent une encéphalopathie aigüe suivie d'une dystonie retardée à 11-60 jours après l'ingestion. Les patients souffraient de symptômes ressemblant à ceux de la MH : dystonie, chorée, hypokinésie (Alexi *et al.*, 1998). Le CT-scan cérébral (Computerized Tomography) de ces patients montrait des hypodensités bilatérales dans le putamen, et dans une moindre mesure dans le globus pallidus (Brouillet *et al.*, 1995; Vis *et al.*, 1999). Des études ont ensuite été entreprises chez les animaux, montrant que l'administration systémique prolongée de 3-NP chez le rat reproduit les principales caractéristiques histologiques et biochimiques de la maladie, avec, en particulier, une atteinte sélective des neurones épineux du striatum (Beal *et al.*, 1993). Chez le primate, l'administration prolongée (plusieurs mois) de doses modérées de 3-NP induit progressivement des mouvements anormaux dyskinétiques et dystoniques, des déficits cognitifs (de type frontal) (Palfi *et al.*, 1996) et des lésions bilatérales du noyau caudé et du putamen (Brouillet *et al.*, 1995; Brouillet *et al.*, 1999).

L'altération des fonctions mitochondriales pourrait contribuer à l'excitotoxicité du glutamate, aux dommages oxydatifs et à l'altération de la transcription génique (via la diminution de production d'AMPc) dans les neurones striataux (Browne and Beal, 2004). Elle

entraîne une perturbation de la régulation du calcium et active ainsi les protéases telles que les calpaïnes (Bizat *et al.*, 2003). Le dysfonctionnement des mitochondries entraîne également la libération de cytochrome c et stimule les caspases. Par conséquent, l'atteinte mitochondriale pourrait jouer un rôle central dans le mécanisme pathogénique de la MH.

### 3.3. Stress oxydatif et rôle de la dopamine : une piste encore peu explorée

En raison de son importante activité métabolique et de sa capacité relativement réduite à régénérer ses cellules, le cerveau est particulièrement sensible aux dommages provoqués par les radicaux libres. Ces composés tels que les radicaux hydroxyl ( $\cdot\text{OH}$ ) et superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) sont formés de manière endogène principalement au niveau de la mitochondrie et représentent des molécules fortement réactives qui oxydent les lipides, les protéines et l'ADN, altérant ainsi le fonctionnement neuronal (Halliwell, 1992). Plusieurs données suggèrent que les radicaux libres pourraient être d'importants médiateurs de la mort des neurones striataux dans la MH.

Par exemple, les taux de marqueurs de stress oxydatif, tels que le glutathion oxydé et le nucléotide 8-hydroxy-désoxyguanosine, sont anormalement élevés dans le striatum des malades MH (Sian *et al.*, 1994; Browne *et al.*, 1997; Browne *et al.*, 1999). De plus, l'activité de l'aconitase mitochondriale, dont l'inactivation est un indicateur indirect de la production de radicaux libres, est diminuée de plus de 90% dans le noyau caudé et 70% dans le putamen des malades MH, alors que l'activité de l'enzyme est normale dans le cervelet et les fibroblastes, qui ne sont pas affectés dans la MH (Tabrizi *et al.*, 1999). De plus, les expériences réalisées sur les modèles murins de MH montrent que l'administration systémique de 3-NP produit une augmentation de radicaux libres dans le striatum chez des rats et des souris transgéniques sur-exprimant la huntingtine mutée (Schulz *et al.*, 1996; Bogdanov *et al.*, 1998). L'administration des neutralisateurs de radicaux libres N-acétylcystéine, coenzyme Q10 ou 7-nitroindazole exerce des effets neuroprotecteurs chez les rats traités par le 3-NP, ce qui suggère que les effets neurotoxiques du 3-NP sont au moins en partie dus à la production de radicaux libres (Schulz *et al.*, 1995; Matthews *et al.*, 1998; La Fontaine *et al.*, 2000).

Même si la source de production de radicaux libres chez ces modèles animaux n'a toujours pas été élucidée, l'inactivation des complexes II et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui a été démontrée dans les cerveaux de malades MH, ou l'excitotoxicité (directe ou indirecte) du glutamate via les récepteurs NMDA peuvent entraîner la production de radicaux libres (Jakel and Maragos, 2000). Toutefois, ces hypothèses ne permettent pas

d'expliquer l'atteinte sélective des neurones striataux dans la MH. Par exemple, l'administration systémique de 3-NP inhibe l'activité de la succinate déshydrogénase dans tout le cerveau mais n'est neurotoxique que dans le striatum (Brouillet *et al.*, 1998). Or le glutamate n'est pas spécifique au striatum, il est également présent dans des structures cérébrales qui ne sont pas sensibles au 3-NP, telles que le cortex cérébral (Cotman *et al.*, 1987).

Un facteur important qui pourrait contribuer à la vulnérabilité sélective des neurones striataux pourrait être la dopamine. En effet, le striatum est la structure cérébrale qui reçoit la plus grande innervation dopaminergique, et la dopamine peut générer la production de radicaux libres (Jakel and Maragos, 2000). Ce point fera l'objet d'un chapitre particulier (voir § 5).

### 3.4. Activation de voies de signalisation neurotoxiques dans le striatum

La voie JNK est une voie de signalisation intracellulaire largement impliquée dans les processus apoptotiques et son implication dans la MH a été suggérée par plusieurs études (voir § 4). En 2002, notre équipe a montré que l'activation de la voie JNK pouvait jouer un rôle dans la vulnérabilité spécifique des neurones striataux dans la MH (Garcia *et al.*, 2002). En effet, l'étude du modèle de rat recevant une injection systémique de 3-NP révèle que la voie JNK/c-Jun est activée spécifiquement dans le striatum, correspondant donc à la neurotoxicité sélective de ce modèle de MH. Ainsi, bien que le 3-NP produise le même effet inhibiteur de la succinate déshydrogénase dans toutes les structures cérébrales, seul le striatum présente une activation de cette voie pro-apoptotique.

De façon intéressante, les expériences menées par Liu en 1998 démontrent que la huntingtine mutée est capable d'activer cette même voie JNK dans des lignées de neurones hippocampiques (Liu Y. F., 1998). Cette étude montre également que l'inhibition de cette voie protège les neurones hippocampiques de la toxicité de la huntingtine mutée.

Par conséquent, la voie JNK, par sa spécificité d'activation dans le striatum dans le modèle 3-NP, et par ses liens avec la huntingtine mutée, devient un candidat intéressant pour la mort sélective des neurones striataux dans la MH.

### 3.5. Formation d'agrégats insolubles

Le domaine riche en glutamines favorise la formation d'agrégats

Plusieurs sites consensus de clivage ont été identifiés dans la séquence de la huntingtine (Figure 27). Elle peut être clivée par des caspases, calpaïnes et aspartyl protéases. Ces clivages produisent des fragments N-terminaux qui contiennent le domaine polyQ.

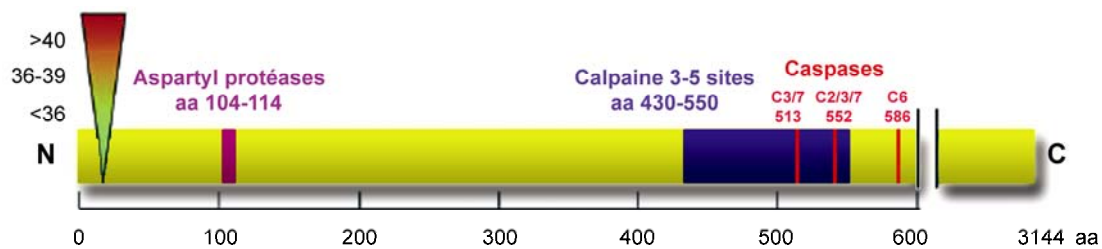


Figure 27 : Sites consensus de clivage présents dans la séquence de la huntingtine. Le schéma présente les domaines de clivage par les aspartyl protéases, les calpaïnes et les caspases (2, 3, 6 et 7) et les positionne dans la séquence de la huntingtine. Schéma adapté d'après (Wellington *et al.*, 2003).

Les fragments porteurs de séquence polyQ de taille normale ne s'accumulent pas dans les cellules, ce qui suggère qu'ils sont efficacement dégradés par le protéasome. Par contre, les fragments porteurs de l'expansion polyQ échappent à ce système de dégradation. Leur clairance étant retardée, ces fragments s'accumulent dans le cytoplasme et le noyau des neurones, devenant alors cytotoxiques (Bence *et al.*, 2001; Jana *et al.*, 2001; Waelter *et al.*, 2001; Lunkes *et al.*, 2002; Verhoef *et al.*, 2002) (Figure 28).

L'expansion de glutamines modifie la structure tri-dimensionnelle des fragments N-terminaux de huntingtine. En effet, la glutamine est un acide aminé polaire et sa présence en abondance crée des liens à l'intérieur et entre les protéines. En utilisant des techniques de microscopie électronique et de diffraction des rayons X, Perutz et ses collaborateurs ont démontré que les domaines polyQ forment des tonneaux de feuillets  $\beta$  maintenus par de fortes liaisons hydrogène. Ces structures agissent comme des « zipper polaires » et favorisent la formation d'agrégats (Perutz M., 1994; Perutz M. F. *et al.*, 1994; Perutz M. F. *et al.*, 2002a; Perutz M. F. *et al.*, 2002b) (Figure 28). Par ailleurs, il a été montré que les transglutaminases sont capables d'établir des liaisons covalentes entre les peptides contenant des répétitions de glutamines, et que la huntingtine mutée est un de leurs substrats (Kahlem *et al.*, 1996; Kahlem *et al.*, 1998). Les transglutaminases pourraient ainsi intervenir pour stabiliser les agrégats de huntingtine par l'établissement de liaisons covalentes (Green, 1993).

La huntingtine s'agrège lorsqu'elle contient plus de 35 glutamines répétées, ce qui correspond étroitement au seuil à partir duquel la MH se développe (Scherzinger *et al.*, 1997;

Huang *et al.*, 1998). L'accumulation progressive de protéines mal conformées et la formation d'agrégats insolubles est un processus commun aux maladies à polyQ, mais également à d'autres maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique.

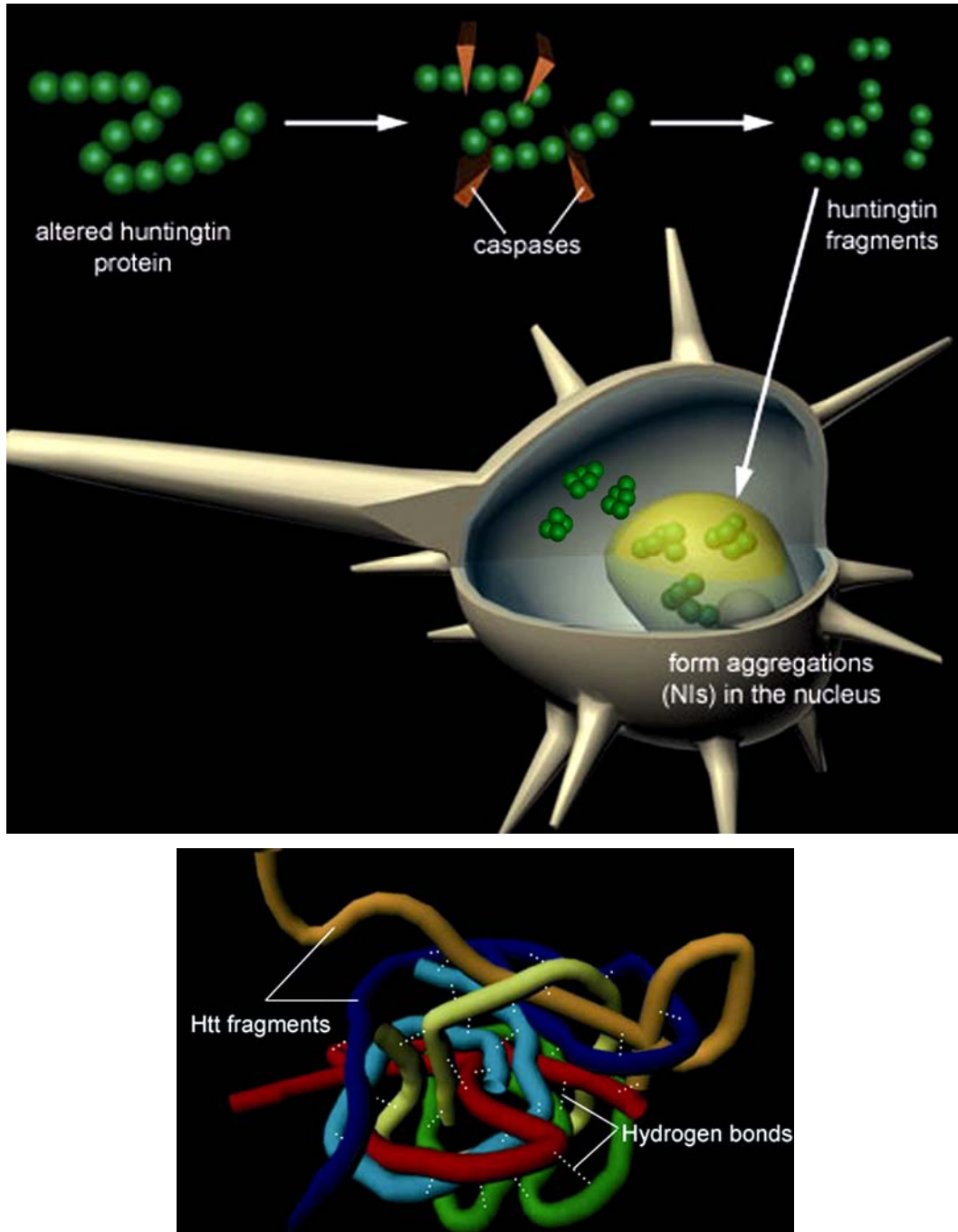


Figure 28 : Formation d'agrégats par la huntingtine mutée.

(*haut*) La huntingtine mutée est clivée par des caspases, des calpaïnes et des aspartyl protéases. Ce clivage génère des fragments N-terminaux porteurs de l'expansion polyQ. Ces fragments s'accumulent et forment des agrégats dans le cytoplasme (terminaison, neurites, soma) et le noyau des neurones. (*bas*) Structure d'un agrégat formé par des fragments de huntingtine mutée (htt), par l'interaction de leurs domaines polyQ. D'après les ressources de l'Université de Stanford, USA (<http://www.stanford.edu/>).

### La huntingtine est clivée par une caspase spécifique du striatum

La huntingtine possède des sites de clivages des caspases 2, 3, 6 et 7 (Figure 27). Les récents travaux de Hermel *et al.* montrent que les caspases présentent des profils d'expression spécifiques à un type cellulaire donné (Hermel *et al.*, 2004). Ainsi, le niveau d'expression de la caspase 7, qui interagit avec la huntingtine, est particulièrement élevé dans le striatum par rapport à d'autres régions cérébrales, telles que le cortex. De plus, au sein du striatum, cette caspase est uniquement exprimée dans les neurones épineux de taille moyenne, la population neuronale la plus vulnérable dans la MH. Par contre, la caspase 9, qui n'interagit pas avec la huntingtine, est enrichie dans les interneurones, qui sont préservés dans la MH. Cette étude montre également que i) l'interaction entre la caspase-2 et la huntingtine est polyQ-dépendante : leur affinité est plus grande lorsque la huntingtine est mutée ; ii) la caspase 7 se lie aussi bien avec la huntingtine normale que mutée ; iii) la caspase 6 n'interagit pas avec la huntingtine pleine longueur mais seulement avec un fragment N-terminal de huntingtine. Les auteurs suggèrent alors que des fragments N-terminaux de huntingtine mutée sont produits de façon accrue dans le striatum par rapport aux autres régions cérébrales. Le scénario est le suivant : la caspase 2, qui est une caspase initiatrice, se lie à la huntingtine mutée pleine longueur et recrute la caspase 7 (spécifiquement dans les neurones striataux vulnérables de la MH). L'association de ces deux caspases avec la huntingtine mutée stimule l'activité des autres caspases effectrices, notamment de la caspase 6, ce qui accélère la production de fragments de huntingtine mutée (Hermel *et al.*, 2004). Ces fragments s'accumulent en grandes quantités et forment des agrégats. D'après cette hypothèse, il en résulterait une plus grande quantité d'agrégats de huntingtine mutée dans le striatum des malades MH par rapport aux autres régions cérébrales.

Les agrégats sont présents dans les régions cérébrales les plus vulnérables dans la MH

Récemment, l'équipe de Djian a réalisé une caractérisation précise des inclusions présentes dans les cerveaux *post-mortem* de malades MH aux stades 3 et 4 (Vonsattel *et al.*, 1985), par des analyses immunohistochimiques et par une nouvelle méthode de purification des inclusions (Hoffner *et al.*, 2005). Cette étude montre notamment que les agrégats de huntingtine mutée, composés de fragments N-terminaux de différentes tailles, liés entre eux par des liaisons covalentes et non covalentes, sont présents dans les structures cérébrales qui sont affectées par la MH, à savoir le cortex et le caudé/putamen, mais qu'ils sont absents des structures non affectées, telles que le cervelet. Ces agrégats sont pratiquement uniquement neuronaux et ne sont pas présents dans les cellules gliales, qui

ne sont pas affectées dans la MH (Hoffner *et al.*, 2005). Les agrégats de huntingtine mutée sont donc spécifiques des cellules les plus vulnérables dans la MH.

#### Les agrégats sont des marqueurs de stress cellulaire

Si les agrégats de huntingtine mutée sont des caractéristiques neuropathologiques de la MH reconnus en tant que tels, leur rôle dans le mécanisme pathogénique entraînant la mort des neurones fait l'objet d'un vif débat entre les équipes de recherche. En effet, de nombreuses données suggèrent qu'ils sont directement impliqués dans la toxicité de la huntingtine mutée, d'autres proposent que la formation d'agrégats pourrait être une stratégie neuroprotectrice pour la cellule. Qu'ils soient toxiques ou neuroprotecteurs, les agrégats semblent être des marqueurs de stress cellulaire, représentant un événement causal ou une réponse à la toxicité de la huntingtine.

##### *3.5.1. La formation d'agrégats, une stratégie neuroprotectrice déployée en réponse à un stress cellulaire*

En 1998, les travaux de Saudou *et al.* suggèrent pour la première fois que la formation d'agrégats de huntingtine mutée est une stratégie neuroprotectrice pour la cellule, développée en réponse au stress que représente l'expression de la huntingtine mutée. En effet, en utilisant un modèle *in vitro* de cultures primaires de neurones striataux exprimant transitoirement un fragment N-terminal de la huntingtine mutée, Saudou *et al.* démontrent que la toxicité de la huntingtine mutée requiert sa localisation dans le noyau, mais qu'elle n'est pas corrélée à la formation d'agrégats. Au contraire, l'inhibition de la formation d'agrégats nucléaires (en empêchant l'ubiquitination de la huntingtine mutée) accélère la mort des neurones (Saudou *et al.*, 1998). Ainsi, les fragments N-terminaux de huntingtine mutée seraient toxiques dans leur forme soluble et la formation d'agrégats permettrait de neutraliser la toxicité de ces fragments, prolongeant ainsi la résistance et la survie de la cellule.

Or, nous avons vu précédemment que dans les cerveaux *post-mortem* de malades, les agrégats de huntingtine mutée sont présents dans les structures cérébrales qui sont touchées par la neurodégénérescence dans la MH (Hoffner *et al.*, 2005). Ces observations ont été faites sur des patients aux stades 3 et 4, c'est-à-dire chez lesquels la neurodégénérescence est avancée. Une hypothèse serait alors que les agrégats que l'on observe dans les neurones striataux de ces cerveaux ont permis à ces cellules de survivre jusqu'à ce stade de la maladie et que les neurones qui sont morts plus précocement ne contenaient pas d'agrégats. Par une technique de vidéomicroscopie automatisée dans une chambre thermostatée, l'équipe de Finkbeiner a observé les effets d'un fragment N-terminal de la hun-



tingtine mutée (correspondant à l'exon 1, en fusion avec la GFP) exprimé transitoirement dans des neurones striataux en culture. Ils ont ainsi pu suivre en temps réel l'expression et la localisation de la huntingtine mutée, la formation d'agrégats, et la survie cellulaire dans un même neurone et pendant plusieurs jours. Ils ont alors fait l'observation surprenante que les neurones dans lesquels la huntingtine mutée forme des agrégats ont un « risque de mourir » moins élevé que ceux dans lesquels la huntingtine mutée reste diffuse (Arrasate *et al.*, 2004). Il convient tout de même de noter que tous les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée finissent par mourir, qu'ils possèdent ou non des agrégats. De plus, ces résultats n'excluent pas la possibilité que les micro-agrégats formés par la huntingtine mutée avant la formation des agrégats visibles au microscope ( $1 \mu\text{m}^2$ ) puissent représenter la forme toxique de la huntingtine mutée.

En conclusion, ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la formation d'agrégats permettrait de résister temporairement à la toxicité de la huntingtine, et ne serait pas la cause directe de la mort des neurones dans la MH.

### *3.5.2. La présence d'agrégats insolubles perturbe le fonctionnement cellulaire dans tous les compartiments neuronaux*

Les agrégats formés par les fragments N-terminaux de huntingtine mutée sont présents dans tous les compartiments cellulaires des neurones : noyau, soma, neurites et terminaison synaptique. La taille de ces agrégats a été mesurée sur des cerveaux *post-mortem* de malades MH : le volume d'une inclusion peut aller jusqu'à  $300 \mu\text{m}^3$  (Hoffner *et al.*, 2005). Avec de telles proportions, il est facile d'imaginer que la simple présence de ces agrégats représente un encombrement stérique et une gêne au fonctionnement cellulaire, quel que soit le compartiment neuronal où ils se trouvent. De plus, les agrégats de huntingtine mutée peuvent interagir, attirer et séquestrer d'autres protéines porteuses de domaines d'interaction avec les séquences riches en glutamines, les empêchant alors d'exercer leur fonction cellulaire.

#### Les agrégats perturbent le fonctionnement du compartiment nucléaire

Le mécanisme de translocation nucléaire de la huntingtine n'est pas clair. Sa séquence ne présente pas de signal de localisation nucléaire consensus. Elle présente toutefois dans ses 548 premiers acides aminés un motif qui présente de grandes homologues avec la séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) de la protéine BRCA1 (BRCA1 Breast Cancer 1). Ce motif pourrait être responsable de la translocation nucléaire de la huntingtine (Chen *et al.*, 1996; Hackam *et al.*, 1998). Les fragments N-terminaux de la huntingtine entrent dans le noyau des neurones. Contrairement aux fragments de huntingtine normale qui peuvent

sortir du noyau par l'intermédiaire de la protéine Tpr, l'expansion de glutamines de la huntingtine mutée empêche son interaction avec cette protéine du pore nucléaire (Cornett *et al.*, 2005). L'interaction entre les fragments N-terminaux de la huntingtine et Tpr, et donc la possibilité pour la huntingtine de sortir du noyau, est d'autant plus faible que la répétition polyQ est longue, ce qui a été confirmé dans les neurones striataux d'un modèle murin de la MH (souris knock-in) (Wheeler *et al.*, 2000). Les fragments N-terminaux de la huntingtine mutée s'accumulent alors dans le noyau des neurones et y forment des agrégats (Figure 29). De plus, contrairement aux agrégats cytoplasmiques, les agrégats nucléaires ne peuvent pas être éliminés par les vacuoles d'autophagie (Iwata *et al.*, 2005). Les fragments de huntingtine possédant un large domaine polyQ présents dans le noyau, ne pouvant ni en sortir ni y être dégradés, pourraient interagir avec d'autres protéines nucléaires et perturber l'homéostasie de ce compartiment neuronal (Figure 29). En effet, la huntingtine mutée attire et séquestre dans ses agrégats des protéines contenant elles-mêmes des motifs riches en glutamines et qui sont souvent des acteurs importants pour la transcription, tels que le facteur de transcription TBP, les co-activateurs CBP, et HAT (Histone Acetyltransferase) (Kazantsev *et al.*, 1999; McCampbell *et al.*, 2000; Steffan *et al.*, 2000; Nucifora *et al.*, 2001). Les fragments N-terminaux de huntingtine mutée interagissent également avec la huntingtine normale exprimée par l'autre allèle (chez les individus hétérozygotes pour la mutation MH), la séquestrant dans les agrégats et l'empêchant ainsi d'assurer ses fonctions (Martindale *et al.*, 1998).

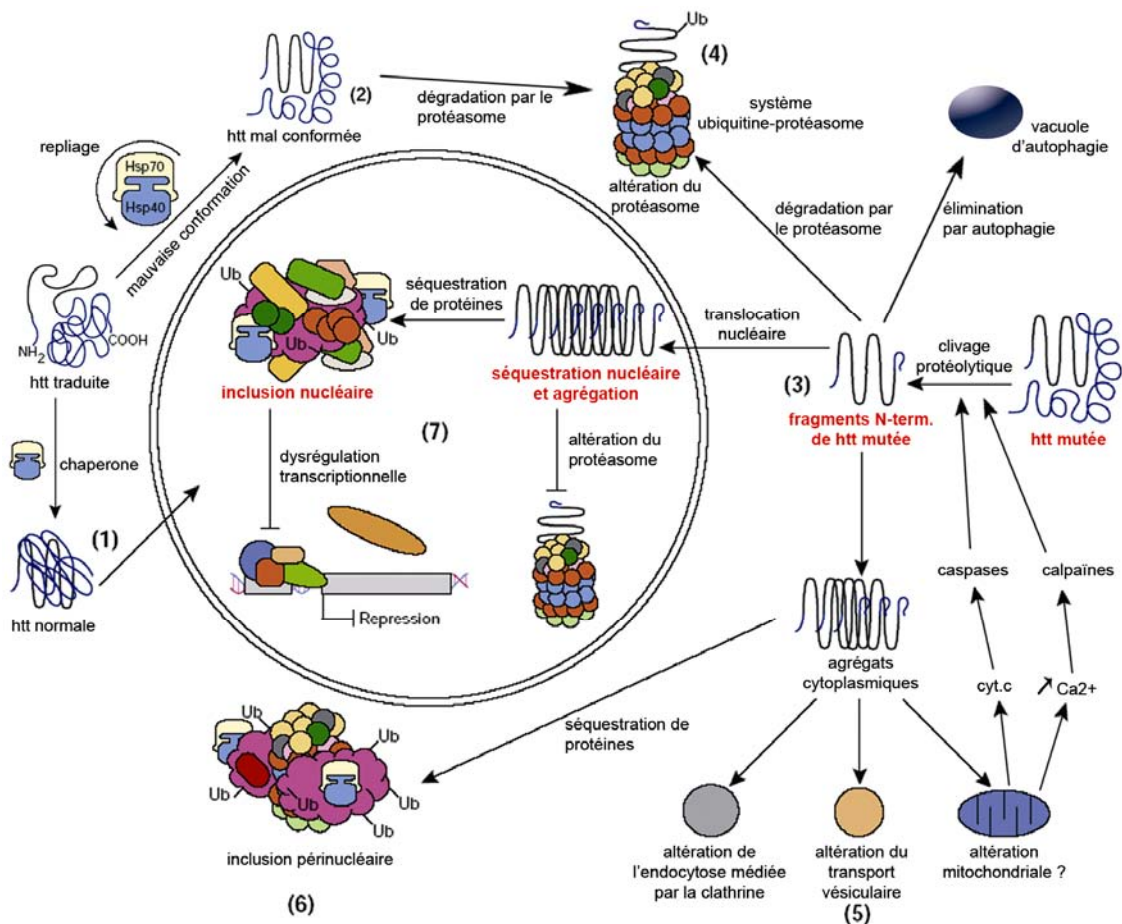


Figure 29 : Schéma modélisant les étapes conduisant à la formation des agrégats de huntingtine mutée et leur toxicité dans le noyau d'un neurone.

(1) Les protéines chaperones (Hsp70 et Hsp40) amorcent le repliement de la huntingtine (htt) normale nouvellement synthétisée. La huntingtine normale peut alors assurer ses fonctions dans le cytoplasme et le noyau du neurone. (2) Lorsque les chaperones détectent une mauvaise conformation de la huntingtine, elles tentent de la corriger. En cas d'échec, la huntingtine mal conformée est ubiquitinée et ainsi adressée au protéasome pour la dégrader. (3) L'expansion de glutamines dans la huntingtine mutée modifie sa conformation. Elle est clivée par des caspases et calpaïnes et les fragments N-terminaux porteurs du motif polyQ, s'ils ne sont ni dégradés par le système du protéasome ni par autophagie (4), s'accumulent dans le cytoplasme et dans le noyau. Ils forment alors des agrégats cytoplasmiques aux multiples cibles (5) et des inclusions périnucléaires en séquestrant d'autres protéines cytoplasmiques (6). Ils forment également des inclusions dans le noyau en séquestrant d'autres protéines nucléaires, telles que la huntingtine normale ou des protéines intervenant dans la régulation de la transcription, les empêchant d'assurer leurs fonctions (7). Schéma modifié et adapté d'après (Landles and Bates, 2004).

### Les agrégats perturbent le fonctionnement du compartiment somatique

Comme dans de nombreuses maladies à expansion de glutamines, les agrégats de huntingtine mutée sont ubiquitinés et co-localisent avec des protéines chaperones, telles que les HSP (Heat Shock Protein) 70 et leur co-activateur HDJ-2, HSP40, HSP90, ainsi qu'avec divers composants du protéasome (sous-unités 20 S, 19 S et 11 S) (Wytttenbach *et al.*, 2000; Jana *et al.*, 2001; Waelter *et al.*, 2001). La co-localisation de composants du système ubiquitine/protéasome avec les agrégats de huntingtine mutée suggère soit que la cellule

tente de dégrader les agrégats mais que ces derniers y sont résistants, soit que les composants du système de dégradation sont séquestrés dans les agrégats, auquel cas ils ne sont plus fonctionnels pour la cellule (Tarlac and Storey, 2003). En effet, de nombreux travaux montrent d'une part que le système du protéasome est inhibé par les agrégats de huntingtine mutée, et d'autre part que les agrégats sont résistants à ce système de dégradation (Bence *et al.*, 2001; Verhoef *et al.*, 2002; Venkatraman *et al.*, 2004). Cela entraîne une accumulation croissante de fragments N-terminaux de huntingtine mutée, d'où une accumulation d'agrégats et une amplification du processus (Waelter *et al.*, 2001; Venkatraman *et al.*, 2004). Par conséquent, l'accumulation d'agrégats est probablement à la fois une cause et une conséquence de l'inhibition du protéasome dans la cellule (Bence *et al.*, 2001; Ciechanover and Brundin, 2003; Goldberg, 2003).

### Les agrégats perturbent le transport neuritique

Dans la MH, ce sont des neurones qui dégèrent. Cette vulnérabilité peut-être due en partie à la structure du neurone, si spécifique avec ses prolongements neuritiques allongés et étroits. Les composants essentiels du neurone doivent être transportés sur de longues distances à travers l'axone et les dendrites, le long des microtubules, afin d'assurer la survie du neurone. Les agrégats de huntingtine mutée pourraient altérer ce transport neuritique, et ainsi mettre en danger la survie du neurone, par deux processus non mutuellement exclusifs : d'une part, localisés dans les prolongements neuritiques, ces agrégats pourraient créer un blocage physique et encombrer la circulation des autres protéines et vésicules (Figure 30) ; d'autre part, les agrégats pourraient séquestrer les protéines essentielles au transport neuritique, les empêchant d'assurer leurs fonctions.

Les analyses de cerveaux *post-mortem* de malades à des stades précoces de la MH révèlent la présence de neurites dystrophiques dans les neurones corticaux et striataux, qui précèdent la mort cellulaire (DiFiglia *et al.*, 1997; Sapp *et al.*, 1999). De même, chez une souris knock-in qui exprime la huntingtine mutée pleine longueur sous le contrôle du promoteur endogène *Hdh*, les agrégats neuritiques se forment au stade pré-symptomatique dans les projections des neurones striataux (Li H. *et al.*, 2001). Contrairement aux agrégats nucléaires, la formation progressive des agrégats neuritiques est étroitement corrélée au développement des symptômes neurologiques (Li H. *et al.*, 1999). Ces observations suggèrent fortement qu'une altération du transport neuritique participe à la pathogenèse de la MH.

Des anomalies du transport neuritique ont effectivement été observées dans des modèles génétiques de MH et dans les cerveaux de malades. Ainsi, les neurites dystrophiques des neurones striataux dans la MH présentent une accumulation de vésicules et

d'organelles associés aux agrégats de huntingtine mutée, au niveau de l'axone et des terminaisons (DiFiglia *et al.*, 1997; Sapp *et al.*, 1999). Dans un modèle de *Drosophile* exprimant l'exon 1 de la huntingtine mutée, les axones présentent les mêmes accumulations de vésicules et d'organelles liées à la présence d'agrégats dans l'axone. Ce phénomène ne s'observe habituellement que chez les *Drosophiles* dont un gène codant des sous-unités de protéines motrices a été muté (Gunawardena *et al.*, 2003). De plus, dans ce même modèle, la présence d'agrégats doit s'accompagner d'une titration des protéines motrices pour que le transport axonal soit bloqué et que le neurone meurt, conduisant à la mort de l'organisme. Les mêmes observations ont été faites avec un autre modèle *Drosophile* de la MH, montrant de plus que la synaptotagmine, une protéine synaptique qui subit un transport antérograde, se retrouve séquestrée dans les agrégats de huntingtine mutée (Lee *et al.*, 2004).

Par conséquent, ces études suggèrent que les agrégats neuritiques de huntingtine mutée sont toxiques par deux processus : d'une part le blocage physique du neurite, et d'autre part la séquestration des protéines motrices (Figure 30).

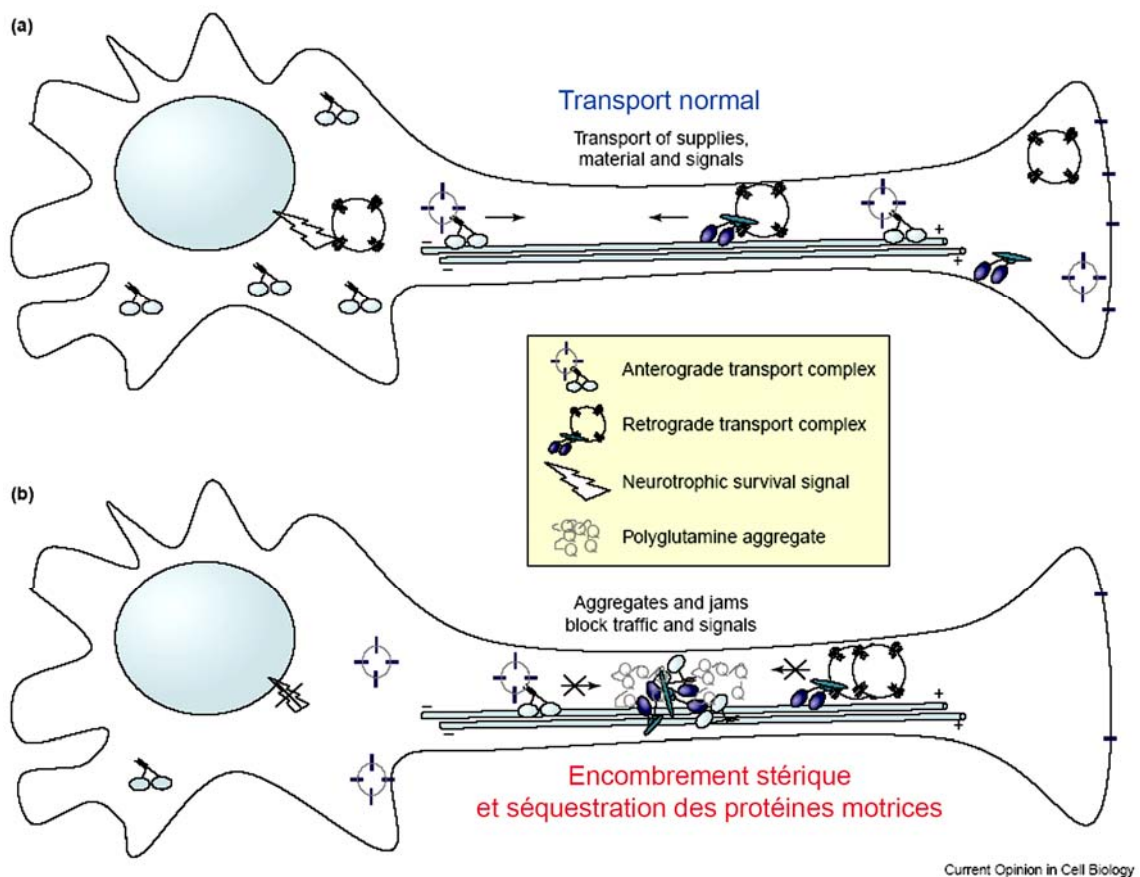


Figure 30 : Schéma modélisant la toxicité des agrégats dans l'axone d'un neurone. (a) Transport axonal normal. Les organelles, les composants des voies de signalisation et autres matériels nécessaires à l'homéostasie du neurone sont transportés antérogradement ou rétrogradement le long des microtubules. (b) La localisation d'agrégats de huntingtine mutée dans l'axone produit deux effets néfastes pour le neurone : d'une part, les agrégats entraînent un encombrement

stérique qui bloque la circulation dans l'axone, et d'autre part, ils séquestrent des protéines motrices indispensables au mécanisme de transport. Ce blocage entraîne un dysfonctionnement du neurone menant inexorablement à sa mort. Schéma d'après (Guzik and Goldstein, 2004).

### Les agrégats perturbent le fonctionnement de la synapse

L'une des fonctions clés des neurones est la libération de neurotransmetteur pour assurer la communication inter-cellulaire. Cette fonction est régulée par un grand nombre de protéines synaptiques, dont certaines sont altérées chez les malades MH et chez des modèles de souris transgéniques (Li J. Y. *et al.*, 2003b) (voir Figure 17). Parmi celles-là, de nombreuses protéines pré-synaptiques sont concernées. Par exemple, des pertes importantes de complexine II et de synaptobrevine-2, deux protéines qui régulent la fusion entre les vésicules synaptiques et la membrane plasmique, ont été observées dans le striatum de malades MH (Morton and Edwardson, 2001; Morton *et al.*, 2001).

La protéine spécifiquement neuronale PACSIN-1, qui joue un rôle central dans le recyclage des vésicules synaptiques et des récepteurs, voit sa localisation cellulaire modifiée. Cette protéine, qui interagit avec la huntingtine, est normalement située le long des neurites et dans les boutons synaptiques, où elle participe à la régulation de l'internalisation des récepteurs en reliant la machinerie de polymérisation de l'actine aux complexes protéiques de l'endocytose. Chez les malades MH, PACSIN-1 disparaît progressivement des boutons synaptiques, dès le stade pré-symptomatique, et co-localise avec la huntingtine mutée. L'affinité de PACSIN-1 avec la huntingtine étant plus forte lorsque la huntingtine est mutée, PACSIN-1 pourrait être séquestrée dans les agrégats de huntingtine mutée, ce qui entraînerait une perturbation de la signalisation post-synaptique (Modregger *et al.*, 2002). La séquestration de la huntingtine normale dans les agrégats de huntingtine mutée pourrait également perturber ses fonctions normales dans l'endocytose et le transport des vésicules à clathrine (voir § 2.1.2), et par conséquent, l'homéostasie synaptique.

Ces observations faites à partir de cerveaux de MH sont corroborées par les données expérimentales obtenues à partir de différents modèles animaux de MH. En effet, les cerveaux de souris transgéniques MH présentent de très faibles quantités de vésicules synaptiques dans les terminaisons nerveuses (Li H. *et al.*, 2003a). Ces vésicules, qui présentent une plus grande affinité pour la huntingtine mutée que pour la huntingtine normale, co-localisent avec les agrégats de huntingtine mutée. Cette anomalie synaptique s'accompagne d'une diminution de la libération de glutamate. Ainsi, les agrégats pourraient agir directement au niveau des vésicules et altérer la libération des neurotransmetteurs (Li J. Y. *et al.*, 2003b).

En conclusion, les agrégats de huntingtine mutée altèrent le fonctionnement des synapses en séquestrant des acteurs importants des mécanismes d'exocytose et d'endocytose.

Toutes ces observations proposent que, plutôt qu'induire la mort cellulaire par eux-mêmes, les agrégats de huntingtine mutée pourraient provoquer une dysfonction neuronale majeure, à l'origine de la MH. Cette hypothèse est fortement confortée par les caractéristiques d'un modèle murin très utilisé pour effectuer des essais thérapeutiques : les souris R6/2. Ces souris transgéniques expriment de façon ubiquitaire l'exon 1 de la huntingtine mutée humaine, contenant 145 répétitions CAG (Mangiarini *et al.*, 1996). Ces souris présentent des symptômes semblables à ceux de la maladie humaine : troubles moteurs progressifs, de type mouvements anormaux (Carter *et al.*, 1999), troubles cognitifs (Lione *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000), perte de poids et mort prématurée. Dans ce modèle, la maladie se développe très rapidement, les premiers agrégats de huntingtine mutée apparaissant dès l'âge de 2 semaines et la mort des souris survenant à l'âge de 12 semaines. Pourtant, très peu de mort neuronale a pu être détectée dans le cerveau de ces souris, y compris dans le striatum et le cortex cérébral, où les agrégats sont présents très précocement et en grandes quantités (Davies *et al.*, 1997; Turmaine *et al.*, 2000). Ces observations suggèrent que les symptômes de ce modèle murin de la MH résultent d'un dysfonctionnement des neurones et non de leur mort.

### *3.5.3. Les agrégats, marqueurs directs ou indirects de stress cellulaire*

Différentes stratégies thérapeutiques diminuent la formation d'agrégats et se montrent également neuroprotectrices. Nous présentons ici quelques-unes de ces stratégies.

En 2000, Ferrante *et al.* montrent que l'adjonction de créatine dans la nourriture dans un modèle murin de MH, les souris transgéniques R6/2, augmente la durée de vie des animaux, améliore leurs performances motrices, ralentit le développement de l'atrophie cérébrale et retarde également la formation d'agrégats (Ferrante *et al.*, 2000). L'effet neuro-protecteur de la créatine peut être médié de la stabilisation de la perméabilité mitochondriale. Cette étude est la première à démontrer l'effet parallèle d'un traitement sur les symptômes neuropathologiques et comportementaux d'animaux MH et sur la formation d'agrégats de huntingtine mutée.

Les travaux récents de Rangone *et al.* ont démontré que la phosphorylation de la protéine arfaptine 2 par Akt protège les neurones striataux en culture de la toxicité des fragments N-terminaux de huntingtine mutée, et diminue la formation d'agrégats (Rangone *et*

*al.*, 2005). Cette étude montre également que l'effet de l'arfaptine 2 phosphorylée ne cible pas directement les agrégats de huntingtine mutée mais qu'il est médié par la restauration de l'activité du protéasome.

En 2004, Tanaka *et al.* montrent, dans un modèle murin de MH, les souris transgéniques R6/2, qu'un traitement oral avec du tréhalose retarde l'apparition des symptômes et la dysfonction motrice provoquées par la MH. Le tréhalose est un dissaccharide qui stabilise les protéines en partie mal conformées. *In vitro*, le tréhalose stabilise la huntingtine mutée pleine longueur et inhibe la formation d'agrégats. *In vivo*, les souris R6/2 traitées avec le tréhalose présentent moins d'inclusions nucléaires (Tanaka *et al.*, 2004). De manière intéressante, il a récemment été montré que le tréhalose agit également sur un peptide impliqué dans la maladie d'Alzheimer, en diminuant l'agrégation du peptide A $\beta$ 40 et en réduisant sa neurotoxicité (Liu R. *et al.*, 2005). En 2003, Sanchez *et al.* montraient des résultats similaires à ceux obtenus avec le tréhalose avec un traitement des souris R6/2 par le rouge Congo. Ce colorant se lie aux fibrilles amyloïdes contenant des feuilletts  $\beta$ . Il est capable à la fois de disloquer les agrégats de huntingtine mutée et de prévenir leur formation, ce qui se traduit par une diminution du nombre d'agrégats dans le striatum des souris traitées, avec une stabilisation de leurs capacités motrices (Sanchez *et al.*, 2003).

En 2002, l'équipe de Thompson crée des peptides qui se lient au domaine polyQ de la huntingtine mutée et entrent ainsi en compétition avec d'autres interactions protéine-protéine, dont celles responsables de la formation d'agrégats. Ces peptides ont été testés dans un modèle MH de Drosophile. Cette étude montre que ces peptides, dessinés pour empêcher la formation d'agrégats, augmentent la survie de l'animal, protègent les photorécepteurs de la neurodégénérescence induite par la huntingtine mutée et inhibent la formation d'agrégats (Kazantsev *et al.*, 2002).

Enfin, des screenings de molécules ont été effectués sur différents modèles afin d'identifier de nouveaux candidats thérapeutiques pour la MH. Les molécules retenues ont souvent un effet à la fois sur la formation d'agrégats et la toxicité de la huntingtine mutée. Par exemple, en 2005, un nouveau composé a été identifié, le C2-8, par l'un de ces tests. *In vitro*, il inhibe la formation d'agrégats et protège les neurones de la toxicité de la huntingtine mutée. *In vivo*, dans un modèle MH de Drosophile, ce composé protège les photorécepteurs de la toxicité de la huntingtine mutée et diminue la taille et la densité des agrégats (Zhang *et al.*, 2005).

Il n'est pas possible d'assurer que le mode d'action des molécules testées est d'agir directement sur la formation d'agrégats elle-même et pas sur une autre cible intermédiaire. Ces études ne permettent donc pas de trancher entre un effet causal ou conséquent des



agrégats dans la toxicité de la huntingtine mutée. En effet, les substances testées peuvent agir sur les médiateurs de toxicité de la huntingtine mutée, diminuer le stress cellulaire, ce qui entraîne la diminution de la formation d'agrégats (comme le suggère l'exemple de l'arfaptine 2 phosphorylée). *A contrario*, les substances testées peuvent agir directement sur la formation d'agrégats, diminuant leur nombre et leur toxicité.

Nous proposons toutefois que, dans tous les cas, les agrégats représentent de bons marqueurs, directs ou indirects, de la souffrance cellulaire.

## 4. JNK et les maladies neurodégénératives

De plus en plus de données expérimentales indiquent que les voies moléculaires de la mort cellulaire programmée (PCD, programmed cell death) jouent un rôle important dans les maladies neurodégénératives. Ces voies connaissent alors un intérêt grandissant en tant que cibles thérapeutiques pour le développement de stratégies neuroprotectrices (Vila and Przedborski, 2003). L'une des voies de PCD qui a attiré une attention particulière est la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) de c-Jun N-terminal Kinase (JNK), qui conduit à la phosphorylation et à l'activation du facteur de transcription c-Jun. De nombreuses expériences menées *in vitro* et *in vivo* démontrent que la cascade de signalisation JNK/c-Jun est un médiateur de la mort cellulaire. De plus, l'inhibition de cette voie permettrait d'empêcher la mort avant l'apparition des dommages cellulaires irréversibles. Cette voie de signalisation semble alors prometteuse pour le développement de thérapies futures (Silva *et al.*, 2005).

Ce chapitre présente les principes de la signalisation de la voie JNK/c-Jun et son implication dans la mort cellulaire. Nous verrons également que cette voie a déjà été impliquée dans la pathophysiologie de maladies neurodégénératives et qu'elle pourrait jouer un rôle dans la vulnérabilité spécifique des neurones striataux dans la MH.

### 4.1. Qui est JNK ?

#### Les JNK, une grande famille

JNK fut initialement identifiée et purifiée en 1990 par Kyriakis *et al.* en tant que protéine kinase hépatique qui phosphoryle MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2) sur des résidus Ser/Thr en réponse à la cycloheximide chez le rat (Kyriakis and Avruch, 1990). Quelques années plus tard, deux études indépendantes ont identifié JNK en tant que protéine kinase qui est activée par un stress cellulaire et qui phosphoryle c-Jun sur les sérines 63 et 73 de son domaine d'activation N-terminal (Adler *et al.*, 1992; Hibi *et al.*, 1993). Les études suivantes ont permis de cloner JNK et de démontrer son appartenance à la famille des MAPK (Derijard *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1994).

La famille des JNK est divisée en trois sous-familles : JNK1, JNK2 et JNK3, qui sont codées par trois gènes différents. Chacun de ces gènes subit des épissages alternatifs qui produisent différentes isoformes protéiques, et la famille des JNK compte finalement dix isoformes (Figure 31). Les protéines JNK1 et JNK2 sont ubiquitaires, alors que les protéines

JNK3 sont principalement présentes dans le cerveau, avec une expression plus faible dans le cœur et les testicules (Kyriakis and Avruch, 2001).

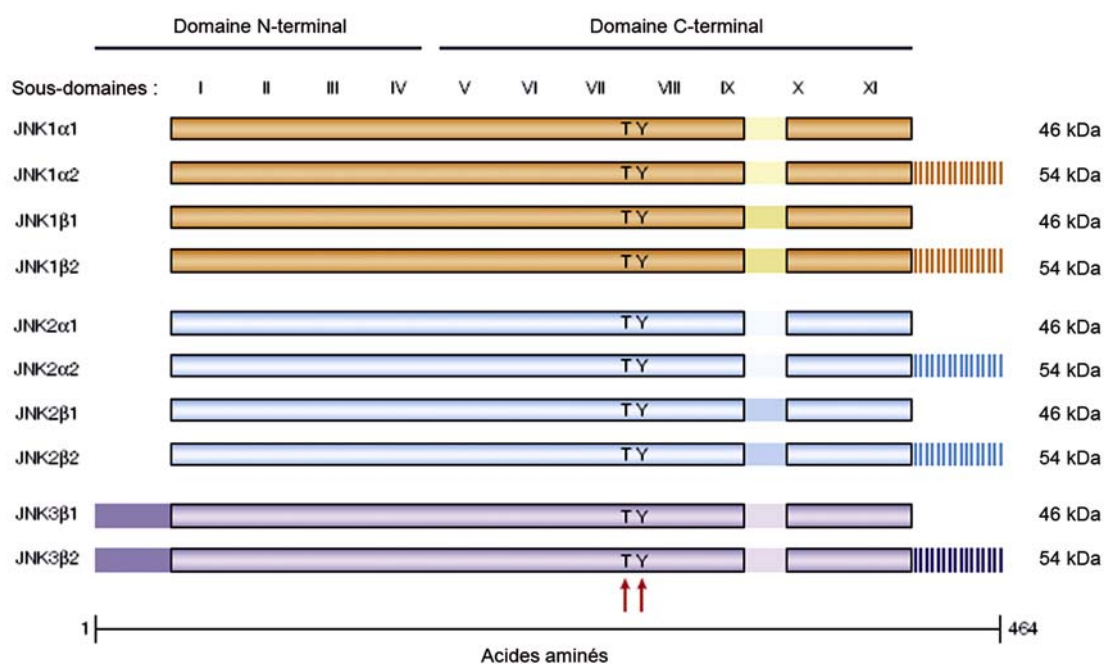


Figure 31 : Caractéristiques structurales des protéines JNK.

Les protéines c-Jun N-terminal Kinases (JNK) sont des sérine/thréonine kinases. Elles sont composées de 11 sous-domaines protéiques (indiqués de I à XI). La boucle d'activation de ces kinases est localisée entre les sous-domaines VII et VIII et comporte des résidus thréonine (T) et tyrosine (Y) qui doivent être tous deux phosphorylés pour une activation complète de la kinase. Les dix membres de la famille JNK sont générés par l'épissage alternatif des trois gènes *Jnk* (*Jnk1*, *Jnk2* et *Jnk3*). Les différences entre les dix formes de JNK sont représentées par les régions ombragées. Il existe deux sites clés d'épissage alternatif : le premier est situé entre les sous-domaines IX et X et produit des isoformes épissées dont la spécificité de substrat est altérée ; le second site est situé dans la partie C-terminale de la protéine et produit des protéines dont la longueur diffère de 42 ou 43 acides aminés (représentés par les régions hachées). Schéma modifié d'après (Manning and Davis, 2003).

### L'activation de JNK requiert une cascade de phosphorylations successives

Les études d'inactivation de gènes chez les souris ont montré que JNK est essentielle pour la phosphorylation de c-Jun et l'activité du complexe AP-1 stimulées par le TNF $\alpha$  (Tumor-Necrosis Factor  $\alpha$ ) (Ventura *et al.*, 2003), et que JNK est également requise pour certaines formes d'apoptose induites par des stress cellulaires tels que les radiations UV (Tournier *et al.*, 2000). Les JNK sont d'ailleurs encore appelées SAPK (Stress Activated Protein Kinase) car elles sont activées en réponse à des situations de stress cellulaire : UV, inhibiteur de la synthèse protéique tels que le cycloheximide, cytokines inflammatoires, chocs osmotiques ou thermiques, stress oxydatif. L'activation de JNK entraîne la phosphorylation de facteurs de transcription dont le principal est c-Jun, et de protéines cellulaires qui sont pour la plupart associées au mécanisme d'apoptose, telles que p53 (Manning and

Davis, 2003). Comme pour toutes les MAPK, l'activation de JNK résulte d'une cascade d'activation de type MAP3K → MAP2K → MAPK, qui repose sur des phosphorylations protéiques séquentielles.

Les MAP3K sont activées par la famille des petites protéines G, les Rho GTPases Rac1 et Cdc42. Les MAP3K de JNK comprennent les membres de la famille des MEKK, ASK1, MLK, TAK1 et TPL-2 (Liu J. and Lin, 2005). Une fois activées, les MAP3K, qui sont des Ser/Thr kinases, phosphorylent à leur tour les MAP2K.

Jusqu'à présent, deux MAP2K ont été identifiées pour JNK : JNKK1, également appelée MKK4 ou SEK1, et JNKK2, également appelée MKK7 (Sanchez *et al.*, 1994; Derijard *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1997; Tournier *et al.*, 2001). Les JNKK phosphorylent JNK sur ses résidus Thr183 et Tyr185 en reconnaissant le motif Thr-Pro-Tyr, conduisant ainsi à l'activation de JNK. Les deux JNKK présentent des affinités différentes pour les deux sites accepteurs de phosphate de JNK, MKK4 phosphorylant préférentiellement la Tyr185 (Lin *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 2000) et MKK7 la Thr183 (Fleming *et al.*, 2000; Tournier *et al.*, 2001). L'activation maximale de JNK requiert donc une coopération entre ces deux JNKK.

L'inactivation de JNK est en partie assurée par des Ser/Thr et des Tyr phosphatases, et en particulier par les MAPK phosphatases (MKP) de type MKP-1, MKP-2, MKP-3 MKP-4 et M3/6 (Camps *et al.*, 2000; Keyse, 2000).

#### L'activation de JNK fait intervenir des plateformes protéiques

Les différentes kinases qui interviennent aux niveaux successifs de la cascade de phosphorylation menant à l'activation de JNK (*i.e.* MAP3K, JNKK et JNK) forment des « signalosomes », des sortes d'échafaudages protéiques qui favorisent et rendent plus efficace l'activation de cette voie de signalisation (Figure 33). La formation de ce complexe protéique fait intervenir deux mécanismes essentiels : l'interaction entre les différentes kinases à travers leur « domaine d'amarrage », et l'intervention d'une protéine d'échafaudage (Tanoue and Nishida, 2003). Il y a quelques années, plusieurs études ont permis de découvrir que l'interaction moléculaire entre MAP3K, MAP2K et MAPK repose sur des régions spécifiques qui sont conservées entre les MAPK et les molécules interagissant avec elles (Gavin and Nebreda, 1999; Jacobs *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999; Tanoue *et al.*, 2000). Ces régions sont appelées « sites d'amarrage », ou « docking sites » (Figure 32). Le premier motif d'amarrage qui a été identifié était le domaine delta (ou « domaine D ») du facteur de transcription c-Jun, qui est essentiel pour l'activation de c-Jun par JNK (Hibi *et al.*, 1993; Dai *et al.*, 1995). D'autre part, le domaine N-terminal de MKK4 contient le site d'amarrage qui sert de site de liaison à la fois à sa propre kinase MEKK1, et à son substrat JNK (Xia Y. *et al.*, 1998). La caractéristique principale de ce site d'amarrage est qu'il se situe en de-

hors du site catalytique des MAPK. L'interaction par le site d'amarrage est donc différente de l'interaction transitoire qui lie habituellement une enzyme à son substrat et qui, elle, se produit au niveau du centre actif pendant la réaction catalytique (Tanoue and Nishida, 2003).

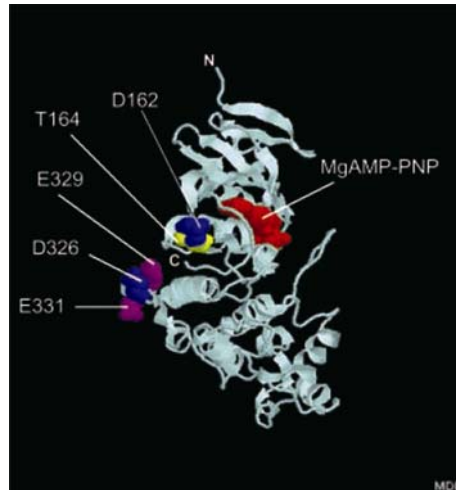


Figure 32 : Structure tridimensionnelle de JNK3 dans sa forme inactive (non phosphorylée). Le site actif de JNK3 est occupé par un analogue de l'ATP et deux ions  $Mg^{2+}$  (MgAMP-PNP, en rouge). Les positions des résidus équivalents à ceux de JNK2 qui sont essentiels à l'interaction d'amarrage sont indiquées. La figure a été générée en utilisant le logiciel *Protein Explorer and Chime software* (MDL). D'après (Mooney and Whitmarsh, 2004).

JNK interagit également avec des protéines d'échafaudage qui permettent l'assemblage de ces complexes protéiques (Figure 33). Les JIP (JNK-Interacting Protein) forment une famille importante de protéines d'échafaudage des JNK (Morrison and Davis, 2003). Cette famille est composée de trois membres, JIP1, JIP2 et JIP3, qui sont codés par trois gènes différents. JIP1 et JIP2 présentent de grandes homologues structurales et sont exprimées dans de nombreux tissus (Yasuda *et al.*, 1999). Elles interagissent avec JNK1, 2 et 3, et JIP2 pourrait également réguler la voie de signalisation p38 (Buchsbaum *et al.*, 2002; Robidoux *et al.*, 2005). JIP3, également appelée JSAP1 (JNK/Stress-activated protein kinase-Associated Protein 1), présente une structure différente de JIP1 et JIP2, elle est exprimée quasiment exclusivement dans le cerveau et interagit préférentiellement avec JNK3 (Ito *et al.*, 1999; Kelkar *et al.*, 2000; Akechi *et al.*, 2001; Kelkar *et al.*, 2003). JNK3 interagit également spécifiquement avec la  $\beta$ -arrestine 2, qui lui sert de protéine d'échafaudage (McDonald *et al.*, 2000).

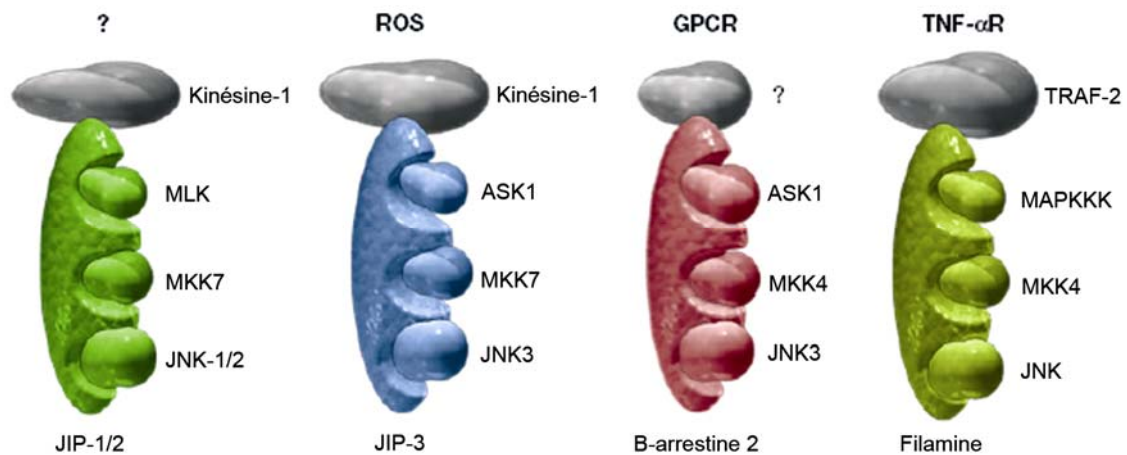


Figure 33 : Organisation des plateformes protéiques permettant l'activation de JNK.

Les protéines kinases de la voie JNK forment des modules de signalisation grâce à l'intervention de protéines d'échafaudage. Ces dernières se lient à des membres distincts de la voie JNK. Ces protéines d'échafaudage, ici JIP 1, 2 et 3,  $\beta$ -arrestine 2 et filamine, pourraient ainsi participer à la spécificité de la réponse de JNK à un stimulus et dans un environnement spatial donné. Les JIP1 et 2 se lient aux composants de la voie MLK/MKK7/JNK1 ou 2. JIP3 est plus spécifique de JNK3 et se lie à ASK1, MKK7 et JNK3 en réponse à la sur-production de ROS par exemple. La  $\beta$ -arrestine 2 lie les GPCR activés par leur ligand et joue un rôle primordial dans leur désensibilisation. De récentes études démontrent que la  $\beta$ -arrestine 2 peut également lier les composants de la voie JNK : ASK1/MKK4/JNK3. La filamine est une large protéine qui interagit avec les filaments d'actine et participe à leur organisation. Elle interagit également avec MAPKKK, MKK4 et JNK en réponse au  $TNF\alpha$ . Schéma modifié d'après (Manning and Davis, 2003).

JIP est transportée par la kinésine, protéine motrice des microtubules (Morrison and Davis, 2003), et la  $\beta$ -arrestine 2 se lie aux vésicules d'internalisation des récepteurs métabotropiques (voir § 5.3.2). Ainsi, outre le rassemblement spatial des différents composants d'une même voie de signalisation, les protéines d'échafaudage, telles que JIP3 et la  $\beta$ -arrestine 2, pourraient réguler la localisation de JNK activé dans la cellule (Figure 34).

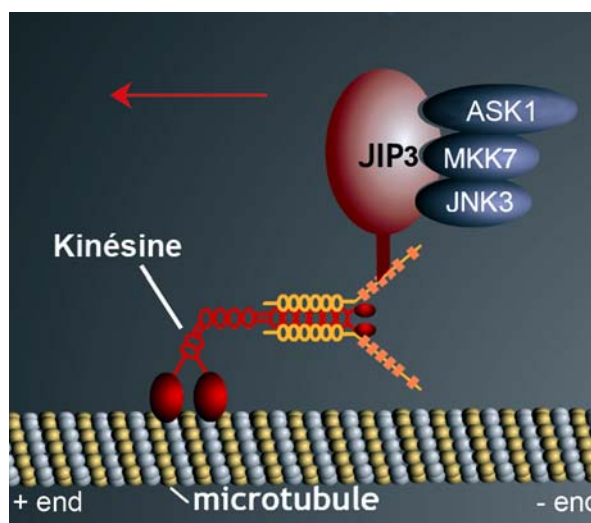


Figure 34 : Double rôle de JIP3 dans l'activation de JNK3.

JIP3 permet d'une part d'assembler ASK1, MKK7 et JNK3, favorisant ainsi l'activation de JNK3. D'autre part, JIP3 se déplace le long des microtubules par l'intermédiaire de la kinésine. JIP3 peut

ainsi réguler à la fois l'activation de JNK3 et sa localisation subcellulaire. Schéma modifié d'après une animation réalisée par le Pr Schnapp B.J., université de l'Oregon, USA.

### JNK, une protéine pro-apoptotique

Les JNK sont des médiateurs cliniquement pertinents des maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn, des dommages ischémiques aigus qui font suite à un infarctus du myocarde, de la résistance à l'insuline qui caractérise le diabète de type 2 et de la neurodégénérescence chronique des maladies d'Alzheimer et de Parkinson par exemple (Manning and Davis, 2003; Waetzig and Herdegen, 2005).

Ainsi, de nombreuses études, tant *in vitro* qu'*in vivo*, montrent que JNK fonctionne en tant que protéine pro-apoptotique (Davis, 2000; Lin, 2003; Liu J. and Lin, 2005). Les expériences d'inactivation de gènes chez les souris montrent notamment que JNK joue un rôle pro-apoptotique dans les neurones.

