



HAL
open science

**ETUDE DE L'AMPLIFICATION DE LA
NEURODEGENERESCENCE EXCITOTOXIQUE PAR
UNE DYSFONCTION
MITOCHONDRIALE:IMPLICATIONS POUR LA
MALADIE DE HUNTINGTON**

Carine Jacquard

► **To cite this version:**

Carine Jacquard. ETUDE DE L'AMPLIFICATION DE LA NEURODEGENERESCENCE EXCITOTOXIQUE PAR UNE DYSFONCTION MITOCHONDRIALE:IMPLICATIONS POUR LA MALADIE DE HUNTINGTON. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2006. Français. NNT: . tel-00092106

HAL Id: tel-00092106

<https://theses.hal.science/tel-00092106>

Submitted on 8 Sep 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.

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

2006

N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : [Neurosciences]

présentée et soutenue publiquement

par

Carine JACQUARD

le 10 juillet 2006

**ETUDE DE
L'AMPLIFICATION DE LA NEURODEGENERESCENCE EXCITOTOXIQUE
PAR UNE DYSFONCTION MITOCHONDRIALE :
IMPLICATIONS POUR LA MALADIE DE HUNTINGTON**

Directeur de thèse : M. Emmanuel Brouillet

JURY

<i>M. le Pr. Marc Le Maire,</i>	<i>Président</i>
<i>M. le Pr. Alain Buisson,</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mme le Dr. Jocelyne Caboche,</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M. le Dr. Pierre-Etienne Chabrier,</i>	<i>Examineur</i>
<i>M. le Dr. David Blum,</i>	<i>Examineur</i>
<i>M. le Dr. Emmanuel Brouillet,</i>	<i>Examineur</i>

**UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

2006

N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : [Neurosciences]

présentée et soutenue publiquement

par

Carine JACQUARD

Le 10 juillet 2006

**ETUDE DE
L'AMPLIFICATION DE LA NEURODEGENERESCENCE EXCITOTOXIQUE
PAR UNE DYSFONCTION MITOCHONDRIALE :
IMPLICATIONS POUR LA MALADIE DE HUNTINGTON**

Directeur de thèse : M. Emmanuel Brouillet

JURY

<i>M. le Pr. Marc Le Maire,</i>	<i>Président</i>
<i>M. le Pr. Alain Buisson,</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mme le Dr. Jocelyne Caboche,</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M. le Dr. Pierre-Etienne Chabrier,</i>	<i>Examineur</i>
<i>M. le Dr. David Blum,</i>	<i>Examineur</i>
<i>M. le Dr. Emmanuel Brouillet,</i>	<i>Examineur</i>

RESUME

Les mécanismes sous-tendant la neurodégénérescence aiguë (ischémie cérébrale) et chronique (maladie d'Alzheimer, maladie de Huntington, sclérose latérale amyotrophique), impliqueraient des altérations mitochondriales et des anomalies de transmission glutamatergique (excitotoxicité). La maladie de Huntington (MH) est caractérisée par une neurodégénérescence du striatum. Dans cette structure cérébrale, une diminution de l'activité du complexe II mitochondrial est observée chez les patients. Les mécanismes de la neurodégénérescence induite par l'inhibition du complexe II sont inconnus *in vivo* et nous les avons caractérisés dans un modèle de rat intoxiqué par l'acide 3-nitropropionique (3-NP). La calpaïne est la protéase majoritairement impliquée dans la mort striatale *in vivo* en parallèle d'une activation des caspases. De plus, les modèles murins transgéniques de la MH présentent une hyperactivation des récepteurs NMDA (R-NMDA). Les atteintes mitochondriales pourraient de manière synergique, potentialiser les effets toxiques de la dysfonction des R-NMDA. Cependant les mécanismes de cette synergie sont, *in vivo*, inconnus.

Dans la présente étude, nous avons cherché à comprendre comment la mort induite par l'injection intrastriatale de l'acide quinolinique (QA), agoniste des R-NMDA, était potentialisée par le 3-NP, inhibiteur du complexe II mitochondrial.

Le 3-NP subtoxique induit une potentialisation de la mort striatale lorsque l'inhibition du complexe II est supérieure à 35%. Le 3-NP seul (sans QA) produit des lésions au-delà de 50% d'inhibition. Entre 35 et 50% d'inhibition, l'utilisation de techniques biochimiques et immunohistochimiques, a permis de démontrer que le 3-NP potentialisait la mort excitotoxique par un facteur 10. Le mécanisme de la potentialisation met en jeu une activation importante de la calpaïne, protéase activée par le Ca^{2+} . L'activation de la calpaïne traduit une élévation délétère de la concentration intracytoplasmique du Ca^{2+} . L'origine du mécanisme calcique de la potentialisation excitotoxique par le 3-NP pouvait sous-tendre l'existence d'une hyperactivation des R-NMDA conduisant à une augmentation de l'influx calcique, et/ou une perturbation de l'homéostasie calcique. Le mécanisme d'augmentation de Ca^{2+} intracytoplasmique ne semble pas mettre en jeu une hyperactivation des R-NMDA. En effet, le 3-NP ne modifie pas l'entrée de glucose induite par le QA *in vivo*, ceci traduisant une activation similaire des R-NMDA avec ou sans 3-NP. De plus, l'entrée du ^{45}Ca induite par le QA appliqué sur des cultures primaires de neurones striataux, n'est pas augmentée par le 3-NP, malgré un niveau de calcium intracellulaire augmenté, détecté par imagerie calcique.

D'après ces résultats, la potentialisation de mort induite par le QA lorsque le complexe II mitochondrial est inhibé, ne résulterait pas d'une entrée accrue de Ca^{2+} par les R-NMDA, mais résulterait plus probablement d'une incapacité des neurones à maintenir l'homéostasie calcique. Par ailleurs, la réduction de l'activité du complexe II mitochondrial combinée à l'excitotoxicité pourraient participer à la dégénérescence striatale dans la MH. Ainsi, l'homéostasie calcique constituerait une cible thérapeutique privilégiée.

Mots clés : maladie de Huntington – mitochondrie – excitotoxicité – calcium - calpaïne

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier le Pr. Marc Le Maire pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir d'accepter de présider cette thèse.

Je voudrais remercier particulièrement les deux rapporteurs de ma thèse, le Pr. Alain Buisson et le Dr. Jocelyne Caboche, pour le travail et le courage qu'ils ont dû mettre en œuvre lors de la lecture critique du manuscrit alors que le printemps, les jours fériés et le soleil étaient plus propices au repos. J'adresse aussi mes remerciements aux examinateurs David Blum et Pierre-Etienne Chabrier d'avoir accepté d'assister à ma thèse ainsi que la lecture de ce manuscrit.

Je remercie le Pr. Syrota, le Dr. Pradelles, le Dr. Ramette et les services administratifs du CEA de m'avoir accueillie et d'avoir financé ma thèse au sein du commissariat à l'énergie atomique, de la direction des sciences du vivant et du département de la recherche médicale dans le service hospitalier Frédéric Joliot.

Je remercie Philippe Hantraye de m'avoir accueillie au sein de l'URA 2210, unité de recherche à l'environnement technique et humain très varié permettant l'étude de sujets fondamental et appliqués de la cellule aux animaux et jusqu'à l'homme pour l'imagerie.

J'adresse mes sincères remerciements à Emmanuel, pour la direction du projet de thèse, son enseignement technique, sa patience et son écoute permanente accompagnée de conseils avisés. Merci de m'avoir fait profiter de ton savoir immense sur la mitochondrie et d'avoir mis les mains dans le « cambouis » quand cela était nécessaire notamment pour le sacrifice de nos amis les rats. Merci aussi pour les discussions extraprofessionnelles et de m'avoir laissé du temps pour préparer mon avenir professionnel.

Merci aux membres de l'URA-2210, en particulier à Yaël avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter et à qui j'ai eu le toupet de piquer plein de cultures cellulaires, toutes prêtes et toutes belles que j'ai intoxiquées sans vergogne ! Merci à Carole pour son aide, les discussions que nous avons eues et pour m'avoir permis de participer à son projet de thèse, particulièrement intéressant. Merci aux personnes impliquées dans le projet de l'inhibiteur du protéasome, Stéphane, Masa, Béchir et Caroline, pour m'avoir permis de découvrir la maladie de Parkinson. Merci à Aïcha, Albertine, Anne-Sophie, Cécile, Elsa, Etienne, Fanny, Gilles, Gweltas, Hirac, Isabelle, Jean-Michel, Ken, Laurent, Nicole, Nicolas, Noëlle, Raymonde, Sandro, Vincent et les autres..., c'était très agréable de travailler à vos côtés...

Je tiens ensuite à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de la thèse au SHFJ et dans les différents lieux de collaboration comme l'institut Alfred Fessard, le DBJC et le SBGM au CEA à Saclay.

Je tiens à remercier particulièrement les gens qui ont collaborés aux différents projets et publications de cette thèse, sur différents sites éloignés du laboratoire, comme David Blum et Kadiombo Bantubungi à l'université libre de Bruxelles et les chimistes de SYNTHEM à Nîmes.

Je remercie Philippe Gervais pour la fourniture du FDG, qui nous a été très utile lors de l'étude de l'activation des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate).

Je remercie Françoise Condé pour m'avoir enseigné les techniques d'immunohistochimie.

Je remercie François Cosker de m'avoir initiée à l'imagerie calcique et José Manuel Cancela pour son analyse critique des résultats.

Je remercie Marie-Claude Gaillard de m'avoir initiée aux techniques de biologie moléculaires et notamment à la RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction).

Je remercie Philippe Champeil pour sa fourniture des moyens techniques nécessaires à l'étude du calcium 45.

Je remercie également Raphaël Boisgard pour la fourniture des moyens techniques nécessaire à la mesure de l'ATP (adénosine triphosphate) *in vitro*.

Je tiens enfin à remercier les animaliers pour leur disponibilité et les soins quotidiens qu'ils prodiguent à mes amis les rats.

Merci aux secrétaires de l'URA, Bérange, Patricia et Cécile pour leur aide administrative précieuse dans la jungle et le labyrinthe administratif du CNRS et du CEA.

Je tiens à remercier mes parents pour m'avoir soutenue tout au long de ce cursus difficile permettant l'accès à la profession de chercheur. Je tiens à remercier Ludo pour son écoute et les discussions que nous avons eues sur un sujet très éloigné de la chimie. Je le remercie particulièrement pour sa patience et d'avoir supporté mon mauvais caractère consécutif aux aléas de la recherche !

SOMMAIRE

1.	<i>Introduction générale</i>	1
2.	<i>La maladie de Huntington</i>	4
2.1.	Description	4
2.2.	Epidémiologie	4
2.3.	Génétique :	5
2.4.	Clinique :	6
2.4.1.	Signes moteurs	6
2.4.2.	Signes cognitifs	7
2.4.3.	Troubles psychiatriques	7
2.4.4.	Autres troubles	7
2.4.5.	Particularités cliniques des formes juvéniles et tardives	7
2.5.	Diagnostic :	8
2.5.1.	Les trois stades de diagnostic : prénatal, présymptomatique et symptomatique	8
2.5.2.	Imagerie médicale	9
2.5.3.	Analyse génétique	11
2.5.4.	Diagnostic différentiel	11
2.5.5.	Anatomopathologie du striatum	12
2.5.6.	Anatomopathologie corticale	15
2.5.7.	Anatomopathologie des autres structures	16
2.6.	Thérapie :	17
2.6.1.	Thérapie des troubles moteurs	17
2.5.2.	Thérapie des troubles psychiatriques	18
2.7.	Modèles d'étude de la maladie de Huntington :	18
2.8.	Physiopathologie de la maladie de Huntington : hypothèses générales	20
2.8.1.	Développement et rôle antiapoptotique	20
2.8.2.	La transcription	21
2.8.3.	Le transport intracellulaire	24
2.8.4.	La transmission synaptique	25
2.8.5.	Anomalies de la transmission glutamatergique et excitotoxicité	27
2.8.6.	Anomalies des autres systèmes synaptiques : GABAergique, dopaminergique, adénosinergique et canabinergique	28
2.9.	Les voies de neurodégénérescence	30
2.9.1.	Kinases, huntingtine et mort cellulaire	30
2.9.2.	Caspases et apoptose	31
2.9.3.	Calpaïnes et nécrose	32
2.9.4.	Cathepsines et autophagie	33
2.9.5.	Mort atypique de type TRIAD	34

2.10.	Les formes toxiques de l'huntingtine et les voies de neurodégénérescence	34
2.10.1.	Protéolyse de l'huntingtine par les caspases	35
2.10.2.	Protéolyse de l'huntingtine par les calpaïnes	35
2.10.3.	Protéolyse de l'huntingtine par les cathepsines	36
3.	<i>Dysfonction mitochondriale</i>	37
3.1.	Rappel historique sur la mitochondrie	37
3.2.	Physiologie mitochondriale	38
3.2.1.	Localisation cellulaire et subcellulaire de la mitochondrie dans le cerveau	38
3.2.2.	Compartimentation de la mitochondrie	38
3.2.3.	Les fonctions de la mitochondrie	39
3.2.4.	Capacité de traduction, transcription du génome mitochondrial	39
3.2.5.	Fonctions métaboliques	40
3.2.6.	Capacité de transport des protéines	45
3.2.7.	Capacité de régulation de la concentration des ions intracellulaires	46
3.2.8.	Capacité de régulation de la concentration du calcium	46
3.2.9.	Capacité de régulation de la concentration des autres ions	49
3.3.	Régulation de la mort cellulaire par la mitochondrie dans les maladies neurodégénératives	53
3.3.1.	Mécanisme de la perméabilisation membranaire mitochondriale	54
3.3.2.	Protéines proapoptotiques libérés dans le cytosol	55
3.3.3.	Perméabilité transitoire mitochondriale et maladies neurodégénératives	55
3.3.4.	Protéines proapoptotiques mitochondriales libérées dans les maladies neurodégénératives	56
3.4.	Dysfonctions mitochondriales et maladie de Huntington	56
3.4.1.	Perméabilité transitoire mitochondriale et libération de protéines proapoptotiques dans maladie de Huntington	57
3.4.2.	Dysfonctions métaboliques dans la maladie de Huntington	57
3.4.3.	Maladie de Huntington et défaut de gestion du calcium par la mitochondrie	60
3.5.	Dysfonctions mitochondriales et maladies neurodégénératives autres que la maladie de Huntington	61
3.5.1.	Mutation de gènes codant des protéines mitochondriales associée à des symptômes neurologiques	61
3.5.2.	Mutation de gènes responsables de maladies neurodégénératives	64
3.5.3.	Dysfonctions mitochondriales observées dans les maladies neurodégénératives liées à l'âge autre que la maladie de Huntington	66
3.6.	Toxines mitochondriales mimant la neurodégénérescence	67
3.6.1.	Neurotoxines inhibant le complexe I et maladie de Parkinson	67
3.6.2.	Neurotoxines inhibant le complexe IV et dégénérescence striatale	68
3.6.3.	Les inhibiteurs du complexe II et la maladie de Huntington	68
3.7.	Le 3-NP, inhibiteur du complexe II et maladie de Huntington	69