Les souris déficientes pour l'un des gènes *Jnk1*, *Jnk2* ou *Jnk3* se développent normalement (Yang *et al.*, 1997; Kuan *et al.*, 1999). Par contre, les souris knock-out pour les deux gènes *Jnk1* et *Jnk2* meurent prématurément et présentent des anomalies cérébrales imputables à une dérégulation de l'apoptose. Ainsi, JNK1 et JNK2 pourraient assurer des fonctions redondantes au cours du développement cérébral embryonnaire. Bien que l'inactivation de *Jnk3* ne présente pas de conséquence apparente durant le développement embryonnaire de la souris, il semble évident que JNK3 joue un rôle pathologique en aval de stimuli à l'origine de stress cellulaire. En effet, chez les souris knock-out pour le gène *Jnk3*, les neurones de l'hippocampe sont résistants à l'excitotoxicité induite par le kaïnate, un agoniste des récepteurs au glutamate (Yang *et al.*, 1997). L'inactivation de *Jnk3* bloque la phosphorylation de c-Jun et la mort des neurones induite par la privation en facteurs trophiques (Bruckner *et al.*, 2001). L'inactivation du gène *Jip1*, protéine d'échafaudage de la voie JNK, rend également les neurones hippocampiques résistants à l'apoptose normalement induite par le kaïnate (Whitmarsh *et al.*, 2001).

La fonction pro-apoptotique de JNK dans les neurones semble être médiée par c-Jun. Ce facteur de transcription fait partie des complexes AP-1 (Activator Protein-1) qui se composent de dimères de facteurs de transcription appartenant aux familles Jun (c-Jun, JunB et JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1 et Fra2) et/ou ATF (Karin, 1995; Karin *et al.*, 1997; Shaulian and Karin, 2002). Ces dimères peuvent être des homodimères Jun ou des hétérodimères Jun/Fos ou Jun/ATF. La composition de ce dimère détermine son activité transcriptionnelle et les gènes cibles (Kaminska *et al.*, 2000; Shaulian and Karin, 2002). La phosphorylation de c-Jun est essentielle pour l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 (Ham *et al.*, 1995; Behrens *et al.*, 1999). Le blocage de l'activité de c-Jun à l'aide

d'anticorps neutralisants ou par surexpression d'une forme dominante négative (mutant de c-Jun privé de son domaine d'activation), protège les neurones de la mort apoptotique induite par privation de facteurs trophiques (Estus *et al.*, 1994; Ham *et al.*, 1995). Au contraire, la surexpression de c-Jun dans des neurones en culture déclenche leur mort cellulaire par apoptose (Ham *et al.*, 1995). Enfin, le rôle du module JNK/c-Jun dans l'apoptose neuronale a fortement été démontré par l'étude de souris transgéniques dont les sites de phosphorylation de c-Jun par JNK, les Ser63 et Ser73, ont été mutés en alanines, non phosphorylables. En effet, chez ces souris, les neurones de l'hippocampe sont protégés de l'apoptose induite par l'injection d'acide kaïnique *in vivo* et *in vitro* (Behrens *et al.*, 1999).

#### La voie JNK participe à l'apoptose résultant d'un stress oxydatif

Le rôle pro-apoptotique de JNK répond à divers stimuli. Il peut par exemple résulter d'un stress oxydatif dans la cellule. La production excessive de radicaux libres, tels que les anions superoxydes et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mène aux dommages des composants cellulaires, au dysfonctionnement et finalement à la mort de la cellule. Il est par exemple clairement établi que l'excès de radicaux libres est impliqué dans des processus pathologiques tels qu'une crise cardiaque, un infarctus du myocarde et la mort neuronale (Annunziato *et al.*, 2003; Kumar and Jugdutt, 2003). L'activation de JNK par les radicaux libres peut s'effectuer par deux mécanismes, l'un dépendant de la thioredoxine (Trx), l'autre de la glutathione S-transférase Pi (GSTp) (Sumbayev and Yasinska, 2005).

La protéine ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1), l'une des MAP3K de JNK, est fortement activée dans les cellules qui sont exposées à divers oxydants et elle est impliquée dans l'apoptose induite par un stress oxydatif (Saitoh *et al.*, 1998; Tobiume *et al.*, 2001; Sarker *et al.*, 2003). Trx, une protéine de régulation des mécanismes de réduction/oxydation (redox) qui est ubiquitairement exprimée, se lie directement à ASK1 et inhibe ainsi l'activité de la kinase (Figure 34). La liaison de Trx à ASK1 nécessite la présence d'un pont disulfure sous sa forme réduite, entre deux résidus cystéines du site catalytique de Trx : Cys32 et Cys35. Lorsque ce pont S-S est oxydé, Trx ne peut plus se lier à ASK1. Par conséquent, sous traitement de la cellule à de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Trx est oxydée et se dissocie d'ASK1. ASK1 libérée est alors activée par autophosphorylation sur sa Thr845 (Matsukawa *et al.*, 2004). ASK1 activée phosphoryle JIP3, qui recrute alors MKK7 et JNK3 dans le complexe JIP3/ASK1 (Matsuura *et al.*, 2002) (Figure 33).

Il existe des données convaincantes qui suggèrent que la GSTp participe également à la régulation de l'apoptose induite par JNK en réponse à un stress oxydatif (Filomeni *et al.*, 2003; Townsend and Tew, 2003; Sumbayev and Yasinska, 2005). La GSTp joue un rôle im-



portant dans la détoxification des radicaux libres et catalyse l'action du glutathion réduit (GSH). Au contraire de Trx, elle s'associe directement avec JNK, inhibant ainsi son activité (Adler *et al.*, 1999). Lors de la production excessive de radicaux libres, GSTp se dissocie de JNK, la rendant ainsi activable (Adler *et al.*, 1999; Yin *et al.*, 2000; Ishisaki *et al.*, 2001; Elsby *et al.*, 2003).

## 4.2. Implication de JNK dans les maladies neurodégénératives

L'utilisation de petites molécules inhibitrices de JNK, telles que le SP-600125 (dont le nom chimique est anthra[1-9cd]-pyrazol-6(2H)-one) qui bloque le domaine catalytique de toutes les formes de JNK (Bennett *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2001), a permis de démontrer que l'inhibition de JNK est neuroprotectrice (Borsello and Bonny, 2004). Parce que la stimulation de JNK3 entraîne les effets les plus nuisibles, dont l'apoptose, et parce qu'elle est la seule JNK dont l'expression est restreinte au cerveau, elle est considérée, parmi les JNK, comme étant la cible la plus pertinente cliniquement pour l'établissement de stratégies neuroprotectrices (Resnick and Fennell, 2004; Waetzig and Herdegen, 2005). La délétion du gène *Jnk3* chez la souris est neuroprotectrice contre l'ischémie, le stress oxydatif et l'excitotoxicité, et atténue les traits pathologiques des maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Yang *et al.*, 1997; Morishima *et al.*, 2001; Coffey *et al.*, 2002; Kuan *et al.*, 2003; Brecht *et al.*, 2005). Dans une étude récente Hunot *et al.* montrent que la double invalidation des gènes *Jnk2* et *Jnk3* est nécessaire et suffisante pour protéger les neurones dopaminergiques de l'activation de c-Jun et de la mort cellulaire induite par le MPTP, agent pharmacologique qui modélise la maladie de Parkinson (Hunot *et al.*, 2004). Ainsi, de plus en plus d'études s'intéressent au rôle que pourrait jouer la voie JNK dans les maladies neurodégénératives et s'interrogent sur la possibilité d'en faire une cible thérapeutique (Manning and Davis, 2003).

### 4.2.1. JNK impliquée dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une perte de mémoire progressive et la détérioration des fonctions cognitives. Les caractéristiques neuropathologiques de cette maladie comprennent la formation de plaques séniles, qui sont des dépôts extracellulaires de peptides  $\beta$ -amyloïdes, et une perte synaptique et cellulaire qui touche majoritairement le cortex et l'hippocampe. Les analyses génétiques de familles atteintes par la maladie d'Alzheimer ont établi des liens entre les mutations du précurseur du peptide amyloïde (APP, Amyloid Precursor Protein) et les gènes codant la préséniline *PSEN1* et *PSEN2*, ce qui

suggère que la préséniline pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Les modèles animaux ont révélé que les mutations identifiées dans l'APP et les gènes *PSEN1* et *PSEN2* affectent la génération et le dépôt des peptides  $\beta$ -amyloïdes (Scheuner *et al.*, 1996). La toxicité directe du peptide  $\beta$ -amyloïde est supposée contribuer à la dysfonction et la mort neuronales observées dans la maladie d'Alzheimer. *In vitro*, l'exposition de neurones à ce peptide résulte en une rétraction neuritique et une mort cellulaire de type apoptotique. La mort cellulaire induite par le peptide  $\beta$ -amyloïde est atténuée dans les neurones corticaux provenant de souris knock-out pour *Jnk3*, et JNK3 intervient dans cette mort cellulaire à travers l'activation de c-Jun et l'augmentation de l'expression de Fas ligand (Morishima *et al.*, 2001). Les coupes de cerveaux *post-mortem* de patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent une distribution altérée des JNK1, 2 et 3 qui peut être soit une cause, soit une conséquence du processus pathologique (Pei *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001). JNK phosphoryle Tau *in vitro* sur des sites localisés dans les plaques neurofibrillaires, dont Tau est le constituant majeur (Reynolds *et al.*, 1997). De plus, le marquage de pJNK chez des souris transgéniques surexprimant une forme mutée de *PSEN1*, est localisé dans les neurones autour des plaques amyloïdes, et dans les neurones qui présentent une accumulation intracellulaire de peptide  $\beta$ -amyloïde (Shoji *et al.*, 2000). Un rôle direct de la voie JNK dans la régulation fonctionnelle et le métabolisme d'APP a également été suggéré, APP étant notamment un substrat de JNK3 (Reynolds *et al.*, 2000).

Toutes ces données suggèrent fortement que la signalisation à travers la voie JNK puisse être impliquée dans les événements pathologiques qui entrent en jeu dans la maladie d'Alzheimer (Manning and Davis, 2003).

#### *4.2.2. JNK impliquée dans la maladie de Parkinson*

La maladie de Parkinson est caractérisée par des mouvements anormaux (tremblements au repos, hypertonie, akinésie) qui résultent de la mort sélective des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée et du manque de dopamine conséquent. De même que pour la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington, la perte neuronale dans la maladie de Parkinson est progressive et s'étend sur une longue période. Plusieurs études reposant sur des analyses de cerveaux *post-mortem* de patients atteints de la maladie de Parkinson ont révélé que les neurones vulnérables dans cette maladie meurent par apoptose (Anglade *et al.*, 1997). D'après l'autopsie de ces cerveaux, il n'y a jusqu'à présent aucune évidence directe de l'implication de JNK dans la maladie de Parkinson, mais cette implication dans le processus pathogénique est fortement suggérée par les études réalisées sur des cultures cellulaires et des modèles animaux.

L'un des modèles animaux de la maladie de Parkinson les plus étudiés est un modèle pharmacologique créé par l'administration systémique d'une neurotoxine spécifique des neurones dopaminergiques nigrostriataux, le MPTP (1-Méthyl-4-Phényl-1,2,3,6-TétrahydroPyridine). À l'exception des corps de Lewy, les inclusions intracellulaires composées principalement d' $\alpha$ -synucléine, l'administration du MPTP produit un profil de neurodégénérescence et une neuropathologie très similaires à celles observées dans les cerveaux *post-mortem* de patients atteints de la maladie de Parkinson. Après son administration systémique, le MPTP, qui est une pro-toxine, traverse rapidement la barrière hémato-encéphalique, puis il est métabolisé successivement en MPDP<sup>+</sup> (1-Méthyl-4-Phényl-2,3-DihydroPyridinium) et enfin en MPP<sup>+</sup> (1-Méthyl-4-PhénylPyridinium), le composé toxique actif. Le MPP<sup>+</sup> est importé dans les neurones dopaminergiques par le transporteur de la dopamine (DAT), pour lequel il présente une grande affinité. Le MPP<sup>+</sup> est ensuite concentré dans la mitochondrie où il perturbe la respiration mitochondriale en inhibant le complexe I de la chaîne de transport des électrons. Il en résulte une augmentation de production de radicaux libres qui entraîne un stress oxydatif et l'activation d'un programme de mort cellulaire (Vila and Przedborski, 2003).

L'activation de JNK et de sa kinase MKK4 ont été observées après l'administration de MPTP (Saporito *et al.*, 2000; Xia X. G. *et al.*, 2001). L'inhibition de l'activation de JNK par l'agent pharmacologique CEP-1347 ou CEP-11004, ou son inhibition par transfert génique adénoviral du domaine de liaison de JIP1 à JNK, inhibe l'activation de c-Jun et des caspases qui sont induites par le MPTP dans la substance noire. Ce traitement bloque également la mort neuronale dans la substance noire et la perte de catécholamine dans les terminaisons dopaminergiques, s'accompagnant d'une atténuation des anomalies comportementales chez les souris (Saporito *et al.*, 1999; Xia X. G. *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que l'activation de JNK est un événement important dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson et qu'elle pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante. Le CEP-1347, qui est un inhibiteur de MLK, une kinase en amont de JNK, est d'ailleurs actuellement en étude clinique pour le traitement de la maladie de Parkinson. Une étude pilote a été réalisée en 2004 pour tester la tolérabilité du CEP-1347 et ses interactions avec la lévodopa chez les patients atteints de maladie de Parkinson. Ce test a démontré que le traitement au CEP-1347 mené sur une période de quatre semaines est bien toléré chez les patients et n'affecte pas la pharmacocinétique de la lévodopa (Group, 2004). Ce premier essai permet ainsi de mener une étude à grande échelle et de longue durée sur les effets de ce traitement qui vise à stopper ou ralentir la progression de la maladie de Parkinson.

### 4.3. JNK et la maladie de Huntington

La huntingtine mutée est capable d'activer le module JNK/c-Jun dans plusieurs modèles

Certaines études ont proposé que JNK puisse également être impliquée dans la pathogenèse de la MH. Ainsi, dans des lignées de neurones hippocampiques, la surexpression de la huntingtine mutée pleine longueur induit la mort par apoptose des neurones via l'activation de JNK (Liu Y. F., 1998). La co-expression d'une forme dominante négative de MKK4, l'une des kinases de JNK, bloque presque complètement l'activation de JNK et la mort neuronale induites par la huntingtine mutée. Par une étude complémentaire, ce groupe a démontré que la huntingtine normale interagit avec MLK2, l'une des MAP3K en amont de JNK, et que l'expansion de glutamines de la huntingtine mutée interfère avec cette interaction (Liu Y. F. *et al.*, 2000). Ainsi, lorsque la huntingtine mutée est exprimée, MLK2 se trouve libre dans le cytoplasme et capable d'être recrutée pour activer la voie JNK.

Merienne *et al.* ont également étudié l'influence de l'expression de la huntingtine mutée sur l'activation du module JNK/c-Jun. Ils ont pour cela utilisé des cellules COS surexprimant transitoirement, et des lignées de cellules NG108 exprimant de façon stable un fragment N-terminal de huntingtine mutée. Ils ont aussi analysé les rétines de souris transgéniques R6/1, qui expriment l'exon 1 de la huntingtine mutée. Leur étude a montré que la huntingtine mutée inhibe l'activité des phosphatases de JNK, les M3/6, ce qui résulte en une phosphorylation prolongée de JNK et de sa cible c-Jun. L'activité basale de JNK étant faible, l'activation de cette voie reste modérée (Merienne *et al.*, 2003).

Le module JNK/c-Jun est activé *in vivo* dans un modèle pharmacologique de MH

A l'aide d'un modèle pharmacologique de MH, consistant en une administration systémique de 3-NP chez le rat, Garcia *et al.* ont montré que la dégénérescence spécifique des neurones striataux s'accompagne d'une activation du module JNK/c-Jun restreinte aux neurones du striatum (Garcia *et al.*, 2002). Cette observation est d'autant plus intéressante que le 3-NP ne possède pas de tropisme particulier pour le striatum et que son administration systémique entraîne l'inhibition de la SDH dans des structures qui ne présentent pas de neurodégénérescence ni d'activation de JNK, telles que le cortex cérébral. L'activation de JNK et de c-Jun a été reproduite *in vitro*, dans des cultures primaires de neurones striataux exposés au 3-NP. De plus, dans ce modèle *in vitro*, la mort neuronale induite par le 3-NP est inhibée par la surexpression d'une forme « dominante négative » de c-Jun, qui ne peut pas être phosphorylée par JNK.

Ces approches complémentaires apportent des arguments forts en faveur d'une possible implication du module JNK/c-Jun dans la mort des neurones striataux dans ce modèle pharmacologique de la MH.

## 5. Dopamine : un neuromodulateur important dans le système nerveux central, qui peut devenir neurotoxique

La dopamine est un neuromodulateur important pour les fonctions striatales. De fait, le striatum représente la structure cérébrale qui reçoit les afférences dopaminergiques, en provenance du mésencéphale, les plus massives. Son action s'exerce par l'intermédiaire de plusieurs types de récepteurs, que nous présenterons dans ce chapitre. Ce chapitre dévoilera également comment la dopamine peut, outre ses nombreuses fonctions physiologiques, se révéler toxique pour les neurones. Ceci nous amènera à exposer différents arguments en faveur d'un rôle de la dopamine dans la pathophysiologie de la MH.

### 5.1. Présentation de la dopamine : rôles physiologiques, distribution

La dopamine est un neuromodulateur aux multiples effets

La dopamine (Figure 35) est une petite molécule et représente la catécholamine prédominante dans le cerveau des mammifères. Ce neurotransmetteur agit en tant que modulateur de l'activité neuronale dans différentes structures cérébrales, ce qui rend compte de son rôle physiologique très important. Ainsi, l'action modulatrice de la dopamine s'exerce sur les perceptions sensorielles dans la rétine et les bulbes olfactifs, la régulation de la libération de prolactine dans l'hypophyse, le contrôle de la température corporelle, la prise de nourriture et le comportement sexuel dans l'hypothalamus, et la coordination des mouvements dans les ganglions de la base. La dopamine joue également un rôle majeur dans les sensations de plaisir, et ainsi dans la motivation ou l'aversion.

Les effets variés de la dopamine sur les systèmes physiologiques et les organes sont dus à son action sur plusieurs types de récepteurs, appartenant tous à la classe des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G hétéromériques (GPCR : G Protein-Coupled Receptors). Pas moins de sept récepteurs dopaminergiques, codés par des gènes différents, ont été isolés chez les Vertébrés, dont cinq sont exprimés chez l'homme (Callier *et al.*, 2003).

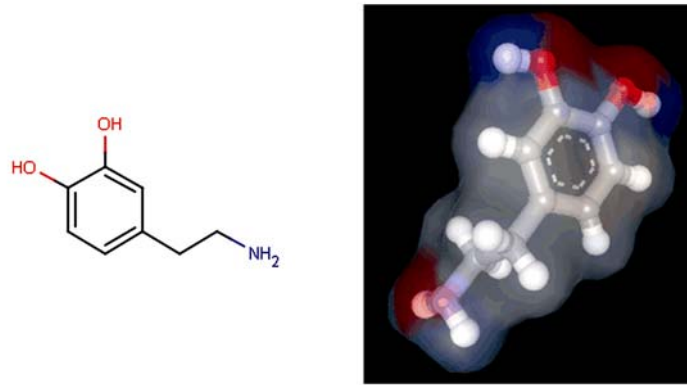


Figure 35 : Molécule de dopamine.

Formule chimique et représentation tri-dimensionnelle de la molécule de dopamine. Sa nomination chimique est : 4-(2-aminoéthyl)benzène-1,2-diol. Comme la noradrénaline et l'adrénaline, la dopamine est une catécholamine. Elles sont toutes les trois synthétisées à partir d'un précurseur commun : la L-tyrosine, qui est un acide aminé provenant de l'alimentation. D'après les ressources de l'université de Kent, Royaume-Uni (<http://www.kent.ac.uk/>).

La dopamine est distribuée dans le cerveau par trois voies majeures

Malgré l'importance majeure de la dopamine dans la physiologie cérébrale, les noyaux dopaminergiques occupent une place restreinte dans le cerveau, étant tous localisés dans le mésencéphale. Ces noyaux se projettent de façon massive sur trois aires cérébrales principales : le striatum, le cortex frontal et les noyaux limbiques. Ainsi, trois voies dopaminergiques principales se distinguent (Figure 36).

La *voie nigro-striée* est assurée par des neurones dopaminergiques venant de la substance noire compacte et se projetant sur le striatum. Cette voie est impliquée dans le contrôle des mouvements, la dégénérescence de ces neurones étant d'ailleurs associée aux symptômes de tremblements et de rigidité musculaire associés à la maladie de Parkinson. La voie nigro-striée est la plus massive des voies dopaminergiques et représente environ 80% du système dopaminergique cérébral (Jucaite, 2002).

La *voie méso-corticale* est formée par les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale qui se projettent dans le cortex frontal. Cette voie est excitatrice et participe à la formation de la mémoire à court terme, la planification, la capacité à établir des stratégies, à résoudre les problèmes, ainsi que la consolidation de la mémoire. Un dysfonctionnement de cette voie pourrait être à l'origine des symptômes de la schizophrénie (hallucinations, désordre de la pensée, ...).

La *voie méso-lobique* prend également son origine dans l'aire tegmentale ventrale et se projette dans les aires du système limbique, qui comprend le noyau accumbens, l'amygdale et l'hippocampe. Cette voie appartient elle-même au système limbique et joue

un rôle important pour la consolidation de la mémoire. En bloquant ce faisceau, les antipsychotiques réduisent les émotions intenses provoquées par la schizophrénie, par exemple.

Parmi toutes les régions innervées par les afférences dopaminergiques, le striatum est la structure cérébrale qui reçoit la plus grande quantité de dopamine (Sano *et al.*, 1959).

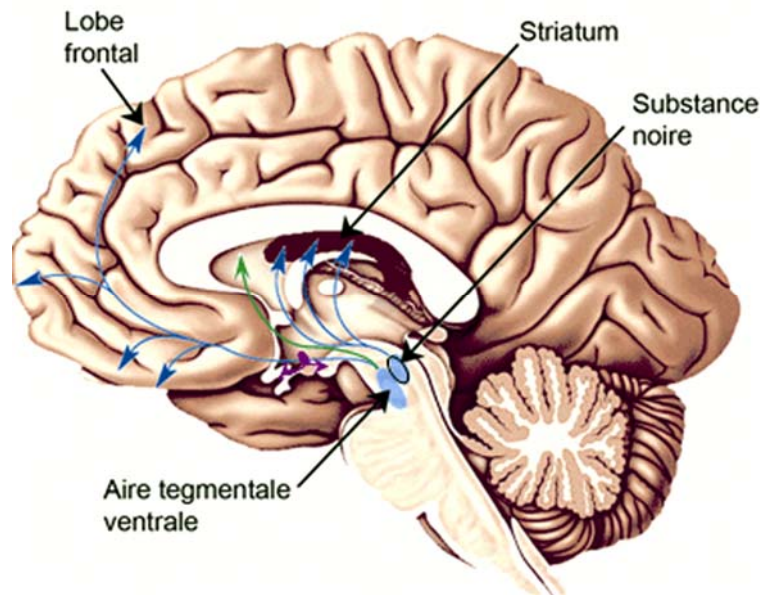


Figure 36 : Principales voies dopaminergiques du système nerveux central.

Le schéma présente les voies dopaminergiques principales du système nerveux central. Les neurones dopaminergiques sont issus de la substance noire compacte ou de l'aire tegmentale ventrale. Les neurones dopaminergiques issus de la substance noire compacte se projettent dans le striatum, formant ainsi la voie nigro-striée (en bleu, à droite). Les neurones de l'aire tegmentale ventrale se projettent soit dans le cortex frontal, formant la voie méso-corticale (en bleu, à gauche), soit dans le noyau accumbens, formant alors la voie méso-limbique (en vert). Mentionnons également la voie tubéro-infundibulaire (en violet), qui relie l'hypothalamus à l'hypophyse, influençant la sécrétion de certaines hormones, telles que la prolactine. Schéma modifié d'après : <http://www.lecerveau.mcgill.ca/>.

## 5.2. Diversité des récepteurs dopaminergiques

### Classification des récepteurs dopaminergiques

Comme la plupart des neurotransmetteurs, la dopamine agit par l'intermédiaire de plusieurs types de récepteurs. Il s'agit tous de récepteurs métabotropiques, qui présentent des homologies de séquences, de structures et de fonctions. Ils sont codés par une famille de gènes qui ont subi des duplications suivies de pression sélective sur les gènes dupliqués (Vernier *et al.*, 1995). Ainsi, les homologies de gènes soulignent la conservation des fonctions fondamentales de ces récepteurs. Les différences moléculaires et pharmacologiques entre les différents types de récepteurs reposent sur la survenue de mutations, larges ou



discrètes, qui ont entraîné des expressions tissulaires et des fonctions différentes entre les récepteurs correspondant (Callier *et al.*, 2003).

Chez les Vertébrés, les récepteurs dopaminergiques appartiennent à deux classes de récepteurs métabotropiques. Ces classes ont été initialement définies par leur capacité à moduler l'activité de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) dans les cellules (Kebabian and Calne, 1979). Alors que la classe des récepteurs D1 stimule l'activité de l'adénylate cyclase, celle des récepteurs D2 inhibe au contraire cette activité. Les récepteurs de ces deux classes ont ensuite été différenciés par leurs propriétés pharmacologiques puis clonés, ce qui a révélé l'existence d'autres types de récepteurs de la même famille (Sokoloff and Schwartz, 1995; Missale *et al.*, 1998). Chez les mammifères, la classe des récepteurs D1 comporte deux sous-types de récepteurs : D1A (ou D1) et D1B (ou D5), et la classe des récepteurs D2 comprend trois sous-types : D2, D3 et D4.

Il existe de nombreuses molécules pharmacologiques permettant de distinguer entre elles les deux grandes familles de récepteurs D1 et D2. La dopamine possède une affinité micromolaire pour les récepteurs D1 et nanomolaire pour les récepteurs D2. D'autre part, le SCH-23390 est le prototype de l'antagoniste spécifique des récepteurs D1 et la famille des SKF (SKF-38393, SKF-81297, ...) celui des agonistes D1. Pour la classe des récepteurs D2, le quinpirole représente un antagoniste classique alors que le raclopride et l'halopéridol sont des antagonistes spécifiques (Gingrich and Caron, 1993; Ogawa, 1995). La discrimination des autres sous-types de récepteurs est pharmacologiquement beaucoup plus difficile.

L'analyse de la séquence des récepteurs dopaminergiques les classe dans la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G hétéromériques. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence de sept hélices hydrophobes traversant la membrane plasmique. Si les segments transmembranaires sont bien conservés entre les récepteurs des classes D1 et D2, les régions intra- et extra-cellulaires sont beaucoup plus variables (Civelli *et al.*, 1993) (Figure 37). Les récepteurs D1 possèdent une longue extrémité C-terminale cytoplasmique et une troisième boucle cytoplasmique courte. A l'opposé, les récepteurs D2 ont une extrémité C-terminale cytoplasmique très courte et une troisième boucle cytoplasmique très longue. Ces deux régions interviennent dans un certain nombre de régulations de l'activité du récepteur, la plus importante étant son couplage aux protéines G. Ce couplage est d'ailleurs un autre critère de distinction des récepteurs dopaminergiques. En effet, les récepteurs D1 sont associés aux protéines  $G_{\alpha_s}/G_{\alpha_{olf}}$  alors que les récepteurs D2 sont couplés aux protéines  $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_o}$ , modulant ainsi différemment les voies de signalisation intracellulaire (Callier *et al.*, 2003).

Ainsi, mise à part leur affinité pour la dopamine, les récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2 sont très différents.

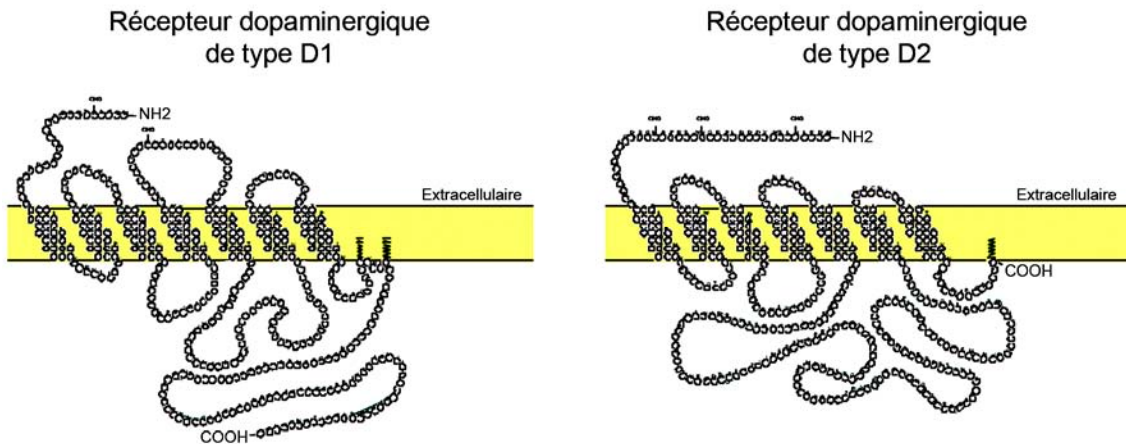


Figure 37 : Structures comparées des récepteurs de la dopamine. Les séquences en acides aminés représentées sont celles des récepteurs D1 et D2 humains. Les groupements glycosylés (CHO) et palmitoylés (lignes brisées) qui ancrent le récepteur à la membrane sont représentés. Schéma modifié d'après (Le Crom, 2000).

#### Distribution tissulaire des récepteurs dopaminergiques

Les récepteurs de type D1 et D2 sont présents dans toutes les aires cérébrales recevant des afférences dopaminergiques et leurs patterns d'expression se recoupent largement (Figure 38). Les récepteurs D1 (ou D1A) et D2 sont les plus abondants de leur classe respective. La majorité des récepteurs D2 est située dans le striatum, le noyau accumbens et les tubercules olfactifs. Ils sont également présents dans la substance noire, où ils agissent en tant qu'auto-récepteurs sur les neurones dopaminergiques. Les récepteurs D1 sont majoritairement présents dans le striatum, le noyau accumbens et les tubercules olfactifs. Le récepteur D5 est le récepteur de type D1 spécifique de l'hippocampe.

Dans le cortex, les récepteurs D1, D4 et D5 sont les plus abondants, bien que les autres sous-types de récepteurs y soient également exprimés, à de plus faibles niveaux. Dans le striatum, seuls les récepteurs D1, D2 et D3 sont exprimés. Les récepteurs D1 et D2 sont distribués de manière homogène à travers le noyau caudé, le putamen et le noyau accumbens (Figure 38). Les récepteurs D3 sont particulièrement enrichis dans le noyau accumbens, avec des taux d'expression moyens dans le putamen ventral.

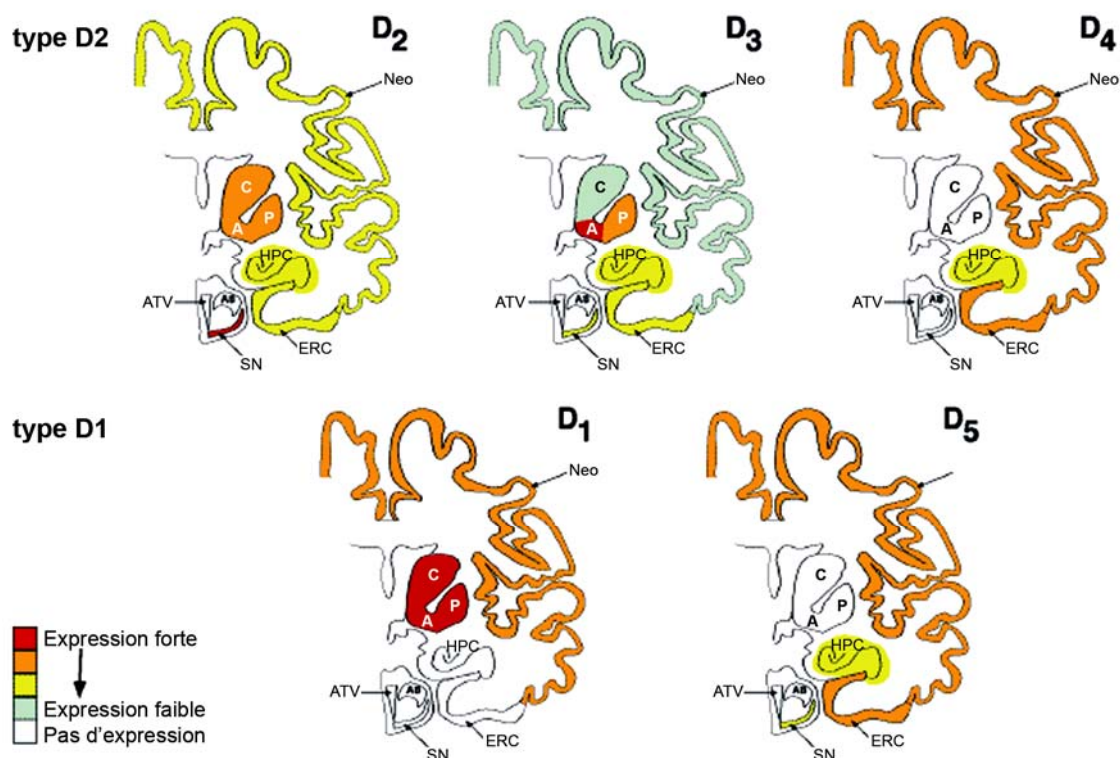


Figure 38 : Distribution de l'expression des gènes codant les cinq récepteurs dopaminergiques dans le cerveau.

Les taux d'ARNm de chaque sous-type de récepteurs sont représentés selon leur niveau d'expression.

A : noyau accumbens ; C : noyau caudé ; P : putamen ; HPC : hippocampe ; ERC : cortex entorhinal ; Neo : neocortex ; SN : substance noire pars compacta ; ATV : aire tegmentale ventrale. D'après les ressources de l'université du Michigan, USA (<http://www.umich.edu/>).

### Localisation cellulaire des récepteurs dopaminergiques

Les récepteurs de types D1 et D2 sont co-exprimés dans certaines régions comme le striatum, le bulbe olfactif et le noyau accumbens. Dans le striatum, les récepteurs D1 et D2 sont exprimés par les neurones efférents de type épineux de taille moyenne. Ils sont très rarement co-exprimés par un même neurone, les récepteurs D1 étant majoritairement exprimés par les neurones de projection de la voie directe (voie striato-nigrale) qui expriment également la substance P, et les récepteurs D2 par les neurones de projection de la voie indirecte (voie striato-pallidale) qui expriment également l'enképhaline (Surmeier *et al.*, 1996).

Les récepteurs D1, tout comme les récepteurs D2, sont localisés sur les neurones post-synaptiques recevant de la dopamine. Par exemple, la localisation des récepteurs D1 en microscopie électronique sur les cellules pyramidales du cortex de primate montre qu'ils sont surtout présents sur les épines dendritiques (Smiley *et al.*, 1994; Bergson *et al.*, 1995). Dans le striatum, les récepteurs D1 et D2 sont également fortement concentrés sur

les dendrites et les épines dendritiques, et sont relativement peu présents au niveau du soma (Levey *et al.*, 1993). L'étude précise de la localisation subcellulaire des récepteurs D1 et D2 dans le striatum montre que les récepteurs D1 sont situés au niveau de « la tête » et du « corps » des épines dendritiques, en dehors des synapses mais aussi en plus faibles proportions au niveau des synapses (Dumartin *et al.*, 1998). Les récepteurs D2 ont une localisation extra-synaptique, et sont positionnés au niveau du « cou » des épines dendritiques, contrairement aux récepteurs du glutamate par exemple qui sont situés sur « la tête » de ces épines (Yung and Bolam, 2000) (Figure 39). De même, dans le bulbe olfactif, les récepteurs D2 sont majoritairement localisés au niveau des parties distales des dendrites et sur les épines dendritiques (Levey *et al.*, 1993; Yung *et al.*, 1995).

Outre cette localisation post-synaptique classique, les récepteurs D2 sont également exprimés par les neurones dopaminergiques eux-mêmes, au niveau desquels ils agissent en tant qu'auto-récepteurs. Le récepteur D2 existe sous deux isoformes, générées par un épissage alternatif de la séquence qui correspond à un segment de 29 acides aminés dans la troisième boucle cytoplasmique. Des analyses en RT-PCR semi-quantitatives et en immunohistochimie ont montré que la forme courte de ce récepteur, appelée D2S, est majoritairement localisée sur les corps cellulaires et les axones de projection des neurones dopaminergiques dans le mésencéphale et l'hypothalamus (Guivarc'h *et al.*, 1995). Au contraire, la forme longue du récepteur D2, appelée D2L, est fortement exprimée dans les neurones du striatum et du noyau accumbens (Khan *et al.*, 1998). Par conséquent, l'épissage alternatif du gène codant le récepteur D2 entraîne des localisations subcellulaires différentes, l'isoforme D2S étant majoritairement pré-synaptique et l'isoforme D2L majoritairement post-synaptique.

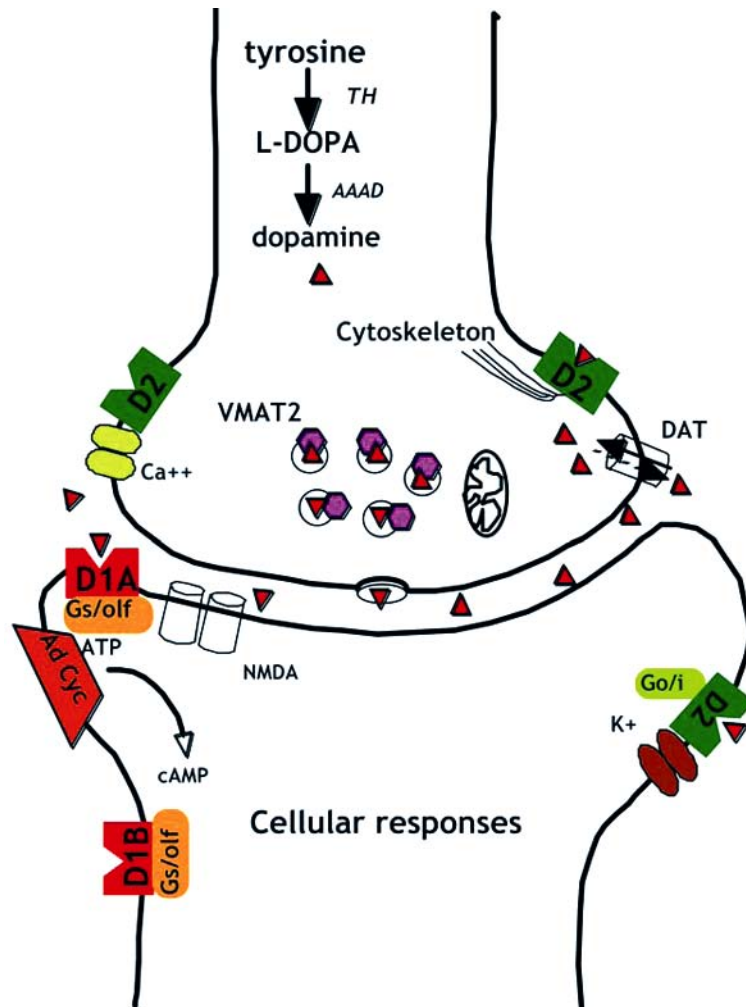


Figure 39 : Organisation d'une « synapse » dopaminergique.

Bien que les terminaisons des neurones dopaminergiques ne forment pas de vraies synapses, elles sont apposées à proximité du « cou » des épines dendritiques dans de nombreuses structures cérébrales, telles que le striatum. La voie de biosynthèse de la dopamine est indiquée dans le neurone dopaminergique (TH : tyrosine hydroxylase, AAAD : aromatic amino acid decarboxylase), de même que le stockage de la dopamine dans des vésicules par l'intermédiaire du transporteur vésiculaire de monoamines (VMAT : vesicular monoamine transporter). Après avoir été libérée dans l'espace extracellulaire, la dopamine est rapidement recapturée par le transporteur de la dopamine (DAT : dopamine transporter). La dopamine agit également sur les récepteurs de type D1 (couplés aux protéines  $G_{\alpha_s}/G_{\alpha_{olf}}$ ) et sur les récepteurs de type D2 (couplés aux protéines  $G_{\alpha_o}/G_{\alpha_i}$ ). La localisation subcellulaire des récepteurs détermine les effets engendrés par l'activation de ces récepteurs. Les récepteurs D2 sont localisés à la fois au niveau des terminaisons dopaminergiques pré-synaptiques, où ils inhibent la libération de dopamine en diminuant l'activité calcique, et sur les neurones post-synaptiques, où ils activent entre autres des canaux potassiques. Les récepteurs D1 occupent une position post-synaptique, où ils activent l'adénylate cyclase (Ad Cyc). Ils peuvent être localisés soit à proximité de la synapse (principalement les récepteurs D1A), où ils peuvent interagir avec des récepteurs synaptiques tels que les récepteurs NMDA, soit à distance du site de libération de la dopamine (pour les récepteurs D1B). D'après (Callier *et al.*, 2003).

### 5.3. Régulation des voies de signalisation intracellulaire par les récepteurs

#### D1 et D2 dans le striatum

Malgré la diversité des récepteurs dopaminergiques évoquée précédemment, nous allons à présent nous intéresser aux voies de signalisation activées par les deux sous-types majoritairement exprimés dans le striatum : les récepteurs D1 et D2. Parmi ceux-ci, nous nous intéresserons plus particulièrement aux récepteurs D2 car ils se sont avérés particulièrement importants dans mon étude.

##### 5.3.1. Les récepteurs D1

L'activation de l'adénylate cyclase est la voie de transduction majoritaire pour les récepteurs D1

La première réponse cellulaire analysée après la stimulation des récepteurs D1 fut l'activation de l'adénylate cyclase, mesurée par la production d'AMPc (Kebabian and Calne, 1979; Monsma *et al.*, 1990). Dans le striatum, cette activation est médiée par la protéine  $G_{\alpha_{olf}}$  (Herve *et al.*, 1993). La production du second messenger AMPc entraîne à son tour l'activation de la PKA (cAMP-dependent Protein Kinase) et la phosphorylation de ses substrats, tels que les canaux calciques de type L (entraînant une augmentation de l'influx de  $Ca^{2+}$ ), DARPP-32, et le facteur de transcription CREB.

La stimulation des récepteurs D1 induit également la phosphorylation de canaux ioniques dans le striatum, tels que les canaux sodiques, potassiques, et les récepteurs NMDA, ce qui produit des effets complexes sur l'activité du neurone, qui dépendent en partie de son état d'activation (Surmeier and Kitai, 1993; Hernandez-Lopez *et al.*, 1997; Cepeda *et al.*, 1998; Cantrell *et al.*, 1999). Les récepteurs D1 seraient également capables d'inhiber l'activité de l'échangeur  $Na^+/H^+$  (Felder *et al.*, 1993) ainsi que l'ATPase  $Na^+/K^+$  (Horiuchi *et al.*, 1993).

Des études sur cultures de neurones striataux montrent que la dopamine active les protéines PKC par l'intermédiaire des récepteurs D1 mais indépendamment de la production d'AMPc (McMillian *et al.*, 1992). En activant la PKC, les récepteurs D1 provoquent une rétraction neuritique des cellules horizontales de la rétine de poisson rouge maintenues en culture (Rodrigues Pdos and Dowling, 1990). Toutefois, des effets opposés ont été observés sur des neurones striataux de rat en culture (mise en culture à E17, traitement à JIV7). Ainsi, après une heure de traitement avec de la dopamine ou un agoniste D1, on observe une augmentation du nombre des cônes de croissance, de la taille des neurites, et de l'arborisation dendritique (Schmidt *et al.*, 1996). Ces modifications morphologiques restent

stables après 24 heures, une observation en faveur d'un rôle des récepteurs D1 dans la différenciation neuronale.

#### Les récepteurs D1 modulent l'activité des voies MAPK

Depuis 1998, l'effet de la dopamine sur l'activation des voies MAPK a été étudié *in vitro* et *in vivo*. Le rôle physiologique de cette signalisation est confirmé par l'observation de la régulation différentielle de l'expression du gène *c-fos* (gène précoce de réponse à l'augmentation d'AMPc) et du facteur de transcription CREB lors du développement du striatum (Arnauld *et al.*, 1998; Wirtshafter, 1998). Ainsi, le SKF-38393, un agoniste D1 très spécifique, n'est capable d'induire l'expression de *c-fos* dans le striatum qu'au cours du développement post-natal précoce. Dans des lignées de cellules de neuroblastomes humain, exprimant de façon endogène les récepteurs D1, la dopamine entraîne l'activation des voies JNK, p38 et ERK, d'une façon dépendante de la concentration de dopamine et de la durée du traitement (Chen *et al.*, 2004). Dans cette étude, la stimulation sélective des récepteurs D1 avec l'agoniste SKF-38393 n'entraîne l'activation que de la voie ERK et non des voies JNK et p38. Cette activation est alors inhibée par l'antagoniste SCH-23390 et par un inhibiteur de la PKA. Dans des cultures primaires de neurones striataux, les récepteurs D1 peuvent activer la voie ERK. Cette activation stimule à son tour la phosphorylation, et ainsi l'activation de la voie Akt (Brami-Cherrier *et al.*, 2002).

#### 5.3.2. Les récepteurs D2

##### Les récepteurs D2 modulent l'activité de nombreux effecteurs intracellulaires

Lorsque la dopamine se lie à un récepteur D2, elle enclenche plusieurs cascades d'activation, qui sont dépendantes ou non des protéines G. Par exemple, l'activation des récepteurs D2 inhibe l'activité de l'adénylate cyclase via  $G_{\alpha_{i/o}}$ , bloquant ainsi la production d'AMPc et l'activité de la PKA (Missale *et al.*, 1998). Par l'intermédiaire des protéines G, les récepteurs D2 sont aussi capables d'activer un canal potassique, augmentant l'efflux de potassium, induisant alors une hyperpolarisation du neurone. Ces effets, observés dans des neurones du striatum et du mésencéphale de rats (Kitai and Surmeier, 1993; Liu L. *et al.*, 1994a; Greif *et al.*, 1995), permettraient aux récepteurs D2 pré-synaptiques d'inhiber la libération de dopamine (Missale *et al.*, 1998).

La stimulation des récepteurs D2 module également la concentration intracellulaire de calcium, en activant des canaux calciques, les récepteurs au glutamate AMPA et NMDA, et la phospholipase C (PLC). Ces modifications calciques s'accompagnent de changements de l'activité de protéines régulées par le calcium, telles que la protéine phosphatase calci-

neurine (PP2B) et les isoformes  $\beta$  et  $\epsilon$  de la protéine kinase C (PKC) (Nishi *et al.*, 1997; Bibb, 2005; Zou *et al.*, 2005).

D'autres effecteurs peuvent être activés par les récepteurs D2 indépendamment du calcium. Parmi eux, d'autres canaux ioniques sont activables par les récepteurs D2 : il s'agit de canaux sodiques, des canaux de courants potassiques rectifiants (GIRK) et de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . L'effet activateur des récepteurs D2 s'applique également sur la protéine phosphatase-1 (PP1), la voie de signalisation Raf/MEK/ERK<sub>1/2</sub>, et les facteurs de transcription tels que CREB et NF- $\kappa$ B (Missale *et al.*, 1998; Takeuchi and Fukunaga, 2004; Bibb, 2005).

Le récepteur D2 interagit avec les protéines G par de courtes séquences peptidiques qui sont proches des extrémités N- et C- terminales de la troisième boucle cytoplasmique (Lachowicz and Sibley, 1997; Scarselli *et al.*, 2001), ce qui laisse le reste de cette longue boucle accessible pour interagir avec d'autres protéines. Elle lui permet par exemple d'interagir avec la protéine d'échafaudage post-synaptique spinophiline, le reliant ainsi à PP1, le cytosquelette d'actine, et d'autres protéines transmembranaires (Figure 40).

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les récepteurs D2 existent sous deux isoformes issues d'un épissage alternatif : les formes D2L (D2 long) et D2S (D2 short). Ces deux formes de récepteurs diffèrent par une séquence de 29 acides aminés qui est manquante dans la troisième boucle cytoplasmique du récepteur D2S par rapport au D2L (Figure 41). Cette boucle étant impliquée dans les interactions entre le récepteur et ses partenaires intra-cytoplasmiques (Figure 40), les récepteurs D2S et D2L pourraient réguler des voies de signalisation différentes. Cette hypothèse est d'ailleurs confortée par plusieurs études (Liu Y. F. *et al.*, 1994b; Guiramand *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004), dont l'étude comparative des souris knock-out pour le gène codant la forme D2L uniquement ou les deux formes L et S (Usiello *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Il semble donc important de différencier les effets de ces deux isoformes pour étudier le rôle des récepteurs D2 dans l'établissement de processus intracellulaires.



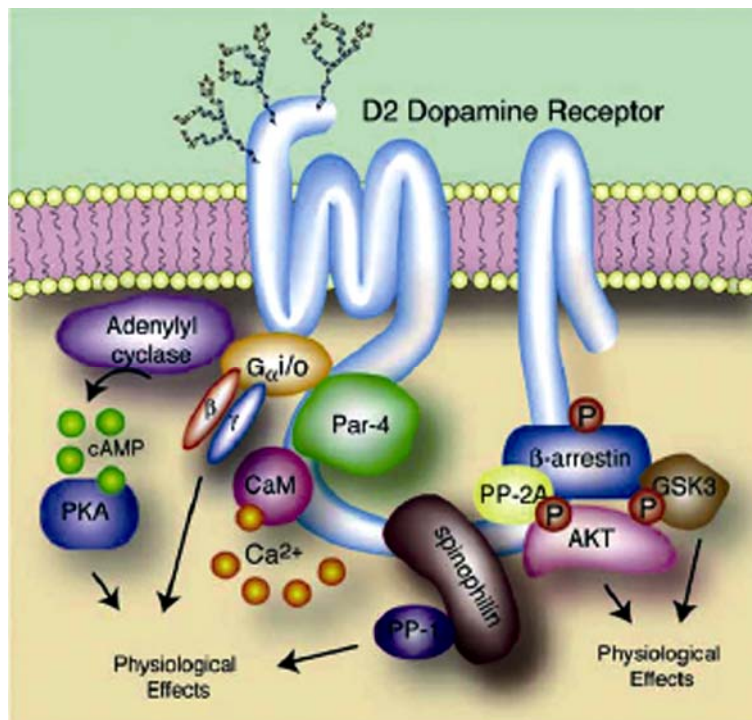


Figure 40 : Schéma représentant le récepteur D2 et ses partenaires participant à des voies de signalisation intracellulaire.

La liaison de la dopamine avec le récepteur D2 entraîne l'activation de la protéine G $\alpha_{i/o}$  hétéromérique qui est couplée à sa troisième boucle cytoplasmique. Cette activation inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et diminue donc la production d'AMPc, et l'activité de la PKA. La régulation de l'AMPc par le récepteur D2 est dépendante de son association avec Par-4, interaction qui est compétitivement inhibée par la calmoduline associée au Ca<sup>2+</sup> (Park *et al.*, 2005). Le  $\beta$ -arrestine 2 se lie à la troisième boucle cytoplasmique du récepteur phosphorylé et forme un complexe avec PP-2A et Akt, conduisant à l'inactivation d'Akt. GSK3, le substrat d'Akt pourrait également participer à ce complexe. Schéma d'après (Bibb, 2005).

### Les $\beta$ -arrestines assurent la désensibilisation des récepteurs D2

Le rôle d'un récepteur métabotrope est de transmettre un signal extracellulaire à travers la membrane plasmique et de le traduire par la régulation de voies de signalisation intracellulaire. Pour effectuer cette tâche, la liaison de l'agoniste à son récepteur modifie la conformation du récepteur, ce qui lui permet d'interagir directement avec les protéines G hétéromériques, ce qui enclenche les cascades de réponses intracellulaires. Pour que le récepteur puisse à nouveau assurer une réponse à une éventuelle activation extracellulaire, il doit retrouver sa conformation initiale, ou laisser sa place à un nouveau récepteur. La désensibilisation est un mécanisme commun aux récepteurs métabotropiques qui leur permet d'être internalisés puis resensibilisés et recyclés à la membrane plasmique. Les récepteurs sont ainsi à nouveau capables de répondre à une nouvelle stimulation extracellulaire. Ce mécanisme fait intervenir deux étapes cruciales : d'une part, la phosphorylation du récepteur par des kinases de la famille des GRK (G protein-coupled Receptor Kina-

ses), et d'autre part l'internalisation du récepteur par des protéines de la famille des  $\beta$ -arrestines.

Dans le cas des récepteurs D2, suite à leur activation par la dopamine, ils peuvent être phosphorylés directement par les GRK, ou par l'intermédiaire de kinases répondant à la production de seconds messagers : les PKC. En effet, la troisième boucle intracellulaire des récepteurs D2 contient plusieurs sites de phosphorylation par la PKC, dont l'un de ces sites, la Ser 355, est associé à la désensibilisation fonctionnelle du récepteur (Namkung and Sibley, 2004) (Figure 41). Ce site est proche de l'extrémité C-terminale de la troisième boucle cytoplasmique, c'est-à-dire proche du domaine d'interaction avec les protéines G. Ainsi, la phosphorylation de cette sérine entraînerait, par un changement conformationnel ou un phénomène électrostatique, un découplage du récepteur avec la protéine G.

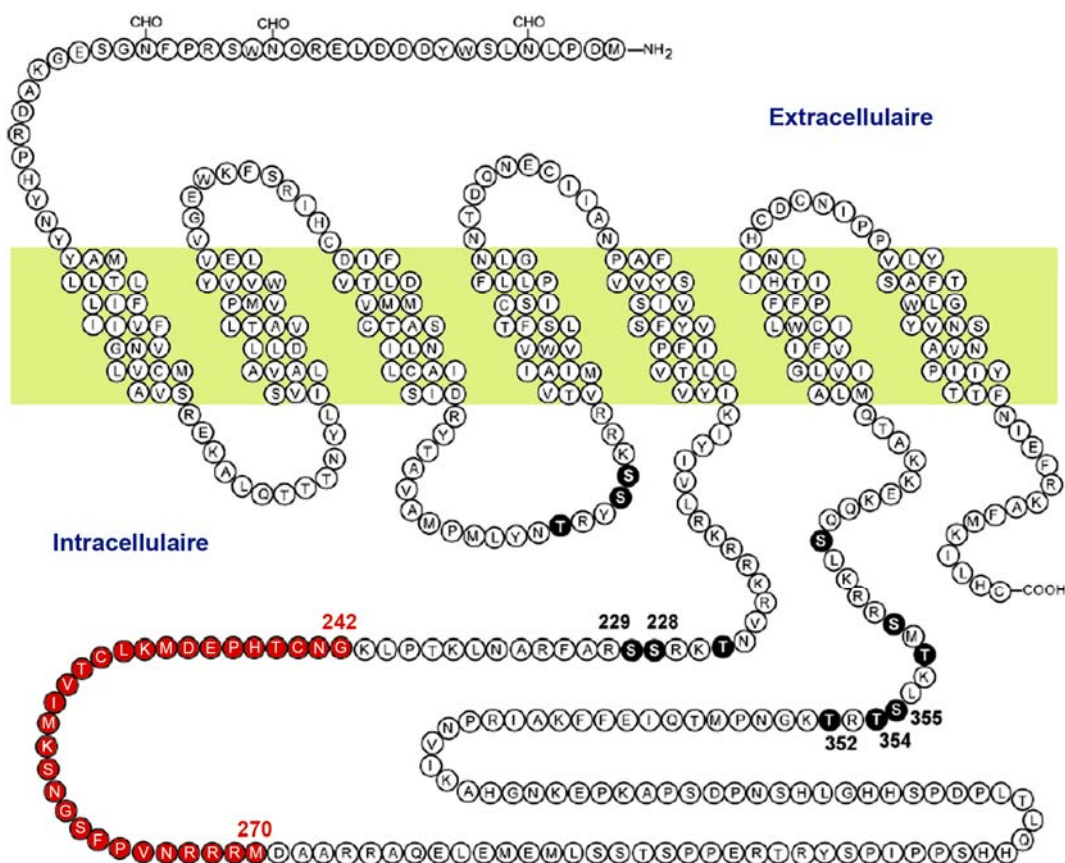


Figure 41 : Séquence du récepteur D2L.

Les résidus en rouge représentent la séquence qui est manquante dans le récepteur D2S (acides aminés 242 à 270). Les résidus en noir représentent les sites putatifs de phosphorylation par les PKC. Les résidus en noir numérotés sont les sites fonctionnellement identifiés comme étant phosphorylés par les PKC. Schéma modifié d'après (Namkung and Sibley, 2004).

Les protéines GRK phosphorylent préférentiellement des sérines et thréonines qui sont à proximité de résidus chargés négativement. Par conséquent, la phosphorylation initiale du récepteur D2 par la PKC pourrait augmenter l'affinité des GRK pour les sérines et thréo-

nines voisines. Cette phosphorylation promeut à son tour l'association de la  $\beta$ -arrestine avec la troisième boucle intracellulaire du récepteur. La  $\beta$ -arrestine recrute alors les composants de la machinerie d'endocytose au niveau du récepteur (AP2, clathrine, dynamine). Celui-ci est internalisé par des vésicules recouvertes de clathrine, resensibilisé dans des endosomes (séparation du récepteur et de son ligand, déphosphorylation du récepteur) puis recyclé à la membrane plasmique, ou dégradé par les lysosomes (Figure 42).

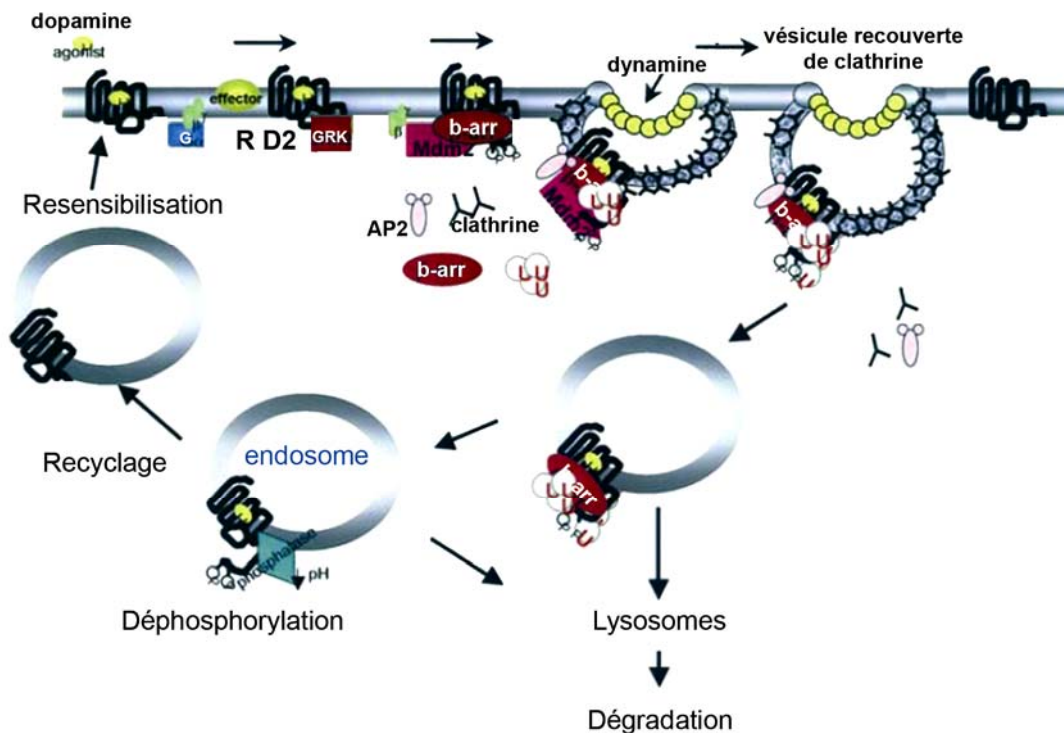


Figure 42 : Désensibilisation, recyclage ou dégradation des récepteurs D2.

Quand la dopamine se lie au récepteur D2, ce dernier active la protéine G qui lui est associée. La PKC et les GRK phosphorylent le récepteur, qui devient alors fonctionnellement découplé de la protéine G. L'affinité du récepteur phosphorylé pour la  $\beta$ -arrestine 2 augmente. La fixation de la  $\beta$ -arrestine 2 sur la troisième boucle cytoplasmique du récepteur empêche toute nouvelle activation d'autres protéines G. De plus, la  $\beta$ -arrestine 2 recrute la clathrine à la membrane, ainsi que les composants permettant la formation d'une vésicule d'endocytose recouverte de clathrine. Le récepteur est alors internalisé, puis il est soit recyclé, soit dégradé par les lysosomes. Schéma modifié d'après (Shenoy and Lefkowitz, 2003).

Parmi les protéines de la famille des arrestines, ce sont les  $\beta$ -arrestines 2 qui interagissent avec les récepteurs D2 dans le striatum (Macey *et al.*, 2004). De même, parmi les protéines de la famille des GRK, il semblerait que la protéine GRK6 soit responsable de la phosphorylation des récepteurs D2, et qu'elle joue un rôle particulièrement important dans la médiation des effets de la dopamine dans le striatum (Gainetdinov *et al.*, 2004). En effet, contrairement aux autres souris knock-out pour un gène codant une protéine de la famille des GRK, les souris knock-out pour GRK6 sont hypersensibles aux effets locomoteurs induits par des psychostimulants comme la cocaïne et l'amphétamine (Gainetdinov *et al.*,

2003), qui augmentent toutes les deux la concentration de dopamine dans les synapses nigro-striatales. Ces souris présentent également une plus grande affinité entre les récepteurs D2 et les protéines G dans le striatum, sans aucun effet sur les récepteurs D1. Les auteurs de cette analyse suggèrent alors que les récepteurs D2 sont une cible physiologique de GRK6 dans le striatum, et qu'un mécanisme de régulation dépendant de GRK6 pourrait contribuer à l'hypersensibilité dopaminergique dans des états pathologiques, tels que l'addiction.

#### 5.4. La dopamine, impliquée dans des conditions pathologiques

##### La dopamine est impliquée dans plusieurs maladies humaines

L'intérêt pour les récepteurs dopaminergiques provient de la découverte de l'altération de la transmission dopaminergique dans plusieurs pathologies humaines, essentiellement la maladie de Parkinson, l'addiction aux drogues d'abus, les désordres de l'humeur et de l'affect (schizophrénie), le syndrome Gilles de la Tourette, les troubles obsessionnels compulsifs, les prolactinomes de la glande hypophysaire, l'hypertension et les dysfonctions cardiovasculaires. De nombreux médicaments utilisés pour traiter ces maladies ciblent les récepteurs dopaminergiques (neuroleptiques, médicaments anti-parkinsonniens, ... etc.) (Strange, 1993; Seeman and Van Tol, 1994; Sokoloff and Schwartz, 1995). Par exemple, les antagonistes des récepteurs dopaminergiques de type D2, tels que l'halopéridol et la rispéridone, diminuent efficacement les psychoses.

##### La dopamine peut engendrer un stress oxydatif

La dopamine est un catéchol actif, qui peut s'auto-oxyder plus facilement que la noradrénaline et l'adrénaline (Graham, 1984). L'auto-oxydation des catécholamines se produit lorsqu'une paire d'électrons est libérée dans le système, un électron étant utilisé pour oxyder la catécholamine, l'autre électron s'ajoutant à la molécule d'oxygène, générant ainsi un radical superoxide ( $O_2^-$ ). Des radicaux libres peuvent être formés *in vivo* par la dopamine au cours de son oxydation par des processus enzymatiques ou non enzymatiques (Fornstedt *et al.*, 1990; Obata, 2002) (Figure 43), principalement dans les régions cérébrales qui reçoivent les plus grandes quantités de dopamine, telles que le striatum (Obata, 2002).

La dopamine est métabolisée par déamination enzymatique par la monoamine oxydase B (MAO-B), une enzyme mitochondriale (Figure 43). Cette déamination produit l'acide 3,4-dihydroxyphenylacétique (DOPAC), qui est non toxique, et de l'eau oxygénée  $H_2O_2$  (Maker

*et al.*, 1981). L' $H_2O_2$  peut être à son tour convertie en radicaux hydroxyl (OH) hautement toxiques, par une réaction catalysée par les ions libérés par les métaux de transition (Youdim, 2003; Sidhu *et al.*, 2004). La dopamine peut également s'auto-oxyder spontanément, au pH intracellulaire normal et en présence de molécules d'oxygène, en semi-quinones, radicaux superoxydes et peroxides d'hydrogène, qui sont des composés fortement réactifs et toxiques (Graham, 1978). De plus, les superoxydes peuvent être convertis en  $H_2O_2$  par des superoxydes dismutases, ou en radical peroxynitrite, très réactif et cytotoxique, en présence de monoxyde d'azote. L'accumulation de ces espèces hautement réactives dans les tissus peut provoquer une cascade d'événements, incluant des dommages du transport d'électrons mitochondrial, une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre, et l'activation de protéases et de lipases conduisant à la mort prématurée de la cellule (Halliwell, 1992).

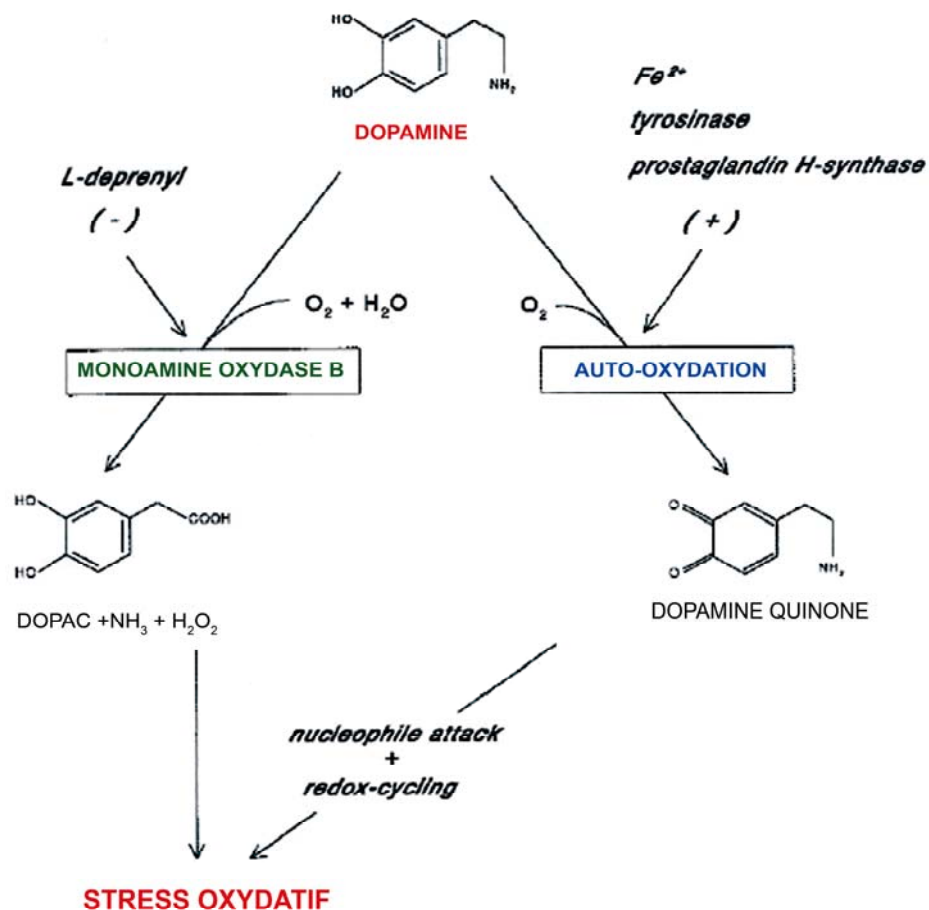


Figure 43 : Métabolisme oxydatif de la dopamine dans le cerveau. L'oxydation de la dopamine par la monoamine oxydase B entraîne la formation d'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC), d'ammonium ( $NH_3$ ) et d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ). L'auto-oxydation spontanée de la dopamine peut être favorisée par la présence d'ions tels que  $Fe^{2+}$  et/ou par des enzymes telles que la tyrosinase et la prostaglandine H-synthase. Dans ce processus, la dopamine est oxydée en quinone. Les deux voies d'oxydation de la dopamine, enzymatique et spontanée,

provoquent un stress oxydatif dans la cellule, soit directement, par la libération de radicaux libres, soit indirectement, par l'action de quinones dérivées de la dopamine.

La dopamine peut s'auto-oxyder à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (Graham, 1978). Bien que la production de radicaux libres soit un mécanisme du métabolisme normal, l'auto-oxydation excessive de la dopamine ou la diminution de l'efficacité des systèmes de défense intracellulaires contre les radicaux libres, conduisent à l'accumulation de composés fortement réactifs et cytotoxiques qui peuvent saturer les systèmes de défense cellulaires, augmentant alors leur toxicité. Ainsi, il a été démontré que la dopamine peut provoquer la mort de neurones en culture en produisant un stress oxydatif en présence d'ions (Tanaka *et al.*, 1991), et que l'injection intra-striatale de dopamine induit la mort des neurones dopaminergiques pré-synaptiques et des neurones striataux post-synaptiques, de manière dose-dépendante (Filloux and Townsend, 1993). Les toxines telles que le MPTP (1-Méthyl-4-Phényl-1,2,3,6-TetrahydroPyridine) et l'amphétamine augmentent la libération synaptique de dopamine dans le striatum et provoquent la dégénérescence des neurones dopaminergiques par un stress oxydatif (Sirinathsingji *et al.*, 1988; O'Dell *et al.*, 1993). La nature « pro-oxydante » de la dopamine est ainsi mise en évidence dans les études qui montrent qu'une élévation de la libération de dopamine augmente à la fois les radicaux hydroxyl (Smith *et al.*, 1994) et les taux de glutathione oxydée dans des neurones mésencéphaliques (Spina and Cohen, 1988; Han *et al.*, 1996). D'autre part, l'administration d'antioxydants isolés ou combinés sous forme de « cocktails » se montre neuroprotectrice contre la toxicité de la dopamine dans des cultures de neurones corticaux (Rosenberg, 1988; Hoyt *et al.*, 1997), de neurones striataux (McLaughlin *et al.*, 1998) et de cellules de neuroblastome (Offen *et al.*, 1996).

Toutes ces données suggèrent que les produits d'oxydation de la dopamine peuvent participer à la toxicité neuronale de la dopamine.

### 5.5. Dopamine et maladie de Huntington ?

La neurodégénérescence sélective dans le cerveau des malades atteints de MH, qui touche le striatum, constitue la base des symptômes neurologiques de cette maladie (Vonsattel *et al.*, 1985). Bien que la huntingtine mutée soit exprimée dans toutes les cellules de l'organisme, seuls les neurones GABAergiques de projection du striatum meurent dans la MH, et parmi ces neurones, ceux de la voie striato-pallidale, porteurs de récepteurs D2, sont les plus vulnérables.

Le striatum est la structure qui reçoit la plus dense innervation dopaminergique. Cette particularité neuro-anatomique pourrait contribuer à la vulnérabilité de cette structure. Il est intéressant de noter en outre que le profil de neurodégénérescence de la MH progresse selon un gradient dorso-ventral qui correspond au gradient de concentration de dopamine dans le striatum (Cass, 1997). Plusieurs arguments indirects suggèrent que la dopamine puisse jouer un rôle dans la MH (Jakel and Maragos, 2000). Ce chapitre expose la plupart de ces arguments.

#### La MH reproduit des symptômes qui ont été corrélés à la dopamine

Dans la littérature, plusieurs articles rapportent des cas de malades de Huntington ayant été diagnostiqués par erreur comme étant atteints du syndrome de Gilles de la Tourette (Kerbeshian *et al.*, 1991; Jankovic and Ashizawa, 1995; Straube *et al.*, 1997; Angelini *et al.*, 1998; Siesling *et al.*, 2000; Alonso *et al.*, 2004). Le syndrome Gilles de la Tourette (SGT) est un trouble neurologique caractérisé par une incoordination des mouvements associée à des tics. Ces tics sont des mouvements involontaires, rapides et soudains. Il s'agit également de sons qui se produisent de façon répétée et stéréotypée. Ce syndrome apparaît généralement avant l'âge de 18 ans. Les tics moteurs caractérisant cette maladie peuvent rappeler les mouvements involontaires de la MH, ce qui conduit parfois à une erreur de diagnostic. Les observations neuropharmacologiques du SGT ont montré que les symptômes de cette maladie sont engendrés par une hyperactivité de la transmission dopaminergique dans la voie nigro-striée et que tous les médicaments qui sont efficaces dans le SGT sont des antagonistes dopaminergiques, tels que l'halopéridol (Singer *et al.*, 1982; Shapiro *et al.*, 1989; Singer, 2001).

D'autre part, les études menées sur les souris knock-out pour le gène codant le transporteur de la dopamine (DAT) ont apporté des connaissances intéressantes sur les effets de concentrations synaptiques élevées de dopamine de façon chronique et physiologique. DAT est un transporteur de recapture de la dopamine, situé sur les terminaisons axonales des neurones dopaminergiques, donc en pré-synaptique. Il permet de réguler la concentration synaptique de dopamine et d'assurer la clairance du neurotransmetteur. Les souris DAT-KO présentent une hyper-dopaminergie persistente, la concentration synaptique de dopamine étant cinq fois plus élevée que chez les souris normales (Giros *et al.*, 1996; Gainetdinov *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998; Gainetdinov *et al.*, 1999). Toutes ces études ont rapporté une hyperactivité locomotrice des souris DAT-KO. Le taux de mortalité est également plus élevé chez les souris DAT-KO (Giros *et al.*, 1996). Une étude récente a révélé que la mort des souris DAT-KO est précédée d'un développement sporadique de symptômes dyskinétiques rappelant ceux de la MH qui s'accompagnent d'une mort sélective des neurones stria-

taux GABAergiques recevant de la dopamine (Cyr *et al.*, 2003). Les symptômes moteurs des souris DAT-KO sont directement induits par la dopamine puisque l'inhibition chronique de la synthèse de dopamine empêche leur apparition. Même si les mécanismes précis ne sont pas connus, cette étude montre que de fortes concentrations synaptiques de dopamine peuvent à elles seules provoquer la mort sélective des neurones striataux de projection et entraîner l'apparition de symptômes moteurs semblables à ceux observés dans la MH.

La dopamine peut être un facteur potentialisateur de la toxicité de molécules pharmacologiques utilisées pour modéliser la MH

Plusieurs expériences indiquent que, bien qu'elles soient tolérées dans des conditions physiologiques normales, les concentrations de dopamine présentes dans le striatum peuvent potentialiser la toxicité neuronale d'inhibiteurs pharmacologiques utilisés pour modéliser la MH, tels que le malonate et le 3-NP, deux inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (complexe II de la chaîne de respiration mitochondriale).

Par exemple, un traitement avec des concentrations subtoxiques de 3-NP provoque une neurodégénérescence striatale lorsqu'il est combiné à un traitement avec des concentrations subtoxiques de dopamine (McLaughlin *et al.*, 1998). Le même effet synergique est observé entre le 3-NP et l'amphétamine, qui provoque la libération endogène de fortes concentrations de dopamine (Bowyer *et al.*, 1996; Reynolds *et al.*, 1998).

Au contraire, la lésion des neurones dopaminergiques dans le striatum par l'injection de la neurotoxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA), protège le striatum de la toxicité du malonate et du 3-NP (Maragos *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 1998). Ainsi, l'absence de dopamine dans le striatum inhibe la neurodégénérescence dans deux modèles pharmacologiques *in vivo* de la MH.

La dopamine pourrait contribuer au stress oxydatif observé dans la MH

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs données suggèrent que les radicaux libres pourraient être d'importants médiateurs de la mort des neurones striataux dans la MH (voir § 3.3). La dopamine pourrait participer à ce stress oxydatif en étant elle-même source de radicaux libres. En effet, dans des cerveaux *post-mortem* de malades MH, il a été montré que l'activité de la MAO-B, l'enzyme responsable de l'oxydation de la dopamine, est augmentée de 260 % dans le noyau caudé, en comparaison avec des individus sains (Mann *et al.*, 1986). Ainsi, même si les concentrations synaptiques de dopamine ne sont pas augmentées, l'augmentation de l'activité de la MAO-B accélérerait le métabolisme de la dopamine et la production subséquente de radicaux libres. Il a d'ailleurs été montré que les taux de DOPAC sont également augmentés dans le liquide céphalo-



rachidien des malades MH (Garrett and Soares-da-Silva, 1992). Ces données confortent donc l'hypothèse de l'implication de la dopamine dans le stress oxydatif observé dans la MH.

Enfin, les travaux de Luo ont montré qu'en produisant des radicaux libres, la dopamine est capable d'activer la voie pro-apoptotique JNK/c-Jun (Luo *et al.*, 1998). Or cette voie est corrélée à la dégénérescence sélective des neurones striataux dans un modèle pharmacologique de la MH (voir § 4.3). La dopamine pourrait donc, par le biais de la production de radicaux libres, participer à la neurodégénérescence spécifique de la MH.

Malgré l'existence de nombreux arguments indirects en faveur d'un rôle de la dopamine dans la vulnérabilité spécifique des neurones striataux dans la MH, les mécanismes précis par lesquels la dopamine pourrait révéler la toxicité de la huntingtine mutée demeurent inconnus.

## Objectifs et stratégies de cette thèse

Malgré les efforts menés par la recherche sur la maladie de Huntington, les mécanismes pathologiques de cette maladie ne sont toujours pas clairement identifiés. Douze ans après la découverte de son origine génétique, il n'existe pas de traitement capable de stopper ni même de ralentir la progression de cette maladie.

Afin de mieux comprendre le processus pathophysiologique qui mène à la dégénérescence des neurones striataux et donc aux symptômes de la maladie de Huntington, nous avons choisi d'explorer le rôle que pouvait jouer la dopamine dans cette maladie.

### Caractérisation et validation d'un modèle cellulaire de MH

La première partie de notre travail consistait à caractériser et valider un modèle cellulaire permettant d'analyser les effets moléculaires de la huntingtine mutée dans les neurones striataux. Nous avons pour cela utilisé un modèle de cultures primaires de neurones striataux de souris qui sont transfectés de manière transitoire avec un plasmide exprimant l'exon 1 de la huntingtine normale (contenant 25 glutamines) ou mutée (contenant 103 glutamines). Ces séquences sont fusionnées à celle codant la GFP, ce qui permet d'identifier les neurones transfectés, et de suivre à la fois la localisation subcellulaire des protéines exprimées ainsi que la formation d'agrégats pour la huntingtine mutée.

Nous avons validé ce modèle *in vitro* qui reproduit deux caractéristiques neuropathologiques importantes de la MH, à savoir la formation d'agrégats de huntingtine mutée dans tous les compartiments neuronaux, et la mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée. La forme normale de la huntingtine ne reproduit pas ces effets.

Une fois ce modèle cellulaire validé, nous avons analysé l'effet de la huntingtine sur l'activation du module JNK/c-Jun dans les neurones striataux, et l'implication de cette voie pro-apoptotique dans la mort cellulaire induite par la huntingtine mutée.

### Analyse de l'effet de la dopamine sur des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier l'influence de la dopamine sur la vulnérabilité des neurones striataux à la huntingtine mutée. Pour réaliser cette étude, nous avons adapté notre modèle cellulaire afin qu'il nous permette d'étudier les effets isolés puis combinés de la dopamine et de la huntingtine mutée sur les neurones striataux.

Nous avons dans un premier temps vérifié qu'un traitement exogène par de la dopamine reproduisait bien sur nos cultures primaires de neurones striataux (non transfectés par la huntingtine) les effets qui avaient été précédemment décrits dans la littérature sur

d'autres modèles neuronaux, à savoir une toxicité dose-dépendante et l'activation de la voie JNK/c-Jun (Luo *et al.*, 1998). Nous avons ainsi décrit les effets de la concentration et de la durée de traitement des neurones striataux avec de la dopamine, puis nous nous sommes placés dans des conditions de traitements où les effets de la dopamine seule sont faibles sur la toxicité et l'activation de JNK/c-Jun.

Connaissant les effets isolés de la dopamine et de la huntingtine mutée sur notre modèle de neurones striataux, nous avons ensuite analysé leurs effets combinés. Nous avons pour cela considéré les trois paramètres que nous avons décrits dans notre modèle, à savoir la formation d'agrégats, la mort neuronale et l'activation de la voie JNK/c-Jun. A l'aide d'outils pharmacologiques et génétiques, nous avons finalement exploré les différents mécanismes moléculaires qui pouvaient expliquer les effets de la dopamine sur la vulnérabilité des neurones striataux à la huntingtine mutée.

#### Validation de l'effet de la dopamine dans un modèle *in vivo* de la maladie de Huntington

La dernière partie de notre travail consistait à valider dans un modèle *in vivo* de la maladie de Huntington les effets de la dopamine que nous avons observés *in vitro*. Nous avons pour cela choisi un modèle qui reproduit la dégénérescence progressive des neurones striataux et la formation d'agrégats de huntingtine mutée. En collaboration avec l'équipe de Nicole Déglon, nous avons utilisé le modèle *in vivo* qu'elle a développé chez le rat. Il s'agit d'injections intra-striatales d'une construction lentivirale qui exprime les 171 premiers acides aminés de la huntingtine normale (contenant 19 glutamines) ou mutée (contenant 82 glutamines). Cette étude nous a ainsi permis de valider nos résultats *in vitro* et de tester l'une des cibles thérapeutiques que nous avons identifiées.

## 1. Article 1 :

### Expanded huntingtin activates the c-Jun N-terminal Kinase/c-Jun pathway prior to aggregate formation in striatal neurons in culture

Garcia M., Charvin D. and Caboche J. (2004)

*Neuroscience*, 127(4):859-70.

#### 1.1. Présentation de l'étude et de ses objectifs

La maladie de Huntington (MH) est une maladie monogénique neurodégénérative dont l'origine moléculaire est une expansion de triplets CAG dans l'exon 1 du gène *IT15* qui se traduit en une répétition de glutamines anormalement longue dans la partie N-terminale de la protéine huntingtine. Ainsi, les répétitions de plus de 36 glutamines conduisent au développement de la pathologie. L'expansion de glutamines modifie la structure de la huntingtine et lui confère de nouvelles propriétés, dont celle d'être clivée et de former des agrégats de fragments N-terminaux dans tous les compartiments intra-neuronaux, et celle de provoquer la mort sélective des neurones striataux.

Les voies moléculaires qui mènent à la mort des cellules connaissent un intérêt grandissant et sont de plus en plus considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles notamment dans les maladies neurodégénératives. Parmi ces voies, la voie MAPK de c-Jun N-terminal Kinase (JNK), dont une cible majeure est le facteur de transcription c-Jun, attire depuis quelques années une attention particulière. En effet, de nombreuses études menées *in vitro* et *in vivo* démontrent que le module JNK/c-Jun est un médiateur précoce de l'apoptose et que l'inhibition de cette voie permet d'empêcher la mort avant l'apparition de dommages cellulaires irréversibles. Certaines données expérimentales sont en faveur d'un rôle de cette voie de transduction intracellulaire dans la pathogenèse de la MH. Les expériences menées par le groupe de Liu démontrent que, dans des lignées de neurones hippocampiques, la surexpression de la huntingtine mutée modifie les interactions protéiques entre certains acteurs de la voie JNK (MLK2) et la huntingtine normale, ce qui provoque l'activation de JNK et l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Liu, 1998; Liu *et al.*, 2000). Les travaux de Merienne *et al.* montrent quant à eux que, dans des lignées de cellules NG108 ou dans des cellules COS, la huntingtine mutée inhibe l'activité des phosphatases de JNK, ce qui résulte en une activation prolongée du module JNK/c-Jun (Merienne *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces études ont été réalisées sur des lignées cellulaires et ne permettent pas d'affirmer que l'activation de la voie JNK/c-Jun est un événement essentiel dans la mort sélective des neurones striataux au cours de la MH. Les travaux de Saudou *et al.* ont précédemment montré que la surexpression transitoire d'un fragment N-terminal de huntingtine mutée est capable d'induire la mort des neurones striataux mais pas des neurones hippocampiques en culture (Saudou *et al.*, 1998). Ces données suggèrent qu'il puisse exister des déterminants moléculaires spécifiquement striataux dans la mort neuronale induite par la huntingtine mutée. Il semble donc important d'analyser l'influence de la huntingtine mutée sur l'activation de la voie JNK/c-Jun dans un contexte striatal. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser un modèle *in vitro* de cultures primaires de neurones striataux de souris qui sont transfectés de manière transitoire avec un plasmide codant l'exon 1 de la huntingtine humaine normale (contenant 25 glutamines) ou mutée (contenant 103 glutamines). Ces séquences sont fusionnées à leur extrémité 3' à celle codant la GFP, ce qui permet d'identifier les neurones transfectés, et de suivre l'évolution de la huntingtine à l'intérieur de la cellule. Ces constructions ont été choisies parce que i) la surexpression de l'exon 1 du gène humain codant la huntingtine mutée (avec 115 glutamines) est suffisante pour reproduire un phénotype MH chez la souris (Mangiarini *et al.*, 1996) ; ii) le fragment N-terminal codé par cette construction possède les caractéristiques importantes de la huntingtine mutée telles que la capacité de former des agrégats cytoplasmiques et nucléaires, et la possibilité d'influencer les interactions de la huntingtine avec nombre de ses partenaires protéiques.

Dans un premier temps, notre étude consistait à caractériser ce modèle *in vitro* de MH. Nous avons pris en compte les principales caractéristiques neuropathologiques de la MH, à savoir la formation d'agrégats cytoplasmiques et nucléaires, et la mort des neurones striataux. Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'influence de la huntingtine normale ou mutée sur l'activation de la voie JNK/c-Jun dans ce modèle de cultures primaires de neurones striataux. Enfin, nous avons testé, par des outils pharmacologiques et génétiques, l'implication du module JNK/c-Jun dans la mort neuronale induite par la huntingtine mutée.

## EXPANDED HUNTINGTIN ACTIVATES THE C-JUN N TERMINAL KINASE/C-JUN PATHWAY PRIOR TO AGGREGATE FORMATION IN STRIATAL NEURONS IN CULTURE

M. GARCIA,<sup>1</sup> D. CHARVIN AND J. CABOCHE\*

Laboratoire Signalisation Neuronale et Régulations Géniques, Unité Mixte de Recherche 7102, Université Pierre et Marie Curie, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

**Abstract**—Huntington's disease (HD) is an autosomal neurodegenerative disorder, caused by expansion of a glutamine repeat in the Huntingtin protein. Pathogenesis in HD includes the cytoplasmic cleavage of Huntingtin and release of an amino-terminal fragment capable of nuclear localization, where expanded-Huntingtin (Exp-Htt) might lead to aberrant transcriptional regulation, neuronal dysfunction and degeneration. Recent evidence, from hippocampal cell lines, also implicates altered interaction of Exp-Htt with components of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) cascade. However, there is yet no proven implication of the JNK/c-Jun module in degeneration of striatal neurons, the more vulnerable cell population, in HD. In the present study, we used primary striatal neurons in culture to analyze c-Jun activation by Exp-Htt. Green fluorescent protein (GFP)-tagged exon 1 of human Huntingtin either in its normal (25Q, normal-Htt) or expanded (103Q, Exp-Htt) version was transiently transfected in these cells. We first set out, in our conditions, the time course of striatal degeneration produced by Exp-Htt, and found it occurred rapidly. At 48 h post-transfection, 60% of striatal neurons expressing Exp-Htt had apoptotic characteristics including DNA fragmentation and neuritic retraction. Most of these neurons also showed nuclear aggregates of GFP-Exp Htt. Kinetics of c-Jun activation were tested in transfected cells using immunocytochemical detection of phospho-c-Jun. We found a significant activation and induction of c-Jun in Exp-Htt but not normal-Htt-transfected neurons. Of interest, these events occurred prior to nuclear translocation of Exp-Htt. Finally, overexpression of a dominant negative version of c-Jun, as well as pharmacological inhibition of JNK strongly protected against DNA fragmentation and neuritic retraction induced by Exp-Htt. Thus our data suggest that c-Jun activation and induction, is an early event in the pathogenesis of HD, occurring prior to formation of nuclear aggregates of Exp-Htt. © 2004 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** Huntington's disease, primary striatal cultures, aggregates formation, c-Jun N terminal kinase, neuronal death.

<sup>1</sup> Present address: Venetian Institute of Molecular Medicine and Department of Biomedical Sciences, University of Padova, 35121 Padova, Italy.

\*Corresponding author. Tel: +33-1-4427-2501; fax: +33-1-4427-2669. E-mail address: jocelyne.caboché@snv.jussieu.fr (J. Caboché).

**Abbreviations:** BDNF, brain-derived neurotrophic factor; Exp, expanded; GFP, green fluorescent protein; HD, Huntington's disease; Htt, huntingtin; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MLK2, mixed lineage kinase 2; P-c-Jun, phospho-c-Jun; P-JNK, anti-phospho Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup> c-Jun N-terminal kinase.

0306-4522/04/\$30.00+0.00 © 2004 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.054

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder, caused by expansion of a CAG repeat in exon 1 of the *IT15* gene, coding for the huntingtin (Htt) protein (Huntington Disease Collaborative Research Group, 1993). The disease is characterized by choreiform movements, mental impairments, and cognitive symptoms (Martin and Gusella, 1986). Although Htt protein is expressed throughout the body (Li et al., 1993; Strong et al., 1993; Sharp et al., 1995), HD pathology is marked by extensive loss of striatal neurons. It is now generally admitted that pathogenesis in HD includes cleavage of Exp-Htt (Goldberg et al., 1996; Wellington et al., 1998; Lunkes et al., 2002) and release of an amino-terminal fragment capable of nuclear localization (Lunkes and Mandel, 1998; Hackam et al., 2000; Li et al., 2001). Within the nucleus, expanded-Htt (Exp-Htt) fragments colocalize with ubiquitin in aggregates (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997; Lunkes and Mandel, 1998; Saudou et al., 1998). They are thought to cause aberrant transcriptional regulation through interaction with cellular transcription factors (Stefan et al., 2000; Nucifora et al., 2001; Dunah et al., 2002; Li et al., 2002).

Recent evidence also implicates, in immortalized hippocampal neuronal cell lines, altered interaction of Exp-Htt with mixed lineage kinase 2 (MLK2), a component of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) cascade (Liu, 1998; Liu et al., 2000). This intracellular signaling pathway is an important mediator of apoptosis in different model systems *in vitro* as well as *in vivo*. The JNK pathway is activated in response to free radicals generated by ultraviolet radiation, inflammatory cytokines and direct application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (for review Davis, 2000) as well as, in striatal neurons, high doses of dopamine (Luo et al., 1998) or glutamate (Schwarzschild et al., 1997). The JNK group of protein kinases phosphorylates the N-terminal region of the transcription factor c-Jun, thereby regulating AP-1 complex transcriptional activity (for review Davis 2000). Mice lacking the neuron-specific isoform of JNK, JNK3, display remarkable resistance to kainic acid-induced excitotoxicity (Yang et al., 1997). This protective effect of JNK3 ablation in mutant animals is associated with marked reduction of c-Jun phosphorylation and decreased activity of the AP-1 transcription factor complex. A similar defect is observed in mice with a germ-line mutation of the *c-jun* gene that replaced the JNK phosphorylation sites (Behrens et al., 1999). Blocking c-Jun functions also protects neurons from neuronal apoptosis *in vitro* (Estus et al., 1994; Ham et al., 1995; Watson et al., 1998).

We recently described that activation of the JNK/c-Jun module was an important event in striatal death in a model system of HD (Garcia et al., 2002). Indeed, systemic administration of 3-nitropropionic acid (3-NP) activates JNK and c-Jun, *in vivo*, specifically in striatal neurons. *In vitro*, overexpression of a dominant negative version of c-Jun (e.g. deleted in its transcriptional domain),  $\Delta$ -c-Jun, totally reversed 3-NP-induced striatal death. Although some of the molecular mechanisms underlying JNK activation by mutated Htt have been defined from hippocampal neuronal cell lines (Liu et al., 2000; Merienne et al., 2003), there is yet no proven implication of the JNK/c-Jun module in degeneration of striatal neurons, the more vulnerable cell population in HD. Furthermore, analyzing kinetically activation of this pathway in relation with aggregate formation is an interesting issue since nuclear aggregates of mutated Htt are thought to be involved in aberrant transcriptional regulation, neuronal dysfunction and degeneration. Therefore, the present work was designed to investigate whether c-Jun phosphorylation and induction was a part of the cascade of events leading to striatal neurodegeneration in HD.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Primary striatal cultures

All experiments on animals were performed in accordance with the guidelines of the French Agriculture and Forestry Ministry for handling animals. Experiments were designed in order to minimize the number and the suffering of all animals used.

Striata were dissected out from 14 days old embryos from pregnant Swiss mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). This stage was chosen because it corresponds to the end of the mitotic phase of striatal neurons, and allows the differentiation of these neurons *in vitro*. The brains were removed from the embryos and were transferred to a plate containing PBS with 0.6% glucose. The striatum was isolated under a stereomicroscope. Briefly, the hemispheres were cut with scissors and folded over, to visualize the striatum. To avoid cortical contamination, the striatal surface close to the neocortex was systematically eliminated. Striata were mechanically dissociated by gently pipetting in PBS–0.6% glucose. After decantation for 5 min, cells were collected by centrifugation at  $1000\times g$  for 5 min. Cell pellets were resuspended in Neurobasal medium supplement with B27 (Invitrogen), 500 nM L-glutamine, 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  penicillin–streptomycin and 25  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma) and then plated into 24-well ( $1.8\times 10^5$  cells per well) plates coated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  poly-D-lysine (Sigma). After removal of the coating solution, cells were seeded in the Neurobasal medium and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO<sub>2</sub> and were used after 7 days *in vitro*, when most of the cells were of neuronal phenotype.

### Transfections and cDNA constructs

cDNA constructs (provided by HDF Resource Bank, UCLA) corresponded to exon 1 of the human Htt gene with 25 or 103 CAA repeats in the 5' region and a green fluorescent protein (GFP) tag in the 3' region. These cDNAs were subcloned in the pCDNA3 vector. Transient transfections of striatal cells were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), using 1  $\mu\text{g}$  of Htt constructs alone or cotransfected with 5  $\mu\text{g}$  of dominant negative c-Jun ( $\Delta$ -c-Jun) with Lipofectamine 2000 (Life Technologies) as recommended by the manufacturer. Transfection efficacy was 5% of total neurons. After 3 h, the cultures were rinsed with fresh medium or treated with 20  $\mu\text{M}$  SP600125 (Calbiochem, France).

### Immunocytochemical analysis

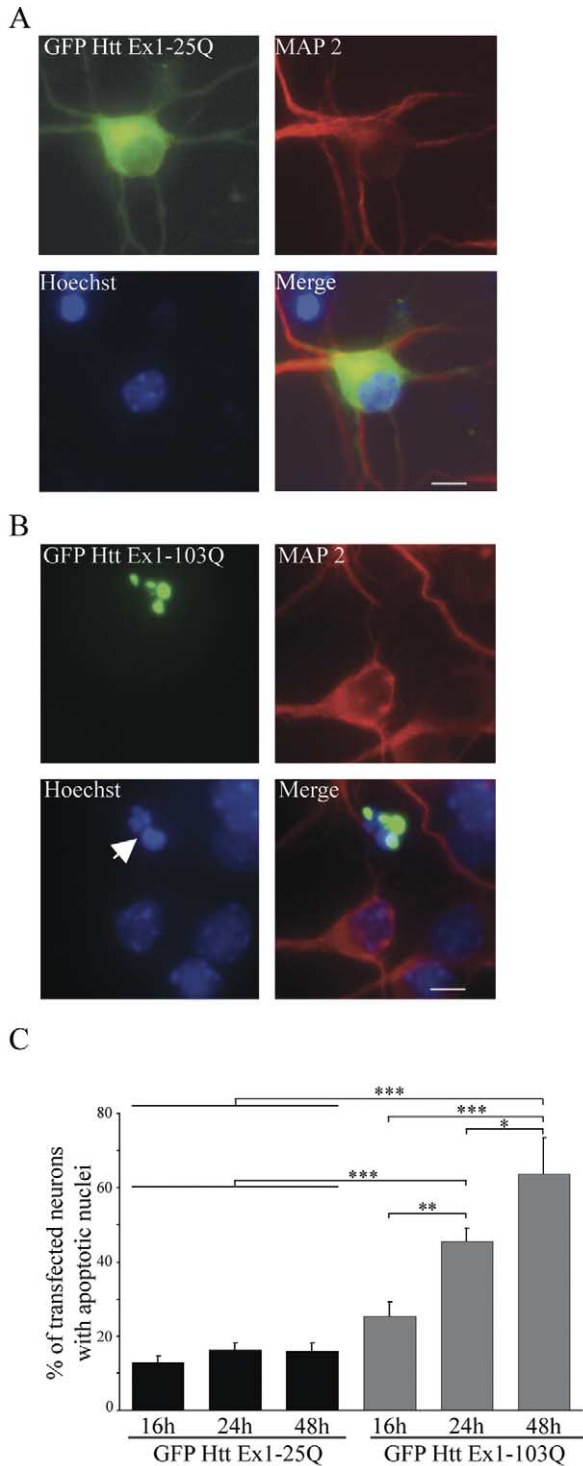
Cells were fixed with 4% paraformaldehyde diluted in PBS for 40 min at room temperature, and then incubated with a 1:1 ratio of methanol/acetone for 10 min at 4 °C. After washing with PBS, plates were preincubated with blocking buffer (10% normal goat serum in PBS) for 2 h at room temperature and then incubated with primary antibodies in PBS containing 1% BSA overnight at 4 °C: polyclonal anti-phospho Ser<sup>73</sup> c-Jun (P-c-Jun; 1:500; Ozyme), polyclonal anti-phospho Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup> JNK (P-JNK; 1:100, Ozyme); mouse MAP-2 (1/100; kindly provided by Dr B. Riederer), mouse Flag M2 (1/200; Sigma), rabbit c-Jun (1/100; New England Biolabs, Ozyme, France). Plates were rinsed and incubated with an anti-rabbit (1/1000; Amersham Pharmacia) for 2 h at RT, or anti mouse (1/600; Jackson Laboratories) CY3-conjugated antibodies. After washing, cells were counterstained with Hoechst and mounted under coverslips using Vectashield (Vector). For each experiment, cells were viewed with a Leica DMLB microscope with 40 $\times$  magnification. Images were acquired with Q imaging, Retiga 1300 camera, operated by Q capture 2.56 software. For double immunocytochemical labeling: P-c-Jun/MAP2, P-c-Jun was revealed with anti rabbit coupled to Cy3, MAP2 with biotinylated anti mouse (1/100) antibodies both incubated during 2 h at RT followed by incubation with AMCA Avidin D (1/100; Vector, Abcys) during 30 min at RT. Color processing was realized using Image Pro Plus 4.5.0.19 software (Media Cybernetics).

### Statistical analysis

Each labeling (DNA fragmentation, P-c-Jun or c-Jun immunoreactivity, GFP) was counted in normal-Htt or Exp-Htt positive cells, under an inverted microscope. For each construct (normal-Htt or Exp-Htt) and each time point, three independent experiments were performed, with a minimum of 100 transfected cells counted from three independent wells for each experiment. For c-Jun induction, c-Jun immunoreactivity was quantified with the image analysis software Image Pro Plus 4.5.0.19 (Media Cybernetics). A basal threshold was established from the intensity of c-Jun immunoreactivity in normal-Htt-transfected neurons and then applied on c-Jun immunoreactivity in Exp-Htt-transfected neurons. Neurons with a c-Jun immunoreactivity more intense than this threshold were counted as c-Jun positive cells. For each construct, 300 transfected cells at least were counted from three independent wells. All data were analyzed using one-way ANOVA between conditions, and post hoc comparisons were made using the Scheffé test. In all cases, significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Primary cultures of striatal neurons were transiently transfected with two constructs encoding the exon 1 of the human Htt containing 25 or 103 glutamine repetition coupled with GFP (GFP-Htt Ex1-25Q, -103Q), and representing the wild type and the mutated forms of the fragment, respectively. These constructs were chosen because i) genetic studies from transgenic mouse model for HD have shown that the expanded exon 1 of human Htt (Exp-Htt Ex1) gene is sufficient to cause a HD-like phenotype (Mangiarini et al., 1996); ii) Exp-Htt Ex1 protein is known to have pathogenic functions, including formation of nuclear aggregates, protein–protein interaction leading to alteration of gene transcription.



**Fig. 1.** Mutated Htt induces striatal apoptosis. (A, B) Striatal neuron morphology was analyzed 48 h after transfection with either wild type (GFP-Htt Ex1-25Q; A) or mutated Htt (GFP-Htt Ex1-103Q; B). Encoded proteins are visualized by GFP (green). The nucleus was counterstained by Hoechst (blue), dendrites and soma were revealed by MAP2 staining using an anti-mouse Cy3-conjugated secondary antibody (red). Merge represents the combination of the three labels. Note in B that the apoptotic nucleus (arrow) contains nuclear aggregates of GFP-Htt Ex1-103Q. Note also the lack of MAP2 staining in this neuron (scale bar = 10  $\mu$ m). (C) Quantification of apoptotic nuclei in neurons

### Kinetics of striatal degeneration induced by Exp-Htt exon 1

We first set out the time course of striatal degeneration induced by GFP-Htt Ex1-103Q (Exp-Htt) in our experimental conditions. Neuronal morphology was identified by immunocytochemical detection of MAP2, a specific marker of dendrites and soma. The nuclear integrity was visualized with the DNA dye, Hoechst 33258 (Fig. 1A, B).<sup>2</sup> The nuclei were considered apoptotic when Hoechst staining showed condensed or fragmented chromatin as shown Fig. 1B. Transfected neurons were analyzed by GFP labeling (Fig. 1A, B) and scored for apoptotic nuclei using an image analyzer system (Image Pro Plus; Fig. 1C). Noteworthy, there was no significant decline in wild type or Exp-Htt-expressing neurons over time. Only 16% of non-transfected neurons (data not shown) or neurons transfected with GFP Htt Ex1-25Q (normal Htt) had apoptotic features, whatever the time after transfection (Fig. 1C). This percentage was not significantly different at 16 h in neurons transfected with Exp-Htt. However, 24 h after transfection with Exp-Htt, 45% of transfected neurons showed signs of neurodegeneration as indicated by a clear nuclear shrinkage and fragmentation (Fig. 1B). This percentage significantly increased later on, and reached 63% of transfected neurons at 48 h (Fig. 1C). We did not succeed to further investigate the time course of striatal death, since GFP was not any more detectable later on.

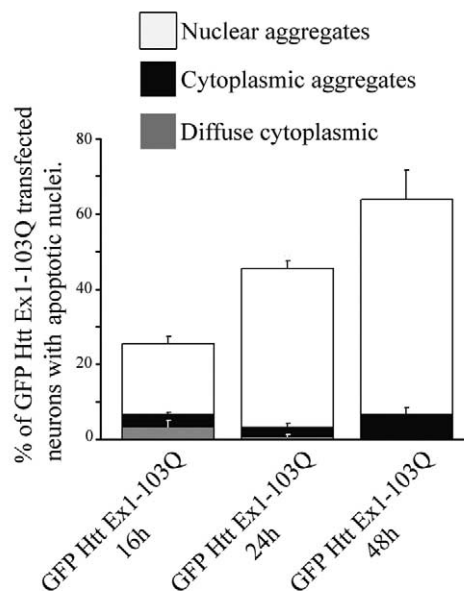
Having established the time course of neuronal death by Exp-Htt, we then wished to analyze a possible correlation between aggregate formation and striatal degeneration. From this analysis, and in agreement with previous reports (Li et al., 2001), it clearly appears that, whatever the time point after transfection, a vast majority of fragmented nuclei also contained nuclear aggregates of Exp-Htt (Fig. 2A; at 48 h post-transfection, 54% over the 63% of fragmented nuclei also contained nuclear aggregates).

Neuritic retraction is characteristic of neuronal degeneration. We wished to analyze this process in relation with nuclear aggregates of Exp-Htt and DNA fragmentation. Neuritic retraction did not occur in non-transfected neurons or in wild-type Htt expressing neurons. By contrast, we found a strong neuritic retraction, characterized by total loss of MAP2 staining (see Fig. 1B), occurring early in the process of striatal apoptosis. Indeed, 16 h after transfection, 78% of neurons with nuclear inclusions of Exp-Htt showed neuritic retraction with either normal (36%) or fragmented (42%) nuclei (Fig. 2B). The percentage of neurons showing both neuritic retraction and fragmented nuclei progressively increased then, to reach (70%) at 48 h.

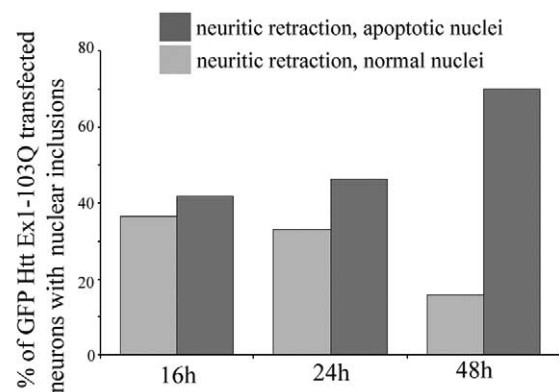
transfected with GFP-Htt Ex1-25Q or -103Q was performed at 16, 24 and 48 h after transfection. Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA followed by post hoc comparisons (Scheffé test), \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ , \*\*\*  $P < 0,001$ . For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.



A



B



**Fig. 2.** Nuclear inclusions of mutated Htt correlates with apoptotic characteristics. (A) Quantification of apoptotic nuclei was performed in GFP-Htt Ex1-103Q-expressing neurons in relation with its subcellular localization. (B) Quantification of neuritic retraction from neurons showing nuclear aggregates of GFP-Htt Ex1-103Q.

### Kinetics of Exp-Htt exon 1 aggregate formation

Besides the analysis of normal- or Exp-Htt expression in striatal neurons, the presence of the GFP tag at the C-terminal region allowed us to follow the subcellular localization of these constructs. At 8 h post-transfection, both normal- and Exp-Htt were already expressed and localized in neuritic extensions and soma (Fig. 3A) of striatal neurons but not in the nucleus. Later on, normal-Htt remained localized in these cytoplasmic compartments, as indicated by MAP2 immunostaining (Fig. 3B), but Exp-Htt clearly showed modifications of localization depending on the time after transfection. When analyzed 16 h after transfection, three different types of labeling were found (Fig. 3C, D): i) a diffuse cytoplasmic

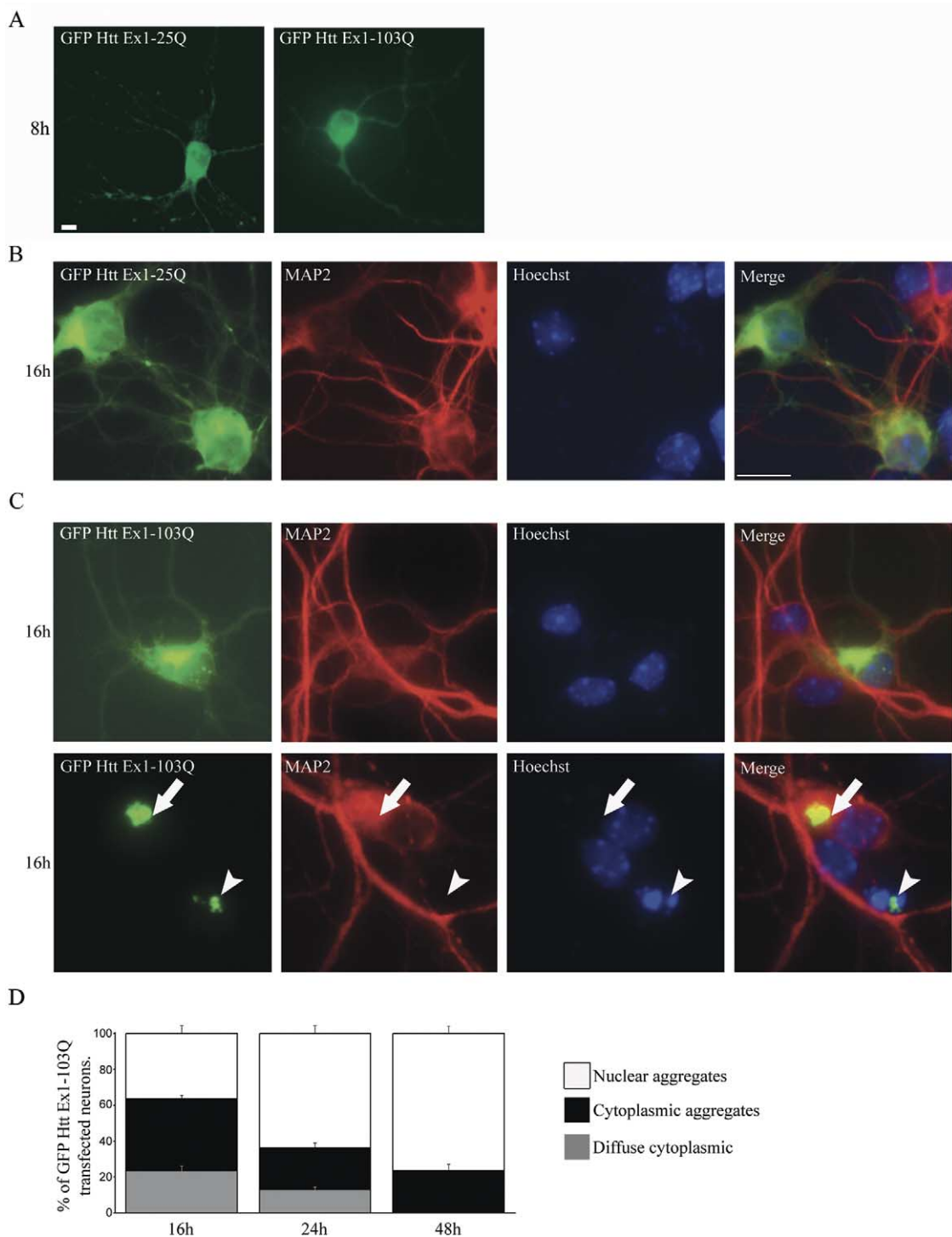
labeling (23% of transfected neurons; top panel), ii) cytoplasmic aggregates (40% of transfected neurons; low panel, large arrow) and iii) nuclear aggregates (36% of transfected neurons; low panel, arrowhead). Then nuclear aggregates progressively increased over time and reached 63% and 75% of transfected neurons at 24 h and 48 h, respectively (Fig. 3D).

### Activation of c-Jun precedes nuclear aggregates formation of Exp-Htt exon 1

The JNK/c-Jun module is implicated in neuronal death in different models of neurodegenerative diseases including Parkinson's (Saporito et al., 2000; Xia et al., 2001) and Alzheimer's (Morishima et al., 2001) diseases. Recent evidence indicates that Exp-Htt can activate JNK in hippocampal neuronal cell lines (Liu et al., 2000; Merienne et al., 2003). As depicted Fig. 4A, we found rapid activation, hyperphosphorylation of JNK, occurring 7–8 h post-transfection in the soma of striatal neurons expressing Exp-Htt. Later on, P-JNK immunoreactivity was found in the nucleus (data not shown). We also found activation and induction of c-Jun in striatal neurons overexpressing Exp-Htt. Phosphorylation of c-Jun, analyzed by immunocytochemistry using an antibody that recognizes its activated form (Phospho-Ser<sup>73</sup> c-Jun), P-c-Jun significantly increased 16 h after the transfection in with Exp-Htt but not normal-Htt-expressing neurons (Fig. 4B, C). This time point represented the peak of P-c-Jun activation since at 24 and 48 h after the transfection, no significant difference was found between Exp-Htt and normal-Htt (Fig. 4C). Moreover, a significant induction of P-c-Jun immunoreactivity was already found at 8 and 12 h post-transfection (12% for Exp-Htt when compared with 3% for normal-Htt; data not shown).

Then we addressed kinetics of Htt aggregate formation and c-Jun phosphorylation. This is of important issue since nuclear aggregates of Exp-Htt is thought to block transcriptional events within the nucleus (Steffan et al., 2000; Nucifora et al., 2001; Jiang et al., 2003). We thus scored aggregates formed by Exp-Htt in P-c-Jun positive cells and only found 13% of nuclear aggregates when compared with 87% of cytoplasmic aggregates (Fig. 4C). Importantly, we never found fragmented nuclei or neuritic retraction in P-c-Jun positive neurons (data not shown). The results indicate that phosphorylation of c-Jun is an early event occurring before the formation of Exp-Htt nuclear aggregates.

By controlling the phosphorylation state of c-Jun, the JNK pathway controls the heterodimeric transcription factor AP1, which in turn regulates transcription of genes including c-Jun itself. We thus analyzed whether c-Jun induction could occur in Exp-Htt expressing neurons by performing an immunocytochemistry with an antibody raised against the total c-Jun protein. This analysis was performed 16 h after the transfection, a time point corresponding to the peak of c-Jun phosphorylation in Exp-Htt expressing neurons (see Fig. 4C). c-Jun induction was quantified in transfected neurons, and showed a significant increase in Exp-Htt, when



**Fig. 3.** Kinetics of subcellular localization of wild type and mutated Htt. The morphology of striatal neurons was analyzed at different time points after transfection with GFP-Htt Ex1-25Q (A, B) or GFP-Htt Ex1-103Q (A, C). (A) Both GFP-Htt Ex1-25Q and GFP-Htt Ex1-103Q were expressed early after the transfection assay (8 h; s) (scale bar=10  $\mu$ m). B and C are examples of neurons analyzed by GFP, Hoechst and MAP2 staining as stated in Fig. 1 (scale bar=10  $\mu$ m) at 16 h after transfection. (B) Note that GFP-Htt Ex1-25Q is diffuse in the cytoplasm, and present in the soma and neurites (compare with MAP2 staining). (C) Three types of subcellular localization of GFP-Htt Ex1-103Q can be found: diffuse cytoplasmic (upper panel); cytoplasmic aggregates (large arrow, lower panel) and nuclear aggregates (arrowhead, lower panel). (D) Quantification of subcellular localization of GFP-Htt Ex1-103Q at different time points after the transfection (16, 24 and 48 h).

compared with normal-Htt-transfected striatal neurons (Fig. 5A–C). Similarly to c-Jun phosphorylation, c-Jun

induction was principally found when mutated Htt was cytoplasmic (Fig. 5C).

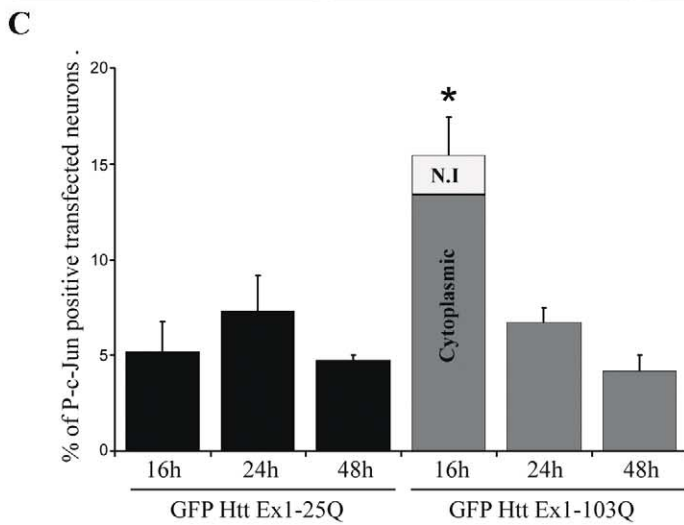
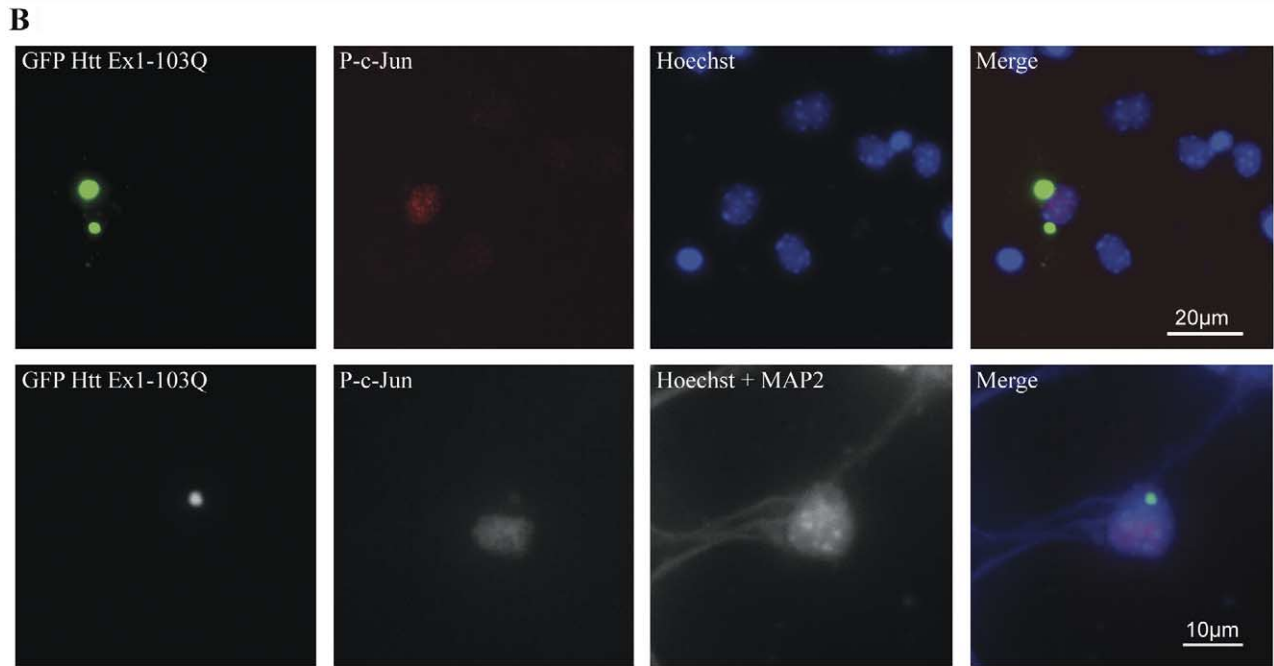
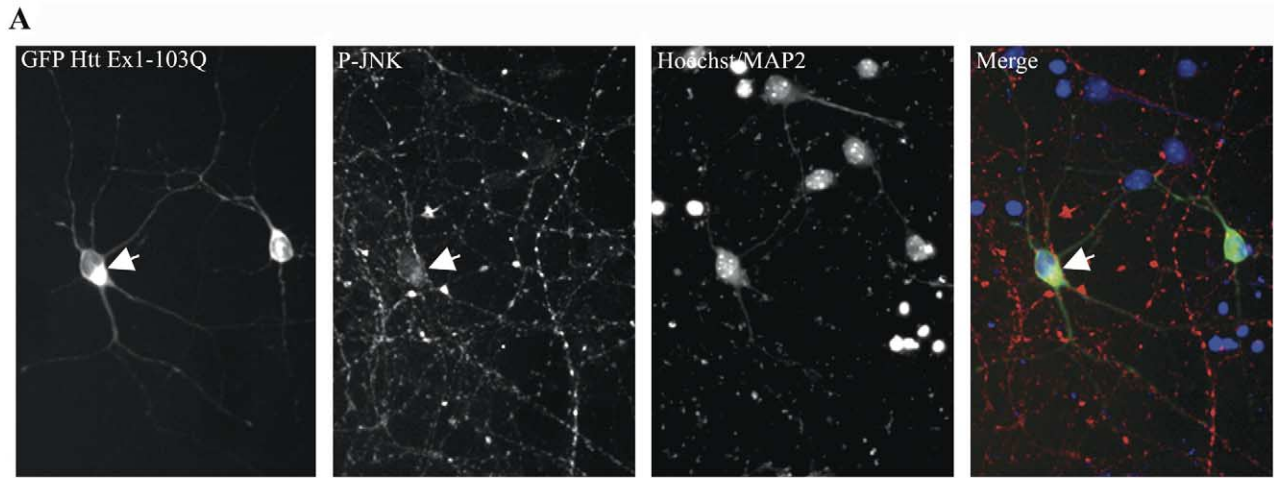


Fig. 4.

Thus, these data indicate that c-Jun induction can occur in exp-Htt-expressing neurons, while Exp-Htt is still cytoplasmic.

### Inhibition of JNK/c-Jun module partially protects against striatal apoptosis induced by Exp-Htt exon 1

We then investigated a possible protective role of a dominant negative version of c-Jun, e.g. lacking its transactivation domain ( $\Delta$ -c-Jun), in striatal death induced by Exp-Htt. Striatal neurons were co transfected with Flag- $\Delta$ -c-Jun and either normal-Htt (Fig. 6A) or -Exp-Htt (Fig. 6B).  $\Delta$ -c-Jun-transfected neurons were revealed using immunocytochemical detection of the Flag (Fig. 6A, B). This showed a perfect co-expression of  $\Delta$ -c-Jun and Htt constructs in all transfected striatal neurons. Analysis of neuronal protection was performed 48 h after co-transfection, e.g. the peak time point of striatal death (see Fig. 1C). A significant protection (26%) against neuronal death, analyzed by Hoechst staining was found in neurons expressing both Flag- $\Delta$ -c-Jun and GFP-Htt Ex1-103Q (Fig. 6D).

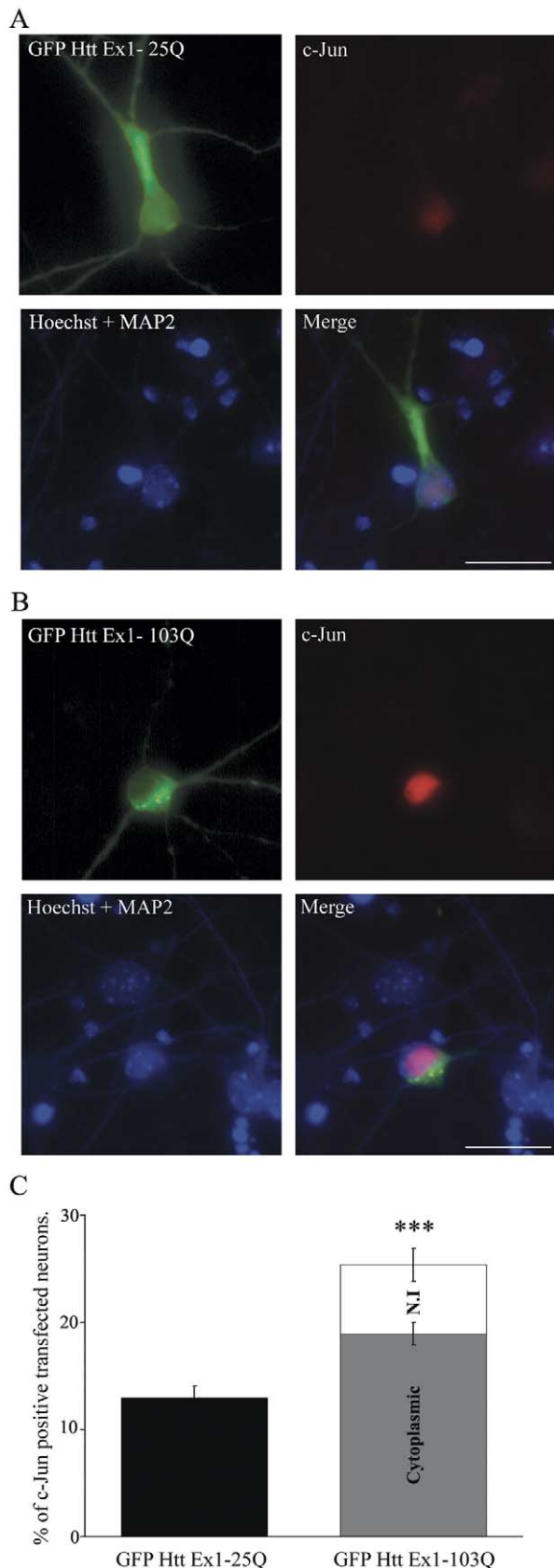
Similarly, a JNK inhibitor (Bennett et al., 2001) SP600125 protected against DNA fragmentation produced by Exp-Htt, albeit significantly lower (19%) than with overexpression of  $\Delta$ -c-Jun (Fig. 6D). Furthermore, using this approach, we could also analyze neuritic retraction, by MAP2 staining (see Fig. 6C). Interestingly neuritic retraction was significantly reduced in Exp-Htt expressing neurons that were treated with the JNK inhibitor (Fig. 6D). We note that the protection against neuritic retraction (17%) was similar to that for DNA fragmentation (19%). At this stage (48H), nuclear inclusions formed by Exp-Htt were not significantly modified (70% versus 75%) upon SP600125 treatment (data not shown).

## DISCUSSION

We show in the present work that activation of the JNK/c-Jun module is part of a cascade of events involved in striatal death induced by Exp-Htt exon 1. A significant increase of c-Jun phosphorylation and induction was observed in Exp-Htt exon 1 expressing striatal neurons. In this population, c-Jun activation and induction was an early event in the neurodegenerative process, occurring prior to nuclear aggregate formation. Furthermore, a dominant negative version of c-Jun and a selective JNK inhibitor, SP600125, significantly protected against striatal death induced by mutated Htt.

The JNK/c-Jun pathway is known to participate to the apoptotic response in various systems, such as excitotoxicity or progression of some neurodegenerative diseases (animal or cellular models of Parkinson's or Alzheimer's disease; for review Davis, 2000). The role of this pathway in striatal neurodegeneration in HD has never been clearly demonstrated, although we previously demonstrated that systemic administration of 3-NP, a mitochondrial toxin that replicates most of the clinical and pathophysiological hallmarks of HD (for review Brouillet et al., 1999), produces activation of JNK/c-Jun *in vivo* specifically in the striatum (Garcia et al., 2002). Furthermore, blocking this pathway *in vitro*, blocked 3-NP-induced striatal death (Garcia et al., 2002). In hippocampal cell lines, overexpression of Exp-Htt can activate JNK via altered interaction with MLK2. In this way, normal Htt was shown, in hippocampal cell lines, to bind to MLK2 (a kinase upstream of JNK) via its proline rich region. This binding was strongly impaired in the presence of the poly Q repeat, e.g. when Exp-Htt was overexpressed in this cell line (Liu et al., 2000), leading in turn to activation of JNK. Blocking the JNK pathway, using a dominant negative mutant of SEK1—one of the upstream kinases in JNK pathway—strongly protected against neurotoxicity of mutant Htt in hippocampal neurons (Liu, 1998). Recently Merienne and colleagues (2003) have proposed another mechanism to account for JNK activation by Exp-Htt. They showed that the activity of MAP kinase phosphatase M3/6 was down-regulated by Exp-Htt, both *in vitro*, in Cos and NG108 cell lines and *in vivo* in the retina of the R6/1 mouse model of HD. Similarly, alteration of M3/6 activity was found in another model of poly-Q disease, a transgenic mouse expressing mutated ataxin-7, the protein involved in spinocerebellar ataxia type 7. Thus, inactivation of M3/6 by poly-Q expansion could be a general mechanism for activating JNK. Poly-Q expansion can also alter the function of the proteasome (Bence et al., 2001) leading in turn to stress responses via the endoplasmic reticulum (Kouroku et al., 2002; Nishitoh et al., 2002), a process known to activate JNK in various model systems. Another mechanism that could account for JNK activation in HD, is defective mitochondrial energy production and increased levels of free radicals, which are observed in HD patients (Beal, 1996; Sharp and Ross, 1996) and in the R6/2 mouse model of HD (Tabrizi et al., 2000). Reactive oxygen and nitrogen species are necessary and sufficient to activate JNK in different model systems and administration of

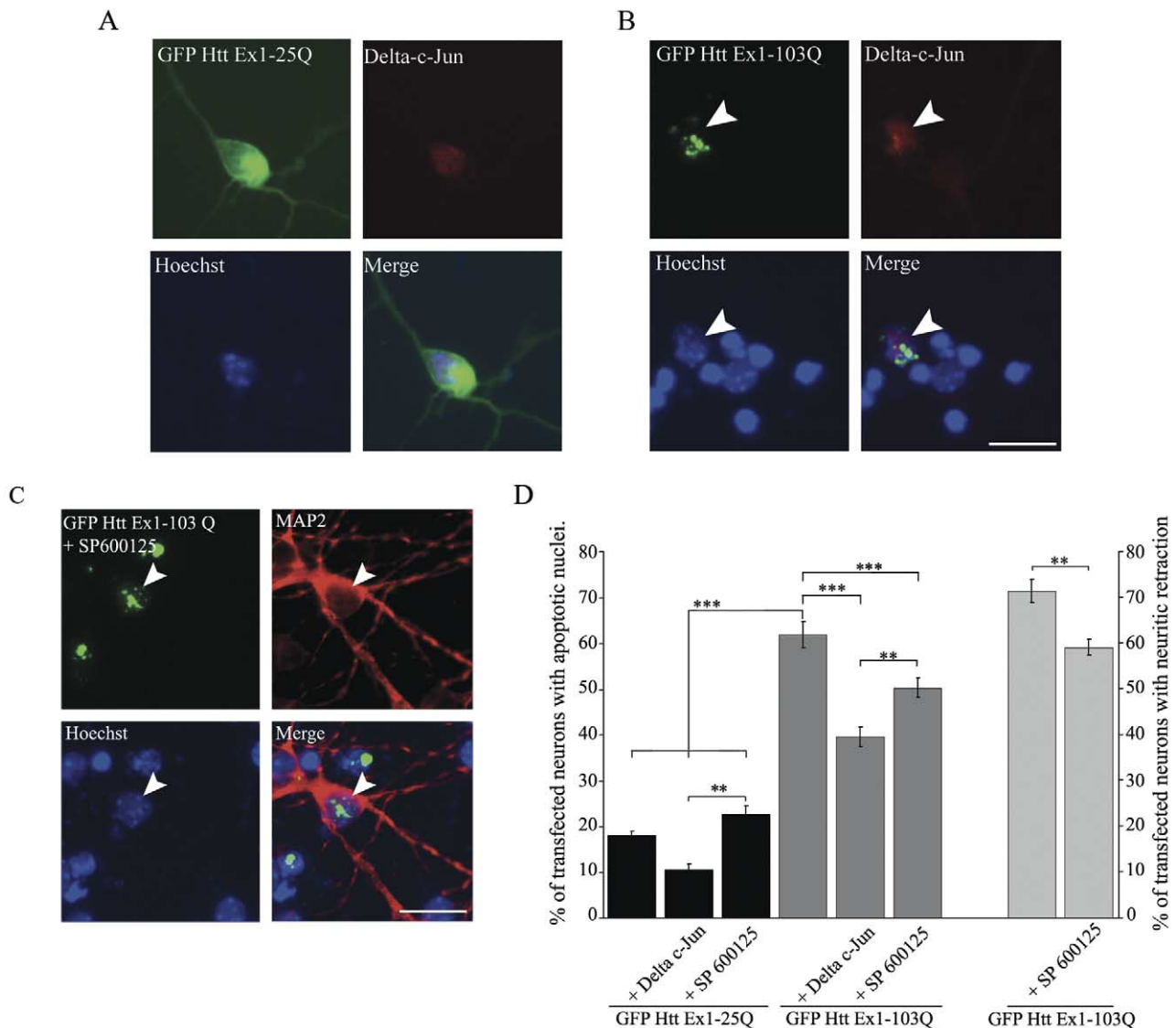
**Fig. 4.** Mutated Htt leads to the activation of the JNK/c-Jun pathway in striatal neurons. (A) Visualization of JNK activation in the soma of GFP-Htt Ex1-103Q. JNK activation was visualized using an anti-active (P-JNK) antibody. Note that, while P-JNK immunostaining is present in the neuritic extensions in all cells, an immunoreactivity can be found in the soma of a GFP Htt-Ex1-103Q expressing neuron (arrow). (B) Upper panel: Activated c-Jun was visualized using an antibody specifically directed against its phosphorylated form (anti-P-c-Jun) and revealed using an anti-Cy3-conjugated rabbit antibody (red labeling). GFP-Htt Ex1-103Q is revealed by the presence of GFP (green labeling). The cells were counterstained with the Hoechst (blue). Merge of the three labeling shows that P-c-Jun is present in a neuron with perinuclear aggregates of GFP-Htt Ex1-103Q. Lower panel: example of counterstaining with MAP2. Merge represents the fusion of the different labeling: GFP-Htt Ex1-103Q (green), P-c-Jun (red), MAP2 and Hoechst (blue). Note also the presence of a perinuclear aggregate in the P-c-Jun positive neuron. (C) Quantification of P-c-Jun positive striatal neurons expressing GFP-Htt Ex1-25Q or GFP-Htt Ex1-103Q. For each experiment, cells were counted from three independent wells (approximately 300 transfected neurons). Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA followed by post hoc comparisons (Scheffé test). \*\*  $P < 0,005$  when comparing GFP-Htt Ex1-103Q 16 h with GFP-Htt Ex1-25Q 16 h, 24 h, 48 h and GFP-Htt Ex1-103Q, 24 h and 48 h. At 16 h, cytoplasmic aggregates or nuclear inclusions (N.I.) of GFP-Htt Ex1-103Q were quantified in P-c-Jun positive neurons. For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.



free radical scavengers can exert neuroprotective effects on 3-NP-treated rats (Schulz et al., 1996). Thus, by analogy with 3-NP-induced striatal degeneration (Garcia et al., 2002), activation of the JNK/c-Jun module by increased levels of free radicals could be a key event in neuronal death in HD. In the present study, a significant number of Exp-Htt expressing neurons, showed P-c-Jun (16% versus 5% for normal-Htt) or c-Jun (32% versus 18% for normal Htt) immunoreactivity. Of interest, a one third protection was observed with the  $\Delta$ -c-Jun construct, indicating that c-Jun transactivating properties are important events for striatal degeneration induced by Exp-Htt in a subpopulation of striatal neurons (about 30%). This partial protection against Exp-Htt-induced apoptosis may account for a particular vulnerability of a specific subpopulation of striatal neurons. The JNK inhibitor SP600125 (Bennett et al., 2001), also protected against DNA fragmentation, albeit to lower extends (17%). This might reflect a non-specific role of SP600125 toward other kinases, such as Akt/PKB (Bennett et al., 2001). However,  $\Delta$ -c-Jun transfection and JNK inhibition showed no significant difference on striatal death, a data arguing for the specific role of JNK in c-Jun phosphorylation observed in our model system.