3.7.1.	Historique de la découverte du 3-NP en tant que neurotoxine associée à une dégénérescence striatale	69
3.7.2.	Mécanismes de neurodégénérescence induits par le 3-NP	70
4.	<i>Excitotoxicité</i>	74
4.1.	Définition de l'excitotoxicité et rappel historique	74
4.2.	Trois voies d'induction de l'excitotoxicité	75
4.3.	Le glutamate	76
4.3.1.	Le glutamate, métabolite intermédiaire	76
4.3.2.	Le Glutamate, neurotransmetteur	77
4.3.3.	Fonctions physiologiques du glutamate	78
4.3.4.	Le Glutamate et maladie neurodégénératives	78
4.4.	Autres excitotoxines endogènes	79
4.4.1.	L'aspartate	79
4.4.2.	Le N-acétylaspartylglutamate	80
4.4.3.	Les dérivés sulfurés	81
4.4.4.	Le quinolinate	82
4.5.	Excitotoxines exogènes	84
4.5.1.	Produits d'origine naturelle	84
4.5.2.	Produits de synthèse	86
4.6.	Récepteurs du glutamates	87
4.6.1.	Récepteurs ionotropiques : types, structures, fonctions et localisations	87
4.6.2.	Récepteurs métabotropiques : types, structures, fonctions et localisations	90
4.6.3.	Fonctions des récepteurs glutamatergiques	91
4.7.	Dysfonctions des récepteurs glutamatergiques et neurodégénérescence	92
4.7.1.	Mutation des gènes des récepteurs et neurodégénérescence	92
4.7.2.	Anticorps dirigés contre les récepteurs et neurodégénérescence	92
4.7.3.	Diminution de l'expression ou dysfonctionnement des récepteurs et neurodégénérescence	93
4.8.	Neuroprotection de maladies neurodégénératives par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs	93
4.9.	Transporteurs des acides aminés excitateurs	94
4.9.1.	Transporteurs du glutamate : types, structure et localisation	94
4.9.2.	Fonctions des transporteurs du glutamate	95
4.9.3.	Intervention des transporteurs dans le mécanisme de neurodégénérescence	96
4.10.	Mécanismes et signalisation intracellulaire mise en jeu dans l'excitotoxicité	97
4.10.3.	Radicaux libres	100
4.10.4.	Activation enzymatiques	102
5.	<i>Objectifs</i>	105
5.1.	Etude des voies de mort cellulaire	105

5.2.	Etude du mécanisme de potentialisation de la neurodégénérescence induit par l'inhibition de la SDH dans un modèle d'excitotoxicité	105
6.	<i>Résultats</i>	107
6.1.	Article 1	107
6.1.1.	Présentation de l'étude, hypothèses et objectifs	107
6.1.2.	Résultats	116
6.1.3.	Discussion	116
6.1.4.	Conclusion	117
6.2.	Article 2:	118
6.2.1.	Présentation de l'étude, hypothèses et objectifs	118
6.2.2.	Résultats	135
6.2.3.	Discussion	137
6.2.4.	Conclusion	139
7.	<i>Discussion générale</i>	140
7.1.	Quel est le lien entre la mutation de l'huntingtine et l'inhibition de la SDH	140
7.2.	Quel est le lien entre la mutation de l'huntingtine et l'excitotoxicité	142
7.3.	Mécanisme d'activation des protéases dans la maladie de Huntington	144
7.4.	Conséquences de l'activation des caspases sur la mort cellulaire dans la maladie de Huntington	148
7.5.	Conséquences de l'activation des calpaïnes sur la mort cellulaire dans la maladie de Huntington	151
7.6.	Calcium intracellulaire et la maladie de Huntington	154
7.7.	Activation des calpaïnes dans les autres maladies neurodégénératives et atteintes neurologiques aiguës	157
7.8.	Quelles sont les implications de ces études sur la thérapeutique de la maladie de Huntington ?	157
8.	<i>Conclusion et perspectives</i>	160
	<i>Annexe 1 : Modèles rongeurs phénotypiques</i>	160
	<i>Annexe 2 : Modèles primates phénotypiques</i>	160
	<i>Annexe 3 : Modèles génétiques</i>	160
	<i>Références bibliographiques</i>	160

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Evolution du nombre de publications en Neurosciences</i>	1 Bis
<i>Figure 2 : Description de la maladie de huntington par Georges Huntington en 1872</i>	4 Bis
<i>Figure 3 : Régions cérébrales atteintes dans la maladie de Huntington</i>	4 Bis
<i>Figure 4 : Gène, mutation, protéine responsable de la maladie de Huntington</i>	5 Bis
<i>Figure 5 : Exemple des mêmes dessin réalisé à deux ans d'intervalle par le même patient</i>	6 Bis
<i>Figure 6 : Différents stades de diagnostic de la maladie</i>	7 Bis
<i>Figure 7 : Mini mental test pour définir la présence d'une démence, d'une dépression avec ou sans troubles cognitifs</i>	8 Bis
<i>Figure 8 : Imagerie TEP du ¹¹C-raclopride au niveau cérébral</i>	10 Bis
<i>Figure 9 : Imagerie TEP avec la DTBZ de cerveaux</i>	10 Bis
<i>Figure 10 : IRM anatomique d'un patient HDL2, Huntington et d'un sujet contrôle</i>	10 Bis
<i>Figure 11 : Coupes coronale et axiale du cerveau humain et représentation tridimensionnelle des noyaux gris centraux</i>	11 Bis
<i>Figure 12 : Dessin d'une coupe axiale et coronale d'un cerveau de rat</i>	11 Bis
<i>Figure 13 : Neurone épineux de taille moyenne striatal</i>	12 Bis
<i>Figure 14 : Afférences, efferences et neurotransmetteurs du striatum humain</i>	12 Bis
<i>Figure 15 : Niveaux de coupe coronale étudiés dans la classification neuropathologique de la maladie par Vonsattel</i>	13 Bis
<i>Figure 16 : Perte neuronale dans le striatum de patient Huntington après coloration histologique à l'hématoxyline-éosine et au crésyl violet</i>	13 Bis
<i>Figure 17 : Astrogliose présente dans les stades II à IV</i>	13 Bis
<i>Figure 18 : Aspect macroscopique de la neurodégénérescence</i>	14 Bis
<i>Figure 19 : Morphologie des neurones épineux au stade II de la maladie</i>	15 Bis
<i>Figure 20 : Morphologie des neurones épineux au stade III et IV de la maladie</i>	15 Bis
<i>Figure 21 : Traitements des troubles moteurs dans la maladie de Huntington</i>	17 Bis
<i>Figure 22 : Traitements des troubles psychiatriques dans la maladie de Huntington</i>	18 Bis
<i>Figure 23 : Transport intracellulaire et protéines impliquées</i>	24 Bis
<i>Figure 24 : Dysfonction du transport du BDNF en présence de l'huntingtine mutée</i>	24 Bis
<i>Figure 25 : Anomalies synaptiques dans la maladie de Huntington</i>	25 Bis
<i>Figure 26 : Exocytose d'une vésicule synaptique et recyclage</i>	26 Bis
<i>Figure 27 : Aspects des neurones lors des quatres types de mort cellulaire</i>	31 Bis
<i>Figure 28 : Huntingtine, protéases et sites de protéolyse</i>	35 Bis
<i>Figure 29 : Compartiments des mitochondries</i>	38 Bis
<i>Figure 30 : Fonctions de la mitochondrie</i>	38 Bis
<i>Figure 31 : ADN mitochondrial et protéines des complexes respiratoires</i>	39 Bis
<i>Figure 32 : Réaction catalysée par le complexe de la pyruvate déshydrogénase</i>	40 Bis
<i>Figure 33 : β-oxydation des acides gras et biosynthèse</i>	40 Bis
<i>Figure 34 : Cycle de Krebs</i>	41 Bis
<i>Figure 35 : Synthèse des corps cétoniques par l'acétylCoA acyltransférase</i>	42 Bis
<i>Figure 36 : Synthèse des corps cétoniques par l'hydroxyméthylglutarylCoA synthase</i>	42 Bis
<i>Figure 37 : Synthèse des corps cétoniques par l'hydroxyméthylglutarylCoA lyase</i>	42 Bis
<i>Figure 38 : Synthèse des corps cétoniques par la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase</i>	42 Bis
<i>Figure 39 : Réaction de la glutamine aminotransférase K ou KAT I</i>	42 Bis
<i>Figure 40 : Réaction de la glutaminase K activée par le phosphate</i>	42 Bis
<i>Figure 41 : Chaîne respiratoire : complexes mitochondriaux, flux d'électrons et de protons et organisation</i>	43 Bis

<i>Figure 42 : Complexe II mitochondrial, structure et réaction d'oxydoréduction catalysée</i>	44 Bis
<i>Figure 43 : Navette malate-aspartate</i>	45 Bis
<i>Figure 44 : Navette carnitine/acylcarnitine</i>	46 Bis
<i>Figure 45 : Canaux calciques mitochondriaux</i>	47 Bis
<i>Figure 46 : Sites possibles de formation de ROS au niveau du complexe I</i>	52 Bis
<i>Figure 47 : Complexe III et sites de formation des ROS</i>	52 Bis
<i>Figure 48 : Réaction catalysée par l'α-cétoglutarate déshydrogénase</i>	53 Bis
<i>Figure 49 : Réaction catalysée par les superoxide dismutases 1 et 2</i>	53 Bis
<i>Figure 50 : Réaction catalysée par la glutathion peroxydase</i>	53 Bis
<i>Figure 51 : Réaction catalysée par la glutathion réductase</i>	53 Bis
<i>Figure 52 : PTP</i>	54 Bis
<i>Figure 53 : Localisation de l'huntingtine mutée sous forme d'agrégats à la membrane mitochondriale</i>	56 Bis
<i>Figure 54 : Complexes mitochondriaux et mutations associées à des pathologies</i>	62 Bis
<i>Figure 55 : 3-NP, structure, provenance et mécanisme d'inhibition de la SDH</i>	69 Bis
<i>Figure 56 : Toxicité du glutamate de sodium au niveau de la rétine de souris</i>	74 Bis
<i>Figure 57 : Schéma des 3 types d'excitotoxicité impliqués dans les maladies neurodégénératives et les modèles in vitro et in vivo d'excitotoxicité</i>	75 Bis
<i>Figure 58 : Excitotoxines endogènes et exogènes</i>	76 Bis
<i>Figure 59 : Acides aminés excitateurs endogènes</i>	77 Bis
<i>Figure 60 : Le glutamate au carrefour du métabolisme</i>	78 Bis
<i>Figure 61 : Les différentes voies glutamatergiques dans le cerveau</i>	79 Bis
<i>Figure 62 : Voie majoritaire du catabolisme du tryptophane</i>	82 Bis
<i>Figure 63 : Acides aminés excitateurs exogènes</i>	84 Bis
<i>Figure 64 : Les 5 types de récepteurs glutamatergiques</i>	87 Bis
<i>Figure 65 : Structure schématique des récepteurs ionotropiques, métabotropiques et du récepteur NMDA</i>	88 Bis
<i>Figure 66 : Localisation cellulaire et subcellulaire des transporteurs du glutamate</i>	94 Bis
<i>Figure 67 : Capture du glutamate et couplage métabolique</i>	95 Bis
<i>Figure 68 : Les deux formes d'excitotoxicité</i>	97 Bis
<i>Figure 69 : Compartiments intracellulaire impliqués dans la gestion du calcium</i>	99 Bis
<i>Figure 70 : Radicaux libres, formation et détoxification</i>	100 Bis
<i>Figure 71 : Enzymes intervenant lors de l'excitotoxicité</i>	102 Bis

ABBREVIATIONS

3-NP : Acide 3-nitropropionique
AIF : apoptosis inducing factor
Akt : murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALLM : Acétyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-méthylleucinal
ALLN : Acétyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal
AMPA : alpha-amino-5-méthyl-3-hydroxy-4-isoxazolepropionate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
APP : précurseur du peptide β -amyloïde
ARN : Acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
BDNF : Brain derived neurotrophic factor
BMAA : β -méthylamino-L-alanine
BOAA : β -oxalylamino-L-alanine
CBP : cAMP response element-binding protein-binding protein
COX : cytochrome c oxydase
CtBP : C-terminal binding protein
DARPP32 : dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein 32 kDa
ENTH : epsin NH2-terminal homology
FDG : ^{18}F -Fluorodeoxyglucose
GABA : acide γ -aminobutyrique
GAD : glutamic acid decarboxylase
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GTP : Guanosine triphosphate
HAP-1 : Huntingtin-associated protein-1,
HEAT : Huntingtin-Elongation-A subunit-TOR
HIP-1 : huntingtin-interacting protein 1
HIP-14 : huntingtin-interacting protein 14
Hippi : huntingtin-interacting protein 1 interactor
HSP : Heat shock protein
IEG : Immediate Early Gene
jnk : kinase de la partie amino-terminale de c-Jun
kDa : kiloDalton
KI : Knock-In
KO : Knock-Out
MELAS : myopathie, encéphalopathie avec acidose lactique et accidents vasculaires cérébraux
MPTP : 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSN : neurones épineux de taille moyenne
N-CoR : nuclear receptor corepressor
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NOS : synthase de l'oxyde nitrique
NRSE : neuron restrictive silencer element
PACSLIN-1: Protein Kinase C and casein kinase Substrate In Neurons 1,
PCM-1 : pericentriolar autoantigen protein 1
PCR : polymérase chain reaction
PINK-1 : PTEN-induced kinase 1
PSD-95 : postsynaptic density protein 95 kDa
REST/NRSF : repressor element-1 transcription factor/neuron restrictive silencer factor
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RT-PCR : Reverse transcriptase polymérase chain reaction

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SOD : superoxyde dismutase

TAFII 130 : RNA polymerase II TATA-binding protein TBP-associated factor de 130kDa

TBP : TATA-binding protein

TEP : tomographie par émission de positons

tPA : tissu plasminogen activator

PUBLICATIONS

Jacquard C., Trioulier Y., Cosker F., Escartin C., Bizat N., Hantraye P., Cancela J.M., Bonvento G. and Brouillet E. (2006) Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation. *FASEB J* **20**, 1021-1023.