In their non-activated state, JNKs are present in the cytoplasm where they can phosphorylate substrates involved in mitochondrial functions, including proteins of Bcl-2 family, such as Bad and Bim (Donovan et al., 2002; Lei and Davis, 2003). Upon activation, JNKs can translocate to the nucleus where they phosphorylate c-Jun. The transcription factor c-Jun has been implicated in neuronal apoptosis in multiple model systems *in vitro* (for review Ip and Davis, 1998). Furthermore, mutations of JNK phosphorylation sites on c-Jun (Ser/Ala<sup>63-73</sup>) prevent neuronal apoptosis *in vivo* (Behrens et al., 1999). Thus, by controlling the phosphorylation state of c-Jun, the JNK pathway controls the heterodimeric transcription factor AP1, which in turn regulates transcription levels of pro-apoptotic genes, such as Fas ligand (Faris et al., 1998; Le-Niculescu et al., 1999; Martin-Villalba et al., 1999; Morishima et al., 2001) or the Bcl-2 family member, Bim (Putcha et al., 2001; Whitfield et al., 2001). The activation of c-Jun was an early event in striatal neurodegeneration induced by mutated Htt, occurring prior to nuclear aggregate formation.

**Fig. 5.** Mutated Htt leads to the up-regulation of the transcription factor c-Jun in striatal neurons. (A, B) Sixteen hours after transfection, c-Jun was visualized by immunocytochemistry (red labeling); GFP-Htt Ex1-25Q (A) or -103Q (B) is revealed by the presence of GFP (green labeling). The cells were counterstained with the Hoechst and MAP2 (blue labeling). Note the higher immunoreactivity of c-Jun in neurons expressing GFP-Htt Ex1-103Q (B), compare with (A); scale bar=20  $\mu$ m). (C) Quantification of c-Jun induction in striatal neurons transfected with GFP-Htt Ex1-25Q or GFP-Htt Ex1-103Q. For each experiment, cells were counted from three independent wells (approximately 300 transfected neurons). Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA followed by post hoc comparisons (Scheffé test), \*  $P < 0,05$  when comparing GFP-Htt Ex1-25Q and GFP-Htt Ex1-103Q. Cytoplasmic aggregates or nuclear inclusions (N.I.) of GFP-Htt Ex1-103Q were quantified in c-Jun positive neurons. For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.



**Fig. 6.** Inhibition of the JNK/c-Jun module protects against striatal death induced by Htt Ex1-103Q. (A, B) Primary striatal cultures were co-transfected with GFP-Htt Ex1-25Q (A) or -103Q (B) together with a dominant negative version of c-Jun ( $\Delta$ -c-Jun). Co-transfected neurons were revealed by GFP staining (green) and immunodetection of  $\Delta$ -c-Jun using an anti Flag M2 antibody (red labeling). (B) Note that overexpression of  $\Delta$ -c-Jun protects GFP-Htt Ex1-103Q expressing neuron from DNA fragmentation. Note also the presence of nuclear aggregate in this neuron (arrowhead). (C) Primary striatal cultures were transfected with GFP-Htt Ex1-103Q and treated with the pharmacological inhibitor of JNK, SP600125 (20  $\mu$ M). The presence of the constructs was visualized by the presence of GFP (green), the nucleus was stained by Hoechst (blue). Dendrites and soma were revealed by MAP2 staining using an anti-mouse Cy3-conjugated secondary antibody (red). Note that the neuron expressing mutated Htt presents nuclear aggregates and a normal nucleus (arrowhead). Note also the integrity of MAP2 immunostaining in this neuron. (D) Left panel: quantification of apoptotic nuclei was performed 48 h after transfection with GFP-Htt Ex1-25Q (dark columns) or -103Q (gray columns) together with  $\Delta$ -c-Jun or in the presence of SP600125. Note that overexpression of  $\Delta$ -c-Jun significantly impairs striatal death induced by GFP-Htt Ex1-103Q. Note the same protection against apoptosis upon SP600125 treatment. Right panel: quantification of neuritic retraction (light gray columns) in neurons transfected with GFP-Htt Ex1-103Q treated or not with SP600125. Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA followed by post hoc comparisons (Scheffé test), \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ , \*\*\*  $P < 0,001$ . For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.

We thus propose that activation of JNK by Exp-Htt is an early event, occurring within the cytoplasm, prior to nuclear translocation of mutated Htt.

Within the nucleus, Exp-Htt acts as a transcriptional repressor by interacting with the tumor suppressor p53 and sequestering the CREB binding protein (CBP) (Steffan et al., 2000; Nucifora et al., 2001). Exp-Htt interferes with the

functions of the transcription factor CREB, one important mediator of cell survival known to control the anti-apoptotic Bcl-2 (Riccio et al., 1999) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF; Tao et al., 1998) genes. Of interest BDNF mRNA and protein levels are modified in the cerebral cortex of HD patients, as well as in a transgenic mouse model of HD (Zuccato et al., 2001). Reduced levels of

CRE-responsive genes are seen in HD versus control brains (Sapp et al., 1995; Augood et al., 1996) as well as in mouse models of HD (Luthi-Carter et al., 2000). Thus, it is generally assumed that impairment of CRE-mediated transcription is involved in HD.

Dystrophic neurites have been reported in HD patient brains (DiFiglia et al., 1997) as well as mice models of HD (Li et al., 2001). Reduced CRE-mediated transcription has recently been proposed to account for the loss of neurite outgrowth in an inducible model of Exp-Htt exon 1 expression in PC12 cell lines. In this model, treatment with cAMP or forskolin reduced both loss of neurite outgrowth and cell death (Wyttenbach et al., 2000). However, similarly to the data reported here, Li et al. (2001) reported that neuritic degeneration preceded nuclear fragmentation in striatal neurons transfected with Exp-Htt exon 1. The authors concluded that the early neuropathology of HD originated from axonal dysfunction and degeneration associated with Htt aggregate in these cellular compartments. More recently, Trushina et al. (2003), using quantitative single-cell analysis and time-lapse imaging, showed that microtubule destabilization mediated by full-length mutated Htt occurred before nuclear entry of mutated Htt. Since neuritic retraction induced by Exp-Htt exon 1 was partially blocked by the JNK inhibitor, we propose that early activation of JNK in the cytoplasm could account, at least in part for dystrophic neurites.

## CONCLUSION

Our data provide the first evidence that inhibition of the JNK/c-Jun module can protect, at least in part, from striatal neuron degeneration in HD. Of course, our data need to be confirmed in more sophisticated model systems, which could take into account the environmental complexity of striatal neurons, for example cortical glutamatergic or nigral dopaminergic afferences. The striatum receives the densest dopaminergic innervation in the brain and dopamine is toxic to striatal neurons *in vitro* as well as *in vivo*. The mechanisms of dopamine toxicity are highly linked to oxidative metabolism and JNK activation (Luo et al., 1998). Thus, within striatal neurons, dopamine could potentiate or amplify activation of the JNK pathway produced by Exp-Htt. This in turn, could lead to a more robust activation of the JNK/c-Jun module. [Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993.](#)

*Acknowledgements*—This work was supported by CNRS, University Pierre et Marie Curie and Fondation Schueller-Bethencourt for J. Caboche. M. Garcia was supported by the Ministère de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie and Fondation pour la Recherche Médicale. D. Charvin was supported by the Ministère de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie. We acknowledge M. Yaniv for the  $\Delta$ -c-Jun plasmid, and HDF Resource Bank, UCLA for the GFP tagged versions (25Q and 103Q) of human exon 1 of huntingtin.

## REFERENCES

Augood SJ, Faull RL, Love DR, Emson PC (1996) Reduction in enkephalin and substance P messenger RNA in the striatum of

- early grade Huntington's disease: a detailed cellular in situ hybridization study. *Neuroscience* 72:1023–1036.
- Beal MF (1996) Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 6:661–666.
- Behrens A, Sibilia M, Wagner EF (1999) Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21:326–329.
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292:1552–1555.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13681–13686.
- Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59:427–468.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90:537–548.
- Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239–252.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277:1990–1993.
- Donovan N, Becker EB, Konishi Y, Bonni A (2002) JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem* 277:40944–40949.
- Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N, Krainc D (2002) Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296:2238–2243.
- Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM Jr (1994) Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 127:1717–1727.
- Faris M, Kokot N, Latinis K, Kasibhatla S, Green DR, Koretzky GA, Nel A (1998) The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J Immunol* 160:134–144.
- Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E, Caboche J (2002) The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci* 22:2174–2184.
- Goldberg YP, Nicholson DW, Rasper DM, Kalchman MA, Koide HB, Graham RK, Bromm M, Kazemi-Esfarjani P, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Hayden MR (1996) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* 13:442–449.
- Hackam AS, Yassa AS, Singaraja R, Metzler M, Gutekunst CA, Gan L, Warby S, Wellington CL, Vaillancourt J, Chen N, Gervais FG, Raymond L, Nicholson DW, Hayden MR (2000) Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *J Biol Chem* 275:41299–41308.
- Ham J, Babji C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14:927–939.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (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.
- Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal

- kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205–219.
- Jiang H, Nucifora FC Jr, Ross CA, DeFranco DB (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.
- Kouroku Y, Fujita E, Jimbo A, Kikuchi T, Yamagata T, Momoi MY, Kominami E, Kuida K, Sakamaki K, Yonehara S, Momoi T (2002) Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum Mol Genet* 11:1505–1515.
- Lei K, Davis RJ (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2432–2437.
- Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret F-X, Green DR, Karin M (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol Cell Biol* 19:751–763.
- Li H, Li S-H, Yu Z-X, Shelbourne P, Li X-J (2001) Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 21:8473–8481.
- Li SH, Cheng AL, Zhou H, Lam S, Rao M, Li H, Li XJ (2002) Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol* 22:1277–1287.
- Li SH, Schilling G, Young WS 3rd, Li XJ, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG, et al (1993) Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11:985–993.
- Liu YF (1998) Expression of polyglutamine-expanded Huntingtin activates the SEK1-JNK pathway and induces apoptosis in a hippocampal neuronal cell line. *J Biol Chem* 273:28873–28877.
- Liu YF, Dorow D, Marshall J (2000) Activation of MLK2-mediated signaling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin. *J Biol Chem* 275:19035–19040.
- Lunkes A, Lindenberg KS, Ben-Haiem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL, Trotter Y (2002) Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 10:259–269.
- Lunkes A, Mandel JL (1998) A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 7:1355–1361.
- Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS (1998) Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J Biol Chem* 273:3756–3764.
- Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, Frey AS, Spektor BS, Penney EB, Schilling G, Ross CA, Borchelt DR, Tapscott SJ, Young AB, Cha JH, Olson JM (2000) Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 9:1259–1271.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trotter Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493–506.
- Martin JB, Gusella JF (1986) Huntington's disease: pathogenesis and management. *N Engl J Med* 315:1267–1276.
- Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM (1999) CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19:3809–3817.
- Merienne K, Helmlinger D, Perkin GR, Devys D, Trotter Y (2003) Connecting heat shock protein 70 to the JNK pathway: polyglutamine expansion induces a protein damaging-stress. *J Biol Chem* 278:16957–16967.
- Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME (2001) beta-Amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21:7551–7560.
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16:1345–1355.
- Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291:2423–2428.
- Putcha GV, Moulder KL, Golden JP, Bouillet P, Adams JA, Strasser A, Johnson EM (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29:615–628.
- Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD (1999) Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286:2358–2361.
- Saporito MS, Thomas BA, Scott RW (2000) MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons in vivo. *J Neurochem* 75:1200–1208.
- Sapp E, Ge P, Aizawa H, Bird E, Penney J, Young AB, Vonsattel JP, DiFiglia M (1995) Evidence for a preferential loss of enkephalin immunoreactivity in the external globus pallidus in low grade Huntington's disease using high resolution image analysis. *Neuroscience* 64:397–404.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55–66.
- Schulz JB, Henshaw DR, MacGarvey U, Beal MF (1996) Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem Int* 29:167–171.
- Schwarzschild MA, Cole RL, Hyman SE (1997) Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J Neurosci* 17:3455–3466.
- Sharp AH, Loev SJ, Schilling G, Li SH, Li XJ, Bao J, Wagster MV, Kotzok JA, Steiner JP, Lo A, et al (1995) Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14:1065–1074.
- Sharp AH, Ross CA (1996) Neurobiology of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 3:3–15.
- Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6763–6768.
- Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL (1993) Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5:259–265.
- Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, Mangiarini L, Mahal A, Bates G, Cooper JM, Schapira AH (2000) Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol* 47:80–86.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709–726.
- Trushina E, Heldebrant MP, Perez-Terzic CM, Bortolon R, Kovtun IV, Badger JD, Terzic A, Estevez A, Windebank AJ, Dyer RB, Yao J, McMurray CT (2003) Microtubule destabilization and nuclear entry are sequential steps leading to toxicity in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12171–12176.
- Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 18:751–762.



- Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M, Rowland KJ, Zhang T, Rasper D, Roy S, Thornberry N, Pinsky L, Kakizuka A, Ross CA, Nicholson DW, Bredesen DE, Hayden MR (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 273:9158–9167.
- Whitfield J, Neame SJ, Paquet L, Bernard O, Ham J (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29:629–643.
- Wyttenbach A, Carmichael J, Swartz J, Furlong RA, Narain Y, Rankin J, Rubinsztein DC (2000) Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2898–2903.
- Xia XG, Harding T, Weller M, Bieneman A, Uney JB, Schulz JB (2001) Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10433–10438.
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P, Flavell RA (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389:865–870.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293:493–498.

*(Accepted 28 May 2004)*  
*(Available online 17 July 2004)*

## 1.2. Apport de l'étude

Les résultats obtenus au cours de cette étude démontrent pour la première fois qu'un fragment N-terminal de huntingtine mutée est capable d'activer la voie JNK/c-Jun dans les neurones striataux. Cette activation est un événement précoce dans le processus de mort neuronale déclenché par la huntingtine mutée, et l'inhibition du module JNK/c-Jun protège partiellement les neurones de la toxicité produite par la huntingtine mutée.

### *1.2.1. Caractérisation et validation de notre modèle in vitro de MH*

Le modèle de cultures primaires de neurones striataux de souris sur-exprimant transitoirement l'exon 1 de la huntingtine humaine mutée permet de reproduire deux caractéristiques neuropathologiques importantes de la MH, à savoir la dégénérescence progressive des neurones striataux et la formation d'agrégats de huntingtine mutée.

En effet, d'une part, la huntingtine mutée, contenant 103 glutamines, entraîne la mort des neurones striataux, caractérisée par une rétraction neuritique précédant la condensation puis la fragmentation du noyau. Cette neurodégénérescence est progressive et atteint son maximum après 48h d'expression de la huntingtine mutée. A ce stade, 63% des neurones exprimant la huntingtine mutée présentent un noyau de type apoptotique, comme le révèle le marquage nucléaire par l'intercalant de l'ADN Hoechst 33258. Au-delà de 48h, la GFP, qui est fusionnée à la partie C-terminale du fragment de huntingtine exprimé, n'est plus détectable et ne permet donc plus la caractérisation de notre modèle.

D'autre part, le fragment N-terminal de huntingtine mutée qui est exprimé est capable de s'agréger dans tous les compartiments neuronaux et cette agrégation est progressive dans le temps. En effet, dans les huit premières heures de son expression, la grande majorité de la huntingtine mutée est diffuse dans les neurites et le soma des neurones striataux. Elle forme ensuite progressivement des agrégats dans le cytoplasme et dans le noyau, la proportion des agrégats nucléaires augmentant avec le temps. Ainsi, après 48h d'expression, 75% des neurones transfectés avec la huntingtine mutée présentent des agrégats dans le noyau.

Tous les effets observés dans ce modèle sont spécifiques à la forme mutée de la huntingtine puisque, par comparaison, l'expression du fragment N-terminal de la huntingtine normale, contenant 25 glutamines, ne forme pas d'agrégats et n'est pas toxique pour les neurones striataux.

### 1.2.2. Analyse de l'influence de la huntingtine sur l'activation de la voie JNK/c-Jun et implication de cette voie dans la toxicité de la huntingtine mutée

Après avoir validé notre modèle cellulaire, nous l'avons utilisé pour analyser l'influence de la huntingtine sur l'activation de la voie JNK/c-Jun. Nous avons alors montré que le fragment N-terminal de la huntingtine mutée (codé par l'exon 1 du gène humain) est capable d'activer JNK et le facteur de transcription c-Jun, alors que le même fragment de huntingtine normale ne l'est pas. L'activation de JNK, caractérisée par la translocation nucléaire de sa forme phosphorylée, est un événement précoce dans le processus pathogénique qui apparaît avant la formation d'agrégats nucléaires de huntingtine mutée.

De façon intéressante, l'inhibition du module JNK/c-Jun, par la co-expression d'une forme dominante négative de c-Jun ou par l'inhibition pharmacologique de JNK par le SP-600125, protège partiellement mais significativement les neurones striataux de la mort induite par la huntingtine mutée dans ce modèle.

Il convient de noter que, bien que la huntingtine mutée soit capable d'activer la voie JNK/c-Jun dans les neurones striataux, cette activation ne concerne qu'une faible proportion des neurones transfectés (15%).

### 1.3. Conclusion

Cette étude démontre qu'un fragment N-terminal de huntingtine mutée cytoplasmique est capable d'activer la voie JNK/c-Jun dans les neurones striataux. Ce résultat est intéressant puisqu'il suggère qu'une voie pro-apoptotique, la voie des JNK, puisse être activée dans le cytoplasme, avant que les agrégats nucléaires n'aient pu exercer leur effet inhibiteur au niveau de la transcription génique. En d'autres termes, outre la capacité de la huntingtine mutée à perturber la transcription et notamment à inhiber l'expression génique de programmes anti-apoptotiques via la séquestration de composants de la machinerie transcriptionnelle au sein des inclusions nucléaires (comme cela est classiquement admis dans la littérature), nous proposons que la huntingtine mutée est capable d'activer un programme pro-apoptotique, précocement, via l'activation de la voie JNK.

De façon surprenante, et contrairement aux données que notre équipe avait obtenues à partir d'un modèle pharmacologique de la MH (Garcia *et al.*, 2002), l'activation de la voie JNK/c-Jun ne concerne qu'une minorité des neurones striataux. Nous avons alors voulu explorer l'hypothèse d'une vulnérabilité accrue des neurones striataux à cette voie de signalisation pro-apoptotique par l'apport exogène de dopamine. Ce travail fait l'objet de la publication n°2.

## 2. Article 2 :

### Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease : The dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation

Charvin D., Vanhoutte P., Pagès C., Borrelli E. and Caboche J. (2005)

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 102(34):12218-23.

#### 2.1. Présentation de l'étude et de ses objectifs

La maladie de Huntington (MH) présente deux caractéristiques notables. D'une part, bien que la protéine huntingtine mutée soit exprimée depuis le développement embryonnaire, les premiers symptômes de la maladie n'apparaissent généralement qu'entre trente-cinq et quarante deux ans. D'autre part, la huntingtine mutée est exprimée dans toutes les cellules de l'organisme, mais seuls les neurones striataux dégénèrent aux premiers stades de la maladie. Cette neurodégénérescence spécifique est importante dans le mécanisme pathophysiologique de la MH puisqu'à la fois l'évolution et la sévérité des symptômes sont directement corrélées au niveau d'atrophie du noyau caudé (Aylward *et al.*, 2000).

Le striatum est la structure qui reçoit la plus dense innervation dopaminergique. Cette particularité neuro-anatomique pourrait contribuer à la vulnérabilité de cette structure. Ainsi, les fortes concentrations de dopamine présentes au sein du striatum pourraient participer à sa vulnérabilité préférentielle. D'ailleurs, le profil de neurodégénérescence de la MH progresse selon un gradient dorso-ventral qui correspond au gradient de concentration de dopamine dans le striatum (Cass, 1997). La libération physiologique de dopamine qui se produit dans le striatum durant le cours normal de la vie pourrait ainsi conduire à une vulnérabilité progressive des neurones striataux dans la MH.

Malgré l'existence de nombreux arguments indirects en faveur d'un rôle de la dopamine dans la vulnérabilité spécifique des neurones striataux dans la MH (Jakel and Maragos, 2000), les mécanismes précis par lesquels la dopamine pourrait révéler la toxicité de la huntingtine mutée demeurent inconnus. Afin de mieux comprendre le processus pathophysiologique qui mène à la dégénérescence des neurones striataux et donc aux symptômes de la MH, nous avons choisi d'explorer le rôle que pouvait jouer la dopamine dans cette maladie.

La première partie de ce travail consistait à mettre au point un modèle cellulaire permettant d'analyser l'effet de la dopamine sur des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée. Nous avons pour cela adapté le modèle *in vitro* que nous avons caractérisé dans notre étude précédente (Garcia *et al.*, 2004). Nous avons alors décrit que ce modèle reproduit plusieurs caractéristiques de la présence de la huntingtine mutée :

- la formation d'agrégats dans tous les compartiments neuronaux,
- la mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée,
- la faible activation de la voie JNK/c-Jun par la huntingtine mutée.

Nous avons dans un premier temps vérifié que la dopamine reproduisait bien sur nos cultures primaires de neurones striataux (non transfectés par la huntingtine) les effets décrits dans la littérature sur d'autres modèles neuronaux, à savoir une toxicité dose-dépendante et l'activation de la voie JNK/c-Jun (Luo *et al.*, 1998). Après avoir décrit les effets de la concentration et de la durée de traitement des neurones striataux par la dopamine, nous nous sommes placés dans des conditions de traitements où les effets de la dopamine seule sont faibles sur la toxicité et l'activation de JNK/c-Jun.

Disposant d'un modèle cellulaire adapté, nous avons pu ensuite analyser l'influence de la dopamine sur les effets de la huntingtine mutée dans les neurones striataux. Nous avons analysé les trois paramètres qui avaient été décrits, à savoir la formation d'agrégats, la mort neuronale et l'activation de la voie JNK/c-Jun. A l'aide d'outils pharmacologiques et génétiques, nous avons entrepris la dissection des mécanismes moléculaires qui pouvaient expliquer les effets de la dopamine sur la vulnérabilité des neurones striataux à la huntingtine mutée, tentant ainsi d'identifier d'éventuelles cibles thérapeutiques.

# Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: The dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation

Delphine Charvin\*, Peter Vanhoutte\*, Christiane Pagès\*, Emiliana Borelli†, and Jocelyne Caboche\*\*

\*Unité Mixte de Recherche 7102, Signalisation Neuronale et Régulations Géniques, 9 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, France; and †Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 Rue L. Fries, 67404 Illkirch Cedex, France

Edited by Vernon Martin Ingram, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, and approved June 17, 2005 (received for review April 2, 2005)

**Huntington's disease (HD), an inherited neurodegenerative disorder, results from an abnormal polyglutamine extension in the N-terminal region of the huntingtin protein. This mutation leads to protein aggregation and neurotoxicity. Despite its widespread expression in the brain and body, mutated huntingtin causes selective degeneration of striatal projection neurons. In the present study, we investigate the role of dopamine (DA) in this preferential vulnerability. Using primary cultures of striatal neurons transiently expressing GFP-tagged-exon 1 of mutated huntingtin, we show that low doses of DA (100  $\mu$ M) act synergistically with mutated huntingtin to activate the proapoptotic transcription factor c-Jun. Surprisingly, DA also increases aggregate formation of mutated huntingtin in all cellular compartments, including neurites, soma, and nuclei. DA-dependent potentiation of c-Jun activation was reversed by ascorbate, a reactive oxygen species (ROS) scavenger, and SP-600125, a selective inhibitor of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. By contrast, DA effects on aggregate formation were reversed by a selective D2 receptor antagonist and reproduced by a D2 agonist. Similarly, striatal neurons from D2 knockout mice showed no effect of DA on aggregate formation. Blocking ROS production, JNK activation, or D2 receptor stimulation significantly reversed DA aggravation of mutated huntingtin-induced striatal death. The combined treatment with the ROS scavenger and D2 antagonist totally reversed DA's effects on mutated huntingtin-induced striatal death. Thus, the present results provide insights into the cellular mechanisms that govern striatal vulnerability in HD and strongly support a dual role of JNK activation and D2 receptor signaling in this process.**

aggregates | expanded huntingtin | c-Jun N-terminal kinase

**H**untington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder characterized by chorea, psychiatric disturbances, and cognitive impairment (1). This autosomal, dominant, inherited disorder results from an abnormal CAG repeat expansion in exon 1 of the *HD* gene, which is translated into an abnormally long polyglutamine tract at the N terminus of the huntingtin protein (Htt) (2). Htt is a 350-kDa protein of unknown function that is essential for normal embryonic development and neurogenesis (3). Cleavage of expanded huntingtin (expHtt) leads to the release of N-terminal fragments containing the polyglutamine repeats. These fragments accumulate and form intraneuronal aggregates in neurites, cytoplasm, and nuclei (4–6). The pathogenic role of these aggregates in the disease remains controversial, but they are a common hallmark of numerous neurodegenerative disorders (7).

Selective neurodegeneration in the patient brain, which occurs most prominently in the striatum, constitutes the basis of the neurological symptoms of HD (8). Despite the widespread expression of Htt in the brain and body, medium-size spiny GABAergic neurons of the striatum are preferentially affected in HD. This specific neurodegeneration is important in the pathophysiology of the disease because the evolution and severity of the symptoms are directly correlated to the rate of caudate

atrophy (9). The striatum receives the densest dopaminergic innervation of the brain, and HD progresses according to a striatal dorsoventral gradient corresponding to the gradient of dopamine (DA) concentration (10). Thus, the physiological DA release that occurs in the striatum during the normal life span could participate in the preferential and progressive vulnerability of striatal neurons in HD. Although numerous indirect arguments suggest a role of DA in HD (11), the precise mechanism by which DA could aggravate mutated huntingtin toxicity remains to be elucidated.

In the present study, we show that low doses of DA aggravate expHtt-induced neuronal death via two distinct routes. One route involves activation of the proapoptotic c-Jun N-terminal kinase (JNK)/c-Jun pathway by oxidative stress, and the other route involves the stimulation of dopaminergic D2 receptor. Thus, our study provides insights into the cellular mechanisms that make striatal neurons more vulnerable to toxicity induced by expHtt and strongly supports a prominent role of DA in the specificity of cell death in HD.

## Methods

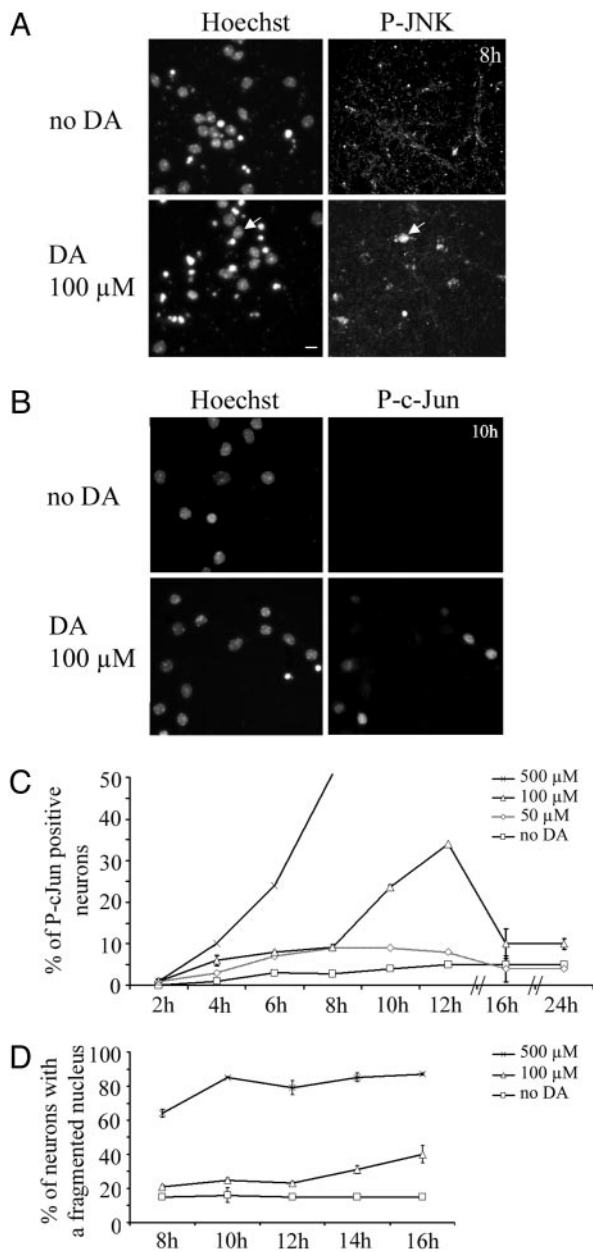
Embryos were removed at day 14 from timed-pregnant Swiss mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) or D2 receptor knockout mice. Striatal cultures and transfections were performed as described in ref. 12. cDNAs for Htt and expHtt (provided by the Huntington's Disease Foundation Resource Bank, University of California, Los Angeles) correspond to pcDNA3 containing the CMV promoter controlling the expression of the entire exon 1 of the human *huntingtin* gene (*IT15*), with 25 (Htt) or 103 (expHtt) continuous CAA or CAG repeats. A sequence encoding an EGFP was inserted in frame at the C terminus of each construct. In parallel, the coding sequence of the *EGFP* gene was expressed under the control of the CMV promoter (referred to as GFP). Four hours after transfection, the medium was removed and replaced by the complete neurobasal medium containing DA (Calbiochem) or quinpirole (Research Biochemicals, Natick, MA), then cells were replaced at 37°C for the appropriate time. For the pharmacological treatments, 10  $\mu$ M SCH-23390 (Sigma), 1  $\mu$ M raclopride (Sigma), 200  $\mu$ M ascorbate (Aldrich), or 20  $\mu$ M SP-600125 (Calbiochem) was added 30 min before and during DA treatment. For immunofluorescence, cells were incubated with monoclonal anti-microtubule-associated protein 2 (anti-MAP2) at 1:100 [kindly provided by B. Riederer (Institut d'Anatomie, Lausanne, Switzerland)] and polyclonal anti-phospho Ser-73 c-Jun at 1:500 (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) and then with the appropriate secondary

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: HD, Huntington's disease; Htt, huntingtin; expHtt, expanded Htt; DA, dopamine; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAP2, microtubule-associated protein 2; p-c-Jun, phosphorylated c-Jun; ROS, reactive oxygen species.

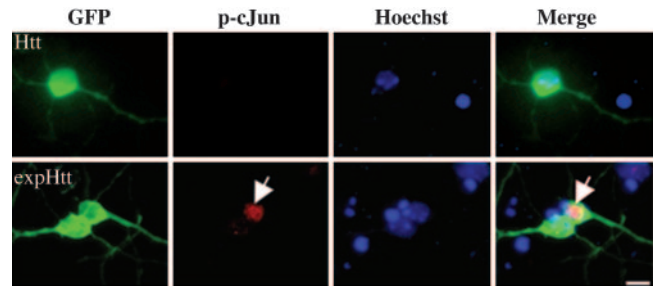
†To whom correspondence should be addressed. E-mail: jocelyne.caboche@snv.jussieu.fr.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA



**Fig. 1.** DA activates the JNK/c-Jun pathway in striatal neurons. (A and B) Activation of JNK (A) and c-Jun (B) by 100  $\mu$ M DA was detected by using antibodies selective for activated phosphorylated JNK (P-JNK) and P-c-Jun, respectively. (Scale bar, 10  $\mu$ m.) (A) Note the nuclear translocation of P-JNK upon DA treatment (arrow). (C and D) The kinetics of c-Jun activation (C) and striatal death determined by a fragmented nucleus (D) induced by different doses of DA in striatal neurons. The percentages were calculated with an image analysis software (IMAGE PRO PLUS). Data are representative of three independent experiments for each dose (50, 100, or 500  $\mu$ M) and time point (from 2 to 24 h) of DA exposure.

antibody: (Cy3)-conjugated anti-rabbit IgG at 1:2,000 (Amersham Pharmacia) or (Cy3)-conjugated anti-mouse IgG at 1:2,000 (The Jackson Laboratory). For double labeling, anti-p-c-Jun and anti-MAP2 antibodies were revealed with a (Cy3)-conjugated anti-rabbit IgG and a biotinylated horse anti-mouse IgG at 1:100 (Vector Laboratories), respectively. Cells were observed under a Leica DM LB fluorescence microscope. Neurons containing condensed or fragmented nuclei (DNA labeling with Hoechst) were scored as dying cells. For each condition, a minimum of 600



**Fig. 2.** ExpHtt activates the proapoptotic c-Jun transcription factor. GFP-Htt (Htt) or GFP-expHtt (expHtt) were transiently transfected into striatal neurons and visualized by GFP expression. Activation of c-Jun was detected by using an anti-phospho-c-Jun (p-c-Jun) antibody (red labeling) in the nucleus (Hoechst, blue staining) of striatal neurons transfected with expHtt (arrow).

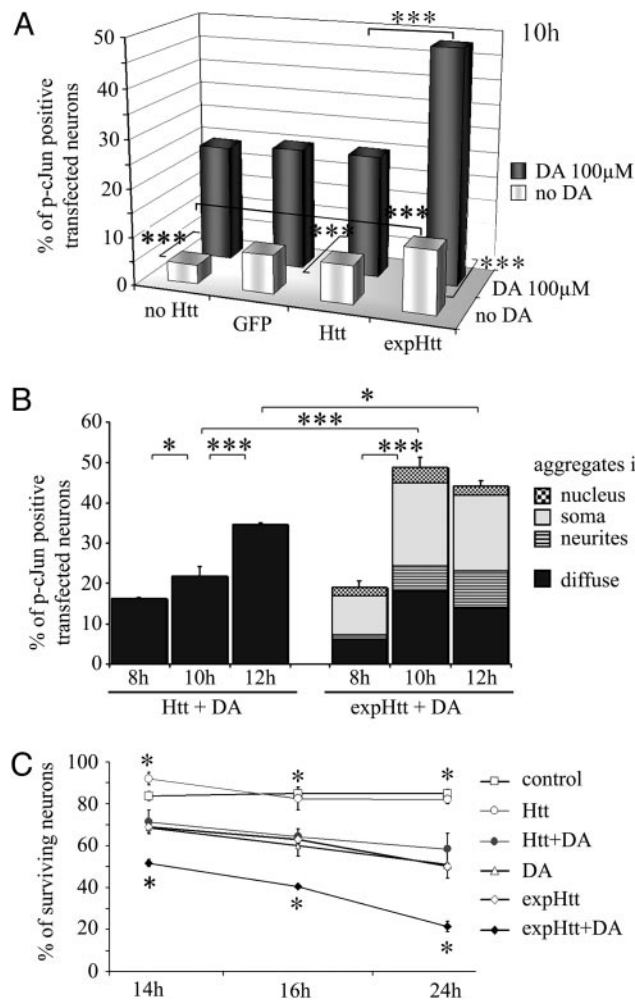
transfected neurons were counted from three independent experiments. Phosphorylated c-Jun (P-c-Jun) immunoreactivity was quantified with the image analysis software IMAGE PRO PLUS 4.5.0.19 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Results were compared by using ANOVA between subjects, and post hoc comparisons were made by using the indicated test (see Figs. 3–5). Detailed procedures and reagents are described in *Supporting Methods*, which is published as supporting information on the PNAS web site.

## Results

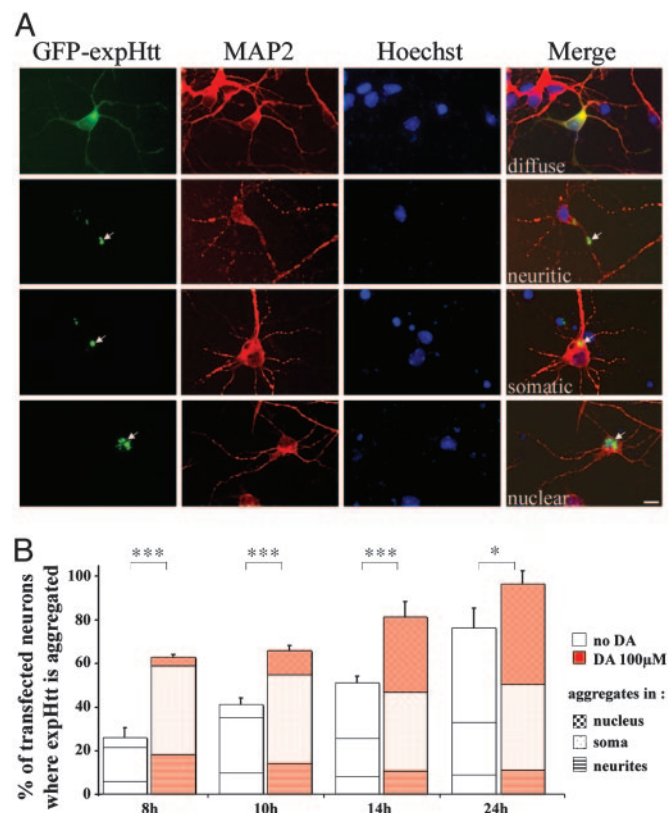
### DA Activates the JNK/c-Jun Pathway in Striatal Neurons in a Time- and Dose-Dependent Manner.

High doses of DA are known to induce striatal death *in vitro* and *in vivo* (11). To investigate the presence of a possible synergism between DA and expHtt fragments, we first analyzed the kinetics and dose–response effects of DA on cultures of primary striatal neurons. Two parameters were taken into account: activation of the proapoptotic JNK/c-Jun pathway (13) and neuronal death. In our conditions, primary striatal cultures were completely devoid of DAergic neurons as proved by the total lack of tyrosine hydroxylase expression (Fig. 6A, which is published as supporting information on the PNAS web site). Activation of JNK and c-Jun was analyzed by immunocytochemistry using antibodies that specifically recognize their active, phosphorylated form (14). Fig. 1 A and B illustrate phosphorylated JNK and P-c-Jun immunoreactivities after 8 and 10 h of 100  $\mu$ M DA treatment, respectively. Increasing concentrations of DA (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, and 500  $\mu$ M) were applied on striatal cultures. c-Jun phosphorylation occurred in a time- and concentration-dependent manner (Fig. 1C). At 500  $\mu$ M DA, c-Jun phosphorylation was very rapid and high (>50% of c-Jun-positive striatal neurons at 8 h) and unobservable later on because of significant striatal death (see Fig. 1D). In response to 100  $\mu$ M DA, c-Jun activation occurred more slowly and transiently, reaching a maximum (up to 7-fold when compared with controls) at 12 h and returning to control values by 16 h (Fig. 1C). c-Jun activation occurred subsequently to nuclear translocation of activated JNK (Fig. 1A). No significant activation of c-Jun was found with 50  $\mu$ M DA (Fig. 1C).

The kinetics of striatal death by DA was determined by evaluating nuclear integrity (as determined by Hoechst staining). Whereas DA applied at 500  $\mu$ M induced a strong and rapid striatal death, this effect was more progressive and modest when cells were challenged with 100  $\mu$ M DA, with 60% of living striatal neurons at 16 h (Fig. 1D). Based on these data, 100  $\mu$ M DA (i.e., the lowest DA concentration allowing detection of c-Jun activation) was used in further experiments at time points when little or no effects could be detected on striatal neuron death (from 8 to 12 h).



**DA Potentiates c-Jun Activation and Striatal Death Induced by Expanded Htt.** Next, we analyzed the combined effect of DA and expHtt on c-Jun activation in striatal neurons. c-Jun activation was analyzed as described above, in striatal neurons expressing either normal Htt or the mutated form, expHtt (Fig. 2). As described in ref. 12, expHtt but not Htt activated c-Jun in striatal neurons, but this activation remained an early (8 h after transfection) and modest (15% of expHtt-transfected neurons) event (Fig. 6B). When DA (100  $\mu\text{M}$ ) was combined with the transient expression of Htt, c-Jun activation was increased to similar proportions than DA alone or DA applied on GFP-transfected neurons (Fig. 3A). However, at this dose, DA produced a clear

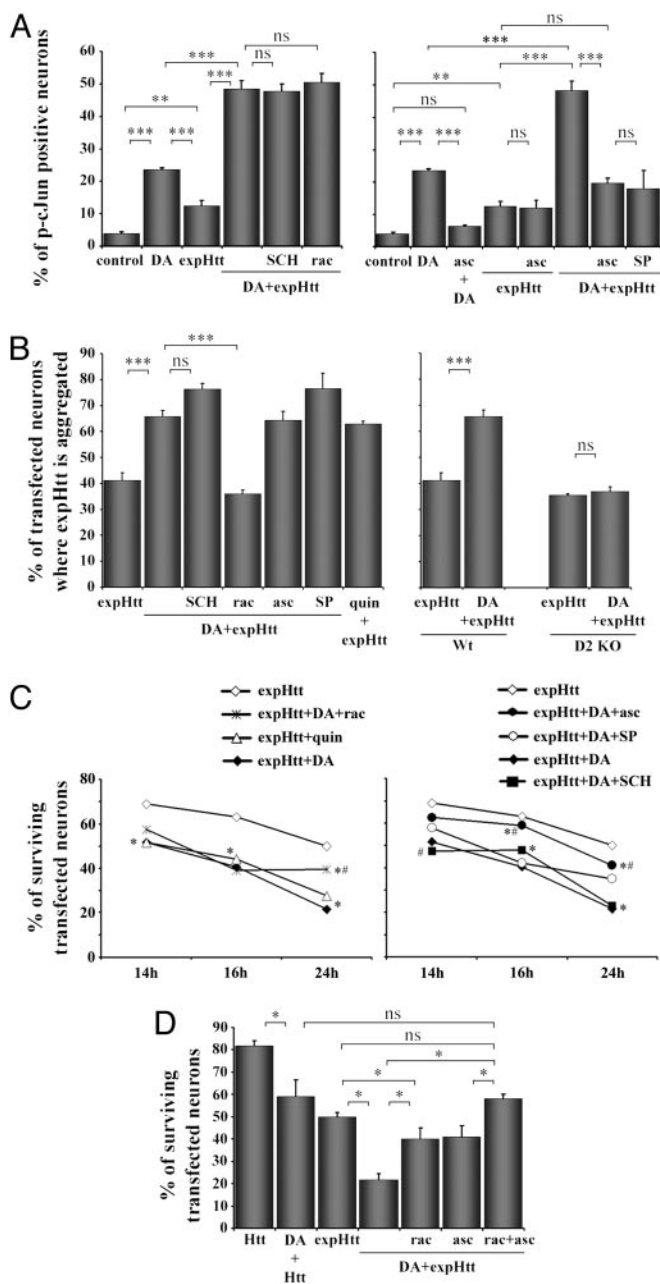


synergistic effect on c-Jun phosphorylation in expHtt-expressing neurons, with 50% of expHtt expressing striatal neurons instead of 25% and 13% for DA or expHtt alone, respectively (Fig. 3A). c-Jun potentiation by DA occurred at 10 h (Fig. 3B), i.e., after expHtt induced effects (see Fig. 6B).

Consistent with its potentiating role on c-Jun activation, DA also aggravated expHtt-induced striatal death (at 24 h, 20% of surviving neurons when compared with 50% in the absence of DA) (Fig. 3C), whereas DA application on Htt-expressing neurons induced striatal death to the same level as DA alone (Fig. 3C).

**DA Increases expHtt-Induced Aggregate Formation.** The presence of a GFP tag at the C-terminal region of expHtt allowed us to follow its subcellular localization and aggregate formation. Various patterns of expHtt localization were found at the different time points after transfection. This finding is well illustrated in Fig. 4A, where the triple labeling with Hoechst, the MAP2 (a neuritic marker) immunostaining, and the GFP fusion to expHtt identify distinct labeling patterns (shown here at 10 h after transfection): a diffuse GFP labeling or labeling in neuritic, somatic, or nuclear aggregates.





**Fig. 5.** DA potentiates c-Jun activation, aggregate formation, and neuronal death induced by expHtt effects via distinct pathways. (A) Pharmacological characterization of DA effects on c-Jun activation by expHtt. P-c-Jun immunoreactive neurons were quantified at 10 h in control, DA-treated (100  $\mu$ M) (DA), or expHtt-transfected neurons. (Left) DA was applied in expHtt-transfected neurons (DA+expHtt) alone or in the presence of a selective D1 (10  $\mu$ M SCH23390; SCH) or D2 (1  $\mu$ M raclopride; rac) antagonist. (Right) The ROS scavenger (200  $\mu$ M ascorbate; asc) and the selective JNK inhibitor (20  $\mu$ M SP-600125; SP) were applied in expHtt-transfected neurons alone (expHtt) or in the presence of DA (DA+expHtt). (B) Pharmacological characterization of DA effects on expHtt aggregate formation. (Left) The experimental procedures for the pharmacological studies were the same as in A. The D2 agonist quinpirole (quin) was applied at 10  $\mu$ M. (Right) Effect of DA on expHtt aggregate formation in striatal neurons from wild-type (Wt) or D2 receptor knockout (D2 KO) mice. (A and B) Quantifications were performed as indicated in Fig. 3. Statistical analyses: \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; ns, nonsignificant (Bonferroni/Dunnett's analysis). (C) Role of DA on survival of expHtt-expressing striatal neurons. The pharmacological treatments are the same as in A and B. ExpHtt-transfected neurons were analyzed for their nuclear integrity by Hoechst staining at 14, 16, and 24 h. \*,  $P < 0.05$  when compared with expHtt; #,  $P < 0.05$  when compared with expHtt plus DA. (D) A cotreat-

Few cells showed expHtt aggregates at 8 h (25%) (Fig. 4B). Later on, aggregates progressively increased reaching  $\approx 80\%$  of expHtt-expressing neurons at 24 h, a time when the majority of aggregates were nuclear. Surprisingly, a strong and early potentiation of expHtt aggregates was found in the presence of DA. At 8 h, DA induced expHtt aggregate formation in 65% of striatal neurons (when compared with 25% without DA; see Fig. 4B). This effect was persistent, given that at 24 h 97% of expHtt-expressing neurons showed aggregates in the presence of DA, compared with 77% without DA.

**DA Plays a Dual Role on expHtt-Induced Phenotype in Striatal Neurons.** Our results clearly show a potentiating role of DA on three important aspects of expHtt-induced phenotype in striatal neurons: c-Jun activation, aggregate formation, and striatal death. DA can act on striatal neurons through two distinct receptors, the D1 and D2 receptors, which can be distinguished on the basis of intracellular signaling (i.e., stimulation and inhibition of adenylate cyclase activity, respectively). DA effects on the expHtt-induced phenotype might also reflect its neurotoxicity by oxidative metabolism, because DA can oxidize spontaneously *in vitro* or through an enzyme-catalyzed reaction *in vivo* to form reactive oxygen species (ROS) (15). We therefore investigated the respective role of D1/D2 receptor stimulation and ROS production on expHtt-induced phenotype. Treatments with dopaminergic antagonists (D1 or D2) or inhibitors (ROS scavenger or JNK inhibitor) were combined with DA.

Although neither D1- nor D2-selective antagonists (SCH-23390 and raclopride, respectively) had any effect on DA potentiation of c-Jun activation by expHtt (Fig. 5A Left), ascorbate (ROS scavenger) totally blocked this effect (Fig. 5A Right). Ascorbate also inhibited c-Jun activation induced by DA alone but had no effect on c-Jun activation induced by expHtt alone, indicating that expHtt induces c-Jun activation independently of ROS production. Similarly to ascorbate, SP-600125, a selective JNK inhibitor, blocked the synergistic effect of DA and expHtt on c-Jun activation. Thus, altogether these results strongly support that the synergistic effect of DA and expHtt on c-Jun activation is mediated by JNK activation via ROS production.

Next, we analyzed how DA potentiates expHtt aggregate formation. Although we found no effect of the D1 antagonist or the ROS or JNK inhibitors (Fig. 5B), DA effects on aggregate formation were totally blocked by a selective D2 antagonist and mimicked by a D2 agonist (Fig. 5B Left). Importantly, primary striatal neurons from D2 knockout mice (16) showed no DA potentiation of expHtt aggregate formation (Fig. 5B Right). Thus, these data provide evidence that D2 receptors stimulation can induce expHtt aggregate formation in striatal neurons.

Finally, we examined the respective influence of D1/D2 receptor stimulation and ROS production or JNK activation on DA aggravation of expHtt-induced neuronal death (Fig. 5C and D). This influence was examined at different time points after DA treatment. The greatest effects were visible at 24 h when DA strongly reduced survival in expHtt-expressing striatal neurons (20% versus 50% of surviving neurons when comparing expHtt plus DA with expHtt alone). Whereas the D2 antagonist, raclopride, significantly reversed DA effects on expHtt-induced neuronal death, the D2 agonist, quinpirole, reproduced these effects (Fig. 5C Left). It is important to note that quinpirole alone had no effect on striatal survival (93% of surviving neurons after 24h treatment. Data not shown). The D1 antagonist was devoid of effect on DA-mediated expHtt-induced

ment with ROS scavenger (200  $\mu$ M ascorbate) and D2 antagonist (1  $\mu$ M raclopride) is more protective for expHtt-expressing neurons exposed to 100  $\mu$ M DA (at 24 h) than each simple treatment with ascorbate or raclopride. (\*,  $P < 0.05$ ; ns, nonsignificant; Fisher's test post ANOVA.)

neuronal death, but the ROS scavenger (ascorbate) and the JNK inhibitor (SP-600125) significantly reversed DA potentiation of expHtt-induced neuronal death (40% versus 20% of surviving neurons) (Fig. 5C *Right*). We note that ascorbate had no effect on striatal death induced by expHtt alone (data not shown), a data consistent with its lack of effect on expHtt-induced c-Jun activation (see Fig. 5A). Importantly, a cotreatment with the ROS scavenger and D2 antagonist totally protected neurons against the combined toxicity of DA and expHtt (Fig. 5D).

## Discussion

Our data show that DA aggravates expHtt toxicity in striatal neurons not only through the production of ROS, which activate the proapoptotic JNK/c-Jun pathway, but also by D2 receptor stimulation, which increases aggregate formation.

Activation of the proapoptotic JNK/c-Jun pathway contribute to the neuronal atrophy and death that can be observed in neurodegenerative diseases, including Alzheimer's and Parkinson's disease, and in pathological conditions, such as stroke (17). In *in vitro* models of HD, such as expHtt overexpression in hippocampal cell lines or primary striatal neurons in culture, expHtt can activate the JNK/c-Jun pathway independently of ROS production (12, 18–20). Here we provide evidence that DA is implicated in a synergistic manner with expHtt to activate c-Jun in striatal neurons. DA can autooxidize and form ROS that were shown in other systems to be important for cell death (21). DA-induced ROS production is known to activate the JNK/c-Jun pathway, and blocking this pathway enables the reversal of DA-induced cell death (15). Our data showing a synergistic effect of DA and expHtt on c-Jun activation are of critical relevance for HD and striatal vulnerability. Thus, the increased autooxidation of DA that occurs in the striatum during aging (22) could potentiate a low level of JNK/c-Jun activation that is due to expHtt expression (12, 17, 19). This process could account for a selective vulnerability of striatal neurons toward this proapoptotic signaling pathway. Autooxidation of DA during aging could also explain why the onset of symptoms and degeneration is delayed to adulthood, despite the constitutive expression of expHtt mutation since birth.

DA treatment also accelerated the kinetics of expHtt aggregate formation through D2 receptors, which demonstrates that an extracellular stimulation can influence expHtt aggregate formation. In presymptomatic HD patients, the first brain areas in which neuropil aggregates appear are the globus pallidus and the substantia nigra (23), two brain regions where D2 receptors are concentrated (24, 25). D2 receptors are also strongly expressed by medium spiny neurons, and more particularly by GABAergic/enkephalinergic neurons (26), which represent the first striatal population affected in HD (27, 28). Thus, our data help to reconcile these neuroanatomical observations and strongly argue for a role of D2 receptor stimulation in aggregate formation as an early event in HD.

There is still a strong debate about the role of aggregates in neurotoxicity. Aggregates of expHtt are observed in HD post-mortem patients' brains as well as in different animal models of

HD (6, 29–32), in which they typically precede an onset of symptoms (23, 33). These aggregates are associated with axonal degeneration as an early pathological event in mice with HD (23), and within the nucleus they are thought to inhibit transcriptional events that are important for the expression of antiapoptotic genes (34, 35). More recently, aggregates of expHtt were proposed to interfere with the proteasome function (36), which is important for the clearance of toxic proteins. Arrasate *et al.* (37) also provided convincing data about the neuroprotective role of aggregates, at least in early stages, because striatal neurons that contained aggregates had a decreased cumulative risk of death when compared with diffused expHtt. Whether D2-mediated aggregates are a cause or a consequence of expHtt toxicity remains to be established. However, we propose that the increased formation of aggregates in response to D2 receptors is a signature of the greater sensitivity of this striatal subpopulation to expHtt.

DA increased expHtt-induced striatal death, a finding strongly arguing for a pathogenic role of DA in the selective vulnerability of striatal neurons in HD. This role was already suggested from pharmacological models of HD in which removal of the nigrostriatal dopaminergic input protected the striatum from neurodegeneration induced by these toxins (38, 39). Furthermore, subtoxic doses of 3-NP produce striatal neurodegeneration when combined with a subtoxic dose of methamphetamine (40). In DA transporter knockout mice, spontaneous striatal death accompanied by behavioral alterations that resemble HD are observed during aging specifically (41). No direct link between DA toxicity and HD mutation has been shown from *in vivo* genetic mice models of HD. However, *in vitro*, striatal neurons derived from the R6/2 mice are more susceptible than wild-type cells to high and neurotoxic concentrations (1 mM) of DA (42). In our model system, we have been able to unravel two fundamental events involved in the death pathway produced by lower doses of DA (100  $\mu$ M). The first pathway is c-Jun activation by ROS, and the second is D2 receptor stimulation, which in turn increases aggregate formation. Noteworthy, these two DA-mediated events occurred early in the pathogenic process induced by expHtt. Thus, blocking at presymptomatic stages of the disease, JNK activation, and D2 receptor-mediated signaling might represent promising strategies for HD therapy. These strategies are important considering that, so far, there are no available therapies aimed at slowing down disease progression, and, consequently, HD progresses inexorably to death. Although most of the patients are treated by neuroleptics that share D2 receptor antagonist properties, there is no clear correlation between neuroleptic treatments and rate of illness progression (43, 44). Furthermore, patients who receive neuroleptics may experience numerous side effects, including extrapyramidal syndrome. Elucidating the nature of elements participating in the signaling pathways involved in neurodegeneration downstream of the D2 receptor might lead to the development of novel therapeutical targets. It may help to design better tolerated drugs that could be given to presymptomatic patients as a therapeutic option aimed at forestalling the onset of the disease.

1. Krawczak, M., Bockel, B., Sandkuijl, L., Thies, U., Fenton, I. & Harper, P. S. (1991) *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 735–745.
2. The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) *Cell* **72**, 971–983.
3. Dragatsis, I., Levine, M. S. & Zeitlin, S. (2000) *Nat. Genet.* **26**, 300–306.
4. Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S. W. & Bates, G. P. (1996) *Cell* **87**, 493–506.
5. Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L. & Bates, G. P. (1997) *Cell* **90**, 537–548.
6. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. & Aronin, N. (1997) *Science* **277**, 1990–1993.

7. Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. (2000) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **924**, 62–67.
8. Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D. & Richardson, E. P., Jr. (1985) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 559–577.
9. Aylward, E. H., Codori, A. M., Rosenblatt, A., Sherr, M., Brandt, J., Stine, O. C., Barta, P. E., Pearlson, G. D. & Ross, C. A. (2000) *Movement Disord.* **15**, 552–560.
10. Cass, W. A. (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 105–113.
11. Jakel, R. J. & Maragos, W. F. (2000) *Trends Neurosci.* **23**, 239–245.
12. Garcia, M., Charvin, D. & Caboche, J. (2004) *Neuroscience* **127**, 859–870.
13. Wang, L. H., Besirli, C. G. & Johnson, E. M., Jr. (2004) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 451–474.
14. Willaime-Morawek, S., Brami-Cherrier, K., Mariani, J., Caboche, J. & Brugg, B. (2003) *Neuroscience* **119**, 387–397.

15. Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R. & Roth, G. S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 3756–3764.
16. Baik, J. H., Picetti, R., Saiardi, A., Thiriet, G., Dierich, A., Depaulis, A., Le Meur, M. & Borrelli, E. (1995) *Nature* **377**, 424–428.
17. Bozyczko-Coyne, D., Saporito, M. S. & Hudkins, R. L. (2002) *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **1**, 31–49.
18. Liu, Y. F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 28873–28877.
19. Liu, Y. F., Dorow, D. & Marshall, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 19035–19040.
20. Merienne, K., Helmlinger, D., Perkin, G. R., Devys, D. & Trottier, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16957–16967.
21. McLaughlin, B. A., Nelson, D., Erecinska, M. & Chesselet, M. F. (1998) *J. Neurochem.* **70**, 2406–2415.
22. Fornstedt, B., Pileblad, E. & Carlsson, A. (1990) *J. Neurochem.* **55**, 655–659.
23. Li, H., Li, S. H., Yu, Z. X., Shelbourne, P. & Li, X. J. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 8473–8481.
24. Floran, B., Floran, L., Sierra, A. & Aceves, J. (1997) *Neurosci. Lett.* **237**, 1–4.
25. Cooper, A. J. & Stanford, I. M. (2001) *Neuropharmacology* **41**, 62–71.
26. Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. & Caron, M. G. (1998) *Physiol. Rev.* **78**, 189–225.
27. Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D’Amato, C. J., Penney, J. B. & Young, A. B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5733–5737.
28. Yohrling, G. J., IV, Jiang, G. C., DeJohn, M. M., Miller, D. W., Young, A. B., Vrana, K. E. & Cha, J. H. (2003) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **119**, 28–36.
29. Gutekunst, C. A., Li, S. H., Yi, H., Mulroy, J. S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R. J., Hersch, S. M. & Li, X. J. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 2522–2534.
30. Menalled, L. B. & Chesselet, M. F. (2002) *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 32–39.
31. Menalled, L. B., Sison, J. D., Wu, Y., Olivieri, M., Li, X. J., Li, H., Zeitlin, S. & Chesselet, M. F. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 8266–8276.
32. Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S. & Chesselet, M. F. (2003) *J. Comp. Neurol.* **465**, 11–26.
33. Bates, G. P., Mangiarini, L. & Davies, S. W. (1998) *Brain Pathol.* **8**, 699–714.
34. Nucifora, F. C., Jr., Sasaki, M., Peters, M. F., Huang, H., Cooper, J. K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V. L., et al. (2001) *Science* **291**, 2423–2428.
35. Jiang, H., Nucifora, F. C., Jr., Ross, C. A. & DeFranco, D. B. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1–12.
36. Holmberg, C. I., Staniszewski, K. E., Mensah, K. N., Matouschek, A. & Morimoto, R. I. (2004) *EMBO J.* **23**, 4307–4318.
37. Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R. & Finkbeiner, S. (2004) *Nature* **431**, 805–810.
38. Reynolds, D. S., Carter, R. J. & Morton, A. J. (1998) *J. Neurosci.* **18**, 10116–10127.
39. Maragos, W. F., Jakel, R. J., Pang, Z. & Geddes, J. W. (1998) *Exp. Neurol.* **154**, 637–644.
40. Bowyer, J. F., Clausing, P., Schmued, L., Davies, D. L., Binienda, Z., Newport, G. D., Scallet, A. C. & Slikker, W., Jr. (1996) *Brain Res.* **712**, 221–229.
41. Cyr, M., Beaulieu, J. M., Laakso, A., Sotnikova, T. D., Yao, W. D., Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11035–11040.
42. Petersen, A., Larsen, K. E., Behr, G. G., Romero, N., Przedborski, S., Brundin, P. & Sulzer, D. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1243–1254.
43. Myers, R. H., Sax, D. S., Koroshetz, W. J., Mastromauro, C., Cupples, L. A., Kiely, D. K., Pettengill, F. K. & Bird, E. D. (1991) *Arch. Neurol. (Chicago)* **48**, 800–804.
44. Feigin, A., Kieburz, K., Bordwell, K., Como, P., Steinberg, K., Sotack, J., Zimmerman, C., Hickey, C., Orme, C. & Shoulson, I. (1995) *Movement Disord.* **10**, 211–214.

## 2.2. Apport de l'étude

Cette étude démontre pour la première fois que la dopamine aggrave la toxicité de la huntingtine mutée dans les neurones striataux par deux mécanismes moléculaires. Le premier mécanisme concerne la production de radicaux libres, qui agissent en synergie avec la huntingtine mutée pour activer la voie JNK/c-Jun. Le deuxième mécanisme, plus inattendu, repose sur l'activation des récepteurs D2, qui a pour conséquence l'augmentation de la toxicité de la huntingtine mutée mais également de la formation d'agrégats.

### *2.2.1. Adaptation de notre modèle cellulaire permettant l'analyse de l'influence de la dopamine sur les effets de la huntingtine mutée dans les neurones striataux*

Notre modèle de cultures primaires de neurones striataux exprimant transitoirement l'exon 1 de la huntingtine normale ou mutée avait été décrit dans notre étude précédente (Garcia *et al.*, 2004). Nous avons ici précisé les cinétiques de formation d'agrégats, de translocation de la huntingtine, et de l'activation du module JNK/c-Jun à des temps précoces (de 8h à 12h après transfection) car l'étude précédente supposait que les mécanismes susceptibles de mener à la dysfonction et à la mort neuronales pouvaient être mis en place de manière précoce.

Nous avons également étudié l'effet de différentes doses et cinétiques de dopamine sur les neurones striataux non transfectés. Nous avons ainsi pu déterminer les paramètres d'un traitement subléthal à la dopamine permettant d'activer la voie JNK.

### *2.2.2. Analyse de l'effet de la dopamine sur des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée*

Après avoir adapté notre modèle cellulaire, nous l'avons utilisé pour explorer le rôle que pouvait jouer la dopamine sur la toxicité de la huntingtine mutée dans les neurones striataux. Nous avons pour objectif d'analyser deux paramètres : l'activation de la voie pro-apoptotique JNK/c-Jun et la mort neuronale induites par la huntingtine mutée. Un troisième paramètre s'est révélé intéressant au cours de l'étude : il s'agit de la formation d'agrégats par la huntingtine mutée.

La dopamine et la huntingtine mutée agissent de façon synergique pour activer la voie JNK/c-Jun dans les neurones striataux

La voie JNK est importante dans la mise en place d'un programme pro-apoptotique. Son implication dans la mort neuronale a été montrée dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives, telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Manning and Da-

vis, 2003). Notre équipe a précédemment démontré que la voie JNK était activée spécifiquement dans le striatum, dans un modèle pharmacologique de MH, le modèle 3-NP. Ces résultats suggéraient que la voie JNK et sa cible nucléaire le facteur de transcription c-Jun pouvaient être impliqués dans la mort des neurones striataux dans ce modèle de MH (Garcia *et al.*, 2002). *In vitro*, sur les cultures primaires de neurones striataux, la huntingtine mutée est également capable d'activer le module JNK/c-Jun dans une population relativement faible de neurones, qui ne peut pas à elle seule expliquer la neurodégénérescence striatale dans la MH (Garcia *et al.*, 2004).

Nous montrons dans l'étude actuelle que la dopamine, en produisant des radicaux libres, exerce un effet synergique avec la huntingtine mutée sur l'activation de la voie JNK/c-Jun dans les neurones striataux. Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine, qui augmente fortement dans le striatum au cours du vieillissement (Fornstedt *et al.*, 1990), pourrait entraîner une activation importante de la voie JNK dans les neurones striataux, et contribuer ainsi à leur vulnérabilité spécifique dans la MH. Ceci pourrait en outre expliquer l'apparition tardive des symptômes malgré l'expression de la huntingtine mutée depuis le développement embryonnaire.

#### La dopamine augmente la formation d'agrégats de huntingtine mutée

Nous avons observé qu'en présence de dopamine, le nombre de neurones transfectés présentant la huntingtine mutée sous forme d'agrégats est fortement augmenté. Cet effet est médié par l'activation des récepteurs dopaminergiques de type D2. Si le rôle des agrégats dans la pathogenèse est encore très controversé, ils sont en tous cas le témoignage d'une souffrance cellulaire. Leur formation sous activation des récepteurs D2 témoigne donc d'une souffrance accrue des neurones porteurs de ce type de récepteurs, qui sont précisément, au sein du striatum, ceux qui dégèrent les premiers dans la MH. De plus, les régions cérébrales dans lesquelles ces neurones projettent leurs axones –en particulier le globus pallidus externe– sont précisément celles dans lesquelles les agrégats neuritiques apparaissent en premier (Li *et al.*, 2001). Nos résultats permettent de concilier ces observations neuro-anatomiques et argumentent fortement en faveur du rôle de l'activation des récepteurs D2 dans la formation d'agrégats en tant qu'étape précoce de la pathologie. Il s'agit de la première démonstration de l'influence d'une stimulation extracellulaire sur la formation d'agrégats.

La dopamine potentialise la toxicité de la huntingtine mutée dans les neurones striataux

Dans notre modèle cellulaire, la dopamine augmente la toxicité de la huntingtine mutée dans les neurones striataux, via deux effets. Le premier repose sur la formation de radicaux libres et l'activation de la voie pro-apoptotique JNK/c-Jun. Le deuxième implique l'activation des récepteurs D2.

### 2.3. Conclusion & perspectives

Cette étude analyse pour la première fois les mécanismes moléculaires par lesquels la dopamine pourrait révéler la toxicité de la huntingtine mutée dans les neurones striataux. Il en résulte la découverte de l'implication de la dopamine dans la mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée à travers deux processus. D'une part, la dopamine produit des radicaux libres qui agissent en synergie avec la huntingtine mutée pour activer la voie pro-apoptotique de JNK/c-Jun. D'autre part, la dopamine augmente également la toxicité de la huntingtine mutée par le biais de l'activation des récepteurs D2. Cette dernière activation a également pour conséquence d'augmenter la formation d'agrégats de huntingtine mutée, ce qui témoigne d'une souffrance cellulaire. Ces deux voies d'action de la dopamine sont impliquées précocement dans le mécanisme pathophysiologique de la huntingtine mutée (Figure 46).

Le blocage de l'une ou l'autre de ces voies démontre un fort pouvoir neuroprotecteur contre la toxicité de la huntingtine mutée, l'effet maximal étant obtenu par un co-traitement avec un antioxydant et un antagoniste D2. Ces données suggèrent que l'oxydation de la dopamine, l'activation de JNK/c-Jun et l'activation des récepteurs D2 pourraient représenter des cibles thérapeutiques éventuelles pour la MH. Ces pistes d'investigation sont d'autant plus intéressantes qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant de ralentir la progression de la maladie, qui conduit inexorablement à la mort des patients.

Une étude menée en 2003 par l'équipe de Collins a montré l'effet bénéfique d'un traitement précoce avec un antioxydant sur les symptômes moteurs d'un modèle de souris transgéniques MH. En effet, les injections intra-péritonéales régulières d'ascorbate, à une dose suffisante pour élever la concentration extracellulaire d'ascorbate dans le striatum, améliore le comportement des souris R6/2 (qui expriment l'exon 1 du gène MH muté humain) et diminue leurs troubles moteurs associés à la MH (Rebec *et al.*, 2003).

Les effets de la dopamine médiés par l'activation des récepteurs D2 nous semblent particulièrement importants étant donnée leur implication éventuelle dans la mort précoce

des neurones striataux porteurs de récepteurs D2 dans la MH. Par conséquent, nous avons voulu évaluer l'effet thérapeutique d'un traitement précoce avec un antagoniste spécifique des récepteurs D2 dans un modèle *in vivo* de MH. Ce travail fait l'objet de la publication n° 3.

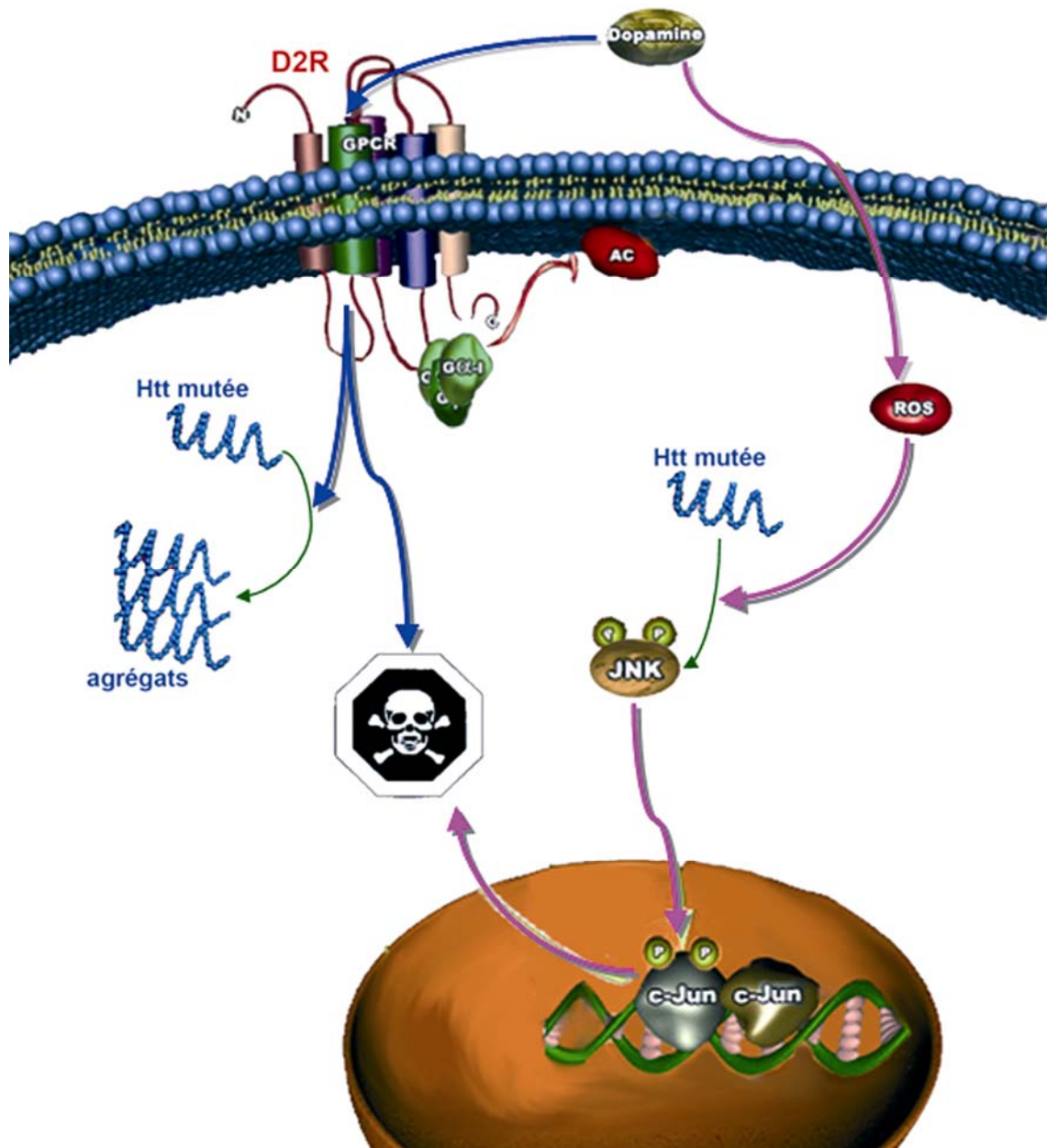


Figure 46 : Implication de la dopamine dans la mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée : double rôle des radicaux libres et de la stimulation des récepteurs D2. Notre étude *in vitro* démontre que la dopamine joue un double rôle dans la vulnérabilité des neurones striataux à la huntingtine mutée. D'une part, en stimulant les récepteurs D2, la dopamine augmente la formation d'agrégats de la huntingtine (Htt) mutée. D'autre part, en produisant des radicaux libres (ROS, Reactive Oxygen Species), la dopamine agit en synergie avec la huntingtine mutée pour activer la voie pro-apoptotique de JNK/c-Jun. Ces deux voies d'action de la dopamine augmentent la mort des neurones striataux.

### 3. Article 3 :

## An old drug indicates a new therapeutic opportunity in Huntington's disease

Charvin D., Perrin V., Roze E., Régulier E., Pagès C., Luthi-Carter R., Déglon N. and Caboche J. (article en soumission)

### 3.1. Présentation de l'étude et de ses objectifs

Les caractéristiques neuropathologiques de la maladie de Huntington (MH) reposent sur la présence d'agrégats de fragments N-terminaux de huntingtine mutée, la protéine à l'origine de la MH, et la dégénérescence sélective des neurones du striatum. Au sein du striatum, les neurones épineux GABAergiques de taille moyenne qui se projettent sur le globus pallidus externe (neurones striataux de la voie indirecte) sont les plus vulnérables et représentent la première population cellulaire à dégénérer dans la MH. Un système de gradation a été défini sur la base de la progression neuropathologique du striatum. Cinq grades ont ainsi été différenciés, du grade 0 (aucune anomalie neuropathologique discernable) au grade 4 (perte de 95% des neurones dans le noyau caudé). Ces grades dans la MH sont étroitement corrélés à l'évolution des symptômes cliniques, ce qui associe la MH à une maladie du striatum (Peschanski *et al.*, 1995). Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement permettant de ralentir la progression de la MH, qui conduit alors à la mort des patients après quinze à vingt ans d'évolution.

Nos précédents travaux, réalisés sur un modèle *in vitro* de cultures primaires de neurones striataux exprimant de façon transitoire un fragment N-terminal de la huntingtine mutée, ont démontré que l'activation des récepteurs dopaminergiques de type D2 augmente la toxicité de la huntingtine mutée et qu'il s'agit d'un événement précoce dans le processus pathogénique. L'activation de ces récepteurs augmente également la formation d'agrégats de huntingtine mutée, et ce, encore plus précocement que l'effet sur la mort des neurones striataux. Ces résultats sont intéressants puisque dans la pathologie humaine, ce sont les neurones striataux porteurs de récepteurs D2 (les neurones striataux de la voie indirecte) qui sont les plus vulnérables à l'expression de la huntingtine mutée. Ainsi, l'expression des récepteurs D2 pourrait représenter un facteur de vulnérabilité à la huntingtine mutée.



Actuellement, la plupart des patients atteints de MH reçoivent un traitement symptomatique à base de neuroleptiques qui ont des propriétés d'antagonistes plus ou moins spécifiques des récepteurs D2. Il n'existe pas de lien clairement établi entre l'administration de neuroleptiques et l'évolution de la pathologie, mais ces traitements ne commencent qu'après l'apparition des symptômes et donc une fois que la neurodégénérescence striatale a commencé. Nous avons alors souhaité vérifier l'implication des récepteurs D2 dans la dégénérescence des neurones striataux dans un modèle *in vivo* de MH, et évaluer l'effet thérapeutique d'un traitement avec un antagoniste très sélectif des récepteurs D2 débuté avant les premiers signes de dysfonction et de mort neuronales.

### Choix du modèle

Il existe plusieurs modèles animaux de MH, pharmacologiques ou génétiques, qui reproduisent chacun certaines caractéristiques de la pathophysiologie humaine (Bates and Hockly, 2003). Nous avons choisi pour notre étude un modèle qui reproduit la formation d'agrégats de huntingtine mutée, le dysfonctionnement puis la mort des neurones striataux. Il s'agit du modèle mis au point par l'équipe du Dr Déglon, avec laquelle nous avons entrepris une collaboration. Des rats de deux mois sont infectés simultanément avec des constructions lentivirales codant un fragment N-terminal de la huntingtine normale (19 glutamines) ou mutée (82 glutamines) dans le striatum droit et gauche respectivement. Dans ce modèle, des agrégats de huntingtine mutée sont détectés dès la première semaine après l'injection du lentivirus, puis s'accumulent progressivement pendant les quatre premières semaines. Une perte de marquage DARPP-32 est observée dès la quatrième semaine dans le striatum exprimant la huntingtine mutée, témoignant d'une dysfonction neuronale, et la neurodégénérescence est bien marquée la dixième semaine post-infection. Aucun changement n'est observé dans le striatum exprimant la forme normale de la huntingtine (de Almeida *et al.*, 2002).

### Choix du traitement

Afin d'étudier le rôle spécifique des récepteurs dopaminergiques de type D2 dans le modèle de MH précédemment décrit, nous avons choisi d'utiliser l'halopéridol, qui est un antagoniste très sélectif des récepteurs D2. Ce neuroleptique typique est très largement utilisé en thérapie chez l'homme, notamment dans le traitement de la schizophrénie. Nous avons utilisé l'halopéridol décanoate, qui est la forme retard du neuroleptique. Elle permet d'obtenir un taux d'occupation des récepteurs D2 relativement stable au cours du temps (Nyberg *et al.*, 1997) et d'éviter aux rats des injections quotidiennes d'halopéridol sous sa forme standard.

### Evaluation des effets du traitement

Nos résultats *in vitro* suggèrent une implication précoce des récepteurs D2 dans le processus pathogénique de la maladie. Nous avons donc décidé de commencer le traitement chez des rats ne présentant encore aucun signe neuropathologique, soit dès le lendemain de l'injection du lentivirus.

Un premier groupe de rats a été sacrifié à deux semaines post-infection pour évaluer l'effet du traitement sur la formation d'agrégats de huntingtine mutée. Un deuxième groupe de rats a ensuite été sacrifié à huit semaines post-infection pour évaluer l'effet du traitement sur la dysfonction neuronale observée dans ce modèle.

**AN OLD DRUG INDICATES A NEW THERAPEUTIC OPPORTUNITY IN  
HUNTINGTON'S DISEASE**

Delphine Charvin<sup>1</sup>, Valérie Perrin<sup>2</sup>, Emmanuel Roze<sup>1,3</sup>, Etienne Régulier<sup>2</sup>, Christiane Pagès<sup>1</sup>, Ruth Luthi-Carter<sup>2</sup>, Nicole Déglon<sup>4</sup> and Jocelyne Caboche<sup>1</sup>.

- 1- Signalisation Neuronale et Régulations Géniques, UMR 7102, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France.**
- 2- École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland.**
- 3- Department of Neurology, Saint-Antoine Hospital, AP-HP, Paris, France.**
- 4- Atomic Energy Commission (CEA), Department of Medical Research and ImaGene Program, Orsay, France**

Correspondence should be addressed to JC ([jocelyne.caboche@snv.jussieu.fr](mailto:jocelyne.caboche@snv.jussieu.fr))

## INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is a fatal neurodegenerative disorder characterized by chorea, dementia and psychiatric disturbances<sup>1</sup>. It is caused by a polyglutamine expansion in the *IT15* gene product huntingtin<sup>2</sup>. Hallmarks of this neuropathology are a progressive loss of striatal neurons and intraneuronal inclusion formation<sup>3,4</sup>. There is no therapy to HD. Most patients are treated with neuroleptics, that have D2 antagonist properties, but there is no obvious slow down disease progression by this treatment<sup>5-7</sup>, which is given in symptomatic patients when striatal degeneration is already in an advanced stage. Based on our recent observations that D2 dopamine receptor stimulation promotes both mutant huntingtin-induced inclusion formation and death of striatal neurons in culture<sup>8</sup>, we have hypothesized that treatment with D2 antagonist given at an early stage of disease might be neuroprotective. To test this hypothesis, we investigated the potential neuroprotective effect of the D2 antagonist haloperidol in a rat lentiviral model of HD<sup>9,10</sup>. We show that early treatment with the D2 antagonist haloperidol significantly reduces both aggregate formation and neuronal dysfunction in the HD rat striatum. Our results suggest that pharmacological blockade of D2 receptors early in the disease process may represent an interesting therapeutic approach to alter the subsequent course of neuropathology.

## RESULTS AND DISCUSSION

We previously showed that D2 receptor stimulation increases both aggregate formation and neuronal death in primary cultures of striatal neurons transiently expressing mutated huntingtin with expanded Polyglutamine tract (expHtt)<sup>8</sup>. In the present study, we make an important extension of this work to examine the effect of haloperidol administration *in vivo* in an intact animal model of HD. For this purpose we used a rat model of HD, whereby striatal infection with lentiviral vectors overexpressing the first 171 amino acid of huntingtin (htt) with 82 glutamines (LV-htt-171-82Q) produces a neuropathology faithful to the striatal lesion observed in HD patients<sup>9</sup>. Inclusions first appear one week after viral injection and striatal neuron dysfunction is observed from the fourth week after infection. Thus, we tested our neuroleptic treatment for HD for mitigation of these hallmark outcome measures. Overexpression of the normal form of the same 171 amino acid htt fragment (htt-171-19Q) is devoid of striatal toxicity, and this treatment serving as a control in the present study was injected in the left striatum and htt-171-82Q in the right. To evaluate the therapeutic effect of early D2 receptor blockade in HD, we administered a depot formulation of haloperidol, haloperidol decanoate, which allows a limited number of injections and a relatively stable D2 receptors occupancy over time<sup>11</sup>. Haloperidol decanoate (one intramuscular, i.m., injection, 30 mg/kg, every 3 weeks) or vehicle (sesame oil, same protocol and volume) were injected in LV-htt171-19/82Q rats at a pre-symptomatic stage starting one day after lentiviral injection.

The impact of haloperidol decanoate versus vehicle treatment was examined on inclusion formation and striatal dysfunction. The appearance of intraneuronal inclusions marks the onset of pathology in our model system<sup>9</sup>. Inclusions were detected by immunofluorescence with the EM48 antibody, which specifically recognizes the aggregated form of htt (**Fig.1a**). As expected, none of the striata infected with LV-htt171-19Q was stained with the EM48 antibody (not shown). In contrast, LV-mediated expression of the htt171-82Q protein induced

the formation of expHtt aggregates beginning two weeks after viral injection. Inclusions accumulated and their number was further increased eight weeks after infection (**Fig.1a, b**). For each expHtt-expressing animal, the total number of aggregates in the striatum was quantified. D2 receptor blockade by haloperidol significantly decreased expHtt aggregate formation in striatal neurons, as early as 2 weeks post LV-injection (**Fig.1a**), consistent with our previous results obtained *in vitro*<sup>8</sup>. Haloperidol decanoate treatment decreased the number of expHtt-containing aggregates at two weeks by 42% (vehicle- versus haloperidol decanoate-treated rats,  $P=0.05$ ). A decrease in expHtt aggregates (-28%) was also found eight weeks after LV-injection (vehicle- versus haloperidol decanoate-treated rats,  $P=0.001$ ) (**Fig.1b**). Thus, chronic blockade of D2 receptors by haloperidol decanoate maintained a decrease in aggregate formation over time. It was previously shown that, in htt171-82Q-infected rat striatum, most of the inclusions were present in the nuclei of striatal neurons, with some aggregates observed in neuritic compartments<sup>9</sup>. To distinguish these two types of inclusions at two weeks, a double staining of aggregates and nuclei was performed with EM48 and Hoechst, respectively. This double staining confirmed that aggregates can take the shape of a dense staining in large spherical nuclear inclusions, or of smaller-sized spheres dotting the extra-nuclear compartments (*i.e.* neurites and soma) (**Fig.1c**). Based on these characteristics, we quantified separately nuclear and extra-nuclear inclusions in LV-htt171-82Q expressing striata of rats treated with haloperidol decanoate (or vehicle). Interestingly, haloperidol decanoate treatment affected extra-nuclear inclusion formation preferentially, decreasing their number by 59% (extra-nuclear aggregates of vehicle-treated rats versus extra-nuclear aggregates of haloperidol decanoate-treated rats,  $P=0.018$ ), while it had no or little effect on nuclear inclusion formation (nuclear inclusions of vehicle-treated rats versus nuclear inclusions of haloperidol decanoate-treated rats,  $P=0.196$ ).

Next, we investigated the effect of haloperidol decanoate treatment on neuronal dysfunction, measured by the loss of DARPP-32 immunoreactivity at eight weeks. DARPP-32 is expressed in 96% of the striatal medium-sized spiny neurons and is down-regulated in HD transgenic mice and in LV-based HD rat models<sup>9,12</sup>. All striata overexpressing expHtt presented a clear loss of DARPP-32 immunoreactivity (**Fig. 2a, b**). In contrast, no loss of DARPP-32 staining was detected in striata overexpressing wild type htt (**Fig. 2a**, left panels). We measured the volume of the DARPP-32 depleted region in LV-htt171-82Q expressing striatum of rat either treated with haloperidol decanoate or vehicle. In control rats, chronic haloperidol treatment did not modify DARPP-32 immunostaining. Of interest, the striatal volume displaying loss of DARPP-32 immunoreactivity in rats infected with LV-htt171-82Q was significantly smaller in rats treated with haloperidol than in animals treated with vehicle (haloperidol,  $1.4 \pm 0.2 \text{ mm}^3$ ; Vehicle,  $2.0 \pm 0.2 \text{ mm}^3$ ;  $P < 0.05$ ) (**Fig.2c**). Thus, haloperidol decanoate treatment produced a 30% reduction in the striatal volume showing expHtt-induced dysfunction.

The present study demonstrates that haloperidol decanoate treatment exerts a parallel decrease in expHtt-containing inclusion formation and striatal degeneration as defined by DARPP-32-deficiency. Actually, at eight weeks, this treatment induced a 28% decrease in the number of expHtt aggregates and a 30% decrease in the volume of DARPP-32 depleted region. The causative role of aggregates in expHtt neurotoxicity has been challenged. In fact, some data suggest that inclusions may even be protective<sup>13</sup>. Alternatively, observations in HD patients and transgenic models support the view that levels of expHtt aggregates, if not causative, are somehow related to dysfunction and degeneration. For instance, aggregate formation precedes the onset of symptoms in HD patients and transgenic mouse models of the disease<sup>14,15</sup>. In HD patients, expHtt inclusions are found in affected areas of the brain, such as cortex and striatum, but not in unaffected areas, such as cerebellum, and they are found

almost exclusively in neurons, and not in unaffected glial cells<sup>16</sup>. It has also been shown in transgenic mouse models of HD that reduction in striatal atrophy and degeneration, amelioration of motor symptoms, as well as improvement of survival are often associated with reduction in htt inclusions. Thus, the presence of expHtt inclusions could be a direct or indirect marker of the pathogenic process of expHtt, even if they are not themselves the toxic species. In our study, a good correlation was observed between the volume of DARPP-32 depleted region and the number of expHtt aggregates (**Fig.3**). As stated above, haloperidol decanoate treatment preferentially decreased extra-nuclear aggregate formation, *i.e.* cytoplasmic neuritic and somatic inclusions. These cytoplasmic aggregates have been shown to disrupt neuritic trafficking<sup>17,18</sup>. Thus, haloperidol decanoate might protect neurons from toxicity of cytoplasmic inclusions by decreasing their number.

In conclusion, our *in vivo* study shows that early treatment with the D2 antagonist haloperidol beginning at an early stage significantly reduces both expHtt-induced aggregate formation and neuronal dysfunction in the rat striatum. Our results suggest that haloperidol treatment may delay onset of disease and/or slow down disease progression. Since there is currently no available neuroprotective therapy, D2 receptor antagonists, if given early, may represent an essential therapeutic option. Most of HD patients are given symptomatic treatments with neuroleptics that share D2 receptor antagonist properties, such as haloperidol. Patients receive this treatment after the onset of symptoms, while neuronal alterations are present before the appearance of clinical symptoms, as it was described by brain imaging studies of HD patients<sup>19-23</sup>. In this case, neuroleptic/D2 antagonists treatments may not be effective because the temporal opportunity for neuronal rescue has passed. Our study suggests that neuroleptic treatment given at pre-symptomatic stages in HD patient may be neuroprotective. Since patients who receive long term treatment with neuroleptics may experience numerous side effects, it is important to develop better tolerated therapeutic



strategies. One interesting approach would be to block intracellular pathways downstream D2 receptors.

## **METHODS**

### ***Animals***

Adult female Wistar rats weighing between 180~200 g were used. The animals were housed in a controlled temperature room that was maintained on a 12 hr light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. The experiments were performed out in accordance with the European Community Council directive 86/609/EEC for care and use of laboratory animals.

### ***Injection of the lentiviruses***

Concentrated viral stocks were thawed and resuspended by repeated pipetting. Htt171-19Q- and htt171-82Q-expressing lentiviral vectors<sup>9</sup> were stereotaxically injected in the right or the left striatum, respectively, of ketamine (75 mg/Kg, i.p.) and xylazine (10 mg/Kg, i.p.) anaesthetized animals using a 10 µL Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV). The animals received 800ng p24 (5 µl) of lentiviral vectors in each side at the following coordinates: 0.5 mm rostral to bregma, 3 mm lateral to midline, and 5 mm ventral from the skull surface. The viruses were injected at 0.2 µl/min by means of an automatic injector (Stoelting Co.). The needle was then left in place for an additional 5 min and gently withdrawn. The skin was closed using wound chips autoclips (Phymep, Paris, France).

### ***Treatment with haloperidol decanoate***

Haloperidol decanoate (GensiaSicor pharmaceuticals) (50 mg/ml; 30 mg/Kg) was injected intramuscularly every three weeks (first injection the day after viral infection) and equal volumes of the vehicle (sesame oil, Sigma France) were injected intramuscularly to sham rats. Haloperidol decanoate-treated rats were sacrificed two or eight weeks, respectively, after the beginning of the treatment (n=7 for each time point). Two groups of vehicle-treated rats were treated in parallel in the same conditions (n=7 for each time point).

### ***Histological processing***

***Tissue preparation.*** Two or eight weeks after lentiviral injection, the animals were anesthetized with a sodium pentobarbital overdose, transcardially perfused, post-fixed in 4% paraformaldehyde, 10% picric acid for 24 hr, and finally cryoprotected in 15% sucrose and 0.1 M phosphate buffer for 48 hr. The brains were frozen in isopentane at -25°C and 25 µm coronal sections were cut on a sliding microtome cryostat (Leitz/Wetslar; Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Slices throughout the entire striatum were collected and stored in 24-well trays as free-floating sections in TB containing 30% ethylene glycol, 30% glycerol. The trays were stored at -20°C until immunohistochemical processing.

***Primary antibodies.*** The following primary antibodies were used : the mouse anti-human huntingtin monoclonal EM48 antibody (MAB5374, Chemicon) and a mouse monoclonal antibody recognizing the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa (DARPP-32; a generous gift from Dr. P. Greengard, Rockefeller University, New York, NY).

***Immunohistochemical procedure.*** For light microscopy, sections were first incubated for 5 min in a PBS solution containing 10% methanol, 0.9% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, next in 0.2% Triton. Free-floating sections were then incubated at RT for 1 hr in 0.1 M PBS containing 10% NGS (Vector Laboratories), followed by a reaction with the DARPP-32 antibody (1:100,000, o/n, 4°C) diluted in a 5% NGS/PBS solution. Sections were incubated with an anti-mouse biotinylated secondary antibody (1:200, Vector Laboratories) diluted in 1% NGS/PBS for 2 hr at RT, and bound antibody was visualized by using the Vectastain ABC kit (PK-4000, Vector Laboratories), with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB metal concentrate;

Pierce) as substrate. The sections were mounted, dehydrated by passing twice through ethanol and xylene, and coverslipped with Eukit.

The nuclear localization of huntingtin was investigated on sections double-stained for htt (EM48 Ab) and Hoechst. Htt immunohistochemistry was done as previously described.

### ***Cell counting and evaluation of the volume of DARPP-32-depleted region***

The number of huntingtin aggregates was evaluated by counting EM48-positive objects, and the striatal dysfunction by measuring DARPP-32-depleted striatal volume. In both cases an image analysis software (Image Pro Plus 4.5.0.19, Media Cybernetics) was used. The aggregates were counted at a magnification of 10X on 25µm thick sections separated by 150 µm throughout the entire striatum. The total number of aggregates per brain was obtained by multiplying the counts by 6. The area of the striatum showing a loss of DARPP-32 staining was measured for each animal with an operator-independent process. The volume was then estimated with the following formula:  $\text{volume} = d(a_1 + a_2 + a_3 \dots)$ , where  $d$  is distance between serial sections (150 µm), and  $a_1, a_2, a_3 \dots$  are DARPP-32-depleted areas for individual serial sections. Determination of the areas showing depletion in DARPP-32 immunoreactivity was performed using a 1.6x objective.

### ***Data analyses***

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were evaluated by a Student  $t$  test. The significance level was set at  $P \leq 0.05$ .

## **AKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université Pierre et Marie Curie for JC, by CEA for ND and by Ecole Polytechnique Fédérale

de Lausanne (EPFL) for RL-C. Delphine Charvin was supported by fellowships of Ministère de la Recherche et de la Technologie and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Valérie Perrin was supported by a fellowship of Association Française contre les Myopathies (AFM). The authors thank Philippe Colin and Noelle Dufour for their excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Quinn, N. & Schrag, A. Huntington's disease and other choreas. *J Neurol* **245**, 709-16 (1998).
2. 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**, 971-83 (1993).
3. Reiner, A. et al. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5733-7 (1988).
4. DiFiglia, M. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-3 (1997).
5. Feigin, A. et al. Functional decline in Huntington's disease. *Mov Disord* **10**, 211-4 (1995).
6. Myers, R.H. et al. Factors associated with slow progression in Huntington's disease. *Arch Neurol* **48**, 800-4 (1991).
7. Bonelli, R.M., Wenning, G.K. & Kapfhammer, H.P. Huntington's disease: present treatments and future therapeutic modalities. *Int Clin Psychopharmacol* **19**, 51-62 (2004).
8. Charvin, D., Vanhoutte, P., Pages, C., Borelli, E. & Caboche, J. Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: The dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12218-12223 (2005).
9. de Almeida, L.P., Ross, C.A., Zala, D., Aebischer, P. & Deglon, N. Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* **22**, 3473-83 (2002).
10. Regulier, E., Trottier, Y., Perrin, V., Aebischer, P. & Deglon, N. Early and reversible neuropathology induced by tetracycline-regulated lentiviral overexpression of mutant huntingtin in rat striatum. *Hum Mol Genet* **12**, 2827-36 (2003).
11. Nyberg, S., Farde, L. & Halldin, C. Delayed normalization of central D2 dopamine receptor availability after discontinuation of haloperidol decanoate. Preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* **54**, 953-8 (1997).
12. Luthi-Carter, R. et al. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **9**, 1259-71 (2000).
13. Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R. & Finkbeiner, S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* **431**, 805-10 (2004).
14. Gutekunst, C.A. et al. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* **19**, 2522-34 (1999).
15. Davies, S.W. et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-48 (1997).
16. Hoffner, G., Island, M.L. & Djian, P. Purification of neuronal inclusions of patients with Huntington's disease reveals a broad range of N-terminal fragments of expanded huntingtin and insoluble polymers. *J Neurochem* (2005).
17. Lee, W.C., Yoshihara, M. & Littleton, J.T. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3224-9 (2004).
18. Trushina, E. et al. Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **24**, 8195-209 (2004).

19. Mazziotta, J.C. et al. Reduced cerebral glucose metabolism in asymptomatic subjects at risk for Huntington's disease. *N Engl J Med* **316**, 357-62 (1987).
20. Grafton, S.T. et al. A comparison of neurological, metabolic, structural, and genetic evaluations in persons at risk for Huntington's disease. *Ann Neurol* **28**, 614-21 (1990).
21. Antonini, A. et al. Striatal glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease. *Brain* **119** ( Pt 6), 2085-95 (1996).
22. Andrews, T.C. et al. Huntington's disease progression. PET and clinical observations. *Brain* **122** ( Pt 12), 2353-63 (1999).
23. Aylward, E.H. et al. Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* **63**, 66-72 (2004).

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Haloperidol decanoate treatment decreases expHtt aggregate formation over time.**

(a) expHtt aggregates were detected by immunofluorescence using the EM48 antibody, on 25  $\mu\text{m}$  thick sections of vehicle- (Veh) and haloperidol decanoate-treated (Hal) rat striata, two (2 wk) or eight (8 wk) weeks after infection. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ . (b) Quantification of EM48 positive aggregates in the whole htt171-82Q-expressing striata of vehicle (veh) or haloperidol decanoate-treated (Hal) animals, two (2 wk) or eight (8 wk) weeks after LV-injection. EM48-positive aggregates were counted on 25  $\mu\text{m}$  thick sections separated by 150  $\mu\text{m}$  throughout the entire striatum, using an image analysis software (Image Pro Plus 4.5.0.19, Media Cybernetics). The total number of aggregates per brain was obtained by multiplying the counts by 6. (c) Double staining with Hoechst (nuclei, in blue) and EM48 (expHtt aggregates, in red) was performed on two weeks htt171-82Q-expressing striata. Note the distinction between big-size aggregates (arrow head) and small-size aggregates (arrow). Note also that while big-size are located in the nucleus, small-size are always extra-nuclear. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . (d) Quantification of total, nuclear and extra-nuclear EM48 positive aggregates in the whole htt171-82Q-infected striata of Vehicle (Veh) or haloperidol decanoate-treated (Hal) animals, two weeks after infection. In **b** and **d**, Ct-2 wk :  $n=7$  ; Hal-2 wk :  $n=7$  ; Ct-8 wk :  $n=7$  ; Hal-8 wk :  $n=7$ . Statistical test : unpaired student's  $t$  test \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , ns : not significant. Values are expressed as means  $\pm$  s.e.m.

**Figure 2. Haloperidol decanoate treatment decreases striatal neurons dysfunction.**

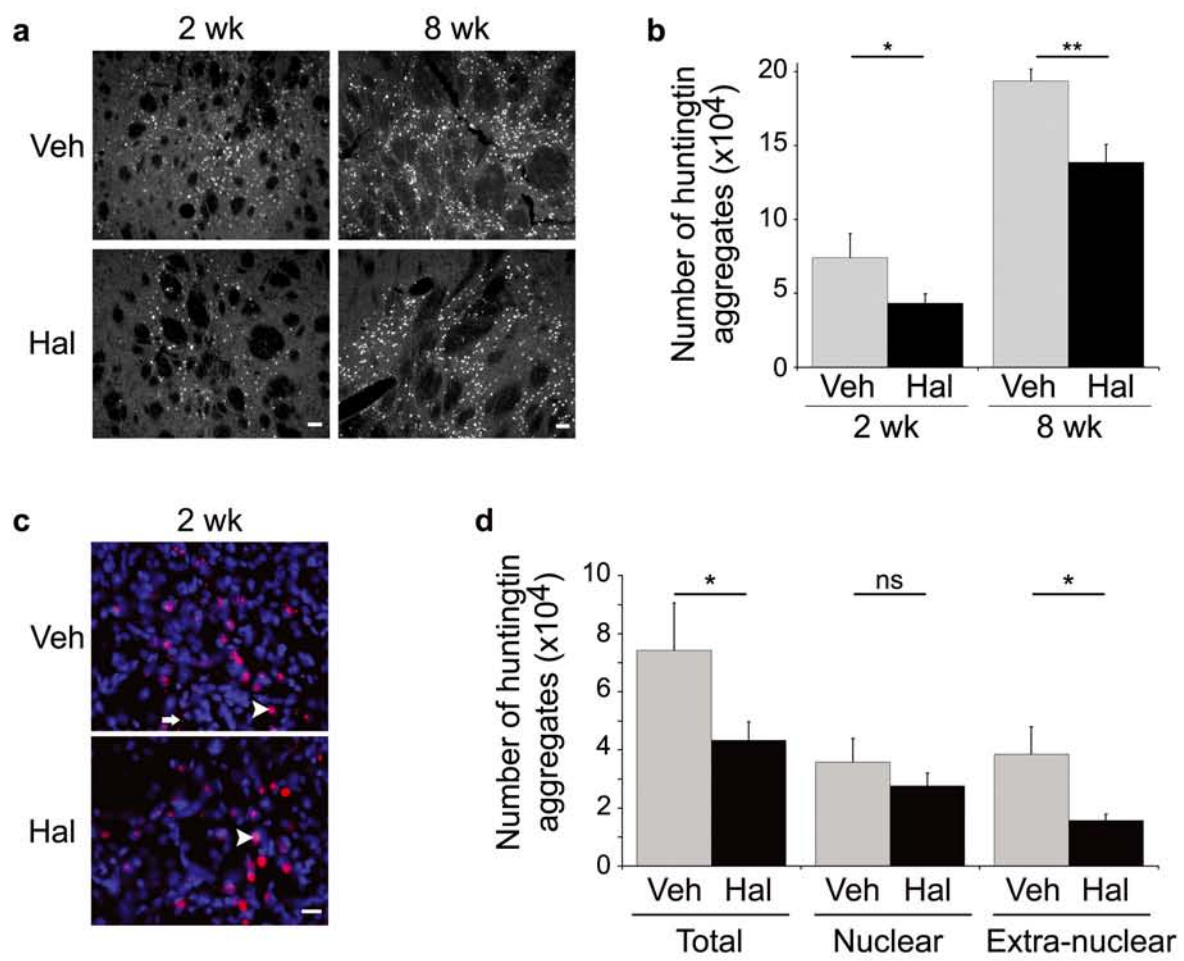
(a) Striatal neurons dysfunction was evaluated by the loss of DARPP-32 immunoreactivity at eight weeks. While overexpression of the normal form of htt (19Q) had no effect on DARPP-32 staining (left panels), a drastic loss of DARPP-32 immunoreactive neurons was observed



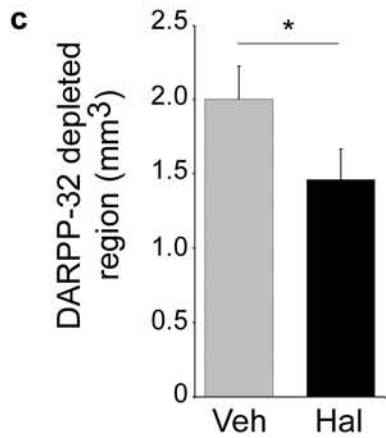
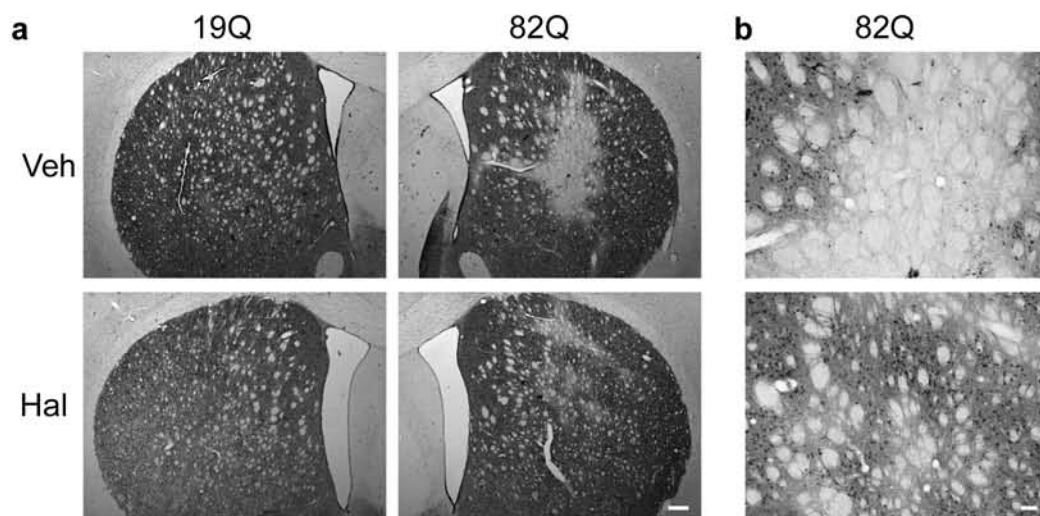
in the LV-htt171-82Q-infected striatum (82Q) of vehicle animals (Veh) (right up panel). Note that haloperidol decanoate treatment (Hal) strongly reduces this loss of DARPP-32 immunoreactivity (right low panel) Scale bar, 500  $\mu$ m. **(b)** High magnification showing the DARPP-32 depleted region in the striata presented in **a**. Scale bar, 100  $\mu$ m. **(c)** Quantification of the volume of DARPP-32 depleted region in the htt171-82Q expressing striata of vehicle- (Veh) or haloperidol decanoate- treated (Hal) animals, eight weeks after LV injection. In **c**, Ct :  $n=7$  ; Hal :  $n=7$ . Statistical test : unpaired student's  $t$  test;  $*P<0.05$ . Values are expressed as means  $\pm$  s.e.m.

**Figure 3. Haloperidol decanoate treatment exerts a parallel effect between neuronal dysfunction and expHtt aggregate formation.**

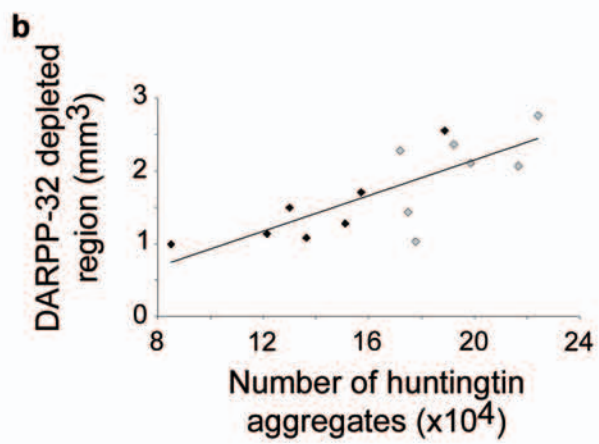
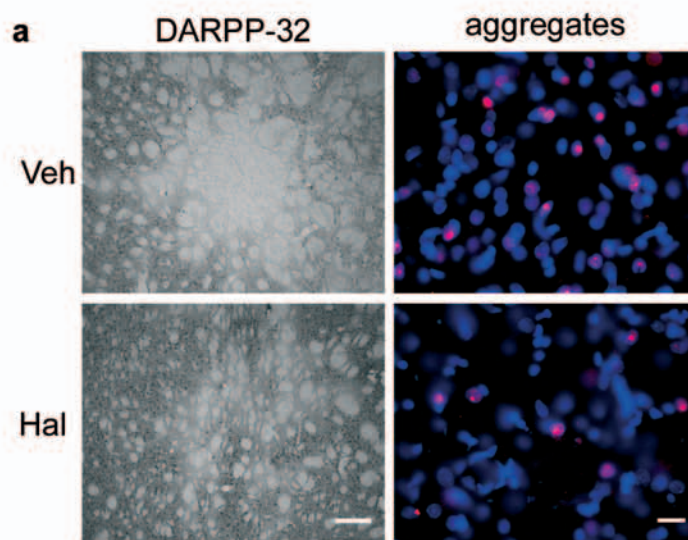
**(a)** DARPP-32 and aggregates immunostainings on adjacent LV-htt171-82Q-infected striatal sections from a vehicle- (Veh; upper panels) and haloperidol decanoate- treated (Hal, lower panels) animal, eight weeks after LV infection. Note that the haloperidol decanoate-treated rat presents a smaller DARPP-32 depleted region and less aggregates than the vehicle treated rats. Scale bar for DARPP-32 stained sections, 200  $\mu$ m. Scale bar for aggregates stained sections, 20  $\mu$ m. **(b)** Correlation between the volume of DARPP-32 depleted region and the number of expHtt aggregates for each animal. Black diamonds : haloperidol decanoate-treated animals ; grey diamonds : vehicle-treated rats.  $R^2 = 0.6$ .



Charvin et al., Figure 1



Charvin et al., Figure 2



**Charvin et al., Figure 3**

### 3.2. Apport de l'étude

Les résultats de cette étude suggèrent qu'un traitement précoce avec l'halopéridol decanoate est une possibilité thérapeutique intéressante pour la MH puisqu'il diminue la formation d'agrégats de huntingtine mutée, et surtout, il protège les neurones striataux de la dysfonction induite par la huntingtine mutée. Par conséquent, ces résultats proposent qu'un traitement précoce avec de l'halopéridol decanoate pourrait ralentir la progression de la MH.

#### *3.2.1. Effet de l'halopéridol decanoate sur la formation d'agrégats de huntingtine mutée*

Nous avons, dans un premier temps, analysé l'effet du traitement avec l'halopéridol decanoate sur la formation d'agrégats de huntingtine mutée, après deux ou huit semaines de traitement. En accord avec les résultats que nous avons obtenus *in vitro*, le blocage des récepteurs D2 par l'halopéridol decanoate diminue la formation d'agrégats de huntingtine mutée dans ce modèle *in vivo*, et cet effet persiste au cours du temps.

#### *3.2.2. Effet de l'halopéridol decanoate sur la dysfonction neuronale*

Nous avons ensuite évalué l'effet thérapeutique du traitement avec l'halopéridol decanoate sur la dysfonction neuronale induite par la huntingtine mutée. La dysfonction neuronale a été quantifiée par la perte de marquage DARPP-32 après huit semaines de traitement. Le traitement précoce avec l'halopéridol decanoate présente alors un fort effet protecteur sur les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée.

#### *3.2.3. Corrélation entre la formation d'agrégats de huntingtine mutée et la dysfonction neuronale*

Cette étude montre que le traitement avec l'halopéridol decanoate exerce des effets similaires sur la formation d'agrégats et la dysfonction neuronale induite par la huntingtine mutée. En effet, après huit semaines de traitement, l'halopéridol decanoate diminue d'une part de 28% le nombre d'agrégats de huntingtine mutée, et d'autre part de 30% le volume de la région striatale présentant une perte de marquage DARPP-32. Cette observation ne résout pas le débat qui existe entre un rôle protecteur ou au contraire toxique des agrégats de huntingtine mutée. Par contre, cette forte corrélation suggère que les agrégats représentent un bon marqueur de souffrance cellulaire.

### 3.3. Conclusion & perspectives

Cette étude démontre pour la première fois que les récepteurs dopaminergiques de type D2 représentent une cible thérapeutique prometteuse pour la MH. En effet, le traitement des rats MH à un stade pré-symptomatique avec de l'halopéridol decanoate, qui est un antagoniste très spécifique des récepteurs D2, a diminué la formation d'agrégats dans les neurones striataux et les a fortement protégé de la dysfonction neuronale induite par la huntingtine mutée.

Nous proposons qu'il puisse être possible et favorable pour les patients d'adapter des stratégies thérapeutiques existantes. En effet, la plupart des patients MH reçoivent un traitement symptomatique à base de neuroleptiques qui présentent des propriétés d'antagonistes des récepteurs D2. Mais ce traitement ne commence qu'après l'apparition des symptômes, c'est-à-dire à un stade de la maladie où le striatum est déjà touché par la neurodégénérescence. Ce même traitement utilisé à un stade plus précoce de la maladie devrait s'avérer bénéfique. Toutefois, l'administration à long terme de traitements neuroleptiques pouvant provoquer chez les patients des effets secondaires importants, il pourrait s'avérer utile de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à bloquer les événements moléculaires en aval des récepteurs D2.

## Discussion générale

L'objectif de cette thèse était d'explorer le rôle que pouvait jouer la dopamine dans la vulnérabilité des neurones striataux à la huntingtine mutée afin de mieux comprendre le processus pathophysiologique qui mène à la dégénérescence de ces neurones dans la maladie de Huntington. Les études que nous avons menées *in vitro* et *in vivo* nous ont permis de démontrer que la dopamine rend les neurones striataux plus vulnérables à l'expression de la huntingtine mutée, et ce, en exerçant un double rôle. D'une part, la dopamine produit des radicaux libres qui entraînent un stress oxydatif et qui sont connus pour rendre ce neuromodulateur neurotoxique dans certaines conditions. Dans le cadre de la MH, les radicaux libres produits par la dopamine dans les neurones striataux en culture agissent en synergie avec la huntingtine mutée pour activer la voie pro-apoptotique JNK/c-Jun. D'autre part, l'activation des récepteurs D2 par la dopamine augmente la vulnérabilité des neurones striataux à la toxicité de la huntingtine mutée. Cette activation a également pour effet d'augmenter la formation d'agrégats de huntingtine mutée. Ces deux phénomènes relatifs à l'activation des récepteurs D2 sont à la fois reproduits *in vitro* et *in vivo*. Enfin, l'étude que nous avons menée sur un modèle *in vivo* de MH suggère qu'un traitement précoce avec un neuroleptique ayant des propriétés d'antagoniste sélectif des récepteurs D2 est susceptible de ralentir la progression de la MH. Ces médicaments existants et étant prescrits dans d'autres maladies neurologiques, cette perspective thérapeutique est intéressante à explorer pour traiter la MH, une maladie dont les traitements actuels ne sont encore que symptomatiques.

### 1. La dopamine : un neuromodulateur qui peut devenir toxique

La dopamine est un neuromodulateur qui exerce de multiples fonctions importantes dans le système nerveux central. Le striatum est la structure cérébrale qui reçoit la plus dense innervation dopaminergique, en provenance des neurones de la substance noire compacte. Cependant, plusieurs expériences menées *in vivo* et *in vitro* démontrent que dans certaines situations, la dopamine peut se révéler toxique pour les neurones (Jakel and Maragos, 2000). La dopamine participe par exemple à la neurodégénérescence striatale provoquée par une ischémie locale (Buisson *et al.*, 1992). Dans ce cas, les concentrations de dopamine augmentent dans le striatum, pouvant atteindre jusqu'à 1100% des concentrations normales (Akiyama *et al.*, 1991). Les injections directes de fortes doses de dopamine dans le striatum (250-500 mM) entraînent des dommages striataux qui sont dépen-

dants de la dose de dopamine et qui se traduisent par une perte neuronale, une dégénérescence des terminaisons axonales et une réaction gliale (Filloux and Wamsley, 1991; Hastings *et al.*, 1996). La dégénérescence des neurones striataux peut encore être provoquée *in vivo* par la libération endogène de dopamine qui résulte de l'administration d'amphétamine (Ricaurte *et al.*, 1982). La dopamine peut également être toxique *in vitro*, sur des cultures de neurones dissociés de mésencéphale (Michel and Hefti, 1990), de striatum (Cheng *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1998; McLaughlin *et al.*, 1998) ou de cortex (Rosenberg, 1988; Hoyt *et al.*, 1997) de rats, et déclencher un mécanisme d'apoptose (Offen *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1998; McLaughlin *et al.*, 1998).

Les effets neurotoxiques de la dopamine sont souvent liés à son oxydation. La dopamine contient un noyau catéchol instable et peut s'oxyder spontanément ou par une réaction enzymatique. Cette oxydation produit des radicaux libres hautement toxiques (ROS, Reactive Oxygen Species) qui peuvent entraîner des dommages cellulaires irréversibles, atteignant les composants cellulaires lipidiques, protéiques, ou encore l'ADN (Halliwell, 1992). Ainsi, de nombreuses données suggèrent que le stress oxydatif provoqué par la dopamine serait un facteur majeur du mécanisme pathogénique responsable de la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson (Adams and Odunze, 1991; Halliwell, 1992).

En 1998, les travaux de Luo ont montré, sur des neurones striataux de rats nouveau-nés, mis en culture pendant 20 jours, qu'un traitement avec de fortes concentrations de dopamine (500  $\mu\text{M}$ ) induit la mort cellulaire par apoptose (Luo *et al.*, 1998). Cette étude montre que la toxicité de la dopamine est entièrement médiée par la production de radicaux libres, puisqu'elle est inhibée par l'ajout d'un antioxydant. Dans ce modèle, la dopamine active également le module JNK/c-Jun via la production de radicaux libres. L'inhibition de JNK ou de c-Jun, par l'utilisation d'une forme dominante négative de MKK4, l'une des kinases de JNK, ou d'une forme dominante négative de c-Jun, bloque complètement la mort induite par la dopamine.

Dans notre modèle de cultures primaires de neurones striataux d'embryons de souris au stade E14, mis en culture pendant 7 jours, la dopamine produit les mêmes effets que dans le modèle de Luo, à savoir l'activation du module pro-apoptotique JNK/c-Jun et la mort des neurones (Charvin *et al.*, 2005). Ces effets sont modulés par la dose et la durée du traitement à la dopamine. Ainsi, un traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de dopamine provoque une rapide activation de c-Jun et une mort rapide des neurones (près de 65% des neurones sont apoptotiques après 8h de traitement), comme l'indique l'aspect condensé ou fragmenté de leur noyau. Un traitement avec 50  $\mu\text{M}$  de dopamine ne permet pas, dans notre modèle,



d'induire une activation significative de c-Jun. En revanche, un traitement avec 100  $\mu\text{M}$  de dopamine permet d'activer le module JNK/c-Jun et d'induire une mort neuronale progressive et plus modeste que le traitement avec 500  $\mu\text{M}$  de dopamine (60% des neurones sont toujours vivants après 16 h de traitement avec 100  $\mu\text{M}$  de dopamine).

L'activation du module JNK/c-Jun précède la mort des neurones, la translocation nucléaire de pJNK (phospho-JNK, JNK phosphorylé) commençant à être observée après 8 h de traitement, la phosphorylation de c-Jun après 10 h et la mort neuronale après 14 h de traitement avec 100  $\mu\text{M}$  de dopamine. Le pré-traitement des neurones striataux avec un antioxydant inhibe complètement l'activation de c-Jun et la mort neuronale induites par la dopamine. Ainsi, dans notre modèle, la dopamine provoque l'activation de la voie proapoptotique JNK/c-Jun et la mort des neurones striataux par l'intermédiaire de la production de radicaux libres.

Par conséquent, suivant les paramètres dose/durée du traitement à la dopamine que l'on applique sur notre modèle de cultures primaires de neurones striataux, la dopamine peut se révéler neurotoxique. Nous avons choisi de nous placer dans des conditions où la dopamine est faiblement et progressivement toxique, tout en activant le module JNK/c-Jun, soit un traitement avec 100  $\mu\text{M}$  de dopamine appliqué de 8 h à 24 h suivant la réponse cellulaire étudiée.

## **2. La dopamine crée un stress oxydatif qui rend les neurones striataux plus vulnérables à la huntingtine mutée : implication de la voie JNK/c-Jun**

Bien que la huntingtine mutée ait une expression ubiquitaire, les neurones de projection du striatum sont les cellules les plus vulnérables de la MH. Cette vulnérabilité ne peut pas s'expliquer par le niveau d'expression de la huntingtine, qui n'est pas particulièrement élevé dans le striatum par rapport aux autres structures cérébrales. Par contre, le striatum reçoit les plus fortes concentrations cérébrales de dopamine et, nous l'avons vu, la dopamine peut, dans certaines conditions, se révéler toxique pour les neurones striataux. Par conséquent, la libération physiologique de dopamine qui se produit dans le striatum durant le cours normal de la vie pourrait conduire à une vulnérabilité progressive des neurones striataux dans la MH.

### **Arguments indirects en faveur d'un rôle de la dopamine dans la MH**

Plusieurs données de la littérature apportent des arguments indirects en faveur d'un rôle éventuel de la dopamine dans la vulnérabilité spécifique des neurones striataux dans

la MH. Par exemple, les travaux de Reynolds *et al.* montrent, dans un modèle pharmacologique *in vivo* de MH, reposant sur l'administration systémique de 3-NP et reproduisant la neurodégénérescence striatale sélective, que la lésion des afférences dopaminergiques protège complètement les neurones striataux de la toxicité du 3-NP (Reynolds *et al.*, 1998). Au contraire, l'administration aiguë ou chronique d'amphétamine, qui augmente la libération de dopamine dans le striatum, accentue les effets toxiques du 3-NP (Bowyer *et al.*, 1996; Reynolds *et al.*, 1998). Les souris transgéniques R6/2, qui surexpriment l'exon 1 humain de la huntingtine mutée avec en moyenne 145 répétitions de glutamines, développent une hypersensibilité à la toxicité de l'amphétamine (Hickey *et al.*, 2002). De manière intéressante, cette hypersensibilité augmente avec l'âge des souris. Les souris knock-out pour le transporteur de la dopamine (DAT), qui présentent une hyper-dopaminergie persistante dans le striatum, sont hypersensibles aux effets neurotoxiques du 3-NP (Fernagut *et al.*, 2002). De plus, ces souris développent spontanément des symptômes dyskinétiques très proches de ceux de la MH et une dégénérescence sélective et progressive des neurones striataux GABAergiques (Cyr *et al.*, 2003). Ainsi, des anomalies de la transmission dopaminergique peuvent être à l'origine de troubles moteurs proches de ceux de la MH, comme c'est également le cas dans le syndrome de Gilles de la Tourette.

Tous ces arguments en faveur d'un rôle de la dopamine dans la pathogenèse de la MH ne sont que des arguments indirects, et les mécanismes par lesquels la dopamine pourrait révéler la toxicité de la huntingtine mutée dans les neurones striataux n'étaient toujours pas élucidés au moment où j'ai commencé ma thèse. Nous avons alors entrepris l'étude de l'influence de la dopamine sur les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée.

**En produisant des radicaux libres, la dopamine agit en synergie avec la huntingtine mutée pour activer la voie pro-apoptotique JNK/c-Jun**

Nous avons montré que dans notre modèle de cultures primaires de neurones striataux transfectés transitoirement avec l'exon 1 de la huntingtine normale (avec 25 glutamines) ou mutée (avec 103 glutamines), la huntingtine mutée est capable d'activer le module pro-apoptotique JNK/c-Jun (Garcia *et al.*, 2004). Cette activation est un événement précoce dans le processus qui mène à la mort des neurones striataux et apparaît avant la formation des agrégats nucléaires. L'inhibition du module JNK/c-Jun soit par un pré-traitement des neurones avec un inhibiteur pharmacologique de JNK (le SP-600125), soit par la co-expression d'une forme dominante négative de c-Jun, protège partiellement mais significativement les neurones striataux de la toxicité de la huntingtine mutée. Ces résultats sont intéressants parce qu'ils démontrent qu'un fragment N-terminal de la huntingtine mutée, outre sa capacité à inhiber la transcription génique dans le noyau, est capable, dans les

neurones striataux, de déclencher une cascade de signalisation pro-apoptotique dans le cytoplasme, indépendamment de la formation des agrégats nucléaires. Par contre, cette activation ne concerne qu'une minorité des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée, et ne peut donc pas expliquer la vulnérabilité de cette population cellulaire dans la MH.

Ayant démontré que la huntingtine mutée seule et que la dopamine seule (100  $\mu$ M) sont capables d'activer la même voie de signalisation pro-apoptotique JNK/c-Jun, mais que cette activation ne concerne dans les deux cas qu'un petit nombre de neurones, nous avons analysé l'effet combiné de la huntingtine mutée et de la dopamine sur l'activation de cette voie. Nous avons alors montré que, dans notre modèle *in vitro* de MH, la dopamine et la huntingtine mutée exercent un effet synergique, et non uniquement additif, sur l'activation du module JNK/c-Jun. Un pré-traitement des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée avec un anti-oxydant inhibe l'effet synergique de la dopamine et de la huntingtine mutée sur l'activation de la voie JNK/c-Jun et sur la mort neuronale. Le même effet protecteur sur l'activation de JNK/c-Jun et sur la mort des neurones striataux est obtenu par un pré-traitement avec un inhibiteur pharmacologique de JNK (le SP-600125). Ces résultats indiquent par conséquent que ce sont les radicaux libres produits par la dopamine qui agissent en synergie avec la huntingtine mutée pour activer la voie pro-apoptotique JNK/c-Jun, et que l'activation de cette voie contribue en partie à la toxicité de la dopamine et de la huntingtine mutée dans les neurones striataux. Récemment, Petersén *et al.* ont montré que des cultures primaires de neurones post-nataux du striatum de souris R6/2 sont plus sensibles à de fortes concentrations de dopamine (1 mM) que les neurones de souris contrôle (Petersen *et al.*, 2001). La toxicité de la dopamine est dans ces expériences entièrement médiée par la production de radicaux libres. Dans notre modèle, nous montrons que les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée sont plus sensibles à de faibles doses de dopamine (0,1 mM) que les neurones striataux exprimant la huntingtine normale, et que la toxicité de la dopamine est partiellement médiée par la production de radicaux libres.

#### Corrélation avec les caractéristiques neuro-anatomiques de la MH

L'oxydation de la dopamine augmente dans le striatum au cours du vieillissement (Fornstedt *et al.*, 1990). Cette oxydation produit des radicaux libres qui, d'après les résultats que nous avons obtenus *in vitro*, amplifient l'activation de la voie JNK/c-Jun qui est faiblement initiée par la présence de la huntingtine mutée dans les neurones. Ainsi, en renforçant fortement l'activation de cette voie pro-apoptotique, l'oxydation de la dopamine dans le striatum pourrait être impliquée dans la vulnérabilité sélective des neurones

striataux à l'expression de la huntingtine mutée. De plus, cette oxydation augmentant au cours du vieillissement, ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi l'apparition des symptômes et de la dégénérescence des neurones striataux sont retardées à l'âge adulte, malgré l'expression constitutive de la huntingtine mutée depuis la naissance.

La dopamine, par son oxydation, pourrait participer au stress oxydatif observé dans le striatum des malades MH. En effet, les cerveaux *post-mortem* de malades MH présentent une activité de la MAO-B (monoamine oxydase B) accrue de 260 % dans le noyau caudé, en comparaison avec les cerveaux d'individus sains de même âge (Mann *et al.*, 1986). Or la MAO-B est l'enzyme responsable de l'oxydation de la dopamine. Par conséquent, même si les concentrations synaptiques de dopamine ne sont pas augmentées, l'hyper-activité de la MAO-B accélérerait le métabolisme oxydatif de la dopamine et la production de radicaux libres qui en résulte. Il a d'ailleurs été montré que les quantités de DOPAC, produit de l'oxydation de la dopamine par la MAO-B, sont également augmentés dans le liquide cérébro-spinal des malades MH (Garrett and Soares-da-Silva, 1992). Ces données confortent donc l'hypothèse de l'implication de la dopamine dans le stress oxydatif observé dans la MH.

Pour confirmer nos observations *in vitro*, il serait intéressant d'analyser l'état d'activation de la voie JNK/c-Jun dans le striatum de modèles *in vivo* de MH. Notre équipe a déjà montré que cette voie est activée spécifiquement dans les neurones striataux dans le modèle pharmacologique du 3-NP (Garcia *et al.*, 2002). Cette analyse sera à présent entreprise dans des modèles génétiques *in vivo* de la MH.