Bizat N., Hermel J. M., Boyer F., **Jacquard C.**, Creminon C., Ouary S., Escartin C., Hantraye P., Kajewski S. and Brouillet E. (2003a) 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**, 5020-5030. Erratum in: *J Neurosci*. 2003 Oct 5029;5023(5030):9960.

Bantubungi K., **Jacquard C.**, Greco A., Pintor A., Chtarto A., Tai K., Galas M. C., Tenenbaum L., Deglon N., Popoli P., Minghetti L., Brouillet E., Brotchi J., Levivier M., Schiffmann S. N. and Blum D. (2005) Minocycline in phenotypic models of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **18**, 206-217.

Bizat N., Hermel J. M., Humbert S., **Jacquard C.**, Creminon C., Escartin C., Saudou F., Krajewski S., Hantraye P. and Brouillet E. (2003b) In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* **278**, 43245-43253.

Bizat N., Galas M. C., **Jacquard C.**, Boyer F., Hermel J. M., Schiffmann S. N., Hantraye P., Blum D. and Brouillet E. (2005) Neuroprotective effect of zVAD against the neurotoxin 3-nitropropionic acid involves inhibition of calpain. *Neuropharmacology* **49**, 695-702.

Brouillet E., **Jacquard C.**, Bizat N. and Blum D. (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* **95**, 1521-1540.

1. Introduction générale

Les maladies neurodégénératives constituent un grave problème de santé publique. En effet le nombre de patients atteints ne cesse de croître alors que peu de thérapies sont disponibles. L'accroissement du nombre de malades est lié à l'allongement de l'espérance de vie. La stagnation des moyens thérapeutiques n'est probablement pas à imputer au manque d'innovation. En effet, le nombre de publications et de brevets dans le domaine des neurosciences, index de l'innovation, est en augmentation constante (Figure 1).

Les progrès réalisés dans les domaines de la biologie moléculaire, de l'imagerie cellulaire et de la bioinformatique ont permis de développer de nombreux modèles animaux et de mieux appréhender les mécanismes des maladies neurodégénératives.

La problématique du laboratoire est axée sur la compréhension des mécanismes de neurodégénérescence dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de tester l'efficacité de molécules thérapeutiques sur des modèles animaux ou de diagnostiquer plus précocement les maladies à l'aide de techniques d'imagerie médicale. Les deux pathologies neurodégénératives historiquement étudiées au laboratoire sont la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington.

Les mécanismes de neurodégénérescence étudiés dans l'équipe font appel aux notions de dysfonction mitochondriale et d'excitotoxicité (c'est-à-dire toxicité cellulaire induite par un acide aminé exciteur analogue au glutamate).

Ces deux mécanismes ont été étudiés par de nombreux laboratoires dès les années 50, notamment *in vitro*. Mais les preuves de leur existence dans les processus physiopathologiques *in vivo* dans les modèles animaux, et à fortiori chez l'homme, sont peu nombreuses. Trois éléments permettent d'impliquer la dysfonction mitochondriale et l'excitotoxicité dans la neurodégénérescence :

- L'existence d'anomalies mitochondriales et de problèmes glutamatergiques mis en évidence chez l'homme en postmortem ;
- L'utilisation de neurotoxines reproduisant ces mécanismes pour créer des modèles animaux de maladies neurodégénératives ;
- L'efficacité d'agents pharmacologiques agissant à l'encontre de la dysfonction mitochondriale et de l'excitotoxicité chez certains modèles animaux de maladies neurodégénératives.

Les mutations de gènes mitochondriaux ou nucléaire codant des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale sont associées à de multiples symptômes d'origine neurologique comme l'ataxie, l'épilepsie, la myoclonie, la migraine, la perte de la vue ou le retard psychomoteur (DiMauro and Schon 2003). On retrouve parmi ces pathologies, le syndrome de Leigh et le MELAS (myopathie, encéphalopathie avec acidose lactique et accidents vasculaires cérébraux)(DiMauro and Schon 2003). D'autre part, diverses pathologies neurodégénératives sont associées à des mutations de protéine mitochondriales aux rôles divers comme (Beal 2005) :

- La forme familiale de sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la mutation de la superoxyde dismutase 1 (SOD1), enzyme du stress oxydatif ;
- Le parkinsonisme et la mutation de l'acide ribonucléique ribosomal 12S (ARNr 12S);
- Les formes autosomales récessives de la maladie de Parkinson et la mutation de la parkine à activité ubiquitine ligase, de DJ-1 participant au stress oxydatif et de PINK-1 à activité de kinase ;

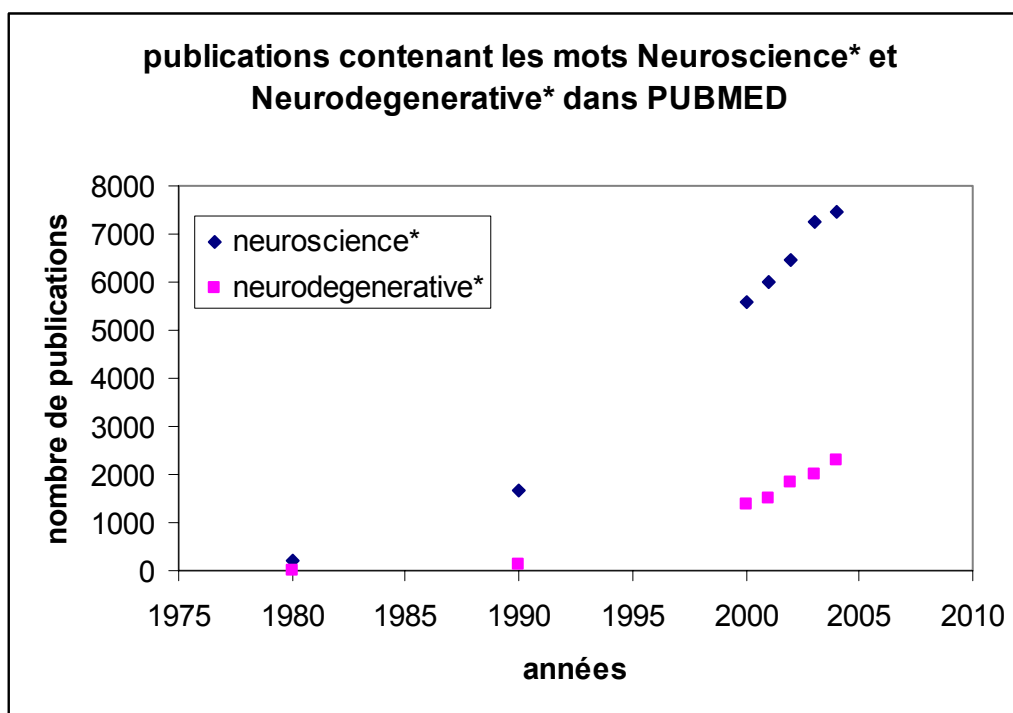


Figure 1 : Evolution du nombre de publications en Neurosciences

On voit sur ce graphique que le nombre de publications contenant le mot « neuroscience ou neurosciences » est en constante augmentation, passant de quelques centaines en 1980 à presque 2000 en 1990 pour atteindre plus de 7000 en 2004. Le même type d'évolution est observé pour le mot « neurodegenerative ». Ces chiffres ont été obtenus à partir d'une recherche bibliographique réalisée sur la base de données Pubmed.

-
- L'ataxie de Friedrich et la mutation de la frataxine, protéine de régulation du Fer ;
 - La paraplégie héréditaire spastique et la mutation de la paraplégine, apparentée aux métalloprotéases de levure.

Différentes pathologies neurodégénératives sont associées à des protéines anormales localisées vers la mitochondrie et présentent des dysfonctions énergétiques et /ou des anomalies du stress oxydatif mitochondriaux. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer avec le précurseur du peptide β -amyloïde (APP) localisé vers la membrane externe mitochondriale et l'existence d'une réduction de l'activité de la pyruvate déshydrogénase, de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase et de la cytochrome oxydase dans le cerveau des patients (Gibson et al. 1998). C'est aussi le cas de la maladie de Huntington avec l'huntingtine anormale localisée vers la membrane mitochondriale (Panov et al. 2002) et l'existence d'une diminution de l'activité du complexe II/III mitochondrial, de l'aconitase et de la pyruvate déshydrogénase dans le striatum des patients (Browne and Beal 2004).

Une mort neuronale apoptotique et/ou nécrotique sous le contrôle de la mitochondrie, notamment du pore de transition mitochondrial, est probablement à l'origine de la mort neuronale dans les pathologies neurodégénératives (Ankarcrona et al. 1995).

Des anomalies de transmission glutamatergique ou des problèmes du métabolisme des kynurénines, intermédiaires du métabolisme du tryptophane à la propriété excitotoxique pour le quinolinate et anti-excitotoxique pour la 3-hydroxykinurénine sont présentes dans différentes pathologies neurodégénératives. Ainsi, l'ischémie cérébrale serait associée à une augmentation de la libération de glutamate (Bullock et al. 1998), maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington sont associées à une neurodégénérescence des neurones portant des récepteurs glutamatergiques situés respectivement dans le cortex et le striatum (Greenamyre et al. 1985). De même, l'expression des transporteurs astrocytaires du glutamate chargés de la recapture du glutamate synaptique est diminuée dans le cortex moteur et la moelle épinière des patients SLA (Rothstein et al. 1995).

D'autre part, différentes pathologies neurodégénératives ont été mimées chez l'animal par l'administration de toxines mitochondriales ou d'excitotoxines visant le système glutamatergique. On trouve parmi ces pathologies neurodégénératives :

- La maladie de Parkinson et les inhibiteurs du complexe I, le MPTP (Heikkila et al. 1984; Langston and Irwin 1986) et la roténone (Betarbet et al. 2000) ;
- La maladie de Huntington et les inhibiteurs du complexe II, le malonate (Beal et al. 1993a; Bazzett et al. 1995) et l'acide 3-nitropropionique (3-NP) (Gould and Gustine 1982; Hamilton and Gould 1987) ou les excitotoxines, le kaïnate (Coyle and Schwarcz 1976) et le quinolinate (Beal et al. 1986);
- L'épilepsie et les excitotoxines, le kaïnate (Ben-Ari et al. 1979; Menini et al. 1980)

Sur la base des observations citées plus haut, c'est-à-dire la dysfonction mitochondriale et les anomalies de transmission glutamatergique, des stratégies thérapeutiques ont été développées et testées dans les modèles de pathologies neurodégénératives. Parmi celles-ci on retrouve :

- des antagonistes des récepteurs du N-méthyl-D-aspartate (NMDA), comme la mémantine (Lipton 2006);
- des inhibiteurs de la libération du glutamate comme le riluzole (Doble 1999) ;
- des substrats énergétiques mitochondriaux comme la créatine (Tarnopolsky and Beal 2001);

-
- des produits intermédiaire de la chaîne respiratoire mitochondriale comme le coenzyme Q10 dans les modèles de la maladie de Huntington (Beal 2004a);
 - Des inhibiteurs du pore de transition mitochondrial, comme la cyclosporine (Mattson and Kroemer 2003).

La première partie de mon travail a consisté à participer à la mise en évidence des voies de mort cellulaire dans un modèle de la maladie de Huntington, mimée par une dysfonction mitochondriale aiguë ou progressive.

La seconde partie de mon travail est basée sur l'hypothèse d'une relation entre le mécanisme de dysfonction mitochondriale et l'excitotoxicité dans la neurodégénérescence *in vivo*. Celle-ci a été suggérée dans la maladie de Parkinson (Loschmann et al. 1994) et dans la maladie de Huntington (Beal 1992a; Turski and Turski 1993). Quelques groupes ont mis en évidence une exacerbation de l'excitotoxicité par une dysfonction mitochondriale *in vivo* (Simpson and Isacson 1993; Greene and Greenamyre 1995b). Cependant, aucune étude n'a démontré le niveau de dysfonction mitochondriale à atteindre pour créer cette exacerbation et les mécanismes impliqués dans l'exacerbation de l'excitotoxicité n'ont pas été mis en évidence. Ces deux aspects de la neurodégénérescence (niveau de dysfonction mitochondriale et mécanismes impliqués dans l'exacerbation de l'excitotoxicité) ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* par l'utilisation du 3-NP et du quinolinate ajoutées sur des culture primaires striatales et administrées chez les rats. Ces études s'intègrent dans l'objectif plus large d'identifier des cibles thérapeutiques afin de tester des stratégies thérapeutiques visant la dégénérescence neuronale.

Seront présentés dans ce manuscrit, un rappel bibliographique portant sur la maladie de Huntington suivis de rappels plus approfondis sur la physiopathologie mitochondriale et l'excitotoxicité. Ces deux derniers points seront présentés dans le cadre de l'étiologie des maladies neurodégénératives et plus particulièrement par rapport à la physiopathologie de la maladie de Huntington. Seront ensuite abordés les objectifs de la thèse et les résultats obtenus ainsi que leurs limites avant de conclure sur les perspectives de ce travail.