#### Implication de JNK dans la vulnérabilité des neurones striataux dans la MH : quelle JNK ?

La famille des protéines JNK est composée de trois sous-familles, les JNK1, JNK2 et JNK3, qui ont des effets cellulaires différents. Parmi les trois JNK exprimées dans le cerveau, JNK1 présente une activité constitutive élevée dans les neurones, qui n'est pas reliée à une situation de stress cellulaire (Coffey *et al.*, 2000; Coffey *et al.*, 2002; Kuan *et al.*, 2003). Cette activité maintient l'homéostasie des microtubules et l'intégrité des axones dans le cerveau adulte (Chang *et al.*, 2003). En ce qui concerne JNK2, elle peut être impliquée dans la réponse à des stimuli pro-apoptotiques (Coffey *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2004; Eminel *et al.*, 2004) mais elle est également importante pour la différenciation coordonnée des cellules immunitaires par exemple (Yang *et al.*, 1998; Jaeschke *et al.*, 2004), ou pour le développement du cerveau (Kuan *et al.*, 1999). Connaissant le rôle physiologique que peuvent jouer certaines JNK dans une situation cellulaire donnée, les stra-

tégies thérapeutiques visant à bloquer la mort neuronale dépendante de JNK nécessitent de connaître la forme de JNK qui doit être ciblée (JNK1, JNK2 ou JNK3).

La conservation de la structure des motifs fonctionnels des JNK rend difficile le développement de composés permettant d'inhiber spécifiquement l'une ou l'autre des sous-familles de JNK (Resnick and Fennell, 2004). Au moins 40 inhibiteurs de structures différentes ont été publiés ou brevetés en tant qu'inhibiteurs de JNK, agissant soit indirectement via la signalisation de la voie JNK (tel que le CEP-1347, qui inhibe MLK, une kinase en amont de JNK et qui est actuellement testé pour le traitement de la maladie de Parkinson (Group, 2004)), soit en bloquant directement le domaine catalytique de JNK (tels que le SP-600125, proposé pour le traitement de l'ischémie cérébrale (Guan *et al.*, 2005)) (Waetzig and Herdegen, 2005). Le domaine catalytique étant conservé entre les différentes formes de JNK, aucune de ces molécules ne permet de distinguer les effets de JNK1, JNK2 ou JNK3. Seule une approche génétique chez des souris knock-out pour l'une ou l'autre des JNK1, 2 ou 3 permettrait d'identifier quelle JNK est activée par la huntingtine mutée et/ou les radicaux libres produits par la dopamine, une étude qui est en cours au laboratoire.

JNK3 est la seule JNK dont l'expression est restreinte au cerveau. La délétion du gène *Jnk3* chez la souris est neuroprotectrice contre l'ischémie, le stress oxydatif et l'excitotoxicité du glutamate (Yang *et al.*, 1997; Kuan *et al.*, 2003; Brecht *et al.*, 2005). Elle atténue de plus les caractéristiques pathologiques de la maladie d'Alzheimer (Morishima *et al.*, 2001). JNK3 apparaît alors comme une cible d'intérêt pour les maladies neurodégénératives, et donc pour la MH.

L'étude de Hunot *et al.* montre que la double invalidation des gènes *Jnk2* et *Jnk3* est nécessaire et suffisante pour protéger les neurones dopaminergiques de l'activation de c-Jun et de la mort cellulaire induites par le MPTP, un composé pharmacologique qui modélise la maladie de Parkinson (Hunot *et al.*, 2004). Il est par conséquent intéressant d'analyser l'implication de JNK2 dans l'activation de c-Jun par l'action synergique de la dopamine et de la huntingtine mutée dans notre modèle.

Une étude récente démontre que lorsque JNK1 est activée dans le cytoplasme d'un neurone, elle phosphoryle MAP2. Il en résulte une modification de la morphologie de l'arbre dendritique du neurone, diminuant le nombre de dendrites par cellule et augmentant la longueur moyenne d'une dendrite (Bjorkblom *et al.*, 2005). Or nous avons également analysé dans notre modèle, la morphologie de l'arbre dendritique des neurones (identifiée par immunomarquage de MAP2) exprimant la huntingtine mutée en présence ou non de dopamine (résultats préliminaires). Sans dopamine, l'expression de la huntingtine mutée ne modifie la morphologie de l'arbre dendritique que lorsqu'elle se présente sous la

forme d'agrégats somatiques ou nucléaires. En effet, les neurones dans lesquels la huntingtine mutée forme des agrégats somatiques présentent des dendrites dont la longueur moyenne est diminuée de 50 % par rapport aux neurones exprimant la huntingtine normale (après 14h d'expression de la huntingtine mutée ou normale). En présence de dopamine, les neurones dans lesquels la huntingtine mutée est diffuse ou sous forme d'agrégats neuritiques présentent des dendrites dont la longueur moyenne est diminuée de 35 % par rapport aux neurones non traités avec la dopamine (après 14h de traitement et d'expression de la huntingtine mutée). La dopamine n'a aucun effet sur les dendrites des neurones dans lesquels la huntingtine mutée est sous forme d'agrégats somatiques ou nucléaires. De manière intéressante, la rétraction neuritique induite par la dopamine dans les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée sous forme diffuse est médiée par l'activation de JNK puisque la longueur des dendrites est préservée avec un pré-traitement des neurones avec le SP-600125 (inhibiteur pharmacologique de JNK). Par contre, la rétraction neuritique induite par la dopamine dans les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée sous forme d'agrégats neuritiques est médiée par l'activation des récepteurs D2. Ces analyses de la rétraction neuritique des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée induite par la dopamine sont en cours au laboratoire.

### 3. L'activation des récepteurs dopaminergiques de type D2 rend les neurones striataux plus vulnérables à la huntingtine mutée

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'oxydation de la dopamine est un médiateur connu de la neurotoxicité de ce neuromodulateur. En revanche, notre étude démontre que dans le cadre de la MH, la dopamine pourrait jouer un double rôle dans la vulnérabilité des neurones striataux, impliquant d'une part l'oxydation de la dopamine, mais également l'activation des récepteurs dopaminergiques de type D2. En effet, nous avons montré que l'activation des récepteurs D2 augmente la vulnérabilité des neurones striataux à la toxicité de la huntingtine mutée. L'activation de ces récepteurs a également pour effet d'augmenter la formation d'agrégats de huntingtine mutée. L'implication des récepteurs D2 dans la pathogenèse de la MH est un résultat original et surprenant. Il est d'autant plus important que notre étude *in vivo* confirme cette implication. Un pré-traitement des neurones striataux en culture avec un antagoniste des récepteurs D2 protège fortement les neurones de la toxicité de la dopamine et de la huntingtine mutée. Ce pré-traitement inhibe également la potentialisation de la formation d'agrégats par la dopamine. De plus, le traitement avec de la dopamine des neurones striataux provenant de souris knock-out pour

le récepteur D2 ne reproduit pas la potentialisation de la formation d'agrégats par la dopamine. De manière très intéressante, ces deux résultats, neuroprotection et diminution de la formation d'agrégats par un traitement avec un antagoniste D2, sont exactement reproduits dans un modèle *in vivo* de la MH. Bien qu'il existe une controverse au sujet du rôle des agrégats dans la toxicité de la huntingtine mutée, notre étude, reproduite *in vitro* et *in vivo*, propose qu'un traitement précoce avec un antagoniste spécifique des récepteurs D2 puisse être neuroprotecteur dans la MH, ce qui laisse entrevoir des perspectives de stratégies thérapeutiques intéressantes.

### *3.1. Récepteurs D2 et mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée*

Les récepteurs D2 sont exprimés par les neurones striataux GABAergiques/enképhalinergiques qui se projettent sur le globus pallidus externe, c'est-à-dire la population cellulaire qui dégénère le plus précocement dans le striatum des malades MH, à un stade où ils sont encore pré-symptomatiques. Or notre étude montre que l'activation des récepteurs D2 favorise la mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée. Ainsi, la présence des récepteurs D2 peut elle-même représenter un facteur de vulnérabilité cellulaire dans la MH. La question reste à présent de comprendre par quels mécanismes moléculaires les récepteurs D2 pourraient révéler la toxicité de la huntingtine mutée.

Inhibition de voies de signalisation anti-apoptotiques par la stimulation des récepteurs D2 ?

Les récepteurs D2 participent à un grand nombre de voies de signalisation intracellulaire, souvent par l'intermédiaire d'interactions protéiques avec leur troisième boucle intracytoplasmique. L'un des médiateurs importants des réponses cellulaires à l'activation des récepteurs D2 est la  $\beta$ -arrestine 2. Le premier rôle reconnu de la famille des arrestines est d'assurer la désensibilisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Parmi les arrestines, ce sont les  $\beta$ -arrestines 2 qui interagissent avec les récepteurs D2 dans le striatum (Macey *et al.*, 2004). Après avoir été stimulés par la dopamine, les récepteurs D2 sont phosphorylés par des kinases de la famille des GRK (G protein-coupled Receptor Kinases). Cette phosphorylation augmente l'affinité de la  $\beta$ -arrestine 2 pour le récepteur D2, auquel elle se lie. Elle recrute alors les composants de la machinerie d'endocytose au niveau du récepteur (AP2, clathrine, dynamine), qui procèdent à l'internalisation du récepteur dans une vésicule recouverte de clathrine.

Outre les récepteurs couplés aux protéines G et les composants de la machinerie de l'endocytose, les  $\beta$ -arrestines peuvent s'associer avec de nombreux acteurs de voies de

signalisation intracellulaire. Les  $\beta$ -arrestines ne participent donc pas uniquement à la désensibilisation des récepteurs mais également à la régulation des voies de signalisation en aval de ces récepteurs. La  $\beta$ -arrestine 2 agit ainsi en tant que plateforme protéique pour les composants de la voie des ERK1/2 (Raf, MEK, ERK) (DeFea *et al.*, 2000; Luttrell *et al.*, 2001). Il semblerait que les effets de la  $\beta$ -arrestine 2 sur cette voie de signalisation puissent être différents en fonction du récepteur qui est à l'initiative de cette régulation. En effet, avec des récepteurs tels que le récepteur à l'angiotensine de type 1a (AT1aR), dits « récepteurs de classe B », la  $\beta$ -arrestine 2 et ERK sont internalisés avec le récepteur et restent accrochés à la vésicule d'endocytose (Luttrell *et al.*, 2001) (Figure 47). L'activation de ERK est alors maintenue sur une longue période (plus de 90 min), peut-être parce qu'il est inaccessible pour ses phosphatases, et il reste cytoplasmique (Tohgo *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2004; Lefkowitz and Shenoy, 2005). Par contre, avec des récepteurs tels que le récepteur adrénergique  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -AR), dits « récepteurs de classe A », l'activation de ERK par la  $\beta$ -arrestine 2 est moins persistante dans le temps et permet à phospho-ERK de transloquer au noyau (Tohgo *et al.*, 2003; Lefkowitz and Shenoy, 2005) (Figure 47).

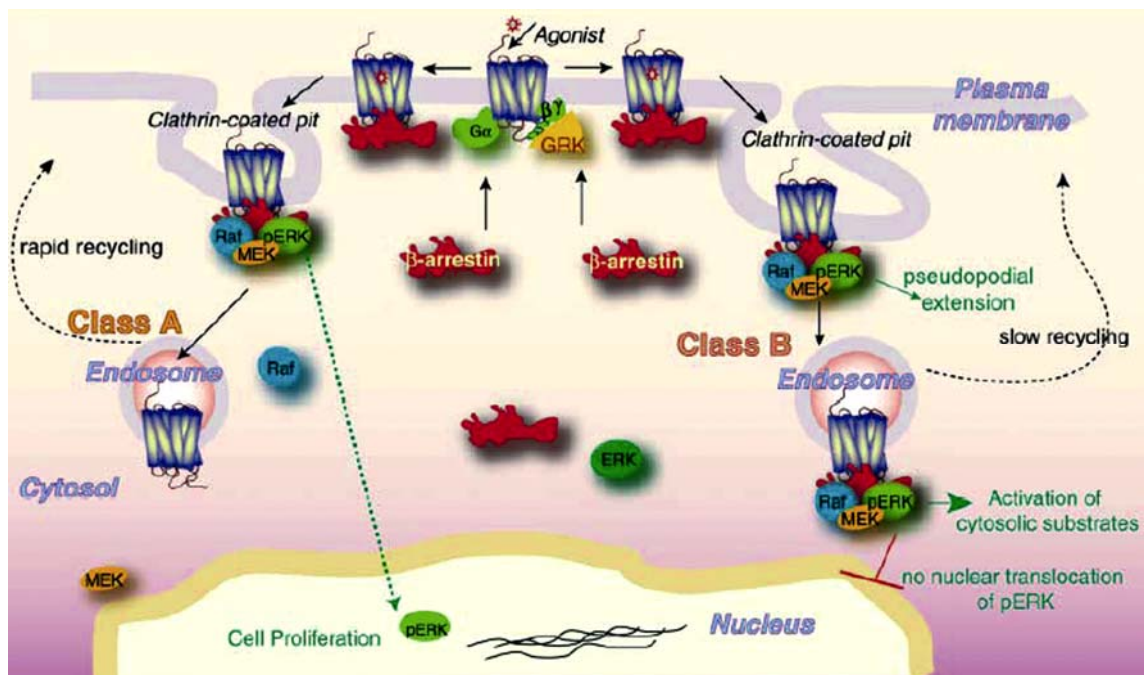


Figure 47 : Activation de la voie ERK par la  $\beta$ -arrestine 2 en réponse à la stimulation d'un récepteur de classe A (à gauche) ou de classe B (à droite). L'activation de la voie ERK par la  $\beta$ -arrestine 2 en réponse à la stimulation d'un récepteur de classe A (tel que  $\beta_2$ -AR) est de courte durée et permet à pERK d'agir sur ses cibles nucléaires. Au contraire, en réponse à l'activation d'un récepteur de classe B (tel que AT1aR), l'activation de ERK par la  $\beta$ -arrestine 2 est soutenue et limitée au compartiment cytoplasmique. Schéma d'après (Lefkowitz and Shenoy, 2005).



La voie des ERK1/2 est généralement considérée comme étant anti-apoptotique, régulant la prolifération et la différenciation cellulaire et étant impliquée dans la mémoire à long terme, la plasticité synaptique et les réponses comportementales aux drogues d'abus (Valjent *et al.*, 2001; Sweatt, 2004). Pour assurer ces fonctions, phospho-ERK transloque au noyau, où elle phosphoryle et active des facteurs de transcription qui stimulent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et d'autres processus cellulaires (Morrison and Davis, 2003). De récentes études ont remis en cause le seul rôle anti-apoptotique de la voie ERK, suggérant au contraire son implication dans la neurodégénérescence (Irving and Bamford, 2002; Cheung and Slack, 2004; Chu *et al.*, 2004). Par exemple, ERK est activée après l'injection de la neurotoxine 6-OHDA qui permet de modéliser la maladie de Parkinson. Dans ce modèle, la mort cellulaire est diminuée par l'inhibition pharmacologique de MEK, l'activateur de ERK (Kulich and Chu, 2001). L'inhibition de MEK, par l'agent pharmacologique PD98059, est également neuroprotectrice contre l'ischémie cérébrale focale (Alessandrini *et al.*, 1999; Namura *et al.*, 2001). Jusqu'à présent, les mécanismes moléculaires qui assurent le rôle pro-apoptotique de ERK dans les neurones sont encore inconnus. L'étude récente menée par Subramaniam *et al.* démontre que l'activation de ERK pourrait entraîner la dégénérescence neuronale en provoquant des dommages au niveau de la membrane plasmique indépendamment de la caspase-3 (Subramaniam *et al.*, 2004). La localisation subcellulaire de la protéine ERK pourrait entraîner des effets cellulaires différents, de nature anti-apoptotique dans le noyau et de nature pro-apoptotique dans le cytoplasme des neurones. Dans ce cas, la régulation de la localisation sub-cellulaire de la protéine ERK par la  $\beta$ -arrestine 2 pourrait directement réguler son rôle pro- ou anti- apoptotique.

Les mécanismes d'activation de la voie ERK par la  $\beta$ -arrestine 2 n'ont pas encore été étudiés en réponse à l'activation des récepteurs D2. Notre équipe a entrepris l'analyse de l'état d'activation et de la localisation subcellulaire de ERK dans notre modèle *in vitro* de la MH.

Très récemment, les travaux de Beaulieu *et al.* ont permis de révéler un autre rôle important de la  $\beta$ -arrestine 2 pour la régulation par les récepteurs D2 d'une voie de signalisation classiquement décrite comme étant anti-apoptotique. Cette voie de signalisation est celle de la sérine-thréonine kinase Akt (ou PKB). Cible majeure des phosphoinositides 3-kinases (PI3-kinases), Akt exerce ses effets neuroprotecteurs en phosphorylant de nombreux substrats (Franke *et al.*, 2003). Ces substrats comprennent des composants de la machinerie apoptotique (tels que BAD), la glycogène synthase kinase 3b (GSK3b) et les facteurs de transcription de la famille de forkhead (FOXOS). La voie d'Akt est particulière-

ment intéressante pour l'étude de la MH, car l'équipe de Saudou a montré que l'un des substrats de cette kinase pouvait être la huntingtine mutée (Humbert *et al.*, 2002). Lorsque la huntingtine mutée est phosphorylée par Akt, elle perd sa toxicité neuronale. De plus, l'activité d'Akt est altérée chez les malades MH. En effet, les travaux de Colin *et al.* ont montré que, dans des cerveaux *post-mortem* de malades et dans un modèle de rat exprimant la huntingtine mutée dans le striatum, Akt est sous-exprimée dès un stade précoce correspondant à la dysfonction mais non à la mort neuronale, et est clivée par la caspase 3, devenant ainsi complètement inactive, aux stades tardifs de la maladie (Colin *et al.*, 2005). Ces données suggèrent que la voie d'Akt pourrait être impliquée dans la pathogénèse de la MH.

Or, les travaux récents de Beaulieu *et al.* démontrent un lien entre les récepteurs D2 et l'activité de cette voie (Beaulieu *et al.*, 2005). En effet, cette étude révèle que le  $\beta$ -arrestine 2 forme un complexe protéique avec Akt et sa phosphatase PP2A. La formation de ce complexe est stimulée par l'activation des récepteurs D2 et conduit à la déphosphorylation, et ainsi à l'inactivation, de la protéine Akt (Figure 48). Par conséquent, en activant les récepteurs D2, la dopamine inhibe Akt. La huntingtine mutée n'est alors plus phosphorylée par Akt, et peut devenir toxique pour les neurones.

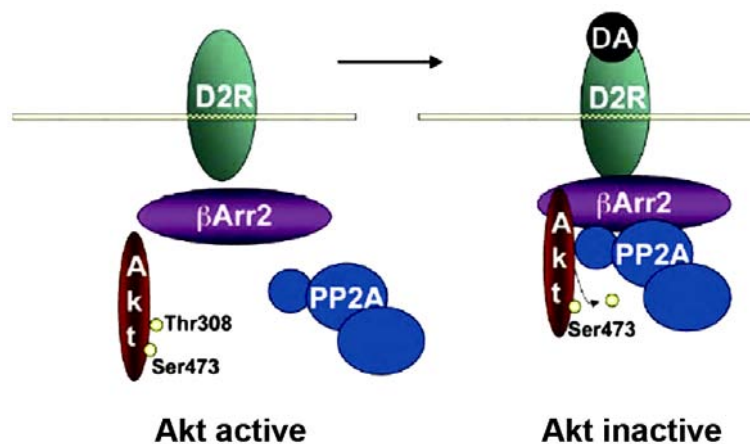


Figure 48 : Schéma modélisant l'inactivation d'Akt par les récepteurs D2 dans les neurones striataux.

La  $\beta$ -arrestine 2 permet de réunir Akt et sa phosphatase PP2A. La formation de ce complexe est stimulée par l'activation des récepteurs D2 et rend Akt inactive. D'après (Beaulieu *et al.*, 2005).

#### Défaut d'endocytose des récepteurs D2 ?

La huntingtine normale interagit directement avec HIP1 et AP2, deux protéines importantes pour la formation des vésicules d'endocytose à clathrine. En favorisant l'assemblage de HIP1 avec AP2 au niveau de la membrane plasmique, la huntingtine normale pourrait elle-même être impliquée dans l'initiation de la formation des vésicules d'endocytose. Il a

récemment été montré que HIP1 joue un rôle essentiel dans le trafic intracellulaire des récepteurs au glutamate de type AMPA (Metzler *et al.*, 2003). En effet, les neurones de souris knock-out pour HIP1 présentent de profondes anomalies de l'internalisation des récepteurs AMPA.

La présence de l'expansion de glutamines diminue l'interaction de la huntingtine avec HIP1 (Gervais *et al.*, 2002). Par conséquent, la huntingtine mutée perd la faculté d'assembler HIP1 et AP2 au niveau de la membrane plasmique, pouvant alors perturber la formation des vésicules d'endocytose à clathrine. La stimulation des récepteurs D2 provoque leur internalisation dans des vésicules à clathrine. Ainsi, la huntingtine mutée pourrait perturber l'internalisation des récepteurs D2 en réponse à la dopamine, ce qui pourrait entraîner une hyperstimulation des récepteurs et des anomalies de la signalisation intracellulaire en aval des récepteurs D2. Il serait intéressant d'étudier le trafic intracellulaire des récepteurs D2 en réponse à la dopamine en présence de la huntingtine normale ou mutée. Si la huntingtine mutée empêche la formation des vésicules d'endocytose à clathrine au niveau des récepteurs D2 activés par la dopamine, l'absence de la  $\beta$ -arrestine 2 devrait reproduire les mêmes effets que la huntingtine mutée sur l'internalisation des récepteurs D2. Il pourrait donc être judicieux d'analyser l'effet de la stimulation des récepteurs D2 sur la survie des neurones striataux provenant de souris knock-out pour la  $\beta$ -arrestine 2.

### *3.2. Récepteurs D2 et agrégats de huntingtine mutée*

Notre étude montre que l'activation des récepteurs D2 augmente la formation d'agrégats de huntingtine mutée dans les neurones striataux. Or chez les patients pré-symptomatiques atteints de MH, les premières structures dans lesquelles apparaissent les agrégats neuritiques sont le globus pallidus externe et la substance noire compacte (Li *et al.*, 2001), deux régions cérébrales dans lesquelles les récepteurs D2 sont fortement concentrés (Floran *et al.*, 1997; Cooper and Stanford, 2001). De plus, chez une souris knock-in qui exprime la huntingtine mutée avec 140 répétitions de glutamines, les premières régions dans lesquelles apparaissent les agrégats nucléaires sont le striatum, le noyau accumbens et les tubercules olfactifs (Menalled *et al.*, 2003). Or il s'agit des trois structures cérébrales dans lesquelles les récepteurs D2 sont le plus fortement exprimés. Ainsi, nos résultats permettent de concilier ces observations neuro-anatomiques et représentent de forts arguments en faveur d'une implication précoce de la stimulation des récepteurs D2 dans la formation des agrégats de huntingtine mutée. Mais comment l'activation des récepteurs D2 peut-elle stimuler la formation d'agrégats de huntingtine mutée ?

### Perturbation du cytosquelette ?

Nos résultats préliminaires indiquent qu'un inhibiteur de la protéine ROCK (Rho-associated Coiled-coil-containing protein Kinase) protège les neurones striataux de l'effet de la stimulation des récepteurs D2 sur la formation d'agrégats de huntingtine mutée et sur la mort. ROCK est un effecteur important de Rho et régule la dynamique des protéines du cytosquelette telles que l'actine (Amano *et al.*, 2000). Son inhibiteur pharmacologique (Y-27632) avait déjà été identifié comme répresseur de la formation d'agrégats de huntingtine mutée dans un modèle Drosophile de la MH (Pollitt *et al.*, 2003). Nos résultats apportent l'information complémentaire d'une éventuelle implication de la voie Rho/ROCK dans l'effet médié par les récepteurs D2.

ROCK est une Ser/Thr kinase, dont l'un des substrats est MAP2, une protéine associée aux microtubules, spécifiquement neuronale (Amano *et al.*, 2003). Elle serait impliquée dans de multiples fonctions, telles que la nucléation et la stabilisation des microtubules et la régulation du transport axonal et dendritique. La phosphorylation de MAP2 contrôle son association avec le cytosquelette, inhibant ses fonctions stabilisatrices, et perturbant ainsi le cytosquelette (Sanchez C. *et al.*, 2000). Comme nous l'avons évoqué précédemment, nos analyses préliminaires de la morphologie dendritique des neurones striataux dans notre modèle *in vitro* montrent une perturbation du marquage MAP2 dans les neurones striataux qui expriment la huntingtine mutée, perturbation qui est aggravée par l'activation des récepteurs D2. L'inhibiteur de ROCK protège les neurones de ces effets (résultats préliminaires). Il serait alors intéressant de rechercher le lien qui pourrait relier la stimulation des récepteurs D2 à l'activation de ROCK.

### 3.3. Effets des récepteurs D2 sur la mort et la formation d'agrégats : une relation de cause à effet ?

Comme dans de nombreuses maladies neurodégénératives, l'une des caractéristiques neuropathologiques de la MH est la formation d'agrégats protéiques insolubles (Taylor *et al.*, 2002). Ces agrégats sont formés, dans le cadre de la MH, par des fragments N-terminaux de huntingtine mutée, qui sont issus de clivages de la protéine par des caspases, calpaines et aspartyl protéases. Les interactions entre les fragments N-terminaux de huntingtine mutée s'établissent par le domaine riche en glutamines et peuvent être stabilisés par l'intervention de transglutaminases. Ces agrégats interagissent également avec d'autres protéines intracellulaires, qu'elles séquestrent en leur sein.

Dans la plupart des maladies neurodégénératives qui sont caractérisées par la formation d'agrégats protéiques insolubles, ces derniers sont reconnus pour jouer un rôle primordial dans le mécanisme pathogénique de la maladie. Par exemple, dans la sclérose la-

térale amyotrophique familiale (fALS), la protéine mutée à l'origine de la maladie est la Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1), une protéine qui permet de neutraliser les radicaux libres. La SOD1 mutée forme des agrégats dans les neurones du cortex moteur et de la moelle épinière. Ces agrégats trappent les protéines du protéasome, comme les agrégats de huntingtine mutée dans la MH (Bence *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2005), bloquant ainsi le fonctionnement du protéasome, et ils provoquent la mort des neurones dans lesquels ils se forment. Une étude par vidéomicroscopie de cellules neuronales PC12 exprimant la SOD1 mutée a montré que 90 % des cellules dans lesquelles se forment des agrégats meurent, et ce, rapidement après l'apparition des agrégats, alors que 70 % des cellules dans lesquelles la SOD1 mutée reste diffuse ne meurent pas (Matsumoto *et al.*, 2005). Les analyses des agrégats au microscope électronique ont montré que les agrégats formés par la SOD1 mutée et ceux formés par la huntingtine mutée possèdent des structures et des morphologies similaires (Bruijn *et al.*, 1997; Bruijn *et al.*, 1998). Cependant, il existe une controverse concernant l'implication des agrégats de huntingtine mutée dans la pathogenèse de la MH. En effet, contrairement à l'expérience menée sur les cellules exprimant la SOD1 mutée, l'analyse en vidéomicroscopie des neurones en culture exprimant la huntingtine mutée montre que les neurones dans lesquels se forment des agrégats survivent plus longtemps que ceux dans lesquels la huntingtine mutée reste diffuse (Arrasate *et al.*, 2004). Cependant, les neurones dans lesquels se forment les agrégats meurent plus vite que les neurones qui expriment la forme normale de la huntingtine. En effet, après 75h d'expression, les neurones dans lesquels la huntingtine mutée forme des agrégats ont un risque de mourir égal à 0,7 alors que les neurones qui expriment la huntingtine normale dans les mêmes conditions ont un risque de mourir égal à 0,35. Ainsi, les neurones striataux dans lesquels se sont formés des agrégats de huntingtine mutée ont deux fois plus de risques de mourir que les neurones striataux qui expriment la huntingtine normale, ce qui suggère que les agrégats représentent également une forme toxique de la huntingtine mutée.

Comme dans de nombreuses études (Kazantsev *et al.*, 2002; Sanchez I. *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2004; Rangone *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005), nos résultats, *in vitro* et *in vivo*, indiquent que la neuroprotection apportée par un antagoniste des récepteurs D2 s'accompagne d'une diminution parallèle du nombre d'agrégats de huntingtine mutée. La forte corrélation que nous avons obtenue dans notre étude *in vivo* entre la diminution du nombre d'agrégats et la protection contre la dysfonction neuronale pour chaque animal suggère fortement que les agrégats sont de bons indicateurs de souffrance cellulaire (Charvin *et al.*, soumis). De plus, chez les malades MH, les premiers neurones dans lesquels apparaissent les agrégats sont également ceux qui dégèrent les premiers, à savoir les

neurones striato-pallidaux, qui sont d'ailleurs porteurs de récepteurs D2 (Reiner *et al.*, 1988; Missale *et al.*, 1998; Glass *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Ainsi, toutes ces données ne permettent pas de résoudre le débat entre un rôle protecteur ou toxique des agrégats de huntingtine mutée, mais elles indiquent que les agrégats peuvent être considérés comme indicateurs de souffrance cellulaire, et de vulnérabilité à la huntingtine mutée.

#### 4. Traitement neuroleptiques : une « nouvelle » thérapie pour la maladie de Huntington ?

Nous avons montré, dans un modèle *in vivo* de la MH, qu'un traitement précoce avec de l'halopéridol décanoate se révèle être une stratégie thérapeutique intéressante puisqu'il diminue la formation d'agrégats et, surtout, il diminue fortement la dysfonction neuronale dans le striatum (Charvin *et al.*, soumis). Ces résultats suggèrent que le traitement avec l'halopéridol décanoate est susceptible de ralentir la progression de la maladie.

Le modèle que nous avons choisi pour réaliser cette étude permet de reproduire les principaux événements neuropathologiques caractéristiques de la MH, à savoir la formation d'agrégats de huntingtine mutée dans les neurites et dans le noyau des neurones, et la dégénérescence progressive des neurones striataux. Il s'agit de rats adultes qui sont infectés simultanément avec des constructions lentivirales codant un fragment N-terminal de la huntingtine normale (avec 19 glutamines) ou mutée (avec 82 glutamines) dans le striatum droit et gauche, respectivement. Dans ce modèle, les premiers agrégats de huntingtine mutée sont détectés dès la première semaine suivant l'infection, puis ils s'accumulent progressivement. La dysfonction neuronale est observée dès la quatrième semaine dans le striatum exprimant la huntingtine mutée, ce qui correspond au pic d'agrégats. La mort des neurones striataux est bien marquée la dixième semaine post-infection (de Almeida *et al.*, 2002). Ce modèle permet ainsi d'étudier les mécanismes moléculaires qui interviennent dans le processus dégénératif des neurones striataux induit par l'expression du fragment N-terminal de la huntingtine mutée. En revanche, le lentivirus codant la huntingtine mutée n'est injecté que dans le striatum. Il permet ainsi d'étudier la vulnérabilité sélective des neurones striataux de projection parmi les cellules du striatum, mais il ne permet pas d'intégrer les effets de la huntingtine mutée dans les cellules non-striatales. Il serait intéressant par exemple d'intégrer les effets de la huntingtine mutée dans les neurones qui se projettent sur le striatum, tels que les neurones corticaux-striataux et les neurones nigro-striataux. Il faudrait pour cela réaliser des injections de lentivirus codant la huntingtine

mutée en plusieurs sites, tels que le cortex et la substance noire compacte. Il serait également intéressant d'étudier les effets de l'halopéridol décanoate dans un modèle de souris transgéniques comme par exemple les souris knock-in qui expriment la huntingtine mutée avec 140 répétitions de glutamines et chez lesquelles les agrégats ne se forment que dans les régions riches en récepteurs D2 (Menalled *et al.*, 2003).

La perspective de bloquer l'activation des récepteurs D2 pour protéger les neurones striataux de la toxicité de la huntingtine mutée n'était *a priori* pas garantie. En effet, en plus des récepteurs situés sur les neurones striataux de projection, les récepteurs D2 sont également présents sur les terminaisons cortico-striatales, au niveau desquelles ils sont supposés diminuer la libération de glutamate (Bamford *et al.*, 2004a; Bamford *et al.*, 2004b). Par conséquent, l'inhibition des récepteurs D2 par l'halopéridol aurait pu provoquer une perte de l'inhibition de la libération du glutamate, et ainsi une excitotoxicité glutamatergique et donc une vulnérabilité accrue des neurones striataux. Or, dans notre étude, l'halopéridol décanoate injecté à des rats contrôles n'ayant reçu aucune injection lentivirale (n'exprimant donc que la huntingtine endogène) n'entraîne ni dysfonction ni mort des neurones striataux. De plus, une étude récente a recherché les effets d'un traitement de six mois de rats adultes avec de l'halopéridol décanoate (injection intramusculaire, 38 mg/Kg/mois) sur les taux de glutamate et d'autres métabolites (N-acétyl aspartate, glutamine, choline, ...) dans différentes régions cérébrales (Bustillo *et al.*, 2005). Cette étude démontre que le traitement n'engendre aucune modification dans les concentrations de glutamate et des autres métabolites, et ce, quelle que soit la structure cérébrale analysée. Ainsi, la libération de glutamate reste inchangée dans le striatum après un traitement de longue durée avec l'halopéridol décanoate. L'équipe de Borrelli a montré que la modulation de la libération de glutamate implique préférentiellement les récepteurs D2S (petite isoforme du récepteur D2) (Centonze *et al.*, 2004). Ainsi, le fait que le traitement avec l'halopéridol décanoate ne modifie pas la libération de glutamate pourrait s'expliquer par un effet antagoniste préférentiel de l'halopéridol sur les récepteurs D2L.

#### Traitement pré-symptomatique : est-ce possible ?

Actuellement, la plupart des malades MH reçoivent un traitement symptomatique à base de neuroleptiques, dont l'halopéridol, qui présentent des propriétés d'antagonistes plus ou moins spécifiques des récepteurs D2, sans que ce traitement n'ait pu démontrer de ralentissement de la progression de la maladie. Mais ce traitement n'est administré qu'après l'apparition des symptômes, alors que la dégénérescence des neurones striataux porteurs de récepteurs D2 commence avant l'apparition des symptômes, au grade qui a été

qualifié de « grade 0 » sur l'échelle de Vonsattel (Vonsattel *et al.*, 1985; Glass *et al.*, 2000). Nous proposons qu'un traitement avec un antagoniste très spécifique des récepteurs D2, tel que l'halopéridol, administré à un stade précoce de la maladie pourrait ralentir sa progression. Dans l'étude que nous avons menée *in vivo*, nous avons débuté le traitement avec l'halopéridol décanoate chez des rats qui ne présentaient aucun signe neuropathologique, c'est-à-dire avant l'apparition des agrégats et de la dysfonction neuronale. Est-il possible de commencer un traitement à un stade si précoce chez les malades ?

#### 4.1. Suivi des personnes porteuses de la mutation MH

La MH est une maladie héréditaire, à transmission autosomique dominante. A l'exception des néo-mutations, les malades ont donc l'un de leurs parents qui était atteint de MH. Il est alors possible de suivre assez précocement les personnes dites « à risque », qui ont un risque sur deux d'avoir hérité de la mutation pathogène. D'autre part, la MH est une maladie monogénique pour laquelle il existe un test génétique qui permet de détecter le nombre de répétitions CAG dans le gène *IT15*, et par conséquent, ce test génétique permet d'affirmer si le patient est porteur ou non de la mutation.

Ainsi, il est tout à fait possible d'identifier les porteurs de la mutation MH avant l'apparition des premiers symptômes.

#### 4.2. Détermination du stade pré-symptomatique à partir duquel il faudrait agir

Le dysfonctionnement des neurones striataux porteurs de récepteurs D2 commence au grade 0 de la MH, c'est-à-dire avant l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie. La difficulté d'un traitement efficace ciblant les récepteurs D2 consiste à déterminer le moment où le traitement doit débiter.

Il existe une forte corrélation inverse entre le nombre de répétitions CAG dans le gène *IT15* et l'âge d'apparition des symptômes (Kiebertz *et al.*, 1994; Wexler *et al.*, 2004). Connaissant le nombre de répétitions CAG chez un individu porteur de la mutation, il est donc possible de cibler une tranche d'âge dans laquelle les symptômes cliniques ont la plus grande probabilité de se déclarer. Une étude récente des volumes du striatum par IRM chez des porteurs de la mutation MH non symptomatiques a montré que l'atrophie du striatum commence de nombreuses années avant l'apparition des symptômes cliniques, en moyenne 11 ans avant l'âge d'apparition des symptômes prédit par le nombre de répétitions CAG (Aylward *et al.*, 2004).

De plus en plus d'études cliniques proposent des examens permettant de suivre l'évolution de la MH et de déterminer à quel stade, y compris pré-symptomatique, se trouve un patient. Ces examens reposent souvent sur des techniques d'imagerie cérébrale,



mesurant notamment l'activité métabolique du noyau caudé et du putamen et montrant qu'une diminution du métabolisme du glucose est observée dans ces structures au stade pré-symptomatique (Mazziotta *et al.*, 1987; Grafton *et al.*, 1990, 1992; Feigin *et al.*, 2001). Mais il a également été montré que l'hypométabolisme du glucose dans le striatum est corrélé avec la perte de liaison du raclopride, et donc des récepteurs D2 (Antonini *et al.*, 1996). Par conséquent, la mesure du métabolisme du glucose dans le striatum pourrait être un marqueur trop tardif de dysfonction neuronale pour débiter un traitement avec un antagoniste des récepteurs D2.

En revanche, une étude récente montre qu'il existe des marqueurs sanguins permettant de suivre la progression de la MH et de discerner les stades pré-symptomatiques précoces, pré-symptomatiques tardifs et symptomatiques (Borovecki *et al.*, 2005). Ces marqueurs sont les ARNm de 12 gènes, dont l'augmentation d'expression induite par la huntingtine mutée est détectable par QRT-PCR dans les cellules sanguines. Ainsi, cette étude très prometteuse suggère qu'il est possible de suivre l'évolution de la MH chez un patient, par une simple prise de sang, pouvant même identifier la progression de la maladie aux stades pré-symptomatiques.

#### 4.3. Traitement à long terme avec l'halopéridol

Puisqu'il semble possible de déterminer à quel stade pré-symptomatique un traitement avec un antagoniste des récepteurs D2 devrait être entrepris pour ralentir la progression de la maladie, cela suggère que le patient devra suivre ce traitement pendant de longues années. Or les traitements neuroleptiques à long terme peuvent entraîner chez les malades des effets secondaires tels qu'un syndrome extra-pyramidal. Pour éviter ces effets secondaires, qui sont dus au blocage des récepteurs D2, il pourrait être préférable de développer des stratégies thérapeutiques ciblant les mécanismes moléculaires en aval des récepteurs D2. D'après nos données préliminaires, l'inhibiteur pharmacologique de ROCK, le Y-27632, apporte les mêmes effets *in vitro* que l'antagoniste des récepteurs D2. Il protège en effet les neurones striataux en culture de la toxicité de la dopamine et de la huntingtine mutée, et il prévient l'effet potentialisateur de la dopamine sur la formation d'agrégats. L'inhibition de ROCK par le Fasudil a été largement étudiée chez l'homme au Japon pour le traitement de maladies cardiovasculaires. Toutes les données disponibles indiquent que le Fasudil est bien toléré chez l'homme et n'entraîne pas d'effet secondaire important, ce qui indique que ROCK est une cible thérapeutique intéressante (Hirooka and Shimokawa, 2005). Par contre, la pénétration dans le cerveau du Fasudil administré par voie orale est très faible, tout comme celle du Y-27632 (Mueller *et al.*, 2005).

En attendant de développer nos connaissances sur les mécanismes en aval des récepteurs D2 qui sont impliqués dans la vulnérabilité des neurones striataux à la huntingtine mutée, il peut être intéressant de proposer un traitement précoce avec de l'halopéridol aux malades atteints de MH. En effet, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement susceptible de ralentir la progression de la maladie. De plus, malgré les effets secondaires d'un traitement à long terme avec l'halopéridol, celui-ci est largement utilisé pour soigner les malades atteints de schizophrénie par exemple. Nous proposons ainsi qu'un traitement pré-symptomatique avec l'halopéridol pourrait être un atout thérapeutique intéressant.

## Conclusion & Perspectives

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire qui se transmet selon un mode autosomique dominant. Elle concerne 6.000 malades en France, et plus de 12.000 personnes qui sont porteuses de la mutation et qui sont provisoirement indemnes de signes cliniques. Les symptômes de cette maladie ne se déclarent le plus fréquemment qu'entre 35 et 42 ans. Il s'agit de troubles moteurs de types mouvements anormaux (chorée), de déficits cognitifs et psychiatriques qui évoluent sans cesse au fil du temps. Il n'existe pas de thérapie permettant de stopper ni même de ralentir la progression de la MH, qui conduit alors inexorablement à la mort des malades après 15 à 20 ans d'évolution.

L'origine moléculaire de la MH est connue depuis plus de 10 ans. Il s'agit d'une expansion de triplets CAG dans le gène *IT15*, qui se traduit en une répétition anormalement longue de glutamines dans la partie N-terminale de la protéine huntingtine. La fonction de la huntingtine n'est toujours pas clairement définie, même si les connaissances sur ce sujet ne cessent de progresser. L'expansion de glutamines modifie la conformation de la huntingtine et lui confère de nouvelles propriétés, dont celle de former des agrégats intraneuronaux. Cette mutation la rend également toxique pour une certaine catégorie de cellules : les neurones GABAergiques du striatum (noyau caudé/putamen). Les processus pathophysiologiques de la MH restent incompris, et parmi les questions les plus intéressantes reste celle de la vulnérabilité spécifique des neurones striataux. En effet, pourquoi, alors que la huntingtine mutée est exprimée dans toutes les cellules de l'organisme, les neurones GABAergiques du striatum sont-ils les plus vulnérables dans la MH ? Répondre à cette question pourrait permettre de soigner plus efficacement les malades atteints de MH, puisqu'à la fois l'évolution et la sévérité des symptômes sont directement corrélées au niveau d'atrophie du noyau caudé (Aylward *et al.*, 2000).

Plusieurs mécanismes sont susceptibles d'être impliqués dans la vulnérabilité des neurones striataux. D'une part, la huntingtine mutée diminue la libération de BDNF dans les terminaisons cortico-striatales (Thompson, 2003; Gauthier *et al.*, 2004). Recevant moins de BDNF, les neurones striataux sont plus vulnérables aux stress cellulaires. D'autre part, les neurones striataux reçoivent d'importantes afférences glutamatergiques, qui pourraient devenir excitotoxiques par un mécanisme qui n'a pas encore été clairement établi dans la MH. Enfin, le striatum est la structure cérébrale qui reçoit la plus grande innervation dopaminergique et la dopamine peut, dans certaines conditions, se révéler toxiques pour les neurones striataux. Nous avons ainsi choisi d'explorer le rôle que pouvait jouer la dopamine dans la vulnérabilité des neurones striataux à la huntingtine mutée.

Les travaux effectués au cours de ma thèse nous ont permis de démontrer que la dopamine a un double rôle à jouer dans la vulnérabilité des neurones striataux dans la MH (Charvin *et al.*, 2005). D'une part, la dopamine produit des radicaux libres qui agissent en synergie avec la huntingtine mutée pour activer la voie de signalisation intracellulaire JNK/c-Jun. Ainsi, la dopamine renforce fortement, dans les neurones striataux, l'activation de cette voie pro-apoptotique qui peut être faiblement activée par la huntingtine mutée seule (Garcia *et al.*, 2004), dans toutes les cellules où elle est exprimée. D'autre part, en activant les récepteurs D2, la dopamine favorise la mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée, et favorise également la formation d'agrégats. Ainsi, l'expression des récepteurs D2 peut constituer un facteur de vulnérabilité à la présence de la huntingtine mutée.

L'exploration de l'influence de la dopamine sur les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée et la dissection des voies moléculaires lui permettant d'assurer ses effets nous ont permis d'identifier plusieurs cibles thérapeutiques prometteuses pour la MH. L'une de ces cibles est la production de radicaux libres par la dopamine, ou l'activation de la voie JNK/c-Jun. En effet, le blocage de l'un ou l'autre de ces événements est neuroprotecteur pour les neurones striataux exprimant la huntingtine mutée et recevant de la dopamine, *in vitro* (Charvin *et al.*, 2005). Le traitement avec un antioxydant, l'ascorbate, s'est déjà montré bénéfique sur les symptômes moteurs de souris transgéniques MH (les souris R6/2) (Rebec *et al.*, 2003). L'inhibition de la voie JNK/c-Jun est quant à elle une stratégie thérapeutique de plus en plus étudiée pour soigner les maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson. Etre capable de cibler la forme de JNK (JNK1, JNK2 ou JNK3) qui est impliquée dans la mort des neurones striataux dans la MH permettrait de s'affranchir d'effets secondaires indésirables, liés aux fonctions physiologiques des protéines JNK.

L'autre stratégie thérapeutique identifiée dans notre étude consiste à bloquer l'activation des récepteurs dopaminergiques de type D2 à un stade précoce de la maladie (Charvin *et al.*, soumis). Nous proposons pour cela d'administrer aux patients MH qui se trouvent à un stade pré-symptomatique, un traitement avec le neuroleptique halopéridol, qui est un antagoniste très spécifique des récepteurs D2. Ce type de traitement est largement utilisé dans le cadre de la schizophrénie, et pourrait permettre de ralentir la progression de la MH.

Enfin, pour contourner les effets secondaires qui sont liés au blocage des récepteurs D2, nous proposons de poursuivre l'analyse des mécanismes moléculaires qui font le lien entre la stimulation des récepteurs D2 et la mort des neurones striataux exprimant la huntingtine mutée. Nous avons pour cela ouvert plusieurs pistes de recherche, telles que

l'analyse de l'état d'activation de la voie ERK dans des modèles MH, de l'implication de l'endocytose des récepteurs D2, du rôle de la protéine ROCK et de la perturbation du cytosquelette.

# Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus

Delphine Charvin<sup>1</sup>, Carmen Cifuentes-Diaz<sup>1</sup>, Nuria Fonknechten<sup>2</sup>, Vandana Joshi<sup>1</sup>, Jamilé Hazan<sup>2</sup>, Judith Melki<sup>1,\*</sup> and Sandrine Betuing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Neurogenetics Laboratory, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), E-0223 Université d'Evry, GENOPOLE, Evry, France and <sup>2</sup>Genoscope, Centre National de Séquençage, and CNRS UMR 8030, Evry, France

Received August 27, 2002; Revised and Accepted November 1, 2002

---

**Mutations of spastin are responsible for the most common autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia (AD-HSP), a disease characterized by axonal degeneration of corticospinal tracts and posterior columns. Generation of polyclonal antibodies specific to spastin has revealed two isoforms of 75 and 80 kDa in both human and mouse tissues with a tissue-specific variability of the isoform ratio. Spastin is an abundant protein in neural tissues and immunolabeling experiments have shown that spastin is expressed in neurons but not in glial cells. These data indicate that axonal degeneration linked to spastin mutations is caused by a primary defect of neurons. Protein and transcript analyses of patients carrying either nonsense or frameshift spastin mutations revealed neither truncated protein nor mutated transcripts, providing evidence that these mutations are responsible for a loss of spastin function. Identifying agents able to induce the expression of the non-mutated spastin allele should represent an attractive therapeutic strategy in this disease.**

---

## INTRODUCTION

Hereditary spastic paraplegia (HSP) is a group of clinically and genetically heterogeneous neurodegenerative disorders characterized by axonal degeneration of corticospinal tracts and posterior columns. HSP is inherited as an autosomal dominant (AD-HSP), autosomal recessive (AR-HSP) or X-linked recessive disorder (X-HSP). Six genes responsible for HSP have been identified so far. Mutations of the PLP or L1-CAM genes, encoding the myelin proteolipid protein or the neural cell adhesion molecule, respectively, are responsible for either pure or complicated X-HSP (1–3). Mutations of paraplegin, a mitochondrial member of the AAA family (for ATPases associated with various cellular activities) were found to be associated with AR-HSP linked to chromosome 16q24.3 (4). In AD-HSP forms, three genes have been identified. The most prevalent form of AD-HSP (40%) is linked to the SPG4 locus on chromosome 2p21 which encodes a novel protein named spastin (5–10). More recently, two other genes responsible for AD-HSP have been identified on chromosome 14q11 (SPG3) or 2q24 (SPG13), encoding a novel protein containing a conserved GTPase domain or the mitochondrial chaperonin

Hsp60, respectively (11,12). The identification of six different genes responsible for HSP highlighted the diversity of molecular defects leading to axonal degeneration of corticospinal tracts.

It has been shown that the spastin gene is ubiquitously expressed and encodes a protein of 616 amino acids with tight homology of the carboxy terminus (residues 342–599) to members of the AAA protein family (5). In addition, a putative nuclear localization signal (RGKKK) was detected at positions 7–11 of the human amino acid sequence (5). We report here the production of polyclonal antibodies specific to spastin and show that spastin is a protein that is highly expressed in neuronal tissues both in human and mouse. These data suggest a determining role of spastin in neuronal network or neurons which may account for the neurodegenerative process found in HSP. In addition, immunolabeling experiments on neuronal tissues have shown that spastin is a nuclear protein with an expression pattern restricted to neurons, providing strong evidence that axonal degeneration of corticospinal tracts is caused by a primary defect of spastin in neurons but not glial cells. Finally, immunoblot analysis of spastin in lymphoblastoid cell lines of HSP patients carrying either nonsense or frameshift

---

\*To whom correspondence should be addressed at: Molecular Neurogenetics Laboratory, INSERM, Université d'Evry, E-0223, GENOPOLE, 2 rue Gaston Crémieux, CP5724, 91057 Evry, France. Fax: +33 160874550; Email: j.melki@genopole.inserm.fr

mutations of spastin gene, the most frequent mutations found in HSP patients, did not reveal truncated protein, which strongly supports the view that loss of spastin function is the pathogenic mechanism underlying this form of HSP.

## RESULTS

### Generation of polyclonal antibodies specific to spastin

Peptides 176 and 177 were chosen in regions of the human amino acid sequence located outside the AAA cassette and showing no homology with other members of the AAA protein family. Peptides 176 (residues 129–143) and 177 (residues 204–218) are encoded by nucleotide sequences overlapping exons 1–2 and 4, respectively. The peptides were synthesized, coupled with KLH and injected into rabbits. The best immune response was obtained with antiserum 7627 (corresponding to peptide 176) and 7730 (corresponding to peptide 177) as monitored by an ELISA (data not shown). Antisera were purified by immunoaffinity beads bearing the corresponding peptides. A fragment of murine spastin cDNA encoding the amino acid sequence from residues 118–286 was amplified from reverse-transcribed total RNA of mouse brain and cloned into the expression plasmid, pGEX-KG. Sequence analysis of cloned cDNA showed a nucleotide sequence identical to mouse spastin cDNA (data not shown). After transformation into DH5 $\alpha$  *E. coli* strain, expression of a protein of the expected size was induced (data not shown). Both antisera were shown to recognize the recombinant murine spastin protein on western blot while pre-immune sera did not cross-react with the recombinant spastin protein nor bacterial proteins (Fig. 1).

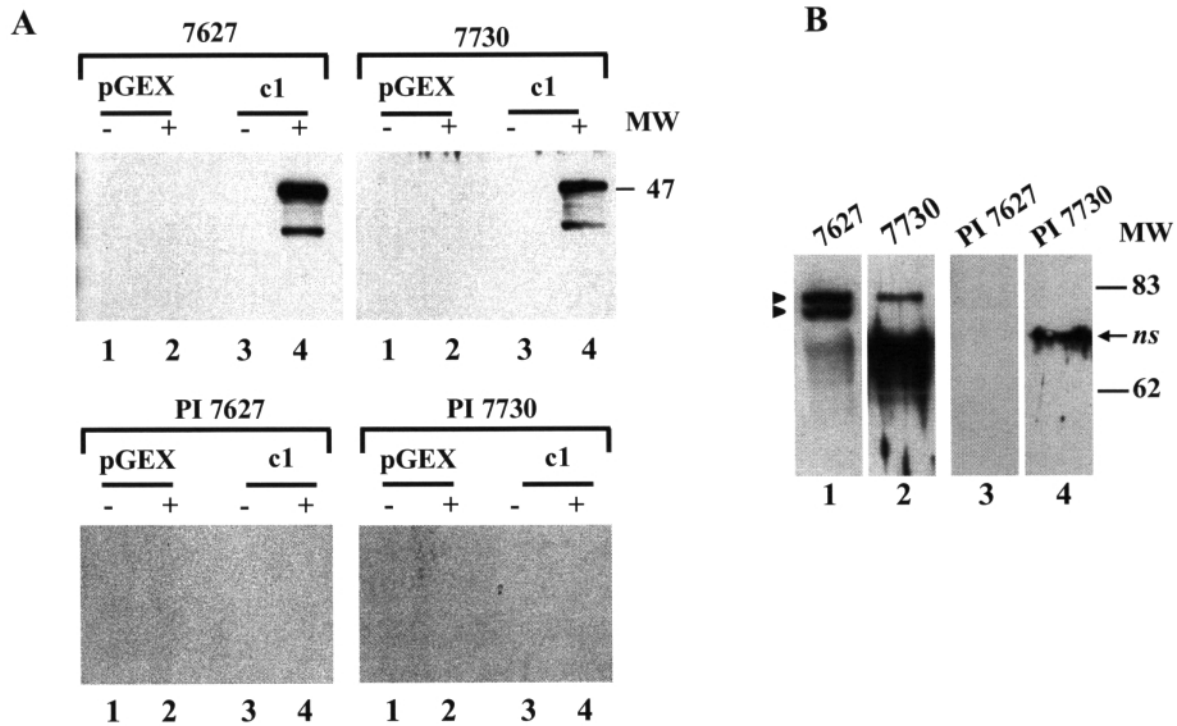
### Spastin is a nuclear protein highly expressed in neural tissues

To determine the expression and subcellular localization of spastin, immunoblot and immunolabeling experiments were performed on human cell lines or tissues and mouse tissues. Western blot analysis of proteins extracted from lymphoblastoid cell lines of human healthy subjects revealed two bands of 75 and 80 kDa, and of 80 kDa only by using the polyclonal antibodies 7627 and 7730, respectively (Fig. 1). No band of similar size was detected using corresponding pre-immune sera (Fig. 1). To determine the expression pattern of spastin, immunoblot analysis of proteins extracted from various mouse tissues was performed. By using the 7627 antiserum, bands identical in size to those detected in human lymphoblastoid cell lines were observed with marked variability of the isoform ratio 80:75 kDa among the mouse tissues examined (Fig. 2). No cross-reacting proteins were detected with pre-immune serum (Fig. 2). The antiserum 7730 does not cross-react with mouse endogenous spastin (data not shown). Interestingly, the highest level of spastin expression was observed in the brain while low amount was noticed in other tissues including kidney, lung, spleen, heart and skeletal muscle, as determined by comparison of spastin with actin expression. In addition, studying various regions of the human brain revealed high expression of spastin in the cortex and striatum, while no expression was detectable in the cerebellum (Fig. 2). Although spastin is ubiquitously

expressed, high expression in defined areas of the brain suggests an important role of spastin in these neuronal structures. These results may account for the neurodegenerative process found in HSP disease linked to spastin mutations.

Recent data have shown the presence of alternative splicing events of spastin transcripts including or excluding exon 4, 8 or 15 in lymphoblastoid cell lines (8). To determine whether the protein isoforms of 75 and 80 kDa might result from alternative splicing events, RT-PCR amplification analysis of spastin transcripts was performed. The main RNA product consisted of full-length transcript whereas a minor product arising from alternative splicing of exon 4 was observed in lymphoblastoid cell line as previously described (Fig. 2). In mouse tissues, amplification of exons 3–16 revealed two PCR products, corresponding to full-length and truncated transcripts lacking exon 4, as determined by direct sequence analysis of PCR amplification products (Fig. 2 and data not shown). Marked tissue-specific variability of the ratio of full length to truncated transcripts was observed in mouse tissues (Fig. 2). These data indicate that spastin transcripts undergo alternative splicing of exon 4 which is conserved through species and appears to be tightly regulated in tissues. This post-transcriptional event might lead to the generation of protein isoforms. However, the resolution of western blot gel did not allow to determine whether the two bands detected by 7627 antiserum corresponded to alternatively spliced products or to additional post-translational modifications. Nevertheless, comparison of spastin transcript with protein profiles failed to reveal a direct correlation of the amount of the full-length versus truncated spastin transcripts with protein isoforms in either mouse tissues or human lymphoblastoid cell lines (Fig. 2). These data suggest that, in addition to or as a consequence of alternative splicing of spastin exon 4, post-translational modifications of spastin occur in a tissue-specific regulated manner. Consistently, protein isoforms of 75 and 80 kDa migrate more slowly than expected from the predicted size of spastin (67 kDa) on SDS-PAGE and several putative phosphorylation or glycosylation sites have been predicted along the spastin amino acid sequence, including the region encoded by exon 4 through Prosite database analysis (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>). Further investigations are required to elucidate the link between the alternative splicing event of exon 4 and putative post-translational modifications of spastin.

To determine the subcellular localization of spastin, immunolabeling experiments were performed by using 7627 polyclonal antibodies or pre-immune serum on mouse tissues including spinal cord, liver and kidney or HeLa cell line. On HeLa cell line, 7627 antiserum revealed a nuclear staining outside the nucleolus and failed to detect cytoplasmic labeling (Fig. 3). Double labeling with DAPI and 7627 antiserum confirmed the nuclear localization of spastin. On transverse frozen sections of mouse spinal cord, 7627 antiserum revealed a strong nuclear labeling of spinal cord cells with large nuclei (Fig. 3). To identify cells expressing spastin, double labeling experiment of spastin and choline acetyl transferase, an enzyme specific to motor neurons, was performed. Spastin was expressed in motor neurons of the anterior horns but not in the neighboring cells (Fig. 3). Furthermore, the double-labeling experiment of spastin and the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) showed that spastin was not expressed in nuclei of



**Figure 1.** Detection of recombinant and endogenous spastin protein using 7627 and 7730 antisera. (A) Fusion GST-spastin protein (residues 118–286, c1) or GST expression alone was induced in *E. coli* with IPTG. Immunoblot analysis of proteins extracted from non-induced (-) or induced (+) transformed bacteria. 7627 and 7730 antisera reveal a protein of 47 kDa corresponding to the recombinant GST-spastin protein (c1) but not GST alone (pGEX, upper panel). The smaller band seen in lane 4 probably corresponds to shorter translational product. Pre-immune sera did not cross-react with the recombinant spastin protein nor bacterial proteins (lower panel). (B) Western blot analysis of proteins extracted from lymphoblastoid cell line of healthy human subject. 7627 antiserum reveals two bands of 75 and 80 kDa (lane 1, arrowheads) while 7730 antiserum reveals the band of 80 kDa only (lane 2). A non-specific band of smaller size was detected using either 7730 immune or pre-immune sera (lanes 2 and 4, NS).

astrocytes (Fig. 3). These data indicate that, in neural tissues, spastin expression was specific to neurons. Nuclear localization of spastin was further confirmed by immunofluorescence studies of other tissues including liver and kidney (data not shown, available on request). Pre-immune serum did not detect nuclear or cytoplasmic labeling in either mouse or human cells suggesting that nuclear labeling was specific to spastin protein (Fig. 3). The nuclear localization of spastin in both human and mouse is consistent with the presence of a putative nuclear localization signal in the N-terminal region of human spastin amino acid sequence. Importantly, the expression of spastin restricted to neurons strongly supports the view that HSP linked to spastin mutations is caused by a primary defect of neurons but not secondary to glial cell defect.

#### Evidence for a loss of function of mutated spastin allele

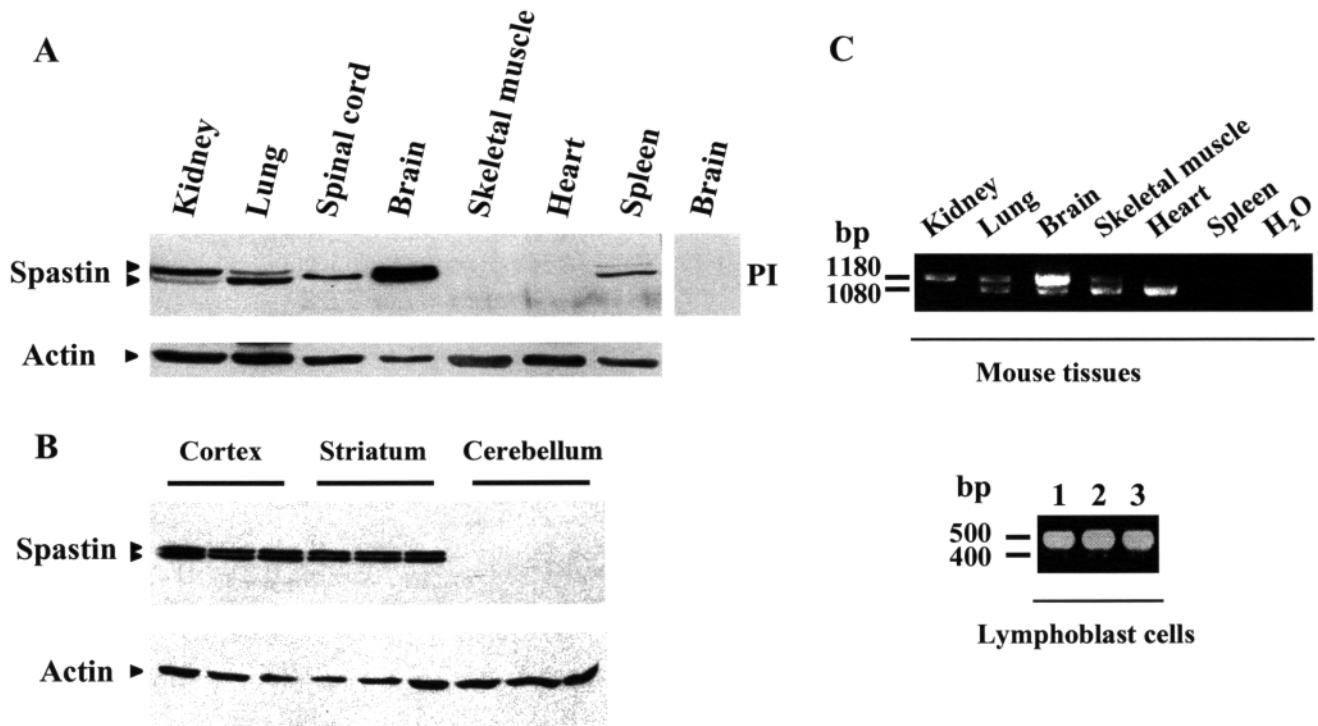
The generation of polyclonal antibodies against spastin led us to investigate protein expression in lymphoblastoid cell lines from patients carrying nonsense (Q193Stop and Q229Stop), frameshift (1634del22) or missense mutations (C448Y) as previously described (6). The nonsense mutations at position 702 or 873 result in premature stop codon which leads to loss of 423 and 387 amino acids, respectively. The frameshift mutation at position 1634 leads to an expected shorter protein of 490 amino acids. Immunoblot analysis did not reveal

truncated spastin protein corresponding to the mutated allele by using 7627 antiserum that recognizes a peptide encoded by sequence overlapping exons 1 and 2, thereby located upstream from the mutations (Fig. 4). These data indicate that nonsense or frameshift mutations result in the absence of mutated spastin protein. In addition, reduced amount of spastin was observed in patients carrying nonsense mutations but not in the one carrying missense mutation when compared with control subjects and actin expression. To determine whether the absence of truncated spastin protein was caused by instability of mutated transcripts, semi-quantitative RT-PCR amplification analysis of spastin RNA was performed. Reduced amount of spastin transcript was observed in patients carrying nonsense or frameshift mutations when compared to control individuals and actin transcripts (Fig. 4). In addition, sequence analysis of transcripts from these patients revealed wild-type transcript only, while both mutated and wild-type alleles were identified by sequence analysis of spastin gene in patients (data not shown). These data demonstrate that nonsense or frameshift mutations of spastin gene results in instability of mutated transcripts, leading to reduced amount of spastin protein.

#### DISCUSSION

Using peptides deduced from the human spastin amino acid sequence, rabbit polyclonal antibodies were produced and two





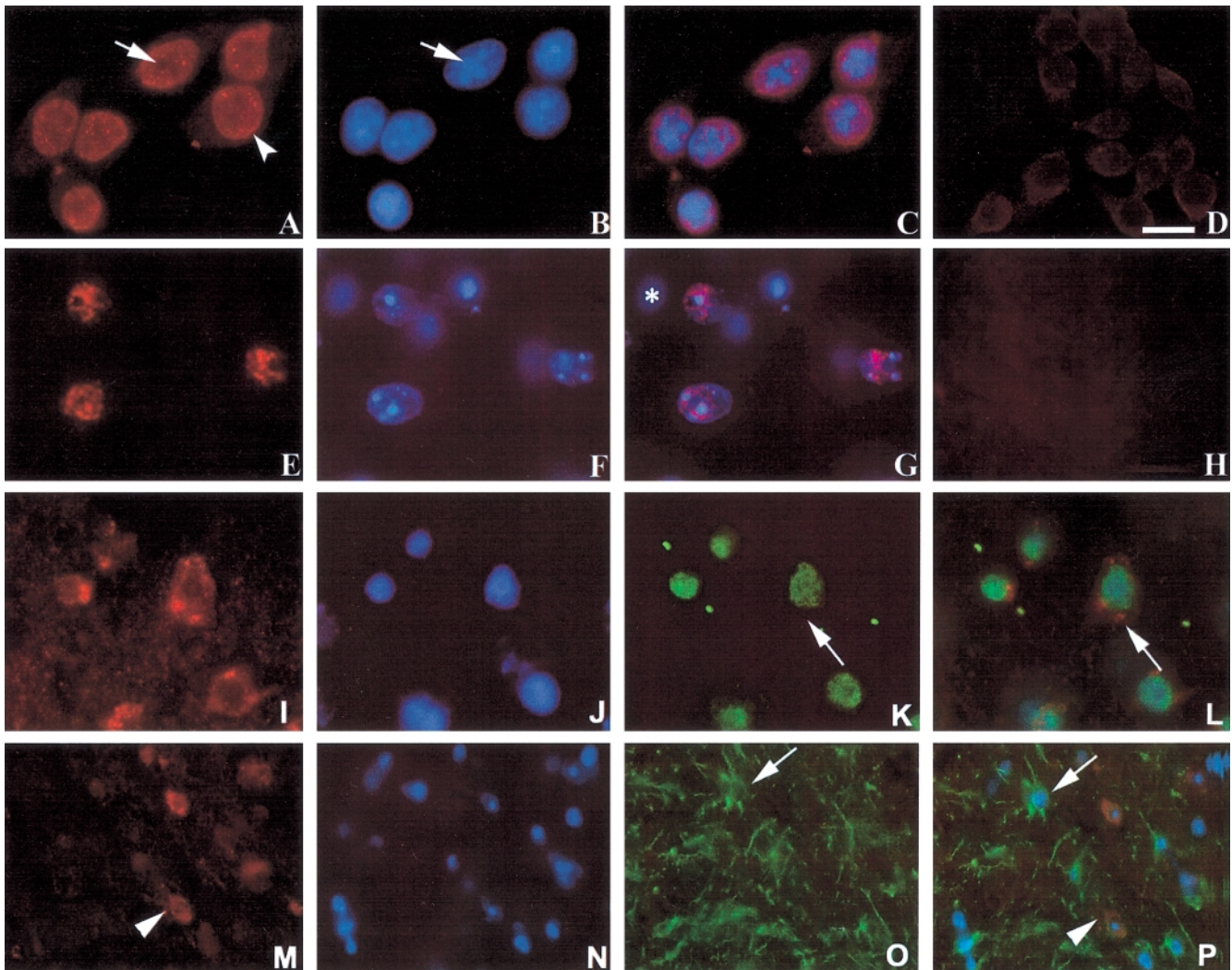
**Figure 2.** Analysis of spastin protein and transcripts of mouse and human tissues. (A) In mouse tissues, immunoblot analysis of spastin reveals two bands identical in size to those detected in human cell lines by using the 7627 antiserum. The ratio between the two isoforms is highly variable among the mouse tissues analyzed. Pre-immune serum did not cross-react with mouse proteins (PI). Note the high expression of spastin in brain when compared with other tissues. (B) Immunoblot analysis of spastin in various areas of human brain. Note the expression of spastin in cortex and striatum but not in cerebellum. Actin was used as internal control of loading in A and B. (C) Alternative splicing of spastin exon 4 in human cell line and mouse tissues. RT-PCR amplification of murine spastin transcripts from exons 3–16 reveals transcripts retaining (1180 bp) or lacking (1080 bp) exon 4. The ratio between full-length and truncated forms is variable among the tissues examined (upper panel). RT-PCR amplification of human spastin transcript was performed from exons 3–7 and shows that full-length transcript (500 bp) is more abundant than transcript lacking exon 4 (400 bp) in human lymphoblastoid cell line (lower panel).

antisera (7627 and 7730) recognize the recombinant spastin protein expressed in *E. coli*. Immunoblots of proteins extracted from various tissues or cell lines of either human or mouse revealed two bands of 75 and 80 kDa by using the 7627 antiserum, while no band of similar size was detectable using the corresponding pre-immune serum. In human, anti-serum 7730 directed against another spastin epitope recognizes the same 80 kDa band as the one detected by 7627, which further supports the specificity of our polyclonal antibodies. Interestingly, the peptide detected by 7730 anti-serum is encoded by exon 4, while the one detected by 7627 anti-serum is encoded by exons 1–2, suggesting that 7730 antiserum is isoform-specific. Consistently, RT-PCR amplification analysis of spastin transcripts from either human or mouse tissues has revealed an alternative splicing of spastin exon 4. These data suggest that 7730 antiserum is specific to full-length isoform while 7627 is able to detect both full-length and truncated isoforms lacking sequence encoded by exon 4. In addition, several consensus sites for glycosylation or phosphorylation were found along the spastin amino acid sequence, including the region encoded by exon 4, which may lead to tissue-specific variability of spastin isoform ratio.

Spastin is an abundant protein in neuronal tissues and immunofluorescence microscopy analysis revealed an expression in neurons but not in glial cells. These data suggest a

determining role of spastin in neuronal network, which is consistent with the neurodegenerative process found in HSP disease linked to spastin mutations. Moreover, these results provide evidence that axonal degeneration of corticospinal tracts is caused by a primary defect of neurons. Mutations of genes encoding proteins with various functions are responsible for HSP. Interestingly, mutations of the PLP gene which encodes the myelin proteolipid protein, a protein specific to oligodendrocyte, is responsible for either pure or complicated spastic paraplegia (1), while our data have shown that spastin expression is restricted to neurons. These data reveal that defects arising from glial cells or neurons might result in axonal degenerative process, leading to a similar clinical phenotype.

Immunolabeling experiments have shown that spastin protein is localized in the nucleus outside the nucleolus both in HeLa cells or mouse tissues including spinal cord, liver and kidney. No cross-reacting protein was detected using the pre-immune serum, suggesting that the nuclear signal was specific to spastin. We did not observe cytoplasmic staining in all tissues examined. Recent data have shown that various cell lines, including HeLa cells, transiently transfected with epitope-tagged spastin constructs revealed a protein similar in size to that detected with our polyclonal antibodies but localized in perinuclear (cytoplasmic) compartment when detected with anti-tag antibodies (13). The lack of immunohistochemical

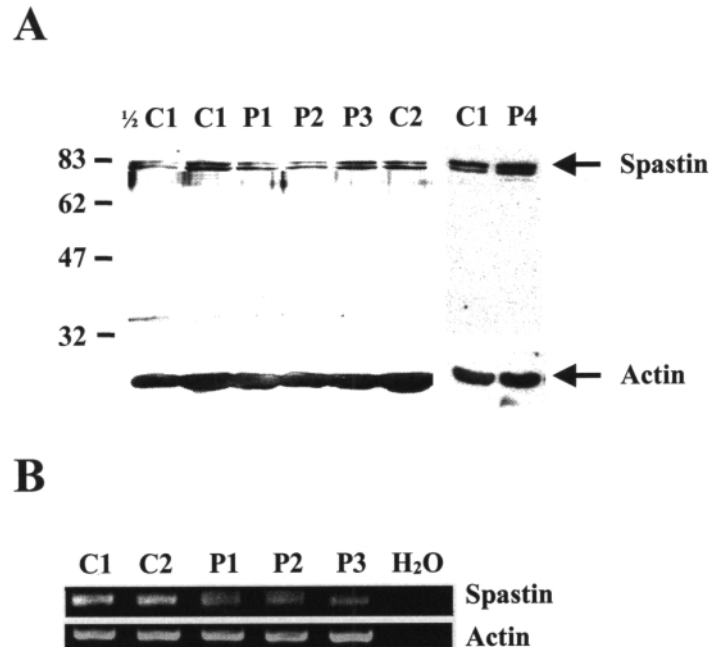


**Figure 3.** Nuclear localization of endogenous spastin in HeLa cells (A–D) and mouse motor neurons (E–P). Double labeling of spastin and nuclei was performed by using immune serum (7627, A, E, K, M) and DAPI (B, F, J, N) in HeLa cells and transverse sections of spinal cord. In HeLa cells (A–D), spastin is localized in nuclei (arrowhead) outside the nucleolus (arrow). In spinal cord (E–H), note that spastin is expressed in cells with large nuclei. The asterisk points to spastin-negative cell (G). Triple labeling experiment of ChAT (I), spastin (K) and nuclei (J) on transverse section of spinal cord revealed a high expression of spastin in motor neuron nuclei (arrow). Superimposed view of DAPI, ChAT and spastin labeling (L). Triple labeling experiment of spastin (M), nuclei (N) and GFAP (O) on transverse section of spinal cord revealed a nuclear localization of spastin in neurons (arrow head) but not in astrocytes (arrow). Superimposed view of DAPI, GFAP and spastin labeling (P). No cross-reacting protein was observed by using the pre-immune serum in HeLa (D) and spinal cord (H). Scale bar: 20  $\mu$ m (A–L) and 40  $\mu$ m (M–P).

signal using the 7730 antiserum, which detects the full-length form only, did not allow determination of whether the nuclear signal detected by 7627 antiserum comes from the full-length or truncated forms or both. We cannot indeed exclude the hypothesis that spastin isoforms have distinct subcellular distribution and that our set of experiments revealed the nuclear localization one. Alternatively, the discrepancy in subcellular distribution of spastin could come from experimental approaches used by Errico *et al.* (13) and ourselves. Tag fused to spastin could have an effect on post-translational modifications and thereby nuclear import of spastin. In addition, overexpression of spastin in cultured cells might result in sublocalization of spastin different from that observed *in vivo* on several mouse tissues. Generation of other

isoform-specific spastin antibodies should allow clarification of this question.

Mutation analysis of HSP patients linked to the SPG4 locus has previously shown various DNA alterations of the spastin gene including missense (25%), nonsense (16%), frameshift (39%) or splice site mutations (20%) (6). Nonsense, frameshift or splice site mutations have suggested a haploinsufficiency mechanism responsible for AD-HSP linked to the SPG4 locus. Protein analysis of lymphoblastoid cell lines of HSP patients carrying either nonsense or frameshift spastin mutations did not reveal truncated protein. In addition, spastin transcript analysis has provided strong evidence that mutated transcripts are unstable *in vivo*, resulting in the absence or marked reduction of mutated spastin protein. Our results strongly suggest that a



**Figure 4.** Immunoblot and RT-PCR analyses of spastin in lymphoblastoid cells of controls and HSP patients. (A) The antiserum 7627 did not reveal truncated protein of spastin in patients carrying either nonsense (P1 and P2) or frameshift mutations (P3) when compared with healthy subjects (C1 and C2) and actin expression. Note the reduced amount of spastin in P1 and P2 patients when compared with control subjects. No reduction of spastin expression was observed in P4 patient carrying missense mutation. A total of 30  $\mu$ g of protein extracts were loaded in patients and controls. In controls, 15  $\mu$ g of proteins were also loaded (indicated by 1/2 C1). (B) RT-PCR analysis of RNA extracted from lymphoblastoid cell lines of P1–P3 patients revealed a marked reduction of spastin transcripts in patients when compared with controls (C1, C2) and actin transcripts.

dosage effect of spastin is the molecular mechanism underlying AD-HSP. However, in a patient carrying a missense mutation into the AAA domain (C448Y), no protein dosage effect was observed as expected. This mutation could impair the spastin function through either a dominant negative effect on the wild-type spastin as suggested by Errico *et al.* (13) or by a loss of function of the mutated protein. Knocking out the murine spastin ortholog or generating transgenic mice overexpressing missense mutations should allow this question to be addressed and should contribute to elucidate the function of spastin.

Taken together, our results indicate that AD-HSP linked to spastin mutations leading to premature stop codon, the most frequent mutations found in patients (55%), are responsible for a loss of spastin function. Characterizing the transcription factors involved in the regulation of spastin gene expression may lead to the identification of candidate molecules able to induce the expression of the non-mutated spastin allele, the other one being unstable. This approach should represent an attractive therapeutic strategy in this form of HSP.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients

A total of four patients with AD-HSP were included in this study. These patients harbor SPG4 mutations as previously reported (6). Patients P1 and P2 carry nonsense mutations in exons 5 or 3 leading to K229Stop and Q193Stop, respectively. Patient P3 carries a deletion of 22 nucleotides in exon 13

resulting in frameshift mutation and P4 a missense mutation (C448Y). Lymphoblastoid cells from affected or control individuals were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO-BRL). DNA was extracted in lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 10 mM NaCl, 200  $\mu$ g/ml proteinase K) overnight at 55°C followed by phenol extraction, ethanol precipitation and resuspension in TE buffer. In order to confirm the mutations in AD-HSP patients, PCR amplification of genomic DNA was performed and PCR products were directly sequenced. Primers were chosen in intronic sequences flanking exons 3, 5 and 13 (Table 1).

### Generation of antibodies

Rabbit spastin-specific antibodies were generated against two synthetic peptides chosen in the N-terminal region of human spastin sequence; peptide 176 (residues 129–143, cyst-IALRIDEDEKAGQKE) and peptide 177 (residues 204–218, FSKSQTVDVYNDSTNL-cys), were injected into rabbits and antisera were collected and purified on affinity column (Eurogentec, Belgium). Lyophilized antibodies were then resuspended in sterilized water to a final concentration of 5 mg/ml. In order to evaluate specificity of polyclonal antibodies, recombinant spastin protein was produced in *E.coli*. Spastin cDNA cloning was performed from RNA extraction of mouse brain tissue then RT-PCR amplification of RNA using primers 5'Spact and rec1AS (Table 1). Spastin cDNA fragment from exons 1–5 was cloned into pGEX-KG plasmid at the EcoRI

**Table 1.** Primers used for PCR amplification of human or mouse spastin cDNA or gene

Spastin	Amplified segment	Name of primers	Primer sequence
Human cDNA	Exons 3–5 (320 bp)	lymphS	5'-TGACTAATT TGGTTATGG CCAAG-3'
		ex5hAS	5'-GAGCAGGAC CAGATCCCTG-3'
	Exons 12–16 (290 bp)	Ex12S	5'-GACAGAGTA CTTGTAATGGG-3'
		lymphAS	5'-GGCAGACAT ATTCTTCAC CTG-3'
Human gene	Exon 3 and flanking sequences (310 bp)	In2hS	5'-GACTGTGAC TCCCATGA AAGTAG-3'
		In3hAS	5'-GTGACAGAG CAAGCGTCC ATCTC-3'
	Exon 5 and flanking sequences (420 bp)	In4hS	5'-GAAGATCCT GGTACATG TTCTC-3'
		In5hAS	5'-CAACTTAAAG CAGGAATAG TATC-3'
	Exon 13 and flanking sequences (380 bp)	In12hS	5'-CTACCAAAA TGCATTCCA GTGCC-3'
In13hAS		5'-GTACAAGTC TTTGTGTGG ACATAC-3'	
Mouse cDNA	Exons 1–5 (510 bp)	5'spact	5'-GTCTTCCACA AGCAGGCCTTCGAG-3'
		rec1AS	5'-GCTGCAGGAC CAGGTCCCGGTC-3'
	Exons 3–16 (1180 bp)	lymphS	5'-TGACTAATT TGGTTATGG CCAAG-3'
		lymphAS	5'-GGCAGACAT ATTCTTCAC CTG-3'

site. Recombinant spastin protein expression was induced as glutathione *S*-transferase fusion protein in *E.coli* after IPTG incubation at 37°C for 1 h. After centrifugation, bacteria pellets were lysed in Laemmli buffer. Lysates from induced or non-induced bacteria transformed with either recombinant or non-recombinant pGEX-KG plasmids were loaded on SDS-PAGE to visualize recombinant protein expression.

### RNA analysis and cDNA synthesis

RNA from lymphoblastoid cells or from mouse tissues was extracted using Trizol procedure (Life Technologies, Karlsruhe, Germany). cDNA synthesis was performed by incubating 1 µg RNA with either 100 pmol oligodT primer, spastin primer (ex5hAS) or β-actin primer (β-AHU2, 5'-GGAAGAGTG CCTCAGGGC AGCG-3') and 200 U of Superscript II (Invitrogen) according to standard procedures. To detect alternative splicing events of spastin transcripts, RT-PCR amplification was performed from RNA extracted from mouse tissues or lymphoblastoid cells. Primers lymphS and lymphAS were used to amplify mouse spastin transcripts from exons 3–16 (Table 1). Primers lymphS and ex5hAS were used to amplify human spastin transcripts from exons 3–5 (Table 1). Human β-actin transcripts were amplified by using primers β-AHU1 (5'-CCAACCGCG AGAAGATGA CCCAG-3') and β-AHU2 (5'-GGAAGAGTG CCTCAGGGC AGCG-3'). Detection of mutated transcripts in patients was carried out by RT-PCR amplification of RNA extracted from lymphoblastoid cells and PCR products were directly sequenced. Primers Ex5hAS and lymphS were used to amplify human cDNA from exons 3–5 (Table 1). Primers Ex12S and lymphAS were used to amplify exons 12–16 (Table 1).

### Protein analysis

Immunoblots were performed from total protein extracts of mouse tissues or lymphoblastoid cells. Human brain tissues were provided by the Harvard Brain Tissue Resource Center (HBTC). Protein extracts were prepared by using either buffer 1 (25 mM sodium phosphate pH 7.2, 5 mM EDTA, SDS 1%) or buffer 2 (12 mM Tris-HCl pH 6.8, 9% SDS, 4% glycerol, 0.25% β-mercaptoethanol) supplemented with cocktail of

protease inhibitors (Sigma) and 1 mM PMSF. A total of 40 µg of total protein extracts were electrophoresed on SDS-PAGE (12% w/v) and then transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblotting was performed after overnight incubation at 4°C with 7627, 7730 rabbit pre-immune (dilution 1:200) or immune sera (1:200), or actin mouse monoclonal antibody (1:10 000, Amersham) diluted in PBS-T buffer (PBS, 0.05% Tween 20). After washing in PBS-T buffer, membranes were subsequently incubated for 45 min at room temperature with peroxidase-labeled anti-rabbit or anti-mouse antibodies. Immunostained proteins were visualized using enhanced chemiluminescence detection system (Santa Cruz Biotechnology). Immunoblotting experiments of proteins extracted with either buffers 1 or 2 resulted in identical results.

### Immunofluorescence experiments

Immunofluorescent analyses were performed either on transverse sections of mouse spinal cord, liver and kidney or on HeLa cells. Transverse frozen sections of tissues (10 µm) prepared from wild-type mice were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS for 15 min. Fixed tissues were then permeabilized with 0.1 M glycine in PBS for 10 min, and blocked in 3% goat serum with PBS-Tr buffer (PBS, 0.03% Triton X-100) for 30 min. Sections were incubated with 7627 antibody (1:50) diluted in 1% goat serum in PBS-Tr buffer for 1 h at room temperature. After washing with 0.1% Tween 20 in PBS, sections were incubated with rhodamine (TRITC)-conjugated anti-rabbit IgG (H + L, 1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) for 1 h at room temperature. The double labeling experiment of spastin and GFAP was performed by using 7627 antiserum and monoclonal GFAP antibody (1:1000, Sigma, St Louis, MO, USA) and was revealed with a TRITC-conjugated anti-rabbit IgG and fluorescein (FITC)-conjugated anti-mouse (1:300 Jackson ImmunoResearch Laboratories), respectively. For double labeling experiments of spastin and choline acetyl transferase (ChAT), spinal cord sections were fixed in 0.5% paraformaldehyde in PBS (5 min) and incubated with an anti-ChAT goat antibody as previously described (Chemicon Inc., CA, USA) (14). This antibody was revealed with an CY3-conjugated anti-goat (1:300, Jackson ImmunoResearch

Laboratories). Sections were then incubated with spastin antiserum revealed with an FITC-conjugated anti-rabbit (1:300 Jackson Immunoresearch Laboratories). For immunocytological analysis, HeLa cells were grown on glass coverslips in DMEM supplemented with 10% FBS and fixed in cold methanol for 1 min. Fixed cells were blocked in 3% goat serum in PBS for 30 min. After blocking, cells were incubated with 7627 antibody (1:200) for 1 h and TRITC-conjugated anti-rabbit IgG (H + L, 1:500) for 1 h. Samples were then mounted with Vectashield mounting medium with or without DAPI (Vector Laboratories) and observed under Zeiss Axiophot fluorescence microscope.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Humbert and F. Saudou for helpful assistance, C. Caloustian for sequencing facility and Genethon bank facility for lymphoblastoid cell lines. We greatly thank the Harvard Brain Tissue Resource Center (HBTC) supported by NIH grant (MH/NS31862-24) for providing us with brain tissue samples. This work was supported by the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau, INSERM, Université d'Evry, the Conseil Regional d'Ile de France, GENOPOLE and the Fondation Bettencourt Schueller.

## REFERENCES

1. Saugier-Verber, P., Munnich, A., Bonneau, D., Rozet, J.M., Le Merrer, M., Gil, R. and Boespflug-Tanguy, O. (1994) X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nat. Genet.*, **6**, 257-262.
2. Vits, L., Van Camp, G., Coucke, P., Fransen, E., De Boulle, K., Reyniers, E., Korn, B., Poustka, A., Wilson, G., Schrandt-Stumpel, C. *et al.* (1994) MASA syndrome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM. *Nat. Genet.*, **7**, 408-413.
3. Jouet, M., Rosenthal, A., Armstrong, G., MacFarlane, J., Stevenson, R., Paterson, J., Metzberg, A., Ionasescu, V., Temple, K. and Kenwick, S. (1994) X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat. Genet.*, **7**, 402-407.
4. Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R. *et al.* (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, **93**, 973-983.
5. Hazan, J., Fonknechten, N., Mavel, D., Paternotte, C., Samson, D., Artiguenave, F., Davoine, C.S., Cruaud, C., Durr, A., Wincker, P. *et al.* (1999) Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat. Genet.*, **23**, 296-303.
6. Fonknechten, N., Mavel, D., Byrne, P., Davoine, C.S., Cruaud, C., Boensch, D., Samson, D., Coutinho, P., Hutchinson, M., McMonagle, P. *et al.* (2000) Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 637-644.
7. Lindsey, J.C., Lusher, M.E., McDermott, C.J., White, K.D., Reid, E., Rubinsztein, D.C., Bashir, R., Hazan, J., Shaw, P.J. and Bushby, K.M. (2000) Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients with hereditary spastic paraparesis. *J. Med. Genet.*, **37**, 759-765.
8. Svenson, I.K., Ashley-Koch, A.E., Gaskell, P.C., Riney, T.J., Cumming, W.J., Kingston, H.M., Hogan, E.L., Boustany, R.M., Vance, J.M., Nance, M.A. *et al.* (2001) Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.*, **68**, 1077-1085.
9. Patrono, C., Casali, C., Tessa, A., Cricchi, F., Fortini, D., Carrozzo, R., Siciliano, G., Bertini, E. and Santorelli, F.M. (2002) Missense and splice site mutations in SPG4 suggest loss-of-function in dominant spastic paraplegia. *J. Neurol.*, **249**, 200-205.
10. Meijer, I.A., Hand, C.K., Cossette, P., Figlewicz, D.A. and Rouleau, G.A. (2002) Spectrum of SPG4 mutations in a large collection of North American families with hereditary spastic paraplegia. *Arch. Neurol.*, **59**, 281-286.
11. Zhao, X., Alvarado, D., Rainier, S., Lemons, R., Hedera, P., Weber, C.H., Tukul, T., Apak, M., Heiman-Patterson, T., Ming, L. *et al.* (2001) Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat. Genet.*, **29**, 326-331.
12. Hansen, J.J., Durr, A., Courmu-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M.N., Davoine, C.S., Brice, A., Fontaine, B., Gregersen, N. *et al.* (2002) Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am. J. Hum. Genet.*, **70**, 1328-1332.
13. Errico, A., Ballabio, A. and Rugarli, E.I. (2002) Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 153-163.
14. Frugier, T., Tiziano, F.D., Cifuentes-Diaz, C., Miniou, P., Roblot, N., Dierich, A., Le Meur, M. and Melki, J. (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 849-858.

## DOPAMINE, DEGENERESCENCE STRIATALE ET MALADIE DE HUNTINGTON

Delphine Charvin<sup>1</sup>, Marta Garcia<sup>2</sup>, Christiane Pagès<sup>1</sup>, et Jocelyne Caboche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Signalisation Neuronale et Régulations Géniques, UMR 7102, Université P6, 75005 Paris, France

<sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, University of Padova, 35121 Padova, Italy

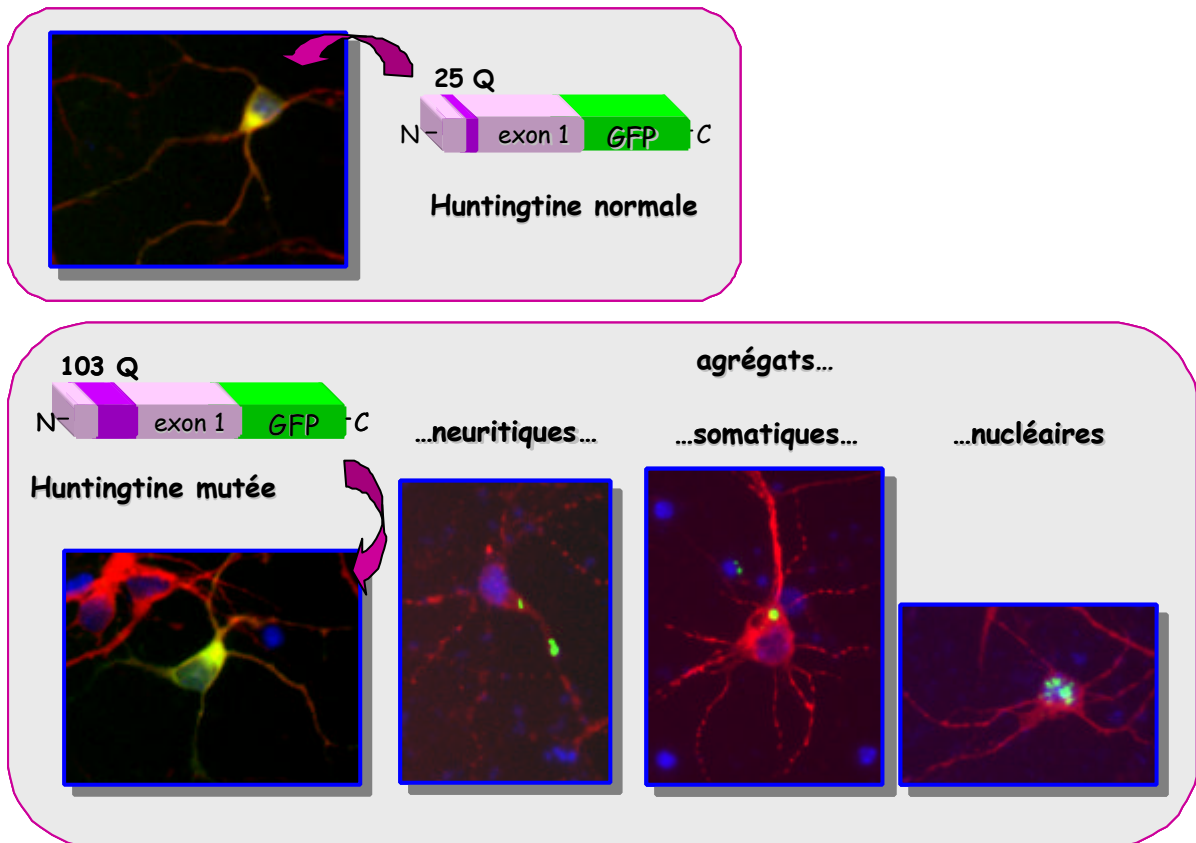
### Introduction

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'apparition progressive de mouvements involontaires de type choréique, des troubles de l'équilibre et des désordres psychiatriques qui apparaissent progressivement<sup>1</sup>. Cette maladie héréditaire dominante autosomale est due à la présence anormale de répétitions CAG au niveau de l'exon 1 du gène codant pour la Huntingtine, mutation qui donne lieu à une protéine possédant des répétitions anormales de polyglutamine dans la région N-terminale de la protéine huntingtin (Htt)<sup>2</sup>. Cette mutation confère de nouvelles propriétés à la protéine qui devient délétère dans les neurones. Ainsi, le clivage de la polyQ-Htt par des caspases donne naissance à des fragments toxiques N-terminaux qui s'accumulent et forment des agrégats intraneuronaux, insolubles qui s'accumulent dans les neurites, le cytoplasme, puis le noyau des cellules<sup>3-5</sup>. De nombreuses données sont en faveur d'un rôle délétère de ces agrégats, à la fois dans les neurites, dans lesquels ils interfèrent avec le transport neuritique, et dans le noyau où ils bloquent des événements transcriptionnels importants pour la régulation de gènes anti-apoptotiques<sup>6-9</sup>.

Une observation clinique importante est que seuls les neurones épineux de type GABAergiques du noyau caudé (autrement appelé striatum) dégèrent dans la MH, tout au moins aux stades précoces. Ainsi bien que la polyQ-Htt soit exprimée de façon ubiquitaire dans le cerveau, une vulnérabilité particulière des neurones striataux rend compte de la pathophysiologie de la maladie, puisque l'évolution et la sévérité des symptômes sont directement corrélées à l'atrophie du noyau caudé<sup>10</sup>. Cette région est la région cérébrale qui reçoit le plus de dopamine (DA) et de nombreuses données de la littérature sont en faveur d'un rôle neurotoxique de la DA, à forte concentration, sur des cellules *in vitro* ou *in vivo*. De plus, la MH progresse parallèlement à un gradient dorso-ventral de dégénérescence striatale, correspondant au gradient de concentration de DA<sup>11</sup>. L'ensemble de ces données suggère que la DA pourrait aggraver la toxicité liée à la présence de huntingtine mutée (polyQ-Htt) dans les neurones striataux, une hypothèse que nous avons explorée.

1) *Modèle utilisé :*

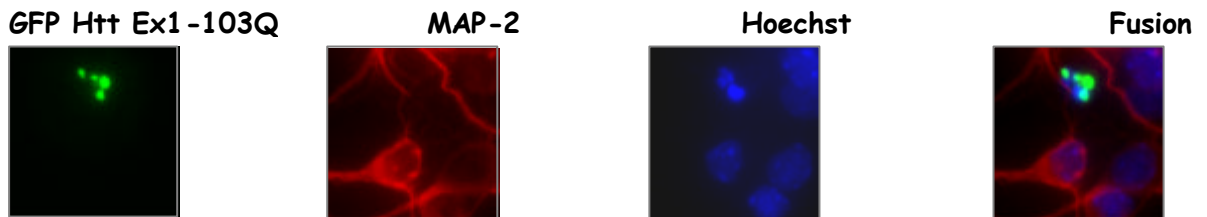
Nous avons utilisé un système *in vitro* de cultures primaires de neurones striataux de souris, dans lesquels nous avons surexprimé soit l'exon 1 de la Htt normale, soit l'exon 1 de la Htt mutée d'origine humaine (Figure 1). Ce système a été optimisé de façon à reproduire plusieurs caractéristiques importantes de la MH : 1) mort des neurones striataux induite par la présence de polyQ-Htt; 2) activation par la polyQ-Htt d'une voie de signalisation intracellulaire pro-apoptotique : la voie des cJun-Nterminal kinase (JNK) ; 3) formation d'agrégats par la polyQ-Htt. Des cinétiques ont été réalisées de façon à observer ces différents événements de façon séquentielle.



**Figure 1:** *Modèle in vitro* utilisé pour l'analyse des mécanismes intracellulaires responsables de la mort des neurones striataux dans la MH. Des neurones striataux embryonnaires (E14) de souris ont été mis en culture pendant 7 jours. Ils ont été alors transfectés à l'aide d'ADN complémentaires correspondant à l'exon 1 de la huntingtine normale (panneau du haut) ou mutée (panneau du bas). Les protéines traduites fluorescentes sont visualisées en vert, car elles expriment la GFP (green fluorescent protein) en fusion avec les fragments de Htt. Ce marquage nous permet de suivre, au cours du temps, la formation d'agrégats par la huntingtine mutée : dans les neurites, le soma, et finalement dans le noyau. Des contre-colorations ont été réalisées de façon à visualiser le noyau (marquage au « Hoechst » en bleu) et les neurites (marquage immunocytologique de la protéine MAP2 en rouge) qui nous permettent de voir l'intégrité de la cellule.

## 2) la DA 100µM potentialise la mort des neurones striataux induite par l'expression de polyQ-Htt

A partir de ce modèle *in vitro* nous avons pu établir que la surexpression de polyQ-Htt produisait une dégénérescence des neurones transfectés, caractérisée sur des critères morphologiques, telle la fragmentation de l'ADN (marquage par l'intercalant de l'ADN : le Hoechst) ou la rétraction neuritique (voir figure 2). Cette dégénérescence est spécifique de la forme polyQ de la Htt, puisqu'elle n'est pas observée après surexpression de sa forme normale. Elle est progressive, atteint 40% des neurones exprimant la polyQ-Htt après 24 heures, et près de 65% après 48 heures.



**Figure 2:** Mort des neurones striataux surexprimant la polyQ-Htt (Htt Ex1-103Q). L'expression de la polyQ-Htt est visualisée, 48H heures après la transfection, par le marquage GFP (en vert). Notez que la protéine est exprimée sous forme d'agrégats nucléaires. Le neurone ainsi transfecté ne présente pas de marquage MAP2 (en rouge) signe d'une rétraction neuritique. L'ADN de ce même neurone est fragmenté (marquage Hoechst en bleu).

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé les effets dose-réponse de la DA appliquée seule sur les neurones striataux. Nous avons ainsi pu déterminer que la DA appliquée à la dose de 500 µM produisait une mort rapide des neurones, avec 70% des cellules présentant des caractéristiques apoptotiques (marquage Tunel positif) dès 8 heures après l'application de DA, et 90% après 12 heures. En revanche, la mort des neurones est beaucoup plus restreinte lorsque la DA est appliquée à des doses plus faibles, en l'occurrence 100 µM. A cette dose, seuls 10% des neurones striataux sont Tunel positifs après 8 heures de traitement, et 20% après 12 heures. Nous avons donc choisi d'appliquer de la DA 100 µM sur des neurones au préalable transfectés avec la polyQ-Htt ou la Htt normale.

**Nos résultats mettent en évidence un effet potentialisateur de la DA 100µM, puisque seuls 20% des neurones exprimant la polyQ-Htt survivent après 24 heures, contre 50% en absence de DA.**

## 3) La DA 100µM potentialise l'activation de la voie JNK/c-Jun induite par la polyQ-Htt

La voie des cJun-N-terminal Kinase (JNK) est une voie de signalisation intracellulaire importante dans la mise en place d'un programme pro-apoptotique. Son rôle dans la mort neuronale a été mis en évidence dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives, incluant les maladies de Parkinson et d'Alzheimer<sup>12</sup>. Nous avons récemment démontré que cette voie de signalisation était activée dans le striatum, spécifiquement, dans un modèle pharmacologique d'administration systémique de 3-NP (acide 3 nitropropionique) qui reproduit la plupart des altérations phénotypiques de la maladie de Huntington<sup>13</sup>.

Après activation, la protéine kinase JNK transloque au noyau où elle peut activer par phosphorylation un facteur de transcription : c-Jun. Nous avons donc analysé l'activation de c-Jun par immunocytochimie, à l'aide d'un anticorps reconnaissant de façon spécifique la forme phosphorylée de c-Jun. Nous avons trouvé, dans les neurones surexprimant la polyQ-Htt, spécifiquement, une induction de la phosphorylation de c-Jun, significative, quoique de



faible ampleur (13% des neurones exprimant la polyQ-Htt contre 8% pour les neurones exprimant la Htt normale après 10 heures). En revanche, après l'application de DA 100µM, ce pourcentage est fortement augmenté, puisque 48% des neurones transfectés avec la polyQ-Htt montrent une immunoréactivité P-c-Jun. La DA seule, à cette concentration, produit une activation de c-Jun dans 25% des neurones striataux seulement.

***Ces résultats sont importants car ils indiquent que la DA 100 µM potentie l'activation d'une voie pro-apoptotique induite par la polyQ-Htt.***

#### ***4) la DA 100 µM accélère la formation des agrégats induite par la polyQ-Htt***

La présence d'une « étiquette » GFP dans la région N-terminale de la polyQ-Htt nous a permis de suivre sa localisation subcellulaire, ainsi que la formation des agrégats dans les neurones striataux transfectés. Selon le point de la cinétique après la transfection, nous avons trouvé des patterns d'expression différents, puisque la polyQ-Htt est d'abord présente de façon diffuse dans les cellules, s'agrège progressivement dans les neurites, le soma et enfin dans le noyau. 24h après la transfection, ces agrégats sont présents dans le noyau de 77% des neurones striataux.

De façon inattendue, nous avons observée que la cinétique de formation de ces agrégats était fortement accélérée en présence de DA 100µM. Ainsi, la DA induit la formation d'agrégats de polyQ-Htt dans 65% des neurones striataux après 8 heures (par comparaison aux 25% sans DA, voir figure 3). Après 24 heures, ce sont 97% des neurones transfectés avec la polyQ-Htt qui présentent des agrégats (par comparaison aux 77% en absence de DA).

***Ces résultats tout-à-fait nouveaux donnent les premières évidences d'une implication de la DA dans la formation des agrégats par la polyQ-Htt.***

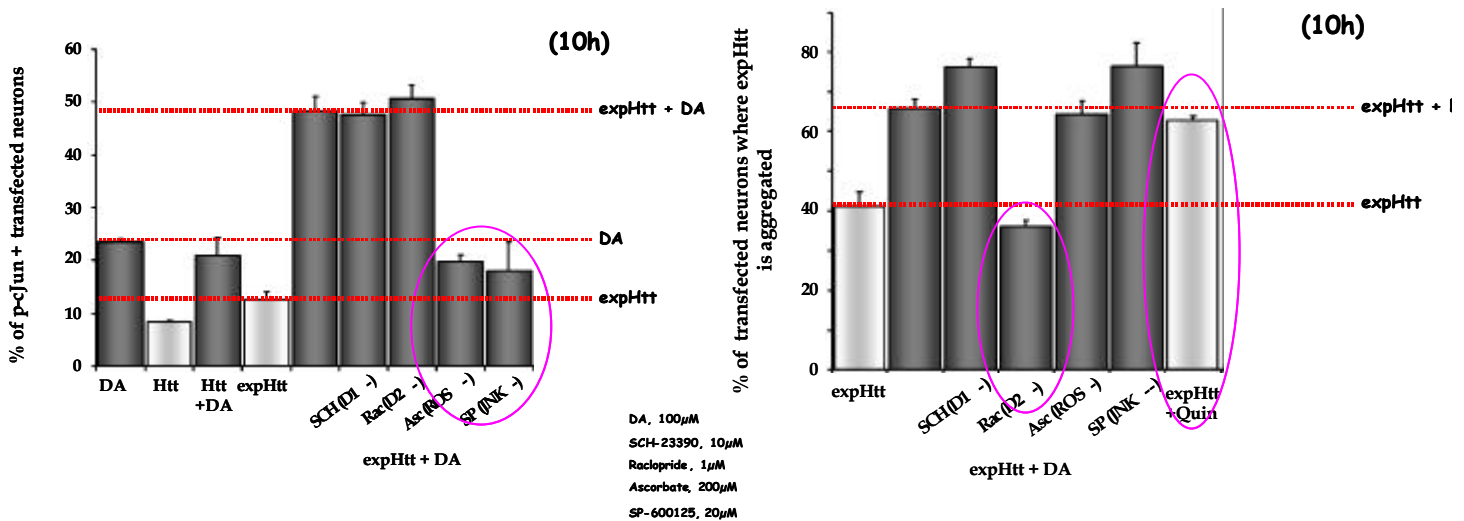
#### ***5) Mécanismes cellulaires à l'origine des effets DA dans la MH***

Ayant établi les effets de la DA sur trois événements importants induits par la polyQ-Htt : i) mort neuronale, ii) activation de c-Jun ; iii) formation des agrégats, nous avons cherché à déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de ces événements.

La DA peut agir sur les neurones striataux par deux types majoritaires de récepteurs, les récepteurs D1 et D2, qui peuvent se distinguer sur la base des voies de signalisation intracellulaires activées en aval : stimulation et inhibition de l'activité adénylate cyclase, respectivement. Les effets DA sur le phénotype des neurones striataux exprimant la polyQ-Htt, peuvent également refléter une neurotoxicité via le métabolisme oxydatif, puisque la DA peut s'auto-oxyder spontanément *in vitro*, ou sous l'influence d'une réaction catalysée par des enzymes *in vivo*, formant ainsi des radicaux libres<sup>14</sup>.

Nous avons réalisé des études pharmacologiques pour investiguer le rôle respectif des récepteurs D1, D2 ou des radicaux libres sur les effets exercés par la DA sur les neurones striataux exprimant la polyQ-Htt (Fig. 3). Alors que les antagonistes sélectifs D1 ou D2 (SCH-23390 et raclopride, respectivement) sont dépourvus d'effets sur la potentialisation de c-Jun induite par la DA, l'ascorbate, un inhibiteur de radicaux libres, bloque totalement cet effet. Des résultats similaires sont obtenus avec un inhibiteur sélectif des voies JNK. ***Ces résultats indiquent que la potentialisation de c-Jun par la DA est liée à la production de radicaux libres et à l'activation de JNK.***

Ces composés n'ont en revanche aucun effet sur la formation des agrégats par la DA. Alors que le raclopride, un antagoniste D2 sélectif bloque totalement l'effet DA sur la formation des agrégats, cet effet est totalement reproduit par un agoniste D2, le quinpirole (figure 3). ***Ces résultats mettent en évidence, pour la première fois, l'implication des récepteurs D2 dans la formation des agrégats produits par la polyQ-Htt.***



**Figure 3 : Mécanismes cellulaires à l'origine des effets DA dans la MH.** Les cellules striatales exprimant la Htt normale ou polyQ (expHtt) ont été traitées avec des antagonistes sélectifs des récepteurs D1 (SCH 23390), D2 (raclopride), des inhibiteurs de radicaux libres (ascorbate) ou de la voie des JNK (SP-600125) 30 minutes avant et pendant tout le traitement avec la dopamine (DA). L'induction de phospho c-Jun par la polyQ-Htt est potentialisée par la DA, un effet réversé par l'ascorbate et le SP (panneau de gauche). La formation des agrégats par la polyQ-Htt est potentialisée par la DA, un effet réversé par l'antagoniste D2, et reproduit par les agonistes D2 (quinpirole) en absence de DA (panneau de droite).

Enfin, nous avons examiné l'influence respective des récepteurs D2 et des radicaux libres produits par la DA sur la mort des neurones striataux exprimant la polyQ-Htt. Le traitement des cellules avec un antagoniste D2 ou l'inhibiteur de radicaux libres seuls, prévient significativement des effets DA sur cette mort. Le traitement combiné avec les deux composés, antagoniste D2 et inhibiteur de radicaux libres, ajoutés avant la DA, prévient des effets potentialisateur de la DA sur la mort des neurones striataux exprimant la polyQ-Htt.

### Conclusion

En conclusion nos données indiquent que la DA potentialise deux événements cellulaires importants responsables de la toxicité de la polyQ-Htt sur les neurones striataux. Tout d'abord, la DA induit un stress oxydatif qui produit, en synergie avec la polyQ-Htt, l'activation de la voie pro-apoptotique JNK/c-Jun. Ce mécanisme pourrait être à l'origine d'un accroissement de sensibilité des neurones striataux au cours de vieillissement puisque les mécanismes de détoxification des radicaux libres s'amenuisent au cours du temps<sup>15</sup>. A cet égard, il est intéressant de noter que les symptômes, dans la maladie de Huntington, apparaissent chez le jeune adulte, bien que la protéine mutée soit exprimée dès la naissance.

La deuxième observation importante est que la DA accélère la formation des agrégats de polyQ-Htt, par un mécanisme impliquant la stimulation des récepteurs D2. Ceci est d'autant plus intéressante d'un point de vue physiopathologique, que les agrégats de polyQ-Htt sont tout d'abord observés, tant chez l'homme que chez les modèles animaux, dans les régions cérébrales qui expriment le plus de récepteurs D2, dont le globus pallidus, la substance noire compacte<sup>16-17</sup>, et au sein du striatum, dans les neurones striataux éférents enképhalinerigiques qui expriment les récepteurs D2<sup>18</sup>.

Ainsi, nos résultats permettent d'expliquer de façon moléculaire, la vulnérabilité particulière des neurones du caudé-putamen dans la maladie de Huntington. Ils apportent de nouvelles voies d'investigation thérapeutique pour le

traitement de cette maladie génétique, dominante héréditaire, vis-à-vis de laquelle il n'existe aucun traitement à l'heure actuelle. Nous proposons de traiter des patients diagnostiqués porteurs de la mutation génétique, à des stades présymptomatiques, à l'aide d'inhibiteurs des voies JNK associés avec des antagonistes des récepteurs D2. Bien que la plupart des patients atteints de la maladie de Huntington soient traités à l'aide de neuroleptiques, qui ont des propriétés D2 antagonistes, il n'existe aucune corrélation claire entre le traitement et l'évolution de la maladie<sup>19-20</sup>. De plus, les neuroleptiques à long terme produisent des effets indésirables, dont des symptômes extrapyramidaux. Il est donc nécessaire d'élucider les événements intracellulaires en aval des récepteurs D2 et leur rôle dans la formation des agrégats de polyQ-Htt afin de développer des stratégies thérapeutiques efficaces, qui contourneraient le problème des neuroleptiques.

## REFERENCES :

1. Krawczak, M. et al. Covariate-dependent age-at-onset distributions for Huntington disease. *Am J Hum Genet* **49**, 735-45 (1991).
2. The Huntington's disease collaborative research group, Y. 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**, 971-83 (1993).
3. Mangiarini, L. et al. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506 (1996).
4. Davies, S. W. et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-48 (1997).
5. DiFiglia, M. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-3 (1997).
6. Li, H., Li, S. H., Yu, Z. X., Shelbourne, P. & Li, X. J. Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci* **21**, 8473-81 (2001).
7. Gunawardena, S. et al. Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* **40**, 25-40 (2003).
8. Nucifora, F. C., Jr. et al. Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* **291**, 2423-8 (2001).
9. Jiang, H., Nucifora, F. C., Jr., Ross, C. A. & DeFranco, D. B. 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 (2003).
10. Aylward, E. H. et al. Rate of caudate atrophy in presymptomatic and symptomatic stages of Huntington's disease. *Mov Disord* **15**, 552-60 (2000).
11. Jakel, R. J. & Maragos, W. F. Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* **23**, 239-45 (2000).
12. Wang LH, Besirli CG, Johnson EM, Jr. (2004) Mixed-lineage kinases: a target for the prevention of neurodegeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:451-474.
13. Garcia, M. et al. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci* **22**, 2174-84 (2002).
14. Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R. & Roth, G. S. Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J Biol Chem* **273**, 3756-64 (1998).
15. Fornstedt, B., Pileblad, E. & Carlsson, A. In vivo autooxidation of dopamine in guinea pig striatum increases with age. *J Neurochem* **55**, 655-9 (1990).
16. Gutekunst, C. A. et al. Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* **19**, 2522-34 (1999).
17. Menalled, L. B. & Chesselet, M. F. Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 32-9 (2002).
18. Reiner, A. et al. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5733-7 (1988).
19. Myers, R. H. et al. Factors associated with slow progression in Huntington's disease. *Arch Neurol* **48**, 800-4 (1991).
20. Feigin, A. et al. Functional decline in Huntington's disease. *Mov Disord* **10**, 211-4 (1995).

## A LA RECHERCHE D'UN ROLE DE LA DOPAMINE DANS LA MALADIE DE HUNTINGTON

### ROLE OF DOPAMINE IN HUNTINGTON'S DISEASE.

**Delphine Charvin et Jocelyne Caboche**

Adresse

CNRS : UMR 7102 et Université Pierre et Marie Curie

9 quai Saint Bernard,

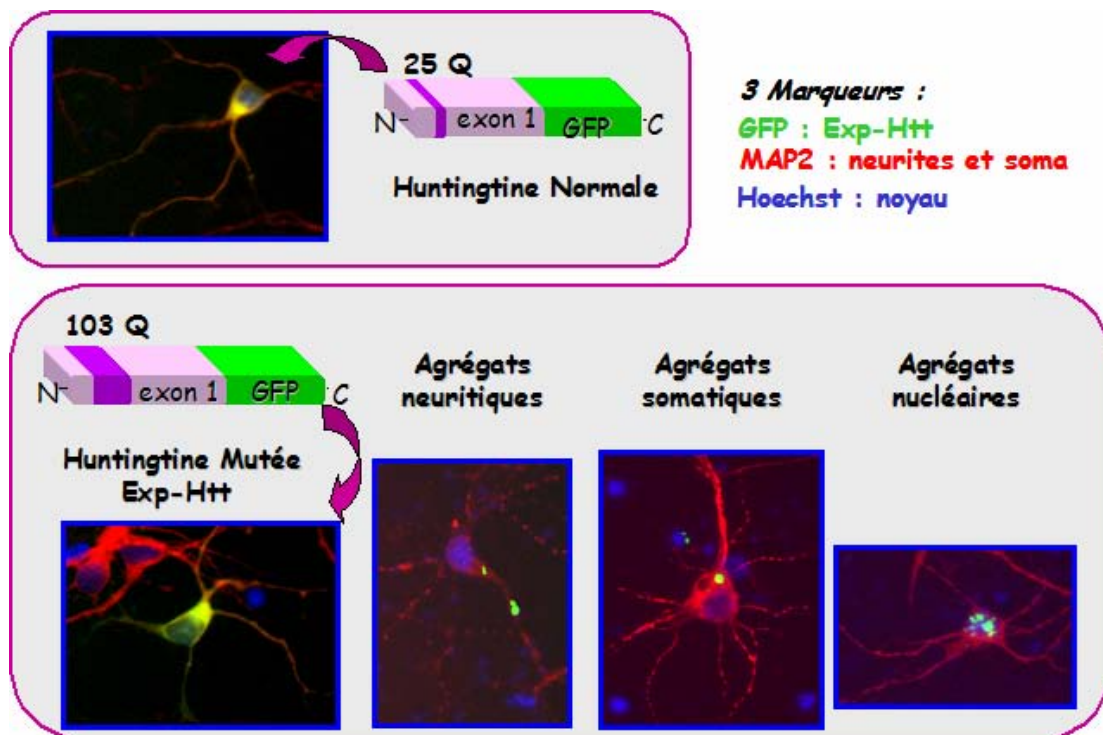
75005 Paris, France

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'apparition progressive de mouvements involontaires de type choréique, des troubles de l'équilibre et des désordres psychiatriques qui apparaissent progressivement. L'issue en est fatale entre 15 et 20 ans après l'apparition des premiers symptômes. Cette maladie héréditaire dominante autosomale est due à la présence anormale de répétitions CAG, codant la glutamine (polyQ), au niveau du gène *IT15* qui code la huntingtine (1). La pathogénie dans la MH semble liée à la fois à une perte de fonction de la huntingtine normale et à une toxicité liée à la mutation. Si le rôle précis de la huntingtine normale demeure mal connu –elle a été impliquée dans de multiples fonctions dont la régulation de la transcription, le trafic cellulaire, l'assemblage protéique- elle joue un rôle important pour la neurogénèse au cours du développement. La mutation (polyQ-Htt) induit des changements de conformation qui peut alors être clivée par des caspases, ce qui donne naissance à des fragments N-terminaux qui s'accumulent pour former des agrégats intraneuronaux insolubles dans les neurites, le cytoplasme, et le noyau des cellules. Certains auteurs pensent que ces agrégats sont toxiques parce qu'ils bloquent des fonctions cellulaires vitales : transport axonal, régulation de la transcription de gènes de survie (2, 3, 4). D'autres suggèrent qu'ils sont neuroprotecteurs, et constituent une forme de protection de la cellule contre la toxicité de la forme soluble de polyQ-Htt (5). Quoiqu'il en soit ces agrégats représentent la « signature » d'une souffrance neuronale

Il n'existe aucun traitement de la MH à l'heure actuelle. Une voie d'investigation thérapeutique peut être développée sur la base d'une observation neuropathologique importante, à savoir la vulnérabilité particulière d'une région cérébrale donnée : le noyau caudé (autrement appelé striatum) (6). Ainsi, bien que la polyQ-Htt soit exprimée de façon ubiquitaire dans le cerveau, seuls les neurones striataux (et parmi ceux-ci, une catégorie de neurones dits « épineux ») dégénèrent dans la MH, tout au moins aux stades les plus précoces de la maladie. Nous avons émis l'hypothèse qu'une susceptibilité accrue du noyau caudé dans la MH pouvait être liée aux propriétés neuro-anatomiques de cette région cérébrale, à savoir une dense innervation dopaminergique (DA) issue du mésencéphale. La DA est un neuromodulateur important pour de nombreuses fonctions physiologiques, telles le contrôle de la coordination motrice, de l'humeur, et les processus d'apprentissage liés à la récompense. Toutefois, sous certaines conditions, libérée ou administrée à forte concentration, la DA peut avoir un effet neurotoxique, *in vitro* ou *in vivo* (7). C'est le cas par exemple, lorsque de trop fortes doses d'amphétamine (un agoniste indirect de la DA) sont administrées chez l'animal. Des souris génétiquement modifiées qui n'expriment plus le transporteur de la DA (DAT), une protéine qui régule les taux de DA dans le striatum, présentent une dégénérescence spontanée des cellules striatales au cours du vieillissement (8). De plus, il existe une corrélation directe, chez l'homme entre la sévérité et l'évolution des symptômes et le gradient dorso-latéral de la concentration DA (9). Quelques-uns des effets neurotoxiques de la DA ont été étudiés en relation avec les altérations du métabolisme de l'oxygène et l'on sait que la DA peut s'auto-oxyder spontanément *in vitro*, ou sous l'influence d'une réaction catalysée par des

enzymes *in vivo*, formant ainsi des radicaux libres. De cette façon, la DA à forte dose (500  $\mu$ M) permet l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire pro-apoptotique, la voie des JNK (cJun N-terminal Kinase) qui s'avère déterminante pour induire la mort des neurones striataux (10).

Nous avons pu reproduire deux caractéristiques importantes de la MH : i) mort progressive des neurones striataux induites par la polyQ-Htt; ii) formation des agrégats dans les différents compartiments cellulaires (Figure 1), à l'aide d'un modèle *in vitro*, de culture primaire de neurones striataux de souris, dans lesquels des ADN complémentaires (ADNc) codant des formes mutées (polyQ-Htt) ou normale (Htt) de Htt sont introduits par des méthodes de transfection. Il s'agissait donc d'un modèle de choix pour étudier les événements extracellulaires et/ou intracellulaires à l'origine de la vulnérabilité striatale dans la MH.



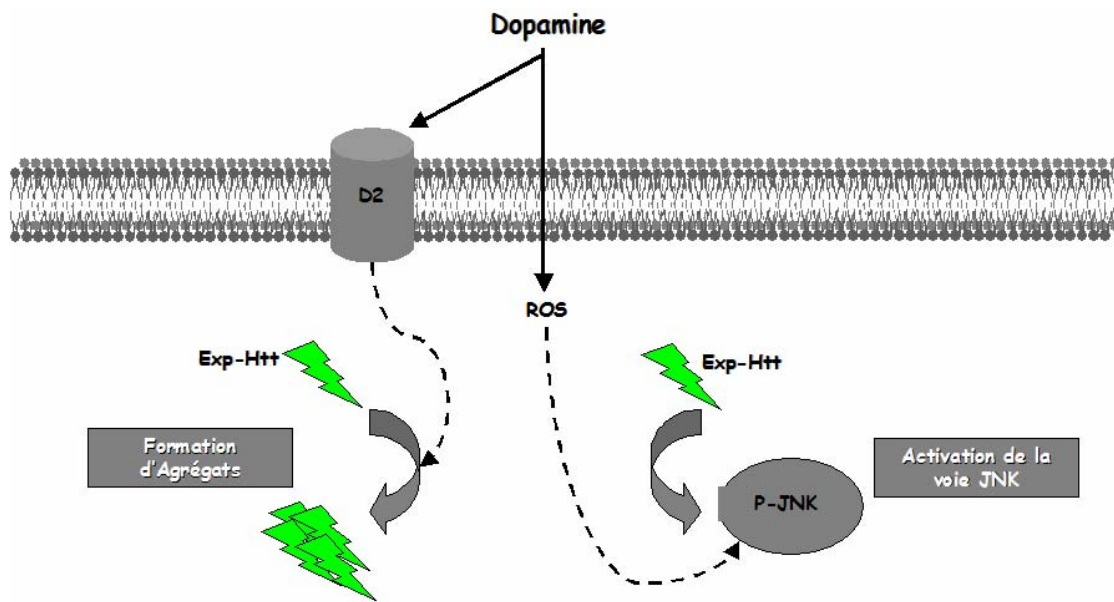
**Figure 1: Modèle cellulaire de Maladie de Huntington (MH).** Des neurones striataux embryonnaires (E14) de souris sont mis en culture pendant 7 jours, puis transfectés à l'aide d'ADN complémentaires (ADNc) correspondant à l'exon 1 de la huntingtine normale (Htt : panneau du haut) ou mutée (polyQ-Htt, panneau du bas). Les protéines traduites fluorescentes sont visualisées en vert, car elles expriment la GFP (green fluorescent protein) en fusion avec les fragments de Htt. Ce marquage nous permet de suivre, au cours du temps, la formation d'agrégats par la huntingtine mutée : dans les neurites, le soma, et le noyau. Des contre-colorations ont été réalisées de façon à visualiser le noyau (marquage au « Hoechst » en bleu), le soma et les neurites (marquage immunocytoologique de la protéine MAP2 en rouge) qui nous permettent de voir l'intégrité de la cellule.

Pour étudier le rôle de la DA dans la vulnérabilité des neurones striataux, nous avons combiné des applications de DA, à des doses sub-létales, c'est-à-dire qui induisent peu d'effet sur la mort striatale, à la surexpression des polyQ-Htt. Ce traitement combiné produit une forte amplification des effets toxiques de la polyQ-Htt et accélère à la fois la formation des agrégats et la mort des neurones. Deux événements cellulaires importants sont responsables de ces effets DA (Figure 2).

Tout d'abord, la DA induit un stress oxydatif qui produit, en synergie avec la polyQ-Htt, l'activation de la voie JNK. C'est un mécanisme précoce, apparaissant avant la formation des agrégats nucléaires et avant toute souffrance neuronale. En bloquant soit la production de radicaux libres soit la voie JNK une partie significative des effets DA sur la mort des neurones striataux est inhibée. Ce mécanisme pourrait être à l'origine d'un accroissement de sensibilité des neurones striataux au cours du vieillissement puisque les systèmes de détoxification des radicaux libres s'amenuisent au cours du temps. A cet égard, il est intéressant de noter que les symptômes, dans la MH, apparaissent chez le jeune adulte, bien que la protéine mutée soit exprimée dès la naissance.

Le deuxième événement est une plus grande quantité d'agrégats polyQ-Htt formés en présence de DA. Cet événement, tout à fait inattendu, implique la stimulation des récepteurs D2, puisque il est bloqué par des antagonistes sélectifs D2, est inexistant dans les neurones striataux provenant d'une souris knock-out D2, et peut être reproduit par un agoniste des récepteurs D2. Ceci est d'autant plus intéressant d'un point de vue physiopathologique, que les agrégats de polyQ-Htt sont tout d'abord observés, tant chez l'homme que chez des modèles animaux, dans les régions cérébrales qui expriment le plus de récepteurs D2, dont le globus pallidus, la substance noire compacte, et au sein du striatum, dans les neurones striataux efférents enképhalinergiques (11 , 12).

Nos résultats permettent d'expliquer de façon moléculaire, la vulnérabilité particulière des neurones du striatum dans la MH (13). Ainsi, l'utilisation conjointe d'un inhibiteur de radicaux libres et d'un antagoniste des récepteurs D2 bloque complètement le rôle stimulateur de la DA sur la mort de ces neurones. Ils apportent de nouvelles voies d'investigation thérapeutique pour le traitement de cette maladie, vis-à-vis de laquelle il n'existe aucun traitement à l'heure actuelle. Une thérapie possible serait de traiter des patients diagnostiqués porteurs de la mutation génétique, à l'aide d'inhibiteurs des voies JNK associés à des neuroleptiques, qui sont des antagonistes des récepteurs D2. Notons à cet égard que les patients sont parfois traités à l'aide de neuroleptiques, à des stades tardifs, pour traiter les symptômes cognitifs. Nos résultats impliquent des effets précoces de la DA via la stimulation des D2. Il serait donc intéressant d'envisager une thérapie à l'aide de cette classe d'agents pharmacologiques à des stades pré-symptomatiques de la maladie.



**Figure 2 : La dopamine facilite deux événements intracellulaires produits par la Huntingtine mutée (polyQ-Htt).** Sous sa forme mutée la Huntingtine (polyQ-Htt) est clivée et les fragments ainsi libérés (⚡) peuvent s'agréger ou activer la voie JNK dans les cellules. La vulnérabilité des neurones striataux pourrait s'expliquer par un double effet toxique de la dopamine : i) un effet accélérateur sur la formation des agrégats, via la stimulation des récepteurs D2 ; ii) un effet amplificateur sur la voie JNK, via la production de radicaux libres. Ces deux mécanismes agiraient en synergie pour précipiter la mort des neurones striataux qui expriment la PolyQ-Htt.

**REFERENCES :**

1. The Huntington's disease collaborative research group, Y. (1993) *Cell* **72**, 971-83.
2. Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S. W. & Bates, G. P. (1996) *Cell* **87**, 493-506.
3. Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L. & Bates, G. P. (1997) *Cell* **90**, 537-48.
4. DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. & Aronin, N. (1997) *Science* **277**, 1990-3.
5. Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R. & Finkbeiner, S. (2004) *Nature* **431**, 805-10.
6. Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D. & Richardson, E. P., Jr. (1985) *J Neuropathol Exp Neurol* **44**, 559-77.
7. Jakel, R. J. & Maragos, W. F. (2000) *Trends Neurosci* **23**, 239-45.
8. Cyr, M., Beaulieu, J. M., Laakso, A., Sotnikova, T. D., Yao, W. D., Bohn, L. M., Gainetdinov, R. R. & Caron, M. G. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11035-40.
9. Aylward, E. H., Codori, A. M., Rosenblatt, A., Sherr, M., Brandt, J., Stine, O. C., Barta, P. E., Pearlson, G. D. & Ross, C. A. (2000) *Mov Disord* **15**, 552-60.
10. Luo, Y., Umegaki, H., Wang, X., Abe, R. & Roth, G. S. (1998) *J Biol Chem* **273**, 3756-64.
11. Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B. & Young, A. B. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5733-7.
12. Li, H., Li, S. H., Yu, Z. X., Shelbourne, P. & Li, X. J. (2001) *J Neurosci* **21**, 8473-81.
13. Charvin, D., Vanhoutte, P., Pages, C., Borelli, E. & Caboche, J. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12218-23.



-A-

- Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, Wang YT, Salter MW and Tymianski M (2002). Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298(5594): 846-50.
- Adams JD, Jr. and Odunze IN (1991). Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 10(2): 161-9.
- Adler V, Polotskaya A, Wagner F and Kraft AS (1992). Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* 267(24): 17001-5.
- Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ and Ronai Z (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J* 18(5): 1321-34.
- Ahn S, Shenoy SK, Wei H and Lefkowitz RJ (2004). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem* 279(34): 35518-25.
- Akechi M, Ito M, Uemura K, Takamatsu N, Yamashita S, Uchiyama K, Yoshioka K and Shiba T (2001). Expression of JNK cascade scaffold protein JSAP1 in the mouse nervous system. *Neurosci Res* 39(4): 391-400.
- Akiyama Y, Koshimura K, Ohue T, Lee K, Miwa S, Yamagata S and Kikuchi H (1991). Effects of hypoxia on the activity of the dopaminergic neuron system in the rat striatum as studied by in vivo brain microdialysis. *J Neurochem* 57(3): 997-1002.
- Albin RL, Young AB and Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12(10): 366-75.
- Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA and Bonventre JV (1999). MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12866-9.
- Alexi T, Hughes PE, Faull RL and Williams CE (1998). 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *Neuroreport* 9(11): R57-64.
- Alland L, Muhle R, Hou H, Jr., Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N and DePinho RA (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387(6628): 49-55.
- Alonso H, Cubo-Delgado E, Mateos-Beato MP, Solera J, Gomez-Escalonilla CI and Jimenez-Jimenez FJ (2004). [Huntington's disease mimicking Tourette syndrome]. *Rev Neurol* 39(10): 927-9.
- Alonso ME, Yescas P, Rasmussen A, Ochoa A, Macias R, Ruiz I and Suastegui R (2002). Homozygosity in Huntington's disease: new ethical dilemma caused by molecular diagnosis. *Clin Genet* 61(6): 437-42.
- Alston TA, Mela L and Bright HJ (1977). 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(9): 3767-71.
- Amano M, Fukata Y and Kaibuchi K (2000). Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 261(1): 44-51.
- Amano M, Kaneko T, Maeda A, Nakayama M, Ito M, Yamauchi T, Goto H, Fukata Y, Oshiro N, Shinohara A, Iwamatsu A and Kaibuchi K (2003). Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J Neurochem* 87(3): 780-90.
- Angelini L, Sgro V, Erba A, Merello S, Lanzi G and Nardocci N (1998). Tourettism as clinical presentation of Huntington's disease with onset in childhood. *Ital J Neurol Sci* 19(6): 383-5.
- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC and Agid Y (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12(1): 25-31.
- Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, Sirabella R, Secondo A, Sibaud L and Di Renzo GF (2003). Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol Lett* 139(2-3): 125-33.
- Antonini A, Leenders KL, Spiegel R, Meier D, Vontobel P, Weigell-Weber M, Sanchez-Pernaute R, de Yebenez JG, Boesiger P, Weindl A and Maguire RP (1996). Striatal glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease. *Brain* 119 ( Pt 6): 2085-95.