2. La maladie de Huntington

2.1. Description

Cette maladie est connue sous le nom de « danse de Saint Guy », terme utilisé en 1810 par un médecin du nom de Bouteille, pour illustrer le fait que les malades « choréiques » se rendaient en procession à la chapelle Saint-guy pour implorer leur guérison (Siabas 1991). La maladie de Huntington fut pour la première fois décrite en 1872 par le médecin américain Georges Huntington (Durbach and Hayden 1993). Dans un mémoire qu'il publie en 1872, il rassemble les observations faites par son grand-père et son père, médecins généralistes à Long Island, dans plusieurs familles touchées sur plusieurs générations depuis 1797. Il la décrit alors comme une chorée héréditaire caractérisée par une apparition tardive, une évolution inexorable et accompagnée d'une tendance à la folie et au suicide (Figure 2) (Huntington 2003).

C'est une affection dégénérative progressive du système nerveux central caractérisée par une perte des cellules neuronales localisée dans des régions précises du cerveau : le noyau caudé et le putamen (structures du striatum) sont touchés préférentiellement et massivement, alors que le thalamus, le cortex et la substance blanche sous-corticale sont touchés plus partiellement et tardivement (Figure 3) (de la Monte et al. 1988). La perte neuronale est accompagnée d'une gliose, consistant en un remplacement des neurones par les cellules astrocytaires réactives. Ces structures cérébrales interviennent dans le contrôle des mouvements du corps, les émotions, la pensée, le comportement et la perception du monde extérieur.

Les patients, au cours de l'évolution de la maladie, éprouvent des difficultés à contrôler leurs mouvements, à se souvenir d'évènements récents, à prendre des décisions et à contrôler leurs émotions.

2.2. Epidémiologie

La maladie de Huntington est classée dans les maladies rares, c'est-à-dire qu'elle atteint moins d'une personne sur 2000, la fréquence est inférieure à 1/5000 en France et de 1/10000 en Europe. En France, environ 6000 personnes sont atteintes et 100 000 personnes sont confrontées à cette maladie en tant que proches.

La prévalence, c'est-à-dire le nombre total de personnes atteintes de chorée de Huntington, à un moment donné, varie selon le lieu géographique observé. En Europe et Amérique du Nord, elle est assez élevée, c'est-à-dire 4 à 8 cas pour 100000 personnes (Harper 1992). Les populations où la prévalence est la plus faible sont la population noire de Caroline du Sud comptant 9,7 cas pour 1 million de personnes selon une estimation au 1^{er} janvier 1980 (Wright et al. 1981), la population finlandaise avec seulement 5 cas pour 1 million de personnes (Palo et al. 1987). La prévalence la plus élevée de la maladie de Huntington (9,9/100000) est attribuée à la région de Grampian en Ecosse (Simpson and Johnston 1989).

L'incidence de la Chorée de Huntington, c'est-à-dire le nombre de nouveaux cas diagnostiqués dans une population donnée, sur une période donnée est estimée à 344 sur 60 millions d'habitants, en France pendant une année. (http://www.wrongdiagnosis.com/h/huntingtons_disease/stats-country.htm].

"The hereditary chorea, as I shall call it, is confined to certain and fortunately a few families, and has been transmitted to them, an heirloom from generations away back in the dim past. It is spoken of by those in whose veins the seeds of the disease are known to exist, with a kind of horror, and not at all alluded to except through dire necessity, when it is mentioned as "that disorder." It is attended generally by all the symptoms of common chorea, only in an aggravated degree, hardly ever manifesting itself until adult or middle life, and then coming on gradually but surely, increasing by degrees, and often occupying years in its development, until the hapless sufferer is but a quivering wreck of his former self.

"It is as common and is indeed, I believe, more "common among men than among women, while I am not aware that season or complexion has any influence in the matter. There are three marked peculiarities in this disease:

1. Its hereditary nature.
2. A tendency to insanity and suicide.
3. Its manifesting itself as a grave disease only in adult life.

Figure 2 : Description de la maladie de huntington par Georges Huntington en 1872

Ce texte est extrait de l'article de Georges Huntington, écrit en 1872 dans le journal *The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal* (Philadelphia: S.W. Butler), vol. 26, no. 15 (April 13, 1872), pp. 317–321. Introduction copyright 2003 American Psychiatric Publishing, Inc.

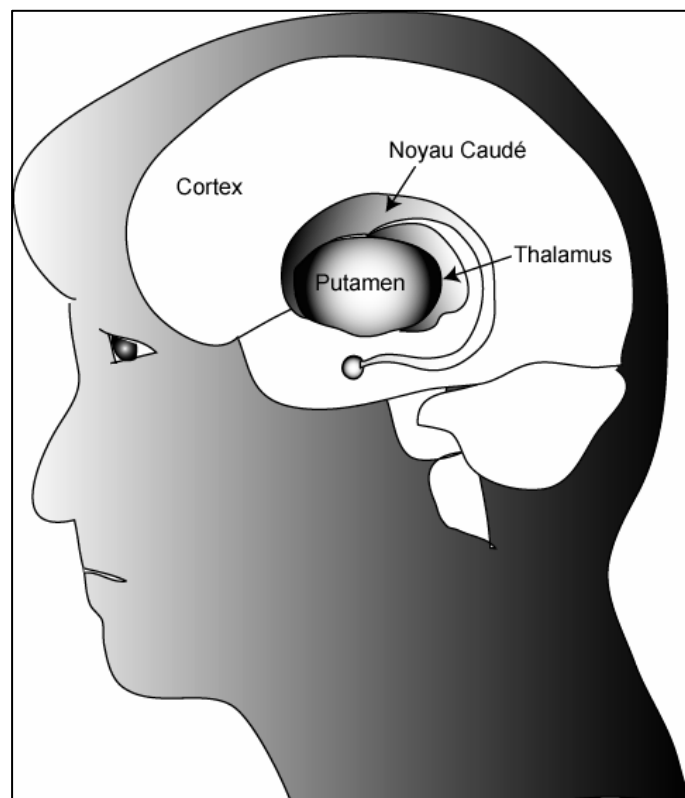


Figure 3 : Régions cérébrales atteintes dans la maladie de Huntington

Il existe probablement plusieurs mutations du gène à l'origine de la maladie, mais en Europe, la forte prévalence indique qu'une seule ou qu'un faible nombre de mutation a eu lieu pendant l'antiquité.

La maladie semble toucher autant d'hommes que de femmes, en effet l'atteinte génétique est autosomique. Il est cependant admis que l'instabilité génétique est plus grande chez les hommes, à l'origine du phénomène d'anticipation, c'est-à-dire de la transmission d'une forme juvénile à leurs enfants dans 70 à 90% des cas (De Rooij et al. 1993; Telenius et al. 1993; Navarrete et al. 1994; Kremer et al. 1995). Les formes tardives seraient quant à elles plus souvent transmises par la mère (Myers et al. 1983).

L'âge d'apparition de la maladie est variable :

- entre 30 et 40 ans, dans la forme classique de la maladie de Huntington ;
- entre 3 et 20 ans, dans la forme juvénile de la maladie (aussi appelée Westphal variant), représentant 5 à 7% de la totalité des patients atteints de la maladie de Huntington (Harper 1991) ;
- après 50 ans, dans la forme tardive de la maladie, représentant 30% des cas.

L'évolution de la maladie est irréversible et progressive sur une durée de 10 à 20 ans pour les formes non juvéniles, et de 8-10 ans pour la forme juvénile.

2.3. Génétique :

La maladie de Huntington est une affection autosomique dominante, elle touche autant d'hommes que de femmes, avec un antécédent familial sauf en cas de mutation de novo (très rare). Elle est dite à pénétrance complète, c'est-à-dire que la mutation s'exprime au niveau du phénotype dans 100% des cas.

Les enfants ont 50% de risque de développer la maladie. Le facteur génétique lié à la maladie a été localisé sur le bras court du chromosome 4 en 1983 (Gusella et al. 1983) et le gène responsable IT15 a été identifié en 1993 par le groupe « Huntington's disease Collaborative Research Group » sur le bras court du chromosome 4 (4p16.3) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993).

La présence anormale et instable d'une expansion de triplets CAG supérieure ou égale à 37 sur le gène IT15 est responsable du phénotype de la maladie (Kremer et al. 1994). Cependant il peut exister une pénétrance incomplète pour une expansion de CAG entre 35 et 39 CAG (Snell et al. 1993), alors qu'elle est toujours complète à partir de 40 CAG et que le gène normal comporte 9 à 34 CAG. Cette expansion de triplets CAG code pour une succession de glutamines en partie N-terminale de la protéine huntingtine (Figure 4). La présence d'un nombre anormal de glutamines confère à l'huntingtine un changement dans sa conformation, ses interactions et ses fonctions biochimiques.

La mutation génique est présente dès la naissance mais ne s'exprime cliniquement, que tardivement. L'âge de l'apparition des symptômes de la maladie est relié à la taille de l'expansion de CAG dans le gène IT15, il est inférieur à 30 ans pour les formes longues et supérieures à 50 ans pour les formes courtes (Andrew et al. 1993; Snell et al. 1993).

Les rares patients homozygotes pour la mutation ont une évolution plus rapide de la maladie (Squitieri et al. 2003).

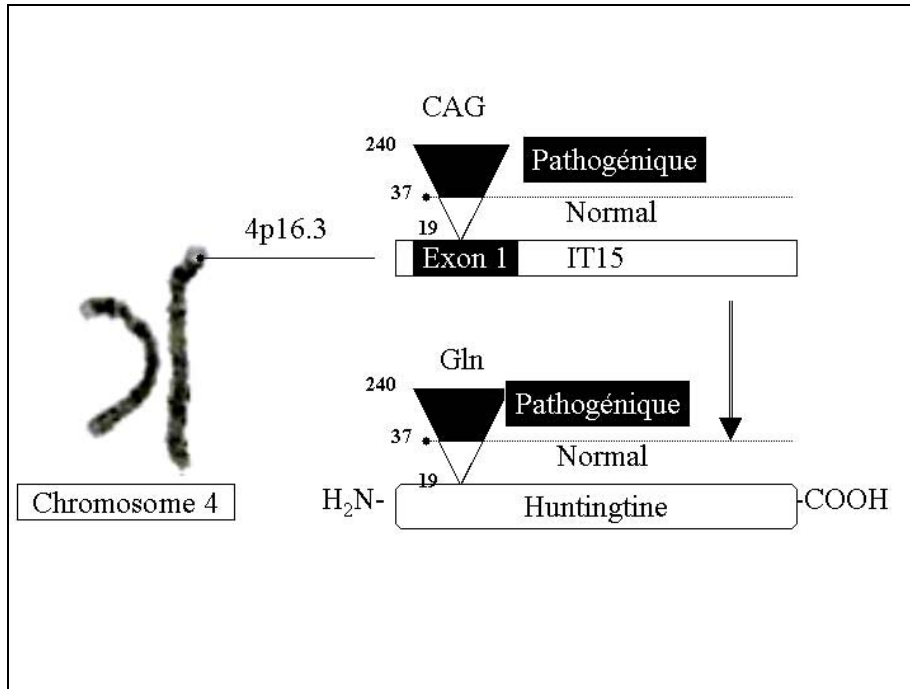


Figure 4 : Gène, mutation, protéine responsable de la maladie de Huntington

2.4. Clinique :

Classiquement, la maladie de Huntington est définie par une triade caractéristique de signes cliniques (Siabas 1991; Mikaelian 2001):

- troubles moteurs : la chorée
- troubles psychiatriques : la démence progressive
- troubles cognitifs

On peut cependant distinguer selon l'évolution clinique, trois formes de maladie de Huntington : commune, précoce et tardive. Les différences d'âge d'apparition, d'évolution clinique peuvent impliquer des mécanismes physiopathologiques différents et nécessiter des stratégies thérapeutiques différentes. Il est donc important de connaître les trois formes de maladie de Huntington pour adapter les critères d'observation lors des essais cliniques et la prise en charge thérapeutique.

La forme commune comporte une phase présymptomatique longue, puis une phase avec des symptômes peu marqués de type moteur et cognitif (Kirkwood et al. 2000) et enfin une phase symptomatique progressive marquée comportant signes moteurs, cognitifs et psychiatriques.

2.4.1. Signes moteurs :

Une des premières anomalies de motricité concerne les mouvements oculaires : ils sont saccadés (Young et al. 1986; Penney et al. 1990). On observe une bradykinésie, c'est-à-dire une lenteur des mouvements alternatifs répétés volontaires (marionnettes) qui s'accroît au cours de la maladie (Hefter et al. 1987). L'atteinte motrice s'observe aussi au niveau des réflexes : clignement des yeux sous stimulation électrique prolongé (de Tommaso et al. 2001). Lors de l'évolution de la maladie, les troubles moteurs deviennent prédominants et évoluent inexorablement, constituant une signature de la pathologie.

Ils comprennent :

- La chorée : mouvement involontaire, brusque, explosif, anarchique et imprévisible, accentué par le stress. Elle touche différentes parties du corps : le visage (grimaces), le cou (balancement), le tronc (révérence) et les membres (projection des bras en avant et marche désordonnée pseudo-ébrioise).
- La bradykinésie : lenteur des mouvements.
- L'akinésie : absence de mouvement, observée en phase terminale.
- La dystonie : contraction tonique, simultanée des muscles agonistes et antagonistes, imposant à certains segments de membres ou à une partie du corps des attitudes extrêmes de contorsion. Le mouvement est lent mais peut s'exacerber sous la forme d'un spasme dystonique.
- La dysarthrie : problème de prononciation des mots sans anomalie d'écriture, de lecture, de compréhension.
- La dysphagie : trouble de la déglutition, à l'origine de fausse route et cause importante de complications pulmonaires et de mortalité.
- L'hypotonie : baisse du tonus musculaire au niveau des bras et des pieds.
- L'hyper-réflexie : réflexes accentués et présence de réflexe archaïque : agrippement.
- L'atteinte des mouvements volontaires fins, problématique car elle concerne tous les gestes de la vie quotidienne dont l'habillage et l'écriture (Figure 5).

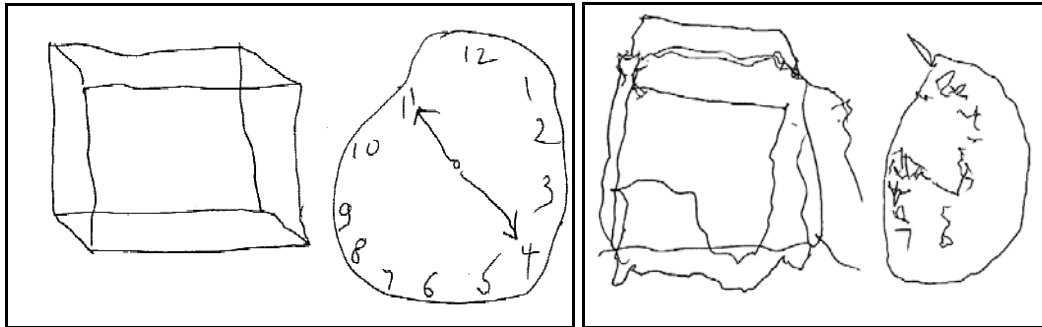


Figure 5 : Exemple des mêmes dessins réalisés à deux ans d'intervalle par le même patient

A gauche, le patient a réalisé les dessins demandés de façon assez correcte, un cube et une pendule, alors qu'à droite deux ans plus tard, le cube n'a pas de relief et la pendule n'est pas reconnaissable, marque d'une extrême incoordination. Figure issue de (Georgiou et al., 1999)

2.4.2. Signes cognitifs :

Les signes cognitifs sont précoces et précèdent les signes moteurs dans la symptomatologie de la maladie (Hahn-Barma et al. 1998). Ils nécessitent une prise en charge précoce. Contrairement à d'autres pathologies neurodégénératives, le patient ne souffre pas de désorientation spatiale et temporelle. D'autres fonctions supérieures sont touchées précocement, comme la mémoire immédiate et à court terme ainsi que la vigilance et l'attention. En fait les défauts de mémoire sont visibles à travers les difficultés éprouvées par le patient à apprendre et à recouvrer des éléments stockés.

Les premières atteintes des fonctions supérieures sont détectables statistiquement grâce à l'échelle WAIS-R (Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised) (Wechsler 1981) et concernent les exercices d'arithmétique, le classement d'images et la reconnaissance de symboles (Kirkwood et al. 2000). Les anomalies détectées par les exercices d'arithmétique mettent en évidence des troubles de la compréhension verbale et de la mémoire auditive à court terme. Le classement d'images pointe des anomalies de l'analyse visuelle, de la compréhension de la cause à la conséquence et de la réflexion séquentielle. La reconnaissance de symboles est diminuée par les anomalies au niveau de la vitesse d'exécution oculomotrice, de la mémoire visuelle et de la coordination. Le langage oral et l'expression orale sont aussi touchés mais sont plus les conséquences des problèmes de prononciation des mots et d'une expression du visage déformé par la chorée que la conséquence de dysfonction cognitive.

2.4.3. Troubles psychiatriques :

Les troubles psychiatriques sont rarement inauguraux mais s'installent au cours de l'évolution de la chorée. Ils apparaissaient autrefois auprès des autorités religieuses comme une expression de la possession démoniaque (mouvements particuliers et comportements anormaux) et justifiaient l'envoi au bûcher. Ces troubles psychiatriques sont de différents types et comprennent des troubles du caractère avec des problèmes relationnels, des crises de colère et une indifférence. Les patients souffrent fréquemment d'anxiété et de dépression qui se transforme en mélancolie et d'une tendance au suicide. Ils souffrent plus rarement de délires de passages psychotiques ou de troubles maniaco-dépressifs. Ils ont souvent un comportement agressif et exhibitionnisme. Enfin, la démence choréique fait suite aux troubles mnésiques, à la perte de concentration, aux troubles de jugement et s'accompagne d'une recherche perpétuelle de nourriture (boulimie).

2.4.4. Autres troubles :

Les patients souffrent d'une perte de poids continue qui les mène à un état cachexique, parfois causal de la mort. Ils peuvent aussi avoir des troubles du sommeil et des atteintes des fonctions végétatives comme la perte du contrôle sphinctérien (incontinence dans la phase terminale), et souffrent parfois d'hypotension et d'hyperhidrose des pieds et des mains (sudation excessive).

2.4.5. Particularités cliniques des formes juvéniles et tardives :

La forme juvénile de la maladie représente moins de 10 % des cas de maladie de Huntington. Elle débute avant 20 ans et évolue, avec des signes cliniques particuliers, sur une

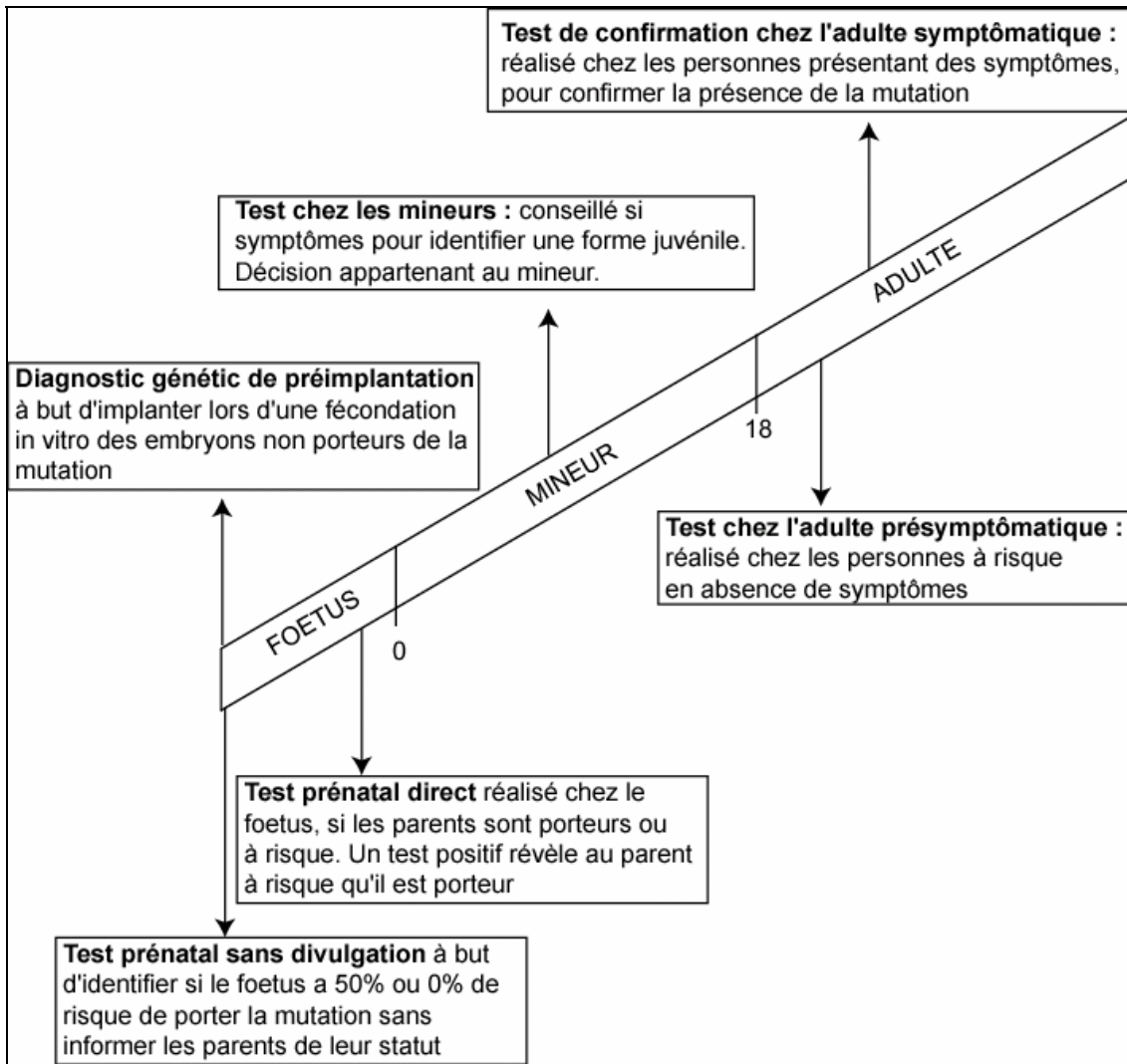


Figure 6 : Différents stades de diagnostic de la maladie

dizaine d'années vers la mort irrémédiable. Elle se caractérise par des troubles moteurs comprenant une akinésie précoce, une hyper-réflexie, une hypertonie (augmentation du tonus musculaire), une dysarthrie et ne comporte une chorée que de faible durée, voire absente. Les troubles cognitifs et psychiques se caractérisent par une détérioration intellectuelle avec une baisse des performances scolaires, des troubles de caractères communs à la forme classique comme l'irritabilité, la maladresse et les crises de colères. Elle s'accompagne très fréquemment d'épisodes épileptiques, dont la fréquence est corrélée avec l'âge de début de la maladie (Sato and Abe 2002).

La forme tardive de la maladie représente environ 25 % des cas de maladie de Huntington. Elle débute après 50 ans et a une évolution lente et consiste en une chorée associée à une faible dysphagie, avec des troubles cognitifs et psychiatriques atténués par rapport à la forme commune.

2.5. Diagnostic :

2.5.1. Les trois stades de diagnostic : prénatal, présymptomatique et symptomatique

Le diagnostic peut se faire à différents stades de l'affection : prénatal, pré-symptomatique et symptomatique (Figure 6).

Le diagnostic prénatal est réalisé dans le cas d'une fécondation non assistée sur un prélèvement du liquide amniotique par une amniocentèse, suivie d'une analyse de l'ADN des cellules fœtales (Figure 6). Ce type de diagnostic s'accompagne d'un risque non négligeable de fausses couches. Dans le cas d'une fécondation in vitro, le diagnostic de préimplantation est réalisé sur une des 8 cellules de l'embryon congelé jusqu'à l'implantation.

Le diagnostic au stade présymptomatique repose principalement sur l'analyse de l'ADN des cellules sanguines.

Dans le cas symptomatique, la confirmation du diagnostic repose sur cinq procédés médicaux : l'étude des dossiers médicaux, l'histoire de la maladie, l'examen clinique, les examens de laboratoire conventionnels et l'analyse génétique moléculaire (Bennett and Plum 1997). L'étude des dossiers médicaux permet d'obtenir l'évolution des signes cliniques et les résultats des examens complémentaires chez le patient. Elle permet en outre de définir le statut des différents membres de la famille, important dans le cas d'une transmission dominante de la maladie. L'étude de l'histoire de la maladie est capitale dans le cas d'une maladie neurologique car les signes physiques et biologiques sont absents au début de la maladie et celle-ci permet d'évaluer le stade d'évolution de la maladie. L'examen neurologique peut s'appuyer sur l'examen du Mini-Mental Status (MMS) qui permet de donner un score rapide mettant en évidence la démence (score moyen de 9.5 sur 30), la dépression avec ou sans trouble cognitif (score de 19 ou 27.6) (Figure 7) (Folstein et al. 1975). Cet examen évalue l'orientation temporelle et spatiale, les capacités d'apprentissage, l'attention, le calcul, la mémoire, le langage et la compréhension et la possibilité de dessiner correctement des formes géométriques.

L'examen neurologique étudie les fonctions supérieures, la motricité, la sensibilité, les réflexes, les fonctions végétatives et les fonctions sensorielles. L'examen des fonctions supérieures permet d'évaluer la vigilance et l'attention ; l'orientation (dans le temps et l'espace) ; la mémoire : immédiate, à court terme (antérograde) et à long terme (rétrograde) ; le calcul ; le langage oral et l'expression ; l'écrit et la compréhension ; les gestes (comme l'habillement) ; la reconnaissance auditive et visuelle ; le raisonnement ; et la critique d'une

histoire absurde. L'examen moteur comprends l'étude de la marche ; de la station debout ; du tonus musculaire ; des mouvements ; des troubles trophiques musculaires ; de la force (préhension des mains) ; de la motricité céphalique : cervicale, oculaire, faciale (siffler) et pharyngo-laryngée. L'examen de la sensibilité comprends l'étude de la sensibilité superficielle (tactile et douloureuse) ; de la sensibilité profonde : vibratoire à l'aide d'un diapason, positionnelle (sens de déplacement passif les yeux fermés) et stéréognosie (reconnaissance par palpation). L'examen des réflexes étudie le réflexe ostéo-tendineux, le réflexe cutané et le réflexe archaïque (préhension forcée ou grasping). L'examen des fonctions végétatives étudie le contrôle sphinctérien, les fonctions sexuelles, la régulation tensionnelle, la sudation et la sécrétion lacrymale. L'examen des fonctions sensorielles comprend l'étude de l'audition, l'olfaction, la vision et l'étude du goût.

Une autre échelle, adaptée à la maladie de Huntington est utilisée pour diagnostiquer et évaluer l'évolution de la maladie : l'UHDRS (Unified Huntington's Disease Rating Scale) (Siesling et al. 1998). Elle prend en compte la motricité, la cognition, la psychiatrie et la capacité fonctionnelle.

Les examens de laboratoire conventionnels sont importants dans le cas des maladies neurodégénératives. Ils comprennent l'imagerie médicale qui aident à établir un diagnostic et à apprécier le stade d'évolution de la maladie, les analyses anatomopathologiques réalisées dans un but descriptif en post mortem et les analyses biomédicales courantes (biochimie/hématologie), qui permettent la mise en évidence de nouvelles perturbations reliées à l'évolution de la maladie ou précédant les symptômes cliniques.

Avant la découverte de la mutation génétique responsable de la maladie, deux types d'analyses confortaient le diagnostic clinique : l'imagerie médicale et l'anatomopathologie du cerveau.

2.5.2. Imagerie médicale :

L'imagerie médicale a une grande importance dans la maladie de Huntington. En effet c'est le moyen historique d'observer la neurodégénérescence chez le patient, ceci de son vivant. Elle a été utilisée bien avant la découverte du gène responsable et a permis d'identifier les régions du cerveau atteintes. Elle est un critère important actuellement pour étudier des anomalies chez les patients dès le stade pré-symptomatique, comme pour le suivi d'essai clinique. Les techniques d'imagerie médicale ne cessent d'évoluer depuis l'utilisation de l'encéphalographie gazeuse, aujourd'hui dépassée et traumatisante, jusqu'à la TEP et la RMN (Leeds and Kieffer 2000).

L'ancienne technique d'imagerie permettant le diagnostic par imagerie était l'encéphalographie gazeuse ou pneumo-encéphalographie et consistait à introduire de l'air ou de l'oxygène dans les espaces remplis par le liquide céphalorachidien au moyen d'une ponction lombaire. Ceci induisait un contraste artificiel permettant d'observer les lésions et les ventricules cérébraux sur une radiographie par rayons X. C'est ainsi qu'ont été observés pour la première fois chez le patient vivant les 3 types de conséquences de la maladie de Huntington : une atrophie corticale, un élargissement des ventricules latéraux et du troisième ventricule ainsi qu'une atrophie du noyau caudé (Gath and Vinje 1968). La pneumo-encéphalographie ne permettait cependant pas de décrire le stade d'évolution et n'était pas corrélée avec l'importance des signes cliniques. Cette technique a été remplacée par la tomographie par émission de positons (TEP).

La TEP utilise des radiotraceurs, renseignant de façon non traumatique sur la physiologie et le fonctionnement des organismes vivants, par la reconstitution d'une image quantitative, dynamique et anatomique de la position du radiotraceur dans une coupe de

tissus. Quatre types de radiotraceurs ont été utilisés dans le diagnostic de la maladie de Huntington :

- Un analogue du glucose permettant la mesure de la consommation locale du glucose, le ^{18}F -Fluorodeoxyglucose (FDG) ;
- Un marqueur du flux sanguin cérébral, l'hexaméthylpropylèneamine oxime marqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$;
- Les ligands des récepteurs des neurotransmetteurs comme le ^{11}C -SCH 23390, marquant les récepteurs dopaminergiques D1 et le ^{11}C -raclopride, marquant les récepteurs dopaminergiques D2
- Un ligand des transporteurs vésiculaires des monoamines de type 2, l'alpha- ^{11}C -dihydrotetrabenazine (DTBZ).

L'imagerie par TEP dans la maladie de Huntington a permis différentes observations importantes pour la qualité de vie du patient et la compréhension de la pathologie.

Elle a permis de visualiser une atrophie bilatérale du noyau caudé, sans geste invasif en 1977 (Terrence et al. 1977), avec une bonne corrélation au stade clinique et anatomopathologique (Terrence and Rao 1980). Celle-ci a mis en évidence un hypométabolisme du noyau caudé dès le stade présymptomatique après injection de FDG, en 1982 (Kuhl et al. 1982), celui-ci précédant son atrophie (Kuhl 1984). Une réduction du flux sanguin cérébral a été mise en évidence au niveau cortical (Botsch et al. 1987) et au niveau du noyau caudé (Hasselbalch et al. 1992).

L'atteinte des neurones porteurs de récepteurs dopaminergiques D1a été mise en évidence dans le noyau caudé et le putamen des patients symptomatiques et présymptomatiques, ainsi que dans le cortex frontal de patients symptomatiques (Sedvall et al. 1994). L'atteinte des neurones porteurs de récepteurs dopaminergiques D2 a été mise en évidence dans le noyau caudé et le putamen de façon corrélée à l'âge des patients et à l'expansion de triplets CAG (Antonini et al. 1996; Antonini et al. 1998) et des anomalies de liaison du ligand aux récepteurs ont été mises en évidence dans le cortex frontal et temporal et l'amygdale (Pavese et al. 2003). L'atteinte des neurones porteurs de récepteurs dopaminergiques D2 dans le striatum est corrélée négativement au score moteur total UHDRS (Figure 8) (Pavese et al. 2003).

L'atteinte des neurones exprimant le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 est plus sévère dans le striatum des patients atteints de la forme akinétorigide que de forme classique de la maladie de Huntington (Figure 9)(Bohnen et al. 2000).

La seconde technique d'imagerie utilisée actuellement est l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (RMN), mise au point en 1946 par Bloch et Purcell. L'imagerie par RMN permet de connaître la structure anatomique du cerveau, mais également d'en suivre le fonctionnement ou le métabolisme ; il s'agit dans le premier cas d'une IRM anatomique, dans le deuxième d'une IRM fonctionnelle. L'imagerie anatomique par RMN dans la maladie de Huntington a permis différentes observations importantes pour la compréhension de la pathologie et s'est révélée utile pour le diagnostic différentiel.

L'atrophie bilatérale de la tête du noyau caudé (Bydder et al. 1982) et celle du putamen présente parfois même en l'absence de l'atteinte du noyau caudé (Harris et al. 1992), ont été mises en évidence par IRM 1H dès 1982. L'atrophie du noyau caudé et du putamen précède les signes cliniques et permettraient d'évaluer l'âge de début de la pathologie (Aylward et al. 2004). Des anomalies au niveau du thalamus et du cortex temporal ont été détectées en 1991 et seraient impliquées dans le déficit de mémoire des patients (Jernigan et al. 1991). Jernigan et collaborateurs ont détecté des anomalies de la substance blanche chez

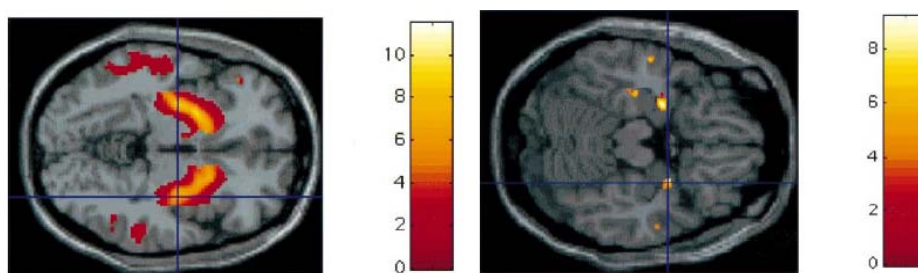


Figure 8 : Imagerie TEP du le ^{11}C -raclopride au niveau cérébral

A gauche, cerveau de sujet contrôle. A droite, cerveau de patient Huntington présentant une hypofixation du traceur indiquant une perte de récepteurs D2 dans le noyau caudé et le putamen. Figure issue de (Pavese et al., 2003).

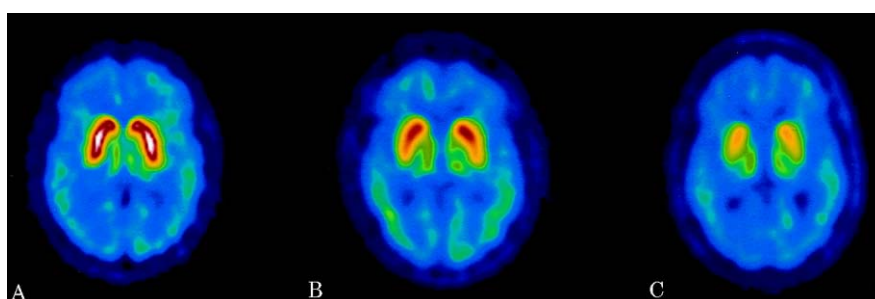


Figure 9 : Imagerie TEP avec la DTBZ de cerveaux

A : cerveau de sujet contrôle en imagerie TEP avec la DTBZ marquant le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2. B : cerveau de patient Huntington atteint de la forme classique avec une réduction de la fixation plus que C, cerveau de patient Huntington atteint de la forme akinétorigide. Figure issue de (Bohnen et al., 2000)

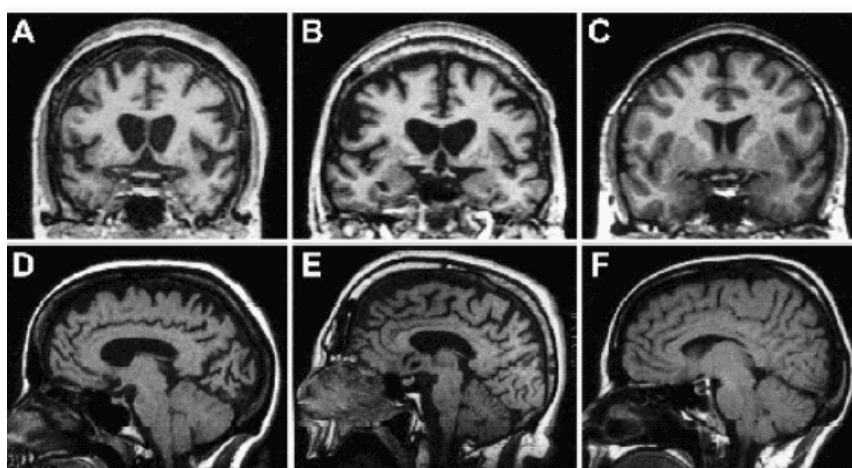


Figure 10 : IRM anatomique d'un patient HDL2, Huntington et d'un sujet contrôle

L'IRM du ^1H permet la différenciation de la maladie de Huntington, caractérisée par atrophie corticale et du noyau caudé (figure B et E), de la maladie Huntington disease like-2 (HDL2), présentant en plus une atrophie du cervelet et du tronc cérébral (figure A et D), en comparaison du sujet contrôle (figure C et F) Figure issue de (Margolis et al. 2001).

les patients Huntington. Plus tard, une corrélation entre les déficits cognitifs et l'atrophie du noyau caudé et du cortex frontal a été démontrée (Starkstein et al. 1992). L'IRM 1H pondérée en T2 a permis de différencier la forme rigide ou juvénile, avec un signal augmenté dans le striatum, en comparaison à la forme hyperkinétique classique (Savoiaro et al. 1991). Il a été démontré plus tard que certaines formes hyperkinétiques ont aussi un signal augmenté dans le striatum en T2, mais en corrélation avec un âge précoce de début de la maladie, un score clinique faible MMS et un test verbal anormal, différents de la forme classique (Oliva et al. 1993). L'IRM 1H permet la différenciation du variant Huntington disease like-2 (HDL2), présentant en plus d'une atrophie corticale et du noyau caudé présentes dans la maladie de Huntington, une atrophie du cervelet et du tronc cérébral (Figure 10) (Margolis et al. 2001).

2.5.3. Analyse génétique :

L'analyse génétique de la mutation apporte la certitude sur la présence ou l'absence de la maladie de Huntington. Elle n'est réalisée que sous le contrôle d'un conseil génétique constitué d'un psychiatre, d'un neurologue et d'un généticien. Elle se fait sur prélèvement tissulaire (postmortem), ou sanguin par la technique de PCR (polymerase chain reaction). Cela consiste en une amplification spécifique de la région du gène de l'huntingtine comportant les répétitions CAG (Goldberg et al. 1993). On obtient ainsi le nombre de triplets présent sur chacun des deux gènes, qui diagnostique la maladie s'il est supérieur à 37 (Toth et al. 1996). Récemment, il est préconisé de réaliser trois PCR pour éviter les faux négatifs, une amplifiant la partie (CAG)_n, une amplifiant la partie (CCG)_n et une amplifiant les deux régions (Gellera et al. 1996).

2.5.4. Diagnostic différentiel :

Le diagnostic différentiel de la maladie de Huntington repose sur l'examen de la chorée, de la démence et des symptômes psychiatriques (Haigh 2006). Deux types de chorées sont à différencier, les chorées non héréditaires et les chorées héréditaires. Les chorées non héréditaires sont faciles à exclure en regardant l'évolution de la maladie et les résultats des analyses biologiques associées et comprennent les dyskinesies tardives, la thyrotoxicose, les maladies cérébrovasculaires, le lupus érythémateux disséminé à localisation cérébrale et la polycythémie.

Les chorées héréditaires comprennent huit pathologies susceptibles d'être confondues avec la maladie de Huntington dont la HDL2 associée à une mutation génétique par expansion CTG supérieure à 40 du gène de la junctophiline 3. Les autres chorées sont la chorée acanthocytose, l'ataxie spino-cérébelleuse de type 17 (SCA 17), les ataxies cérébelleuses, la chorée héréditaire bénigne, la maladie de Creutzfeld-Jakob, les maladies d'Alzheimer familiales à début précoce et la démence frontotemporale familiale (FTDP-17).

Le diagnostic différentiel de la maladie de Huntington chez l'enfant dont l'historique familial est inconnu prend en compte l'exclusion des maladies suivantes :

- la neurodégénérescence associée à la pentoténate-kinase ou syndrome Hallervorden-Spatz avec une mutation du gène PANK2 entraînant une accumulation de fer et caractérisée en IRM T2 par un œil de tigre ;

- le syndrome de Lesch-Nyhan avec une mutation du gène porté par le chromosome X, codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT), caractérisé par une baisse de l'activité de cette enzyme à 1,5 % de la normale et par un rapport urinaire augmenté de l'acide urique sur la créatine ;

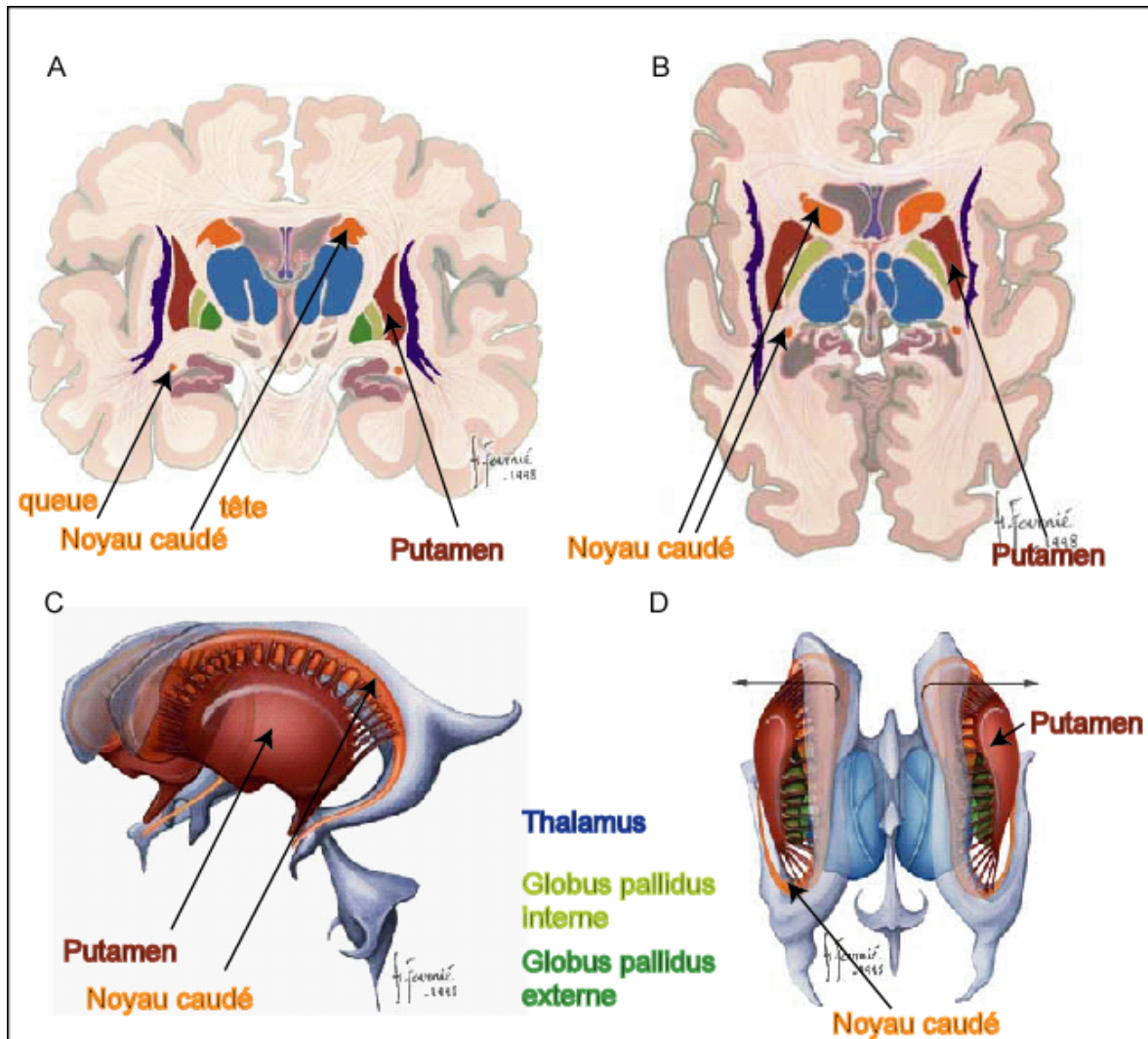


Figure 11 : Coupes coronale et axiale du cerveau humain et représentation tridimensionnelle des noyaux gris centraux

A, coupe coronale ; B, coupe axiale ; C, représentation tridimensionnelle latérale ; D, représentation tridimensionnelle supérieure des ganglions de la base avec le noyau caudé (orange), le putamen (bordeau) et le globus pallidus (vert). Les flèches indiquent les régions lésées dans la maladie de Huntington.

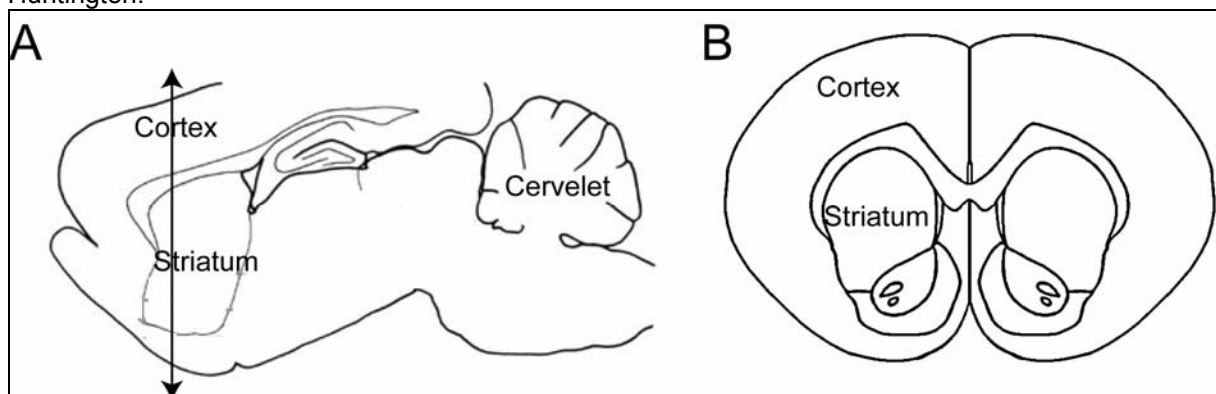


Figure 12 : Dessin d'une coupe axiale et coronale d'un cerveau de rat

A : coupe axiale avec le striatum représentant une grande partie sous-corticale du cerveau antérieur de rat situé sous un ruban de substance blanche, le corps calleux B coupe coronale avec les deux striata bordés dans la partie médiane par les ventricules latéraux et dans la partie dorsale par le corps calleux.

-
- la maladie de Wilson, maladie autosomique récessive du gène *ATP7B* avec un faible taux sérique de cuivre, un fort taux sérique de céruloplasmine et une augmentation de l'excrétion du cuivre urinaire ;
 - L'épilepsie myoclonique progressive.

2.5.5. Anatomopathologie du striatum :

2.5.5.1. Rappel anatomopathologique de la structure du striatum et des connexions :

Le striatum est composé chez l'homme du noyau caudé et du putamen. Sur la Figure 11 représentant une coupe coronale A et axiale du cerveau B, ainsi que deux représentations tridimensionnelles du striatum humain (vue latérale C et vue du dessus D), le noyau caudé apparaît en orange, le putamen en bordeaux et le globus pallidus en vert. Il faut remarquer que chez les rongeurs, il n'y a pas de distinction de structure entre le noyau caudé et le putamen, le striatum est une structure sous-corticale unique (Figure 12). Le striatum humain est divisé constitué de différents sous-types neuronaux que l'on retrouve chez les rongeurs avec des neurones épineux et des neurones non épineux. Ils sont ensuite subdivisés en fonction de leur taille, du neurotransmetteur principal, des neuropeptides co-sécrétés, et enfin en fonction de leurs cibles de projection (Kawaguchi 1997). 90 à 95 % de la population neuronale du striatum est composée de neurones épineux de taille moyenne (MSN), identifiables par la technique d'imprégnation de Golgi par de nombreuses épines dendritiques et un axone long avec de nombreuses collatérales (Figure 13)(Graveland et al. 1985b). Ils ont pour neurotransmetteur principal le GABA (acide γ -aminobutyrique), acide aminé inhibiteur diminué au cours de la maladie dans le striatum et les zones de projection (Perry et al. 1973). Ces neurones contiennent en plus des neuropeptides comme la Met-enképhaline et la substance P, et de la calcineurine. Les neurones épineux de taille moyenne contenant la substance P projettent sur la substance noire réticulée alors les neurones met-enképhalinergiques projettent sur le globus pallidus externe (Figure 14). Les interneurons striataux sont de trois types différents et constituent 5 à 10% de la population neuronale du striatum. Ils diffèrent des neurones épineux par l'absence d'épines dendritiques et la présence d'un axone court en connexion avec des dendrites. Le premier type d'interneurone contient de la somatostatine associée à la NADPH-diaphorase ou synthase de l'oxyde nitrique (NOS) (Dawson et al. 1991). Le second type est l'interneurone cholinergique contenant l'acétylcholine et l'enzyme de biosynthèse de l'acétylcholine, la choline acétyltransférase. Le troisième type d'interneurone est GABAergique et contient la parvalbumine. Les neurones afférents provenant du cortex, contiennent un acide aminé exciteur, le glutamate (Figure 14). Les neurones afférents venant de la substance noire compacte sont dopaminergiques et contiennent l'enzyme de biosynthèse de la dopamine, la tyrosine hydroxylase (Figure 14) (Ferrante and Kowall 1987).

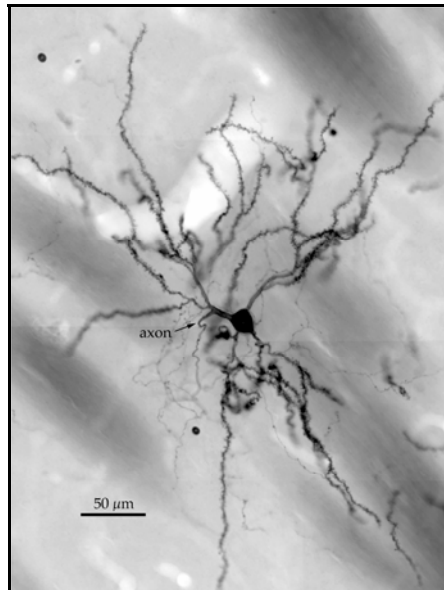


Figure 13 : Neurone épineux de taille moyenne striatal

Photo d'un neurone épineux de taille moyenne mis en évidence par l'injection de biocytine (Wilson and Kawaguchi, 1996)

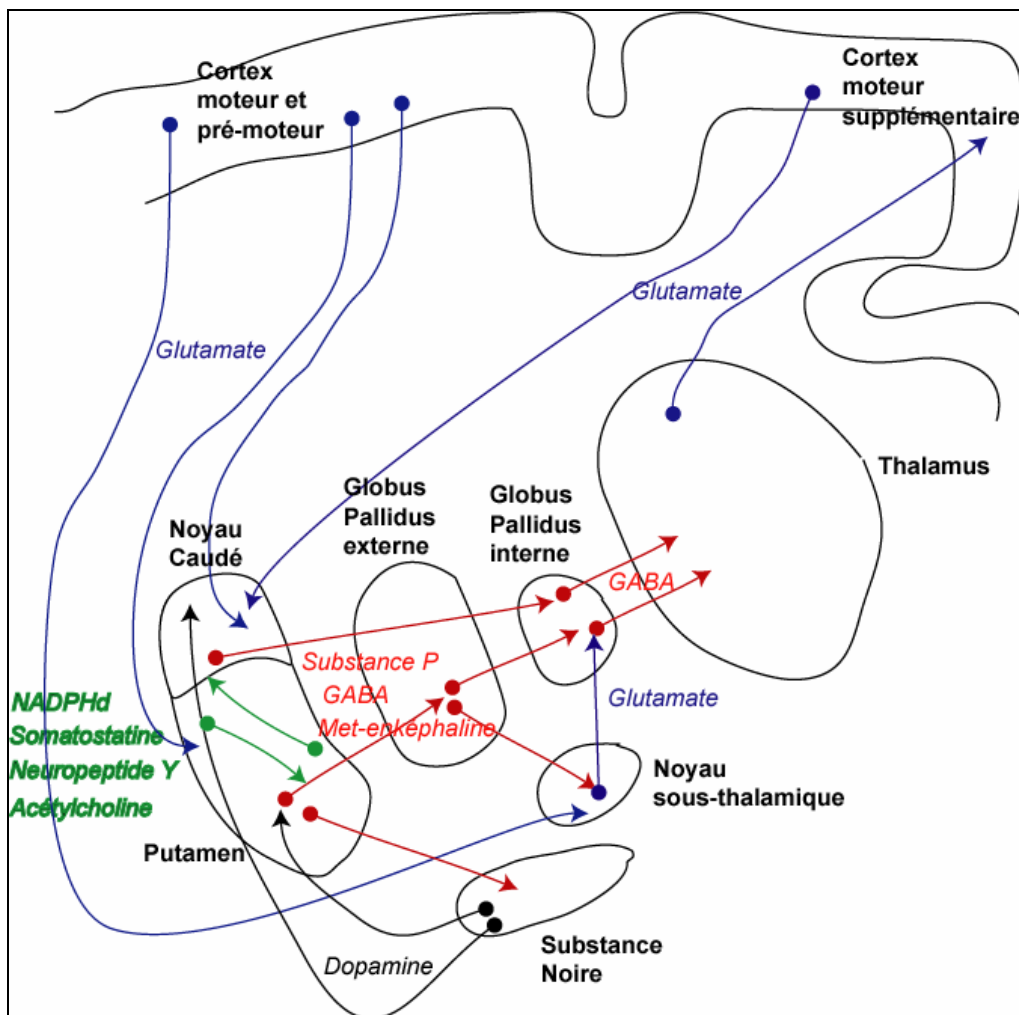


Figure 14 : Afférences, efférences et neurotransmetteurs du striatum humain

2.5.5.2. Anomalies anatomopathologiques du striatum :

2.5.5.2.1. Anomalies à l'échelle tissulaire

Le deuxième type d'examen conventionnel, à l'importance historique notamment pour la classification des différents stades de la pathologie, est l'examen anatomopathologique du cerveau. Avant la découverte de la mutation génétique responsable de la maladie, l'anatomopathologie du cerveau des patients permettait de confirmer le diagnostic. L'observation la plus évidente lors de l'examen global du cerveau d'un patient atteint de la maladie de Huntington est la diminution globale du poids (30%) et de la taille du cerveau (de la Monte et al. 1988). Cette perte de poids globale est la conséquence d'une atrophie corticale, visible en surface par l'élargissement des sillons et surtout d'une atrophie du striatum dorsal constitué du noyau caudé et du putamen.

L'atteinte du striatum a été mise en évidence dès 1896-1897 (Anton 1896; Lannois and Paviot 1897) mais acceptée vers 1904-1911 (Jelgersma 1908; Alzheimer 1911).

Certains auteurs ont suggéré une atteinte du putamen supérieure à celle du noyau caudé (Pfeiffer 1913; Dunlap 1927), mais c'est en fait le noyau caudé qui est le plus sévèrement atteint (Forno and Jose 1973). L'atteinte du globus pallidus existe mais elle est moins importante (Kiesselbach 1914; Terplan 1924; Spielmeyer 1926).

En 1985, Vonsattel et collaborateurs ont évalué l'atteinte striatale en *post mortem* de 163 cerveaux de patients Huntington. Cette évaluation a été réalisée d'après des critères macroscopiques et microscopiques pour établir une classification de la pathologie en 5 stades (de 0 à IV par ordre ascendant de gravité) (Vonsattel et al. 1985). Les critères observés ont été décrits dès 1968 et consistent macroscopiquement en une atrophie diffuse du striatum et microscopiquement en une perte neuronale et une astrogliose (Bruyn 1968). Ils ont été décrits semi-quantitativement comme absent (0), léger (+), modéré (++), sévère (+++) et très sévère (++++). L'atrophie striatale a été quantifiée en forme et en taille à deux niveaux de coupe coronale : un niveau passant par le noyau caudé, le noyau accumbens et le putamen et un niveau passant par le globus pallidus interne et externe (Figure 15). La perte neuronale a été évaluée par comptage après marquage par luxol + hématoxyline éosine ou crésyl violet (Figure 16). L'astrogliose a été évaluée après marquage de l'antigène GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Figure 17).

Dans le tableau 1, les anomalies macroscopiques et microscopiques des différents stades de la maladie sont décrites. Le stade 0 est caractérisé par une absence d'anomalies macroscopique (Figure 18 en haut à droite) ou microscopique, en présence de signes cliniques de maladie de Huntington. Le stade I présente uniquement des anomalies microscopiques : perte neuronale de 50% dans la tête et la queue du noyau caudé, sans atteinte du corps du noyau caudé. Au stade II, l'astrogliose se détecte en parallèle de la perte neuronale avec une atrophie du noyau caudé qui a un aspect convexe du côté ventriculaire (Figure 18B). Le bord ventriculaire du noyau caudé devient droit dans le stade III (Figure 18C) puis concave dans le stade IV, signe d'une atrophie maximale (Figure 18 en haut à gauche). La perte neuronale dans le noyau caudé atteint 95% au stade IV. Le striatum ventral constitué du noyau accumbens est moins sévèrement et plus tardivement touché (Bots and Bruyn 1981; de la Monte et al. 1988).

La perte neuronale est corrélée avec la taille de l'expansion CAG du gène IT15 (Furtado et al. 1996). La neurodégénérescence a une orientation dorso-ventrale et médio-latérale dans le noyau (Vonsattel et al. 1985). Le putamen dégénère selon un axe postero-antérieur et dorso-ventral (Roos et al. 1985). Plus tard, d'autres méthodes de marquage de

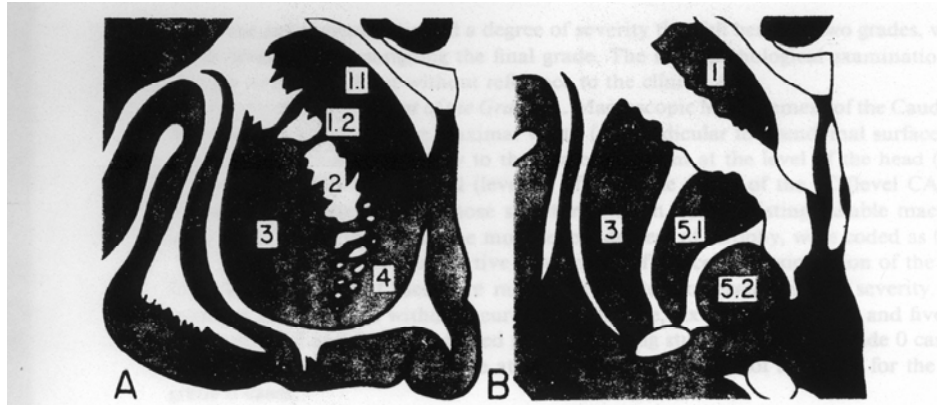


Figure 15 : Niveaux de coupe coronale étudiés dans la classification neuropathologique de la maladie par Vonsattel

A : Niveau de coupe du noyau caudé, de l'accumbens et du putamen. B : niveau du globus pallidus. 1 : Tête du noyau caudé, 1.1 : niveau médian du noyau caudé, 1.2 : niveau latéral du noyau caudé, 2 : substance blanche de la capsule interne séparant le noyau caudé du putamen, 3 : putamen, 4 : Noyau accumbens, 5.1 : partie latérale du globus pallidus et 5.2 : partie médiane du globus pallidus. Schéma issu de (Vonsattel et al. 1985)

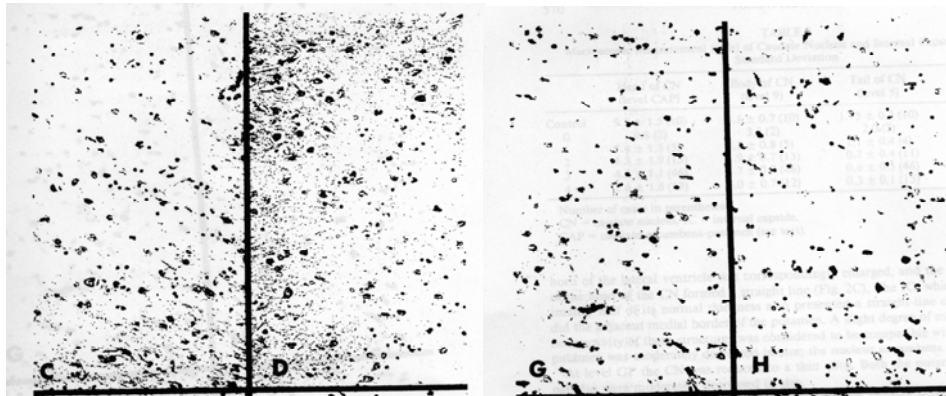


Figure 16 : Perte neuronale dans le striatum de patient huntington après coloration histologique à l'hématoxyline-éosine et au crésyl violet

C : Noyau caudé médian un peu atteint. D : noyau caudé latéral au stade I normal. G : Noyau caudé médian avec perte neuronale plus avancée. H : noyau caudé latéral au stade III avec forte perte neuronale, grossissement x320. Figures issues de (Vonsattel et al. 1985)

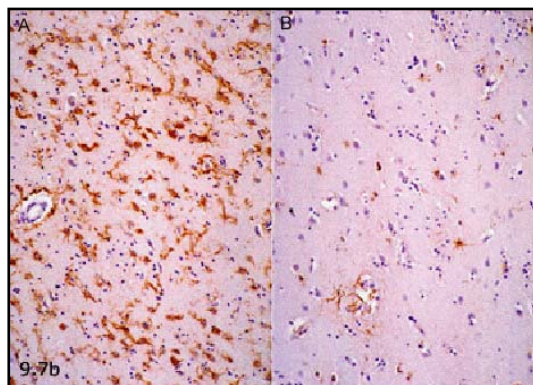


Figure 17 : Astroglie présente dans les stades II à IV

Astroglie détectée dans le cerveau d'un patient Huntington A par immunomarquage GFAP (glial fibrillary acidic protein), absente chez le sujet sain.
http://www.akronchildrens.org/neuropathology/CHAPTER_NINE.html

perte neuronale et une analyse plus complète des niveaux antéro-postérieurs ont permis de démontrer l'existence de perte neuronale dès le stade 0 (Myers et al. 1991; Hedreen and Folstein 1995) et même chez les patients présymptomatiques (Albin et al. 1992).

2.5.5.2.2. Anomalies à l'échelle neuronale

La perte neuronale dans le striatum touche préférentiellement les neurones épineux de taille moyenne efférents (Graveland et al. 1985a), exprimant l'enzyme de biosynthèse du GABA, la GAD (glutamic acid decarboxylase) qui est diminuée dans le striatum des malades (Bird et al. 1973). Cette perte neuronale concerne les MSN contenant de la substance P projetant sur la substance noire réticulée (Marshall et al. 1983) et les neurones mét-enképhalinerigiques projetant sur le globus pallidus externe (Deng et al. 2004). Ces neurones portent des récepteurs au glutamate, de type NMDA, dont le nombre est réduit lors de la maladie (Albin et al. 1990). Les interneurons cholinergiques semblent préservés (Ferrante et al. 1987) car les quantités d'acétylcholine et de choline acétyltransférase ne sont pas modifiées dans la maladie (Chesselet 1988). Ces résultats sont controversés par la description d'une baisse de l'activité de la choline acétyltransférase striatale (McGeer et al. 1973; Aquilonius et al. 1975). Enfin les interneurons GABAergiques contenant la parvalbumine (Harrington and Kowall 1991) comme les interneurons contenant la somatostatine (Ferrante et al. 1985) sont relativement préservés. Les neurones afférents venant de la substance noire sont préservés (Ferrante and Kowall 1987) mais la concentration de la dopamine est parfois diminuée dans le striatum et même si elle est stable dans la substance noire (Kish et al. 1987).

2.5.5.2.3. Anomalies à l'échelle intraneuronale et agrégats

A l'échelle intracellulaire, les anomalies neuronales observées au niveau de la morphologie membranaire des neurones épineux évoluent selon les stades de la maladie (Ferrante et al. 1991). Au stade II, les neurones épineux ont plutôt une augmentation du nombre d'épines dendritiques, parallèle à un recourbement des extrémités des dendrites et à une croissance dendritique anormale (Figure 19). Aux stades plus avancés III et IV, les neurones épineux ont un nombre réduit d'épines dendritiques, des zones de gonflements irréguliers au niveau des dendrites et des recourbements des extrémités dendritiques (Figure 20A, C, D). Puis au stade IV, on aperçoit fréquemment des tronctions dendritiques (Figure 20B). Plusieurs études ont démontré des anomalies au niveau des organelles intracellulaires. Des irrégularités ont été observées au niveau du réticulum endoplasmique rugueux à une déplétion des ribosomes au niveau du noyau caudé de patient Huntington (Roizin et al. 1974). Au niveau nucléaire, un nombre anormalement élevé d'indentations a été observé dans le noyau caudé (Roos and Bots 1983) ainsi qu'une désorganisation du nucléole (Roizin et al. 1974). Au niveau synaptique, les terminaisons synaptiques dégénèrent et sont non myélinisées avec des vésicules synaptiques sans connexion avec la synapse (Forno and Jose 1973). La formation d'agrégats de huntingtine anormale est observée au niveau intranucléaire et au niveau des neurites des MSN, dans les formes classique et juvénile de la maladie (DiFiglia et al. 1997). Il existe plusieurs types d'agrégats contenant l'huntingtine mutée, différenciable selon leur localisation, intranucléaire ou cytosolique, et leur composition, avec des formes plus ou moins courtes de l'huntingtine, ubiquitinées ou pas. L'agrégation nécessite souvent au préalable une protéolyse de la protéine en fragments courts. Les fragments N-terminaux

stades	Noyau Caudé						Putamen		
	<i>Partie médiane</i>			<i>Partie latérale</i>			Atro- phie	Perte neuro- nale	Gliose astrocy- taire
	atrophie	Perte neuro- nale	Gliose astro- cytaire	Atro- phie	Perte neuro- nale	Gliose astro- cytaire			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	+ / +++	+ / +++	0	0 / +	0 / +	0	0	0 / +
II	+	++	++ / +++	+	+	+ / +++	+	+ / +++	+ / +++
III	++ / +++	+++	+++	++ / +++ +	++	++	++	+++ (sup) ++ (inf)	
IV	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++

Tableau 1: Caractéristiques neuropathologiques des patients de stade 0 à 4 au niveau du noyau caudé et du putamen

0 : normale/ + : léger/++ : modéré/ +++ : sévère/++++ : très sévère/sup : supérieure/ inf : inférieure
(Vonsattel et al., 1985)

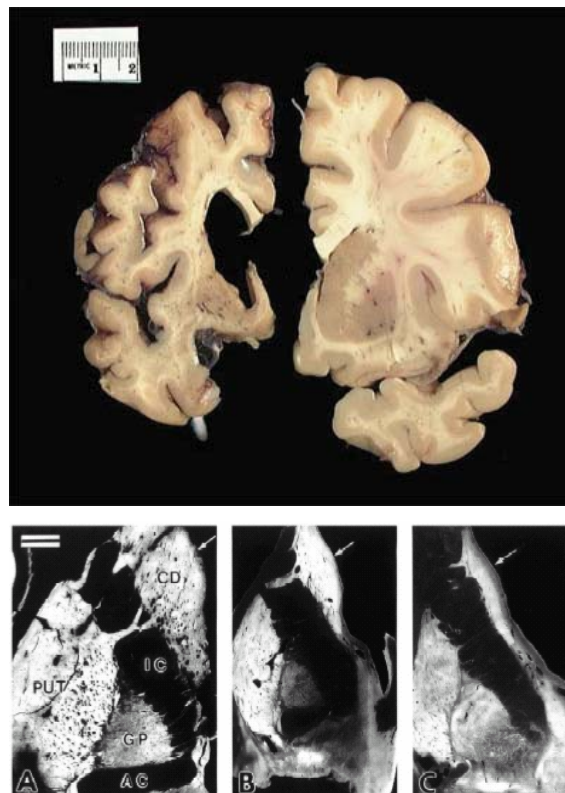


Figure 18 : Aspect macroscopique de la neurodégénérescence

Atrophie du noyau caudé et du putamen chez un patient Huntington en haut à gauche par rapport à un sujet sain, en haut à droite. En bas, évolution de l'élargissement des ventricules latéraux chez les patients Huntington. Figures issues de http://www.akronchildrens.org/neuropathology/CHAPTER_NINE.html (Cicchetti et al., 2000)

reconnus par l'anticorps EM-48 (dirigé contre les 256 premiers acides aminés de la protéine) sont présents dans les agrégats observés chez les patients (DiFiglia et al. 1997; Gutekunst et al. 1999). Mais ils sont aussi observés chez les souris transgéniques R6/1 et R6/2 (Davies et al. 1997; Yu et al. 2003), les souris N171Q82 (Yu et al. 2003), les souris YAC128 (Slow et al. 2003; Van