- Arnauld E, Arsaut J and Demotes-Mainard J (1998). Conditional coupling of striatal dopamine D1 receptor to transcription factors: ontogenic and regional differences in CREB activation. *Brain Res Mol Brain Res* 60(1): 127-32.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR and Finkbeiner S (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431(7010): 805-10.
- Aylward EH, Codori AM, Rosenblatt A, Sherr M, Brandt J, Stine OC, Barta PE, Pearlson GD and Ross CA (2000). Rate of caudate atrophy in presymptomatic and symptomatic stages of Huntington's disease. *Mov Disord* 15(3): 552-60.
- Aylward EH, Sparks BF, Field KM, Yallapragada V, Shpritz BD, Rosenblatt A, Brandt J, Gourley LM, Liang K, Zhou H, Margolis RL and Ross CA (2004). Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 63(1): 66-72.

**-B-**

- Bachoud-Levi AC, Maison P, Bartolomeo P, Boisse MF, Dalla Barba G, Ergis AM, Baudic S, Degos JD, Cesaro P and Peschanski M (2001). Retest effects and cognitive decline in longitudinal follow-up of patients with early HD. *Neurology* 56(8): 1052-8.
- Bamford NS, Robinson S, Palmiter RD, Joyce JA, Moore C and Meshul CK (2004a). Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J Neurosci* 24(43): 9541-52.
- Bamford NS, Zhang H, Schmitz Y, Wu NP, Cepeda C, Levine MS, Schmauss C, Zakharenko SS, Zablow L and Sulzer D (2004b). Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 42(4): 653-63.
- Bates GP and Hockly E (2003). Experimental therapeutics in Huntington's disease: are models useful for therapeutic trials? *Curr Opin Neurol* 16(4): 465-70.
- Beal MF (2000). Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23(7): 298-304.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR and Hyman BT (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13(10): 4181-92.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ and Martin JB (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321(6066): 168-71.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR and Caron MG (2005). An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122(2): 261-73.
- Behrens A, Sibilio M and Wagner EF (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21(3): 326-9.
- Bence NF, Sampat RM and Kopito RR (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292(5521): 1552-5.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM and Anderson DW (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13681-6.
- Bennett EJ, Bence NF, Jayakumar R and Kopito RR (2005). Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17(3): 351-65.
- Berardelli A, Noth J, Thompson PD, Bollen EL, Curra A, Deuschl G, van Dijk JG, Topper R, Schwarz M and Roos RA (1999). Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Mov Disord* 14(3): 398-403.
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R and Goldman-Rakic PS (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15(12): 7821-36.
- Bertram L and Tanzi RE (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 115(6): 1449-57.
- Bibb JA (2005). Decoding dopamine signaling. *Cell* 122(2): 153-5.

- Bizat N, Hermel JM, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S and Brouillet E (2003). Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23(12): 5020-30.
- Bjorkblom B, Ostman N, Hongisto V, Komarovski V, Filen JJ, Nyman TA, Kallunki T, Courtney MJ and Coffey ET (2005). Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *J Neurosci* 25(27): 6350-61.
- Bogdanov MB, Ferrante RJ, Kuemmerle S, Klivenyi P and Beal MF (1998). Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington's disease. *J Neurochem* 71(6): 2642-4.
- Borovecki F, Lovrecic L, Zhou J, Jeong H, Then F, Rosas HD, Hersch SM, Hogarth P, Bouzou B, Jensen RV and Krainc D (2005). Genome-wide expression profiling of human blood reveals biomarkers for Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31): 11023-8.
- Borsello T and Bonny C (2004). Use of cell-permeable peptides to prevent neuronal degeneration. *Trends Mol Med* 10(5): 239-44.
- Boutell JM, Thomas P, Neal JW, Weston VJ, Duce J, Harper PS and Jones AL (1999). Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum Mol Genet* 8(9): 1647-55.
- Bowyer JF, Clausing P, Schmued L, Davies DL, Binienda Z, Newport GD, Scallet AC and Slikker W, Jr. (1996). Parenterally administered 3-nitropropionic acid and amphetamine can combine to produce damage to terminals and cell bodies in the striatum. *Brain Res* 712(2): 221-9.
- Brami-Cherrier K, Valjent E, Garcia M, Pages C, Hipskind RA and Caboche J (2002). Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci* 22(20): 8911-21.
- Brecht S, Kirchoff R, Chromik A, Willesen M, Nicolaus T, Raivich G, Wessig J, Waetzig V, Goetz M, Claussen M, Pearse D, Kuan CY, Vaudano E, Behrens A, Wagner E, Flavell RA, Davis RJ and Herdegen T (2005). Specific pathophysiological functions of JNK isoforms in the brain. *Eur J Neurosci* 21(2): 363-77.
- Brody LC and Biesecker BB (1997). Breast cancer: the high-risk mutations. *Hosp Pract (Off Ed)* 32(10): 59-63, 67-8, 70-2 passim.
- Brouillet E, Hantraye P, Ferrante RJ, Dolan R, Leroy-Willig A, Kowall NW and Beal MF (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 7105-9.
- Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Conde F, Palfi S and Hantraye P (1998). Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J Neurochem* 70(2): 794-805.
- Brouillet E, Conde F, Beal MF and Hantraye P (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59(5): 427-68.
- Brouillet E, Peschanski M and Hantraye P (2000). Du gène à la maladie : la mort neuronale dans la maladie de Huntington. *Med Sci (Paris)* 16(1): 57-63.
- Browne SE and Beal MF (2004). The energetics of Huntington's disease. *Neurochem Res* 29(3): 531-46.
- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED and Beal MF (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41(5): 646-53.
- Browne SE, Ferrante RJ and Beal MF (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol* 9(1): 147-63.
- Bruckner SR, Tammariello SP, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P and Estus S (2001). JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurochem* 78(2): 298-303.
- Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL and Cleveland DW (1997). ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18(2): 327-38.

- Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, Reaume AG, Scott RW and Cleveland DW (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281(5384): 1851-4.
- Buchsbaum RJ, Connolly BA and Feig LA (2002). Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol* 22(12): 4073-85.
- Buisson A, Callebert J, Mathieu E, Plotkine M and Boulu RG (1992). Striatal protection induced by lesioning the substantia nigra of rats subjected to focal ischemia. *J Neurochem* 59(3): 1153-7.
- Burns A, Folstein S, Brandt J and Folstein M (1990). Clinical assessment of irritability, aggression, and apathy in Huntington and Alzheimer disease. *J Nerv Ment Dis* 178(1): 20-6.
- Bustillo J, Barrow R, Paz R, Tang J, Seraji-Bozorgzad N, Moore GJ, Bolognani F, Lauriello J, Perone-Bizzozero N and Galloway MP (2005). Long-Term Treatment of Rats with Haloperidol: Lack of an Effect on Brain N-Acetyl Aspartate Levels. *Neuropsychopharmacology*.

-C-

- Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD and Vernier P (2003). Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95(7): 489-502.
- Camps M, Nichols A and Arkinstall S (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J* 14(1): 6-16.
- Cantrell AR, Scheuer T and Catterall WA (1999). Voltage-dependent neuromodulation of Na<sup>+</sup> channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 19(13): 5301-10.
- Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB and Morton AJ (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 19(8): 3248-57.
- Cass WA (1997). Decreases in evoked overflow of dopamine in rat striatum after neurotoxic doses of methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 280(1): 105-13.
- Cattaneo E (2003). Dysfunction of wild-type huntingtin in Huntington disease. *News Physiol Sci* 18: 34-7.
- Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F and Sipione S (2001). Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* 24(3): 182-8.
- Centonze D, Gubellini P, Usiello A, Rossi S, Tscherter A, Bracci E, Erbs E, Tognazzi N, Bernardi G, Pisani A, Calabresi P and Borrelli E (2004). Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience* 129(1): 157-66.
- Cepeda C, Ariano MA, Calvert CR, Flores-Hernandez J, Chandler SH, Leavitt BR, Hayden MR and Levine MS (2001). NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J Neurosci Res* 66(4): 525-39.
- Cepeda C, Colwell CS, Itri JN, Chandler SH and Levine MS (1998). Dopaminergic modulation of NMDA-induced whole cell currents in neostriatal neurons in slices: contribution of calcium conductances. *J Neurophysiol* 79(1): 82-94.
- Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS and Karin M (2003). JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* 4(4): 521-33.
- Charvin D, Perrin V, Roze E, Regulier E, Pages C, Luthi-Carter R, Deglon N and Caboche J (soumis). An old drug indicates a new therapeutic opportunity in Huntington's disease.
- Charvin D, Vanhoutte P, Pages C, Borelli E and Caboche J (2005). Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34): 12218-23.
- Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD and Lee WH (1996). The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem* 271(51): 32863-8.
- Chen J, Rusnak M, Luedtke RR and Sidhu A (2004). D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J Biol Chem* 279(38): 39317-30.

- Cheng N, Maeda T, Kume T, Kaneko S, Kochiyama H, Akaike A, Goshima Y and Misu Y (1996). Differential neurotoxicity induced by L-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons. *Brain Res* 743(1-2): 278-83.
- Cheung EC and Slack RS (2004). Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Sci STKE* 2004(251): PE45.
- Choi EY, Jeong D, Won K, Park and Baik JH (1999). G protein-mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 256(1): 33-40.
- Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM and DeFranco DB (2004). Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem* 271(11): 2060-6.
- Ciechanover A and Brundin P (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40(2): 427-46.
- Civelli O, Bunzow JR and Grandy DK (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 281-307.
- Coffey ET, Hongisto V, Dickens M, Davis RJ and Courtney MJ (2000). Dual roles for c-Jun N-terminal kinase in developmental and stress responses in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 20(20): 7602-13.
- Coffey ET, Smiciene G, Hongisto V, Cao J, Brecht S, Herdegen T and Courtney MJ (2002). c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons. *J Neurosci* 22(11): 4335-45.
- Coles CJ, Edmondson DE and Singer TP (1979). Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem* 254(12): 5161-7.
- Colin E, Regulier E, Perrin V, Durr A, Brice A, Aebischer P, Deglon N, Humbert S and Saudou F (2005). Akt is altered in an animal model of Huntington's disease and in patients. *Eur J Neurosci* 21(6): 1478-88.
- Cooper AJ and Stanford IM (2001). Dopamine D2 receptor mediated presynaptic inhibition of striatopallidal GABA(A) IPSCs in vitro. *Neuropharmacology* 41(1): 62-71.
- Cornett J, Cao F, Wang CE, Ross CA, Bates GP, Li SH and Li XJ (2005). Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nat Genet* 37(2): 198-204.
- Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP and Storm-Mathisen J (1987). Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci* 10: 273-80.
- Coyle JT and Schwarcz R (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263(5574): 244-6.
- Cyr M, Beaulieu JM, Laakso A, Sotnikova TD, Yao WD, Bohn LM, Gainetdinov RR and Caron MG (2003). Sustained elevation of extracellular dopamine causes motor dysfunction and selective degeneration of striatal GABAergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 11035-40.

### -D-

- Dai T, Rubie E, Franklin CC, Kraft A, Gillespie DA, Avruch J, Kyriakis JM and Woodgett JR (1995). Stress-activated protein kinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function. *Oncogene* 10(5): 849-55.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L and Bates GP (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90(3): 537-48.
- Davis RJ (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103(2): 239-52.
- de Almeida LP, Ross CA, Zala D, Aebischer P and Deglon N (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *J Neurosci* 22(9): 3473-83.
- De Rooij KE, Dorsman JC, Smoor MA, Den Dunnen JT and Van Ommen GJ (1996). Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in cell lines by immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation. *Hum Mol Genet* 5(8): 1093-9.

- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD and Bunnnett NW (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 148(6): 1267-81.
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M and Davis RJ (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76(6): 1025-37.
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ and Davis RJ (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267(5198): 682-5.
- Dewhurst K, Oliver JE and McKnight AL (1970). Socio-psychiatric consequences of Huntington's disease. *Br J Psychiatry* 116(532): 255-8.
- Dietrich N, Thastrup J, Holmberg C, Gyrd-Hansen M, Fehrenbacher N, Lademann U, Lerdrup M, Herdegen T, Jaattela M and Kallunki T (2004). JNK2 mediates TNF-induced cell death in mouse embryonic fibroblasts via regulation of both caspase and cathepsin protease pathways. *Cell Death Differ* 11(3): 301-13.
- DiFiglia M (1990). Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13(7): 286-9.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA and et al. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14(5): 1075-81.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP and Aronin N (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277(5334): 1990-3.
- Djousse L, Knowlton B, Cupples LA, Marder K, Shoulson I and Myers RH (2002). Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology* 59(9): 1325-30.
- Djousse L, Knowlton B, Hayden MR, Almqvist EW, Brinkman RR, Ross CA, Margolis RL, Rosenblatt A, Durr A, Dode C, Morrison PJ, Novelletto A, Frontali M, Trent RJ, McCusker E, Gomez-Tortosa E, Mayo Cabrero D, Jones R, Zanko A, Nance M, Abramson RK, Suchowersky O, Paulsen JS, Harrison MB, Yang Q, Cupples LA, Mysore J, Gusella JF, MacDonald ME and Myers RH (2004). Evidence for a modifier of onset age in Huntington disease linked to the HD gene in 4p16. *Neurogenetics* 5(2): 109-14.
- Dragatsis I, Levine MS and Zeitlin S (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* 26(3): 300-6.
- Dumartin B, Caille I, Gonon F and Bloch B (1998). Internalization of D1 dopamine receptor in striatal neurons in vivo as evidence of activation by dopamine agonists. *J Neurosci* 18(5): 1650-61.
- Dunah AW, Jeong H, Griffin A, Kim YM, Standaert DG, Hersch SM, Mouradian MM, Young AB, Tanese N and Krainc D (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296(5576): 2238-43.
- Dure LSt, Young AB and Penney JB (1991). Excitatory amino acid binding sites in the caudate nucleus and frontal cortex of Huntington's disease. *Ann Neurol* 30(6): 785-93.
- Durr A, Hahn-Barma V, Brice A, Pecheux C, Dode C and Feingold J (1999). Homozygosity in Huntington's disease. *J Med Genet* 36(2): 172-3.
- Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel JP, Gusella JF, Joyner AL and et al. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269(5222): 407-10.

**-E-**

- Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlain M, Henderson CJ, Wolf CR and Park BK (2003). Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *J Biol Chem* 278(25): 22243-9.
- Eminel S, Klettner A, Roemer L, Herdegen T and Waetzig V (2004). JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. *J Biol Chem* 279(53): 55385-92.

- Engelender S, Sharp AH, Colomer V, Tokito MK, Lanahan A, Worley P, Holzbaur EL and Ross CA (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dy-nactin. *Hum Mol Genet* 6(13): 2205-12.
- Engqvist-Goldstein AE, Kessels MM, Chopra VS, Hayden MR and Drubin DG (1999). An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J Cell Biol* 147(7): 1503-18.
- Engqvist-Goldstein AE, Warren RA, Kessels MM, Keen JH, Heuser J and Drubin DG (2001). The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. *J Cell Biol* 154(6): 1209-23.
- Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R and Johnson EM, Jr. (1994). Altered gene expres-sion in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neu-ronal apoptosis. *J Cell Biol* 127(6 Pt 1): 1717-27.

**-F-**

- Faber PW, Barnes GT, Srinidhi J, Chen J, Gusella JF and MacDonald ME (1998). Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet* 7(9): 1463-74.
- Feigin A, Leenders KL, Moeller JR, Missimer J, Kuenig G, Spetsieris P, Antonini A and Eidelberg D (2001). Metabolic network abnormalities in early Huntington's disease: an [(18F)]FDG PET study. *J Nucl Med* 42(11): 1591-5.
- Felder CC, Albrecht FE, Campbell T, Eisner GM and Jose PA (1993). cAMP-independent, G protein-linked inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in renal brush border by D1 dopamine agonists. *Am J Physiol* 264(6 Pt 2): F1032-7.
- Fernagut PO, Diguët E, Jaber M, Bioulac B and Tison F (2002). Dopamine transporter knock-out mice are hypersensitive to 3-nitropropionic acid-induced striatal damage. *Eur J Neurosci* 15(12): 2053-6.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Richardson EP, Jr., Bird ED and Martin JB (1985). Selective spar-ing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* 230(4725): 561-3.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, Kaddurah-Daouk R, Hersch SM and Beal MF (2000). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 20(12): 4389-97.
- Filloux F and Townsend JJ (1993). Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection. *Exp Neurol* 119(1): 79-88.
- Filloux F and Wamsley JK (1991). Dopaminergic modulation of excitotoxicity in rat striatum: evi-dence from nigrostriatal lesions. *Synapse* 8(4): 281-8.
- Filomeni G, Aquilano K, Rotilio G and Ciriolo MR (2003). Reactive oxygen species-dependent c-Jun NH2-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide. *Cancer Res* 63(18): 5940-9.
- Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, Paterson A, Goedert M and Cohen P (2000). Synergistic acti-vation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J* 352 Pt 1: 145-54.
- Floran B, Floran L, Sierra A and Aceves J (1997). D2 receptor-mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. *Neurosci Lett* 237(1): 1-4.
- Fornstedt B, Pileblad E and Carlsson A (1990). In vivo autoxidation of dopamine in guinea pig stri-atum increases with age. *J Neurochem* 55(2): 655-9.
- Foroud T, Gray J, Ivashina J and Conneally PM (1999). Differences in duration of Huntington's dis-ease based on age at onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66(1): 52-6.
- France AH (2002). La Maladie de Huntington. Deficiences motrices et situations de handicaps. *APF*: 197-9.
- Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA and Sugimoto C (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22(56): 8983-98.
- Freiman RN and Tjian R (2002). Neurodegeneration. A glutamine-rich trail leads to transcription fac-tors. *Science* 296(5576): 2149-50.

**-G-**

- Gainetdinov RR, Bohn LM, Sotnikova TD, Cyr M, Laakso A, Macrae AD, Torres GE, Kim KM, Lefkowitz RJ, Caron MG and Premont RT (2003). Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron* 38(2): 291-303.
- Gainetdinov RR, Jones SR, Fumagalli F, Wightman RM and Caron MG (1998). Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis. *Brain Res Brain Res Rev* 26(2-3): 148-53.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ and Caron MG (2004). Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27: 107-44.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M and Caron MG (1999). Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283(5400): 397-401.
- Garcia M, Charvin D and Caboche J (2004). Expanded huntingtin activates the c-Jun terminal kinase/c-Jun pathway prior to aggregate formation in striatal neurons in culture. *Neuroscience* 127(4): 859-70.
- Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E and Caboche J (2002). The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. *J Neurosci* 22(6): 2174-84.
- Garrett MC and Soares-da-Silva P (1992). Increased cerebrospinal fluid dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid levels in Huntington's disease: evidence for an overactive dopaminergic brain transmission. *J Neurochem* 58(1): 101-6.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S and Saudou F (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118(1): 127-38.
- Gavin AC and Nebreda AR (1999). A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1. *Curr Biol* 9(5): 281-4.
- Ge L, Ly Y, Hollenberg M and DeFea K (2003). A beta-arrestin-dependent scaffold is associated with prolonged MAPK activation in pseudopodia during protease-activated receptor-2-induced chemotaxis. *J Biol Chem* 278(36): 34418-26.
- Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudakis S, Gutekunst CA, Leavitt BR, Metzler M, Hackam AS, Tam J, Vaillancourt JP, Houtzager V, Rasper DM, Roy S, Hayden MR and Nicholson DW (2002). Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat Cell Biol* 4(2): 95-105.
- Gingrich JA and Caron MG (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16: 299-321.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM and Caron MG (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379(6566): 606-12.
- Glass M, Dragunow M and Faull RL (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97(3): 505-19.
- Goldberg AL (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426(6968): 895-9.
- Grafton ST, Mazziotta JC, Pahl JJ, St George-Hyslop P, Haines JL, Gusella J, Hoffman JM, Baxter LR and Phelps ME (1990). A comparison of neurological, metabolic, structural, and genetic evaluations in persons at risk for Huntington's disease. *Ann Neurol* 28(5): 614-21.
- Grafton ST, Mazziotta JC, Pahl JJ, St George-Hyslop P, Haines JL, Gusella J, Hoffman JM, Baxter LR and Phelps ME (1992). Serial changes of cerebral glucose metabolism and caudate size in persons at risk for Huntington's disease. *Arch Neurol* 49(11): 1161-7.
- Graham DG (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14(4): 633-43.



- Graham DG (1984). Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 5(1): 83-95.
- Graveland GA, Williams RS and DiFiglia M (1985). Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227(4688): 770-3.
- Graybiel AM (2000). The basal ganglia. *Curr Biol* 10(14): R509-11.
- Green H (1993). Human genetic diseases due to codon reiteration: relationship to an evolutionary mechanism. *Cell* 74(6): 955-6.
- Greif GJ, Lin YJ, Liu JC and Freedman JE (1995). Dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression. *J Neurosci* 15(6): 4533-44.
- Group PS (2004). The safety and tolerability of a mixed lineage kinase inhibitor (CEP-1347) in PD. *Neurology* 62(2): 330-2.
- Group THsDCR (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(6): 971-83.
- Guan QH, Pei DS, Zhang QG, Hao ZB, Xu TL and Zhang GY (2005). The neuroprotective action of SP600125, a new inhibitor of JNK, on transient brain ischemia/reperfusion-induced neuronal death in rat hippocampal CA1 via nuclear and non-nuclear pathways. *Brain Res* 1035(1): 51-9.
- Guiramand J, Montmayeur JP, Ceraline J, Bhatia M and Borrelli E (1995). Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 270(13): 7354-8.
- Guivarc'h D, Vernier P and Vincent JD (1995). Sex steroid hormones change the differential distribution of the isoforms of the D2 dopamine receptor messenger RNA in the rat brain. *Neuroscience* 69(1): 159-66.
- Gunawardena S, Her LS, Brusch RG, Laymon RA, Niesman IR, Gordesky-Gold B, Sintasath L, Bonini NM and Goldstein LS (2003). Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40(1): 25-40.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY and et al. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306(5940): 234-8.
- Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Ferrante RJ, Li XJ and Hersch SM (1998). The cellular and subcellular localization of huntingtin-associated protein 1 (HAP1): comparison with huntingtin in rat and human. *J Neurosci* 18(19): 7674-86.
- Gutekunst CA, Li SH, Yi H, Mulroy JS, Kuemmerle S, Jones R, Rye D, Ferrante RJ, Hersch SM and Li XJ (1999). Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* 19(7): 2522-34.
- Guzik BW and Goldstein LS (2004). Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Curr Opin Cell Biol* 16(4): 443-50.

## -H-

- Hackam AS, Singaraja R, Wellington CL, Metzler M, McCutcheon K, Zhang T, Kalchman M and Hayden MR (1998). The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol* 141(5): 1097-105.
- Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59(5): 1609-23.
- Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M and Rubin LL (1995). A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14(5): 927-39.
- Han SK, Mytilineou C and Cohen G (1996). L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress. *J Neurochem* 66(2): 501-10.
- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM and Firestein GS (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108(1): 73-81.

- Harjes P and Wanker EE (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28(8): 425-33.
- Hastings TG, Lewis DA and Zigmond MJ (1996). Role of oxidation in the neurotoxic effects of intra-striatal dopamine injections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5): 1956-61.
- Hedreen JC, Peyser CE, Folstein SE and Ross CA (1991). Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 133(2): 257-61.
- Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR, Seto E, Eisenman RN, Rose DW, Glass CK and Rosenfeld MG (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387(6628): 43-8.
- Hermel E, Gafni J, Propp SS, Leavitt BR, Wellington CL, Young JE, Hackam AS, Logvinova AV, Peel AL, Chen SF, Hook V, Singaraja R, Krajewski S, Goldsmith PC, Ellerby HM, Hayden MR, Bredesen DE and Ellerby LM (2004). Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 11(4): 424-38.
- Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A and Galarraga E (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca<sup>2+</sup> conductance. *J Neurosci* 17(9): 3334-42.
- Herve D, Levi-Strauss M, Marey-Semper I, Verney C, Tassin JP, Glowinski J and Girault JA (1993). G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci* 13(5): 2237-48.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A and Karin M (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7(11): 2135-48.
- Hickey MA, Reynolds GP and Morton AJ (2002). The role of dopamine in motor symptoms in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 81(1): 46-59.
- Hilditch-Maguire P, Trettel F, Passani LA, Auerbach A, Persichetti F and MacDonald ME (2000). Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum Mol Genet* 9(19): 2789-97.
- Hirooka Y and Shimokawa H (2005). Therapeutic potential of rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases. *Am J Cardiovasc Drugs* 5(1): 31-9.
- Ho LW, Carmichael J, Swartz J, Wyttenbach A, Rankin J and Rubinsztein DC (2001). The molecular biology of Huntington's disease. *Psychol Med* 31(1): 3-14.
- Hoffner G, Island ML and Djian P (2005). Purification of neuronal inclusions of patients with Huntington's disease reveals a broad range of N-terminal fragments of expanded huntingtin and insoluble polymers. *J Neurochem*.
- 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(Pt 5): 941-8.
- Holbert S, Denghien I, Kiechle T, Rosenblatt A, Wellington C, Hayden MR, Margolis RL, Ross CA, Dausset J, Ferrante RJ and Neri C (2001). The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA150 interacts with huntingtin: neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 1811-6.
- Horiuchi A, Takeyasu K, Mouradian MM, Jose PA and Felder RA (1993). D1A dopamine receptor stimulation inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity through protein kinase A. *Mol Pharmacol* 43(2): 281-5.
- Hoyt KR, Reynolds IJ and Hastings TG (1997). Mechanisms of dopamine-induced cell death in cultured rat forebrain neurons: interactions with and differences from glutamate-induced cell death. *Exp Neurol* 143(2): 269-81.
- Huang CC, Faber PW, Persichetti F, Mittal V, Vonsattel JP, MacDonald ME and Gusella JF (1998). Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somat Cell Mol Genet* 24(4): 217-33.
- Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME and Saudou F (2002). The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2(6): 831-7.

- Humbert S and Saudou F (2004). [Stimulation of BDNF transport by huntingtin]. *Med Sci (Paris)* 20(11): 952-4.
- Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P and Flavell RA (2004). JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(2): 665-70.
- Huntington G (2003). On chorea. George Huntington, M.D. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15(1): 109-12.

**-I-**

- Irving EA and Bamford M (2002). Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(6): 631-47.
- Ishisaki A, Hayashi H, Suzuki S, Ozawa K, Mizukoshi E, Miyakawa K, Suzuki M and Imamura T (2001). Glutathione S-transferase Pi is a dopamine-inducible suppressor of dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurochem* 77(5): 1362-71.
- Ito M, Yoshioka K, Akechi M, Yamashita S, Takamatsu N, Sugiyama K, Hibi M, Nakabeppu Y, Shiba T and Yamamoto KI (1999). JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* 19(11): 7539-48.
- Iwata A, Christianson JC, Bucci M, Ellerby LM, Nukina N, Forno LS and Kopito RR (2005). Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(37): 13135-40.

**-J-**

- Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ and Kornfeld K (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* 13(2): 163-75.
- Jaeschke A, Czech MP and Davis RJ (2004). An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes Dev* 18(16): 1976-80.
- Jakel RJ and Maragos WF (2000). Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* 23(6): 239-45.
- Jana NR, Zemskov EA, Wang G and Nukina N (2001). Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 10(10): 1049-59.
- Jankovic J and Ashizawa T (1995). Tourettism associated with Huntington's disease. *Mov Disord* 10(1): 103-5.
- Jensen P, Sorensen SA, Fenger K and Bolwig TG (1993). A study of psychiatric morbidity in patients with Huntington's disease, their relatives, and controls. Admissions to psychiatric hospitals in Denmark from 1969 to 1991. *Br J Psychiatry* 163: 790-7.
- Jones AL (1999). The localization and interactions of huntingtin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354(1386): 1021-7.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM and Caron MG (1998). Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 4029-34.
- Jucaite A (2002). [Dopaminergic modulation of cerebral activity and cognitive functions]. *Medicina (Kaunas)* 38(4): 357-62.

**-K-**

- Kahlem P, Green H and Djian P (1998). Transglutaminase action imitates Huntington's disease: selective polymerization of Huntingtin containing expanded polyglutamine. *Mol Cell* 1(4): 595-601.

- Kahlem P, Terre C, Green H and Djian P (1996). Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14580-5.
- Kaminska B, Pyrzynska B, Ciecchomska I and Wisniewska M (2000). Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60(3): 395-402.
- Karin M (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270(28): 16483-6.
- Karin M, Liu Z and Zandi E (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 240-6.
- Kazantsev A, Preisinger E, Dranovsky A, Goldgaber D and Housman D (1999). Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11404-9.
- Kazantsev A, Walker HA, Slepko N, Bear JE, Preisinger E, Steffan JS, Zhu YZ, Gertler FB, Housman DE, Marsh JL and Thompson LM (2002). A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nat Genet* 30(4): 367-76.
- Kebabian JW and Calne DB (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277(5692): 93-6.
- Kegel KB, Meloni AR, Yi Y, Kim YJ, Doyle E, Cuiffo BG, Sapp E, Wang Y, Qin ZH, Chen JD, Nevins JR, Aronin N and DiFiglia M (2002). Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J Biol Chem* 277(9): 7466-76.
- Kelkar N, Delmotte MH, Weston CR, Barrett T, Sheppard BJ, Flavell RA and Davis RJ (2003). Morphogenesis of the telencephalic commissure requires scaffold protein JNK-interacting protein 3 (JIP3). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17): 9843-8.
- Kelkar N, Gupta S, Dickens M and Davis RJ (2000). Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* 20(3): 1030-43.
- Kerbeshian J, Burd L, Leech C and Rorabaugh A (1991). Huntington disease and childhood-onset Tourette syndrome. *Am J Med Genet* 39(1): 1-3.
- Keyse SM (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Curr Opin Cell Biol* 12(2): 186-92.
- Khan ZU, Gutierrez A, Martin R, Penafiel A, Rivera A and De La Calle A (1998). Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol* 402(3): 353-71.
- Kiebertz K, MacDonald M, Shih C, Feigin A, Steinberg K, Bordwell K, Zimmerman C, Srinidhi J, Sotack J, Gusella J and et al. (1994). Trinucleotide repeat length and progression of illness in Huntington's disease. *J Med Genet* 31(11): 872-4.
- Kim SJ, Kim MY, Lee EJ, Ahn YS and Baik JH (2004). Distinct regulation of internalization and mitogen-activated protein kinase activation by two isoforms of the dopamine D2 receptor. *Mol Endocrinol* 18(3): 640-52.
- Kitai ST and Surmeier DJ (1993). Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv Neurol* 60: 40-52.
- Kremer B, Almqvist E, Theilmann J, Spence N, Telenius H, Goldberg YP and Hayden MR (1995). Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet* 57(2): 343-50.
- Kuan CY, Whitmarsh AJ, Yang DD, Liao G, Schloemer AJ, Dong C, Bao J, Banasiak KJ, Haddad GG, Flavell RA, Davis RJ and Rakic P (2003). A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15184-9.
- Kuan CY, Yang DD, Samanta Roy DR, Davis RJ, Rakic P and Flavell RA (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22(4): 667-76.
- Kulich SM and Chu CT (2001). Sustained extracellular signal-regulated kinase activation by 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 77(4): 1058-66.
- Kumar D and Jugdutt BI (2003). Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med* 142(5): 288-97.
- Kyriakis JM and Avruch J (1990). pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* 265(28): 17355-63.

- Kyriakis JM and Avruch J (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2): 807-69.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J and Woodgett JR (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369(6476): 156-60.

**-L-**

- La Fontaine MA, Geddes JW, Banks A and Butterfield DA (2000). 3-nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Brain Res* 858(2): 356-62.
- Lachowicz JE and Sibley DR (1997). Chimeric D2/D3 dopamine receptor coupling to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 237(2): 394-9.
- Landles C and Bates GP (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep* 5(10): 958-63.
- Landwehrmeyer GB, McNeil SM, Dure LSt, Ge P, Aizawa H, Huang Q, Ambrose CM, Duyao MP, Bird ED, Bonilla E and et al. (1995). Huntington's disease gene: regional and cellular expression in brain of normal and affected individuals. *Ann Neurol* 37(2): 218-30.
- Le Crom S (2000). Analyse comparée des récepteurs D1 de la dopamine chez les vertébrés : définition des caractères fonctionnels spécifiques de chacun des sous-types du récepteur D1. Orsay, Université de Paris-Sud: 257.
- Lee WC, Yoshihara M and Littleton JT (2004). Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a Drosophila model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 3224-9.
- Lefkowitz RJ and Shenoy SK (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308(5721): 512-7.
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ and et al. (1993). Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 8861-5.
- Levine MS, Klapstein GJ, Koppel A, Gruen E, Cepeda C, Vargas ME, Jokel ES, Carpenter EM, Zanjani H, Hurst RS, Efstratiadis A, Zeitlin S and Chesselet MF (1999). Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 58(4): 515-32.
- Li H, Li SH, Cheng AL, Mangiarini L, Bates GP and Li XJ (1999). Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice. *Hum Mol Genet* 8(7): 1227-36.
- Li H, Li SH, Yu ZX, Shelbourne P and Li XJ (2001). Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 21(21): 8473-81.
- Li H, Wyman T, Yu ZX, Li SH and Li XJ (2003a). Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Hum Mol Genet* 12(16): 2021-30.
- Li JL, Hayden MR, Almqvist EW, Brinkman RR, Durr A, Dode C, Morrison PJ, Suchowersky O, Ross CA, Margolis RL, Rosenblatt A, Gomez-Tortosa E, Cabrero DM, Novelletto A, Frontali M, Nance M, Trent RJ, McCusker E, Jones R, Paulsen JS, Harrison M, Zanko A, Abramson RK, Russ AL, Knowlton B, Djousse L, Mysore JS, Tariot S, Gusella MF, Wheeler VC, Atwood LD, Cupples LA, Saint-Hilaire M, Cha JH, Hersch SM, Korshetz WJ, Gusella JF, MacDonald ME and Myers RH (2003b). A genome scan for modifiers of age at onset in Huntington disease: The HD MAPS study. *Am J Hum Genet* 73(3): 682-7.
- Li JY, Plomann M and Brundin P (2003c). Huntington's disease: a synaptopathy? *Trends Mol Med* 9(10): 414-20.
- Li SH, Cheng AL, Zhou H, Lam S, Rao M, Li H and Li XJ (2002). Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol* 22(5): 1277-87.
- Li SH, Gutekunst CA, Hersch SM and Li XJ (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J Neurosci* 18(4): 1261-9.

- Li SH and Li XJ (2004). Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20(3): 146-54.
- Li SH, Schilling G, Young WS, 3rd, Li XJ, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG and et al. (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 11(5): 985-93.
- Lin A (2003). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* 25(1): 17-24.
- Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL and Karin M (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268(5208): 286-90.
- Lione LA, Carter RJ, Hunt MJ, Bates GP, Morton AJ and Dunnett SB (1999). Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 19(23): 10428-37.
- Liu J and Lin A (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 15(1): 36-42.
- Liu L, Shen RY, Kapatos G and Chiodo LA (1994a). Dopamine neuron membrane physiology: characterization of the transient outward current (IA) and demonstration of a common signal transduction pathway for IA and IK. *Synapse* 17(4): 230-40.
- Liu R, Barkhordarian H, Emadi S, Park CB and Sierks MR (2005). Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol Dis* 20(1): 74-81.
- Liu YF (1998). Expression of polyglutamine-expanded Huntingtin activates the SEK1-JNK pathway and induces apoptosis in a hippocampal neuronal cell line. *J Biol Chem* 273(44): 28873-7.
- Liu YF, Dorow D and Marshall J (2000). Activation of MLK2-mediated signaling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin. *J Biol Chem* 275(25): 19035-40.
- Liu YF, Jakobs KH, Rasenick MM and Albert PR (1994b). G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G0 and Gi2 in GH4C1 pituitary cells. *J Biol Chem* 269(19): 13880-6.
- Lu X, Nemoto S and Lin A (1997). Identification of c-Jun NH2-terminal protein kinase (JNK)-activating kinase 2 as an activator of JNK but not p38. *J Biol Chem* 272(40): 24751-4.
- Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J and Sabri M (1991). 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 18(4): 492-8.
- Lunkes A, Lindenberg KS, Ben-Haiem L, Weber C, Devys D, Landwehrmeyer GB, Mandel JL and Trottier Y (2002). Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* 10(2): 259-69.
- Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R and Roth GS (1998). Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J Biol Chem* 273(6): 3756-64.
- Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, Frey AS, Spektor BS, Penney EB, Schilling G, Ross CA, Borchelt DR, Tapscott SJ, Young AB, Cha JH and Olson JM (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 9(9): 1259-71.
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL and Lefkowitz RJ (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2449-54.

**-M-**

- MacDonald ME (2003). Huntingtin: alive and well and working in middle management. *Sci STKE* 2003(207): pe48.
- Macey TA, Gurevich VV and Neve KA (2004). Preferential Interaction between the dopamine D2 receptor and Arrestin2 in neostriatal neurons. *Mol Pharmacol* 66(6): 1635-42.
- Maker HS, Weiss C, Silides DJ and Cohen G (1981). Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem* 36(2): 589-93.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW and Bates GP (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG

- repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87(3): 493-506.
- Mann JJ, Kaplan RD and Bird ED (1986). Elevated postmortem monoamine oxidase B activity in the caudate nucleus in Huntington's disease compared to schizophrenics and controls. *J Neural Transm* 65(3-4): 277-83.
- Manning AM and Davis RJ (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* 2(7): 554-65.
- Maragos WF, Jakel RJ, Pang Z and Geddes JW (1998). 6-Hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway attenuate striatal malonate and 3-nitropropionic acid lesions. *Exp Neurol* 154(2): 637-44.
- Marcora E, Gowan K and Lee JE (2003). Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16): 9578-83.
- Margolis RL and Ross CA (2003). Diagnosis of Huntington disease. *Clin Chem* 49(10): 1726-32.
- Martindale D, Hackam A, Wieczorek A, Ellerby L, Wellington C, McCutcheon K, Singaraja R, Kazemi-Esfarjani P, Devon R, Kim SU, Bredesen DE, Tufaro F and Hayden MR (1998). Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* 18(2): 150-4.
- Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K and Ichijo H (2004). The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem (Tokyo)* 136(3): 261-5.
- Matsumoto G, Stojanovic A, Holmberg CI, Kim S and Morimoto RI (2005). Structural properties and neuronal toxicity of amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu/Zn superoxide dismutase 1 aggregates. *J Cell Biol* 171(1): 75-85.
- Matsuura H, Nishitoh H, Takeda K, Matsuzawa A, Amagasa T, Ito M, Yoshioka K and Ichijo H (2002). Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway. A new mode of regulation of the MAP kinase cascade. *J Biol Chem* 277(43): 40703-9.
- Matthews RT, Yang L, Browne S, Baik M and Beal MF (1998). Coenzyme Q10 administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8892-7.
- Mazziotta JC, Phelps ME, Pahl JJ, Huang SC, Baxter LR, Riege WH, Hoffman JM, Kuhl DE, Lanto AB, Wapenski JA and et al. (1987). Reduced cerebral glucose metabolism in asymptomatic subjects at risk for Huntington's disease. *N Engl J Med* 316(7): 357-62.
- McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G and Fischbeck KH (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 9(14): 2197-202.
- McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ and Lefkowitz RJ (2000). Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290(5496): 1574-7.
- McGeer EG and McGeer PL (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* 263(5577): 517-9.
- McLaughlin BA, Nelson D, Erecinska M and Chesselet MF (1998). Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by a mitochondrial inhibitor. *J Neurochem* 70(6): 2406-15.
- McMillian MK, He XP, Hong JS and Pennypacker KR (1992). Dopamine stimulates [3H]phorbol 12,13-dibutyrate binding in cultured striatal cells. *J Neurochem* 58(4): 1308-12.
- McPherson PS (2002). The endocytic machinery at an interface with the actin cytoskeleton: a dynamic, hip intersection. *Trends Cell Biol* 12(7): 312-5.
- Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S and Chesselet MF (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* 465(1): 11-26.
- Mendel G (1865). Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlungen der Naturforschenden Verein in Brünn* 4: 3-47.
- Merienne K, Helmlinger D, Perkin GR, Devys D and Trotter Y (2003). Polyglutamine expansion induces a protein-damaging stress connecting heat shock protein 70 to the JNK pathway. *J Biol Chem* 278(19): 16957-67.

- Metzler M, Legendre-Guillemain V, Gan L, Chopra V, Kwok A, McPherson PS and Hayden MR (2001). HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *J Biol Chem* 276(42): 39271-6.
- Metzler M, Li B, Gan L, Georgiou J, Gutekunst CA, Wang Y, Torre E, Devon RS, Oh R, Legendre-Guillemain V, Rich M, Alvarez C, Gertsenstein M, McPherson PS, Nagy A, Wang YT, Roder JC, Raymond LA and Hayden MR (2003). Disruption of the endocytic protein HIP1 results in neurological deficits and decreased AMPA receptor trafficking. *Embo J* 22(13): 3254-66.
- Michel PP and Hefti F (1990). Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res* 26(4): 428-35.
- Ming L (1995). Moldy sugarcane poisoning--a case report with a brief review. *J Toxicol Clin Toxicol* 33(4): 363-7.
- Mishra SK, Agostinelli NR, Brett TJ, Mizukami I, Ross TS and Traub LM (2001). Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. *J Biol Chem* 276(49): 46230-6.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M and Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78(1): 189-225.
- Mitchell IJ, Cooper AJ and Griffiths MR (1999). The selective vulnerability of striatopallidal neurons. *Prog Neurobiol* 59(6): 691-719.
- Modregger J, DiProspero NA, Charles V, Tagle DA 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(21): 2547-58.
- Monsma FJ, Jr., Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR and Sibley DR (1990). Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(17): 6723-7.
- Mooney LM and Whitmarsh AJ (2004). Docking interactions in the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 279(12): 11843-52.
- Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y and Greenberg ME (2001). Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21(19): 7551-60.
- Morrison DK and Davis RJ (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 91-118.
- Morton AJ and Edwardson JM (2001). Progressive depletion of complexin II in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 76(1): 166-72.
- Morton AJ, Faull RL and Edwardson JM (2001). Abnormalities in the synaptic vesicle fusion machinery in Huntington's disease. *Brain Res Bull* 56(2): 111-7.
- Mueller BK, Mack H and Teusch N (2005). Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 4(5): 387-98.
- Murphy KP, Carter RJ, Lione LA, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB and Morton AJ (2000). Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci* 20(13): 5115-23.
- Myers RH, Vonsattel JP, Stevens TJ, Cupples LA, Richardson EP, Martin JB and Bird ED (1988). Clinical and neuropathologic assessment of severity in Huntington's disease. *Neurology* 38(3): 341-7.
- Myers RH (2004). Huntington's disease genetics. *NeuroRx* 1(2): 255-62.

-N-

- Naarding P, Kremer HP and Zitman FG (2001). Huntington's disease: a review of the literature on prevalence and treatment of neuropsychiatric phenomena. *Eur Psychiatry* 16(8): 439-45.
- Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL and Evans RM (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89(3): 373-80.
- Namkung Y and Sibley DR (2004). Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* 279(47): 49533-41.



- Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV and Alessandrini A (2001). Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11569-74.
- Nance MA and Myers RH (2001). Juvenile onset Huntington's disease--clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7(3): 153-7.
- Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG and Hayden MR (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81(5): 811-23.
- Neuwald AF and Hirano T (2000). HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res* 10(10): 1445-52.
- Nishi A, Snyder GL and Greengard P (1997). Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17(21): 8147-55.
- Nucifora FC, Jr., Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM and Ross CA (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291(5512): 2423-8.
- Nyberg S, Farde L and Halldin C (1997). Delayed normalization of central D2 dopamine receptor availability after discontinuation of haloperidol decanoate. Preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* 54(10): 953-8.

**-O-**

- Obata T (2002). Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. *J Neural Transm* 109(9): 1159-80.
- O'Dell SJ, Weihmuller FB and Marshall JF (1993). Methamphetamine-induced dopamine overflow and injury to striatal dopamine terminals: attenuation by dopamine D1 or D2 antagonists. *J Neurochem* 60(5): 1792-9.
- Offen D, Ziv I, Sternin H, Melamed E and Hochman A (1996). Prevention of dopamine-induced cell death by thiol antioxidants: possible implications for treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 141(1): 32-9.
- Ogawa N (1995). Molecular and chemical neuropharmacology of dopamine receptor subtypes. *Acta Med Okayama* 49(1): 1-11.
- Okun MS and Thommi N (2004). Americo Negrette (1924 to 2003): diagnosing Huntington disease in Venezuela. *Neurology* 63(2): 340-3.
- Olney JW (1994). Excitotoxins in foods. *Neurotoxicology* 15(3): 535-44.

**-P-**

- Palfi S, Ferrante RJ, Brouillet E, Beal MF, Dolan R, Guyot MC, Peschanski M and Hantraye P (1996). Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 16(9): 3019-25.
- Park SK, Nguyen MD, Fischer A, Luke MP, Affar el B, Dieffenbach PB, Tseng HC, Shi Y and Tsai LH (2005). Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell* 122(2): 275-87.
- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B and Cowburn RF (2001). Localization of active forms of C-jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis* 3(1): 41-48.
- Penney JB, Jr., Young AB, Shoulson I, Starosta-Rubenstein S, Snodgrass SR, Sanchez-Ramos J, Ramos-Arroyo M, Gomez F, Penchaszadeh G, Alvir J and et al. (1990). Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals. *Mov Disord* 5(2): 93-9.
- Perutz M (1994). Polar zippers: their role in human disease. *Protein Sci* 3(10): 1629-37.
- Perutz MF, Finch JT, Berriman J and Lesk A (2002a). Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5591-5.

- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M and Finch JT (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5355-8.
- Perutz MF, Pope BJ, Owen D, Wanker EE and Scherzinger E (2002b). Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid beta-peptide of amyloid plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8): 5596-600.
- Peschanski M, Cesaro P and Hantraye P (1995). Rationale for intrastriatal grafting of striatal neuroblasts in patients with Huntington's disease. *Neuroscience* 68(2): 273-85.
- Petersen A, Larsen KE, Behr GG, Romero N, Przedborski S, Brundin P and Sulzer D (2001). Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy and degeneration. *Hum Mol Genet* 10(12): 1243-54.
- Pollitt SK, Pallos J, Shao J, Desai UA, Ma AA, Thompson LM, Marsh JL and Diamond MI (2003). A rapid cellular FRET assay of polyglutamine aggregation identifies a novel inhibitor. *Neuron* 40(4): 685-94.
- Popovic V, Svetel M, Djurovic M, Petrovic S, Doknic M, Pekic S, Miljic D, Milic N, Glodic J, Dieguez C, Casanueva FF and Kostic V (2004). Circulating and cerebrospinal fluid ghrelin and leptin: potential role in altered body weight in Huntington's disease. *Eur J Endocrinol* 151(4): 451-5.
- Pugh BF and Tjian R (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61(7): 1187-97.

**-Q-**

- Quinn N and Schrag A (1998). Huntington's disease and other choreas. *J Neurol* 245(11): 709-16.

**-R-**

- Ranen NG, Stine OC, Abbott MH, Sherr M, Codori AM, Franz ML, Chao NI, Chung AS, Pleasant N, Callahan C and et al. (1995). Anticipation and instability of IT-15 (CAG)<sub>n</sub> repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet* 57(3): 593-602.
- Rangone H, Humbert S and Saudou F (2004). Huntington's disease: how does huntingtin, an anti-apoptotic protein, become toxic? *Pathol Biol (Paris)* 52(6): 338-42.
- Rangone H, Pardo R, Colin E, Girault JA, Saudou F and Humbert S (2005). Phosphorylation of arfaptin 2 at Ser260 by Akt Inhibits PolyQ-huntingtin-induced toxicity by rescuing proteasome impairment. *J Biol Chem* 280(23): 22021-8.
- Rebec GV, Barton SJ, Marseilles AM and Collins K (2003). Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice. *Neuroreport* 14(9): 1263-5.
- Reed TE and Chandler JH (1958). Huntington's chorea in Michigan. I. Demography and genetics. *Am J Hum Genet* 10(2): 201-25.
- Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB and Young AB (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(15): 5733-7.
- Resnick L and Fennell M (2004). Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. *Drug Discov Today* 9(21): 932-9.
- Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR and Anderton BH (2000). Phosphorylation sites on tau identified by nano-electrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* 74(4): 1587-95.
- Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A and Anderton BH (1997). Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem* 68(4): 1736-44.
- Reynolds DS, Carter RJ and Morton AJ (1998). Dopamine modulates the susceptibility of striatal neurons to 3-nitropropionic acid in the rat model of Huntington's disease. *J Neurosci* 18(23): 10116-27.

- Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR and Moore RY (1982). Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. *Brain Res* 235(1): 93-103.
- Robidoux J, Cao W, Quan H, Daniel KW, Moukdar F, Bai X, Floering LM and Collins S (2005). Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. *Mol Cell Biol* 25(13): 5466-79.
- Robitaille Y, Lopes-Cendes I, Becher M, Rouleau G and Clark AW (1997). The neuropathology of CAG repeat diseases: review and update of genetic and molecular features. *Brain Pathol* 7(3): 901-26.
- Rodrigues Pdos S and Dowling JE (1990). Dopamine induces neurite retraction in retinal horizontal cells via diacylglycerol and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9693-7.
- Rosenberg PA (1988). Catecholamine toxicity in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci* 8(8): 2887-94.
- Ross CA (1995). When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron* 15(3): 493-6.
- Rubinsztein DC, Leggo J, Chiano M, Dodge A, Norbury G, Rosser E and Craufurd D (1997). Genotypes at the GluR6 kainate receptor locus are associated with variation in the age of onset of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3872-6.

-S-

- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K and Ichijo H (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 17(9): 2596-606.
- Sanchez C, Diaz-Nido J and Avila J (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61(2): 133-68.
- Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM and Zon LI (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* 372(6508): 794-8.
- Sanchez I, Mahlke C and Yuan J (2003). Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421(6921): 373-9.
- Sano I, Gamo T, Kakimoto Y, Taniguchi K, Takesada M and Nishinuma K (1959). Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochim Biophys Acta* 32: 586-7.
- Saporito MS, Brown EM, Miller MS and Carswell S (1999). CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons *In vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 288(2): 421-7.
- Saporito MS, Thomas BA and Scott RW (2000). MPTP activates c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) and its upstream regulatory kinase MKK4 in nigrostriatal neurons *in vivo*. *J Neurochem* 75(3): 1200-8.
- Sapp E, Penney J, Young A, Aronin N, Vonsattel JP and DiFiglia M (1999). Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(2): 165-73.
- Sarker KP, Biswas KK, Rosales JL, Yamaji K, Hashiguchi T, Lee KY and Maruyama I (2003). Ebselen inhibits NO-induced apoptosis of differentiated PC12 cells via inhibition of ASK1-p38 MAPK-p53 and JNK signaling and activation of p44/42 MAPK and Bcl-2. *J Neurochem* 87(6): 1345-53.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D and Greenberg ME (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95(1): 55-66.
- Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A, Griffon N, Corsini GU, Sokoloff P, Levenson R, Vogel Z and Maggio R (2001). D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem* 276(32): 30308-14.

- Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H and Wanker EE (1997). Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90(3): 549-58.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D and Younkin S (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2(8): 864-70.
- Schmidt U, Beyer C, Oestreich AB, Reisert I, Schilling K and Pilgrim C (1996). Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons. *Neuroscience* 74(2): 453-60.
- Schulz JB, Henshaw DR, MacGarvey U and Beal MF (1996). Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem Int* 29(2): 167-71.
- Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Ferrante RJ, Siwek D, Henshaw DR, Cipolloni PB, Mecocci P, Kowall NW, Rosen BR and et al. (1995). Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J Neurosci* 15(12): 8419-29.
- Seeman P and Van Tol HH (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 15(7): 264-70.
- Shapiro E, Shapiro AK, Fulop G, Hubbard M, Mandeli J, Nordlie J and Phillips RA (1989). Controlled study of haloperidol, pimozide and placebo for the treatment of Gilles de la Tourette's syndrome. *Arch Gen Psychiatry* 46(8): 722-30.
- Sharp AH, Loev SJ, Schilling G, Li SH, Li XJ, Bao J, Wagster MV, Kotzuk JA, Steiner JP, Lo A and et al. (1995). Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14(5): 1065-74.
- Shaulian E and Karin M (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4(5): E131-6.
- Shenoy SK and Lefkowitz RJ (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375(Pt 3): 503-15.
- Shiwach RS and Norbury CG (1994). A controlled psychiatric study of individuals at risk for Huntington's disease. *Br J Psychiatry* 165(4): 500-5.
- Shoji M, Iwakami N, Takeuchi S, Waragai M, Suzuki M, Kanazawa I, Lipka CF, Ono S and Okazawa H (2000). JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. *Brain Res Mol Brain Res* 85(1-2): 221-33.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P and Marsden CD (1994). Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36(3): 348-55.
- Sidhu A, Wersinger C and Vernier P (2004). Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *FASEB J* 18(6): 637-47.
- Siesling S, Vegter-van de Vlis M, Losekoot M, Belfroid RD, Maat-Kievit JA, Kremer HP and Roos RA (2000). Family history and DNA analysis in patients with suspected Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69(1): 54-9.
- Silva RM, Kuan CY, Rakic P and Burke RE (2005). Mixed lineage kinase-c-jun N-terminal kinase signaling pathway: a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20(6): 653-64.
- Singer HS (2001). The treatment of tics. *Curr Neurol Neurosci Rep* 1(2): 195-202.
- Singer HS, Butler IJ, Tune LE, Seifert WE, Jr. and Coyle JT (1982). Dopaminergic dysfunction in Tourette syndrome. *Ann Neurol* 12(4): 361-6.
- Sirinathsinghji DJ, Heavens RP and McBride CS (1988). Dopamine-releasing action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) in the neostriatum of the rat as demonstrated in vivo by the push-pull perfusion technique: dependence on sodium but not calcium ions. *Brain Res* 443(1-2): 101-16.
- Smiley JF, Levey AI, Ciliax BJ and Goldman-Rakic PS (1994). D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12): 5720-4.
- Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K and Sturgill TW (1999). Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J Biol Chem* 274(5): 2893-8.

- Smith R, Brundin P and Li JY (2005). Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell Mol Life Sci* 62(17): 1901-12.
- Smith TS, Parker WD, Jr. and Bennett JP, Jr. (1994). L-dopa increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-dopa toxicity? *Neuroreport* 5(8): 1009-11.
- Sokoloff P and Schwartz JC (1995). Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol Sci* 16(8): 270-5.
- Spina MB and Cohen G (1988). Exposure of striatal [corrected] synaptosomes to L-dopa increases levels of oxidized glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 247(2): 502-7.
- Squitieri F, Gellera C, Cannella M, Mariotti C, Cislighi G, Rubinsztein DC, Almqvist EW, Turner D, Bachoud-Levi AC, Simpson SA, Delatycki M, Maglione V, Hayden MR and Donato SD (2003). Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* 126(Pt 4): 946-55.
- Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE and Thompson LM (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6763-8.
- Strange PG (1993). New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem Int* 22(3): 223-36.
- Straube A, Mennicken JB, Riedel M, Eggert T and Muller N (1997). Saccades in Gilles de la Tourette's syndrome. *Mov Disord* 12(4): 536-46.
- Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS and Albin RL (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5(3): 259-65.
- Subramaniam S, Zirrgiebel U, von Bohlen Und Halbach O, Strelau J, Laliberte C, Kaplan DR and Unsicker K (2004). ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3. *J Cell Biol* 165(3): 357-69.
- Sumbayev VV and Yasinska IM (2005). Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys* 436(2): 406-12.
- Sun Y, Savanenin A, Reddy PH and Liu YF (2001). Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 276(27): 24713-8.
- Surmeier DJ and Kitai ST (1993). D1 and D2 dopamine receptor modulation of sodium and potassium currents in rat neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99: 309-24.
- Surmeier DJ, Song WJ and Yan Z (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16(20): 6579-91.
- Sweatt JD (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14(3): 311-7.

**-T-**

- Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM and Schapira AH (1999). Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 45(1): 25-32.
- Takeuchi Y and Fukunaga K (2004). Different activation of NF-kappaB by stimulation of dopamine D2L and D2S receptors through calcineurin activation. *J Neurochem* 90(1): 155-63.
- Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M and Nukina N (2004). Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10(2): 148-54.
- Tanaka M, Sotomatsu A, Kanai H and Hirai S (1991). Dopa and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron. *J Neurol Sci* 101(2): 198-203.
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T and Nishida E (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* 2(2): 110-6.
- Tanoue T and Nishida E (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* 15(5): 455-62.
- Tarlac V and Storey E (2003). Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res* 74(3): 406-16.

- Taylor JP, Hardy J and Fischbeck KH (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296(5575): 1991-5.
- Teichmann M, Dupoux E, Kouider S, Brugieres P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Peschanski M and Bachoud-Levi AC (2005). The role of the striatum in rule application: the model of Huntington's disease at early stage. *Brain* 128(Pt 5): 1155-67.
- Thompson LM (2003). An expanded role for wild-type huntingtin in neuronal transcription. *Nat Genet* 35(1): 13-4.
- Tobiome K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T and Ichijo H (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2(3): 222-8.
- Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ and Luttrell LM (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278(8): 6258-67.
- Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ and Luttrell LM (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* 277(11): 9429-36.
- Tournier C, Dong C, Turner TK, Jones SN, Flavell RA and Davis RJ (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 15(11): 1419-26.
- Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA and Davis RJ (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288(5467): 870-4.
- Townsend DM and Tew KD (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22(47): 7369-75.
- Trottier Y, Biancalana V and Mandel JL (1994). Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet* 31(5): 377-82.
- Trottier Y, Devys D, Imbert G, Saudou F, An I, Lutz Y, Weber C, Agid Y, Hirsch EC and Mandel JL (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet* 10(1): 104-10.
- Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP and Davies SW (2000). Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 8093-7.

**-U-**

- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV and Borrelli E (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408(6809): 199-203.

**-V-**

- Valjent E, Caboche J and Vanhoutte P (2001). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory? *Mol Neurobiol* 23(2-3): 83-99.
- Velier J, Kim M, Schwarz C, Kim TW, Sapp E, Chase K, Aronin N and DiFiglia M (1998). Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Exp Neurol* 152(1): 34-40.
- Venkatraman P, Wetzel R, Tanaka M, Nukina N and Goldberg AL (2004). Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell* 14(1): 95-104.
- Ventura JJ, Kennedy NJ, Lamb JA, Flavell RA and Davis RJ (2003). c-Jun NH(2)-terminal kinase is essential for the regulation of AP-1 by tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 23(8): 2871-82.
- Verhoef LG, Lindsten K, Masucci MG and Dantuma NP (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum Mol Genet* 11(22): 2689-700.

- Vernier P, Cardinaud B, Valdenaire O, Philippe H and Vincent JD (1995). An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 16(11): 375-81.
- Vetter IR, Arndt A, Kutay U, Gorlich D and Wittinghofer A (1999). Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* 97(5): 635-46.
- Vila M and Przedborski S (2003). Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4(5): 365-75.
- Vis JC, Verbeek MM, De Waal RM, Ten Donkelaar HJ and Kremer HP (1999). 3-Nitropropionic acid induces a spectrum of Huntington's disease-like neuropathology in rat striatum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25(6): 513-21.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED and Richardson EP, Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44(6): 559-77.

**-W-**

- Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H and Wanker EE (2001a). Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 12(5): 1393-407.
- Waelter S, Scherzinger E, Hasenbank R, Nordhoff E, Lurz R, Goehler H, Gauss C, Sathasivam K, Bates GP, Lehrach H and Wanker EE (2001b). The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet* 10(17): 1807-17.
- Waetzig V and Herdegen T (2005). Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *Trends Pharmacol Sci* 26(9): 455-61.
- Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP and Sankoorikal EB (2000). Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci* 20(22): 8305-14.
- Wellington C, Ellerby LM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW and Hayden MR (2003). Huntingtin proteolysis in Huntington disease. *Clin Neurosci Res* 3: 129-39.
- Wexler A (1996). Mapping Fate.
- Wexler NS, Lorimer J, Porter J, Gomez F, Moskowitz C, Shackell E, Marder K, Penchaszadeh G, Roberts SA, Gayan J, Brocklebank D, Cherny SS, Cardon LR, Gray J, Dlouhy SR, Wiktorski S, Hodes ME, Conneally PM, Penney JB, Gusella J, Cha JH, Irizarry M, Rosas D, Hersch S, Hollingsworth Z, MacDonald M, Young AB, Andresen JM, Housman DE, De Young MM, Bonilla E, Stillings T, Negrette A, Snodgrass SR, Martinez-Jaurrieta MD, Ramos-Arroyo MA, Bickham J, Ramos JS, Marshall F, Shoulson I, Rey GJ, Feigin A, Arnheim N, Acevedo-Cruz A, Acosta L, Alvir J, Fischbeck K, Thompson LM, Young A, Dure L, O'Brien CJ, Paulsen J, Brickman A, Krch D, Peery S, Hogarth P, Higgins DS, Jr. and Landwehrmeyer B (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3498-503.
- Wheeler VC, White JK, Gutekunst CA, Vrbanc V, Weaver M, Li XJ, Li SH, Yi H, Vonsattel JP, Gusella JF, Hersch S, Auerbach W, Joyner AL and MacDonald ME (2000). Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice. *Hum Mol Genet* 9(4): 503-13.
- Whitmarsh AJ, Kuan CY, Kennedy NJ, Kelkar N, Haydar TF, Mordes JP, Appel M, Rossini AA, Jones SN, Flavell RA, Rakic P and Davis RJ (2001). Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation. *Genes Dev* 15(18): 2421-32.
- Wirtshafter D (1998). D1 dopamine receptors mediate neuroleptic-induced Fos expression in the islands of Calleja. *Synapse* 28(2): 154-9.
- Wytenbach A, Carmichael J, Swartz J, Furlong RA, Narain Y, Rankin J and Rubinsztein DC (2000). Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2898-903.

**-X-**

- Xia XG, Harding T, Weller M, Bieneman A, Uney JB and Schulz JB (2001). Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10433-8.
- Xia Y, Wu Z, Su B, Murray B and Karin M (1998). JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev* 12(21): 3369-81.

**-Y-**

- Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincon M and Flavell RA (1998). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 9(4): 575-85.
- Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, Rakic P and Flavell RA (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389(6653): 865-70.
- Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M and Davis RJ (1999). The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 19(10): 7245-54.
- Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K and Ronai Z (2000). Glutathione S-transferase p elicits protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Res* 60(15): 4053-7.
- Youdim MB (2003). What have we learnt from CDNA microarray gene expression studies about the role of iron in MPTP induced neurodegeneration and Parkinson's disease? *J Neural Transm Suppl*(65): 73-88.
- Yung KK and Bolam JP (2000). Localization of dopamine D1 and D2 receptors in the rat neostriatum: synaptic interaction with glutamate- and GABA-containing axonal terminals. *Synapse* 38(4): 413-20.
- Yung KK, Bolam JP, Smith AD, Hersch SM, Ciliax BJ and Levey AI (1995). Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* 65(3): 709-30.

**-Z-**

- Zeitlin S, Liu JP, Chapman DL, Papaioannou VE and Efstratiadis A (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* 11(2): 155-63.
- Zeron MM, Fernandes HB, Krebs C, Shehadeh J, Wellington CL, Leavitt BR, Baimbridge KG, Hayden MR and Raymond LA (2004). Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 25(3): 469-79.
- Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR and Raymond LA (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33(6): 849-60.
- Zhang X, Smith DL, Meriin AB, Engemann S, Russel DE, Roark M, Washington SL, Maxwell MM, Marsh JL, Thompson LM, Wanker EE, Young AB, Housman DE, Bates GP, Sherman MY and Kazantsev AG (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(3): 892-7.
- Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Boux H and Smith MA (2001). Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 76(2): 435-41.
- Zou S, Li L, Pei L, Vukusic B, Van Tol HH, Lee FJ, Wan Q and Liu F (2005). Protein-protein coupling/uncoupling enables dopamine D2 receptor regulation of AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *J Neurosci* 25(17): 4385-95.



- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S and Cattaneo E (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293(5529): 493-8.
- Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt BR, Hayden MR, Timmusk T, Rigamonti D and Cattaneo E (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet* 35(1): 76-83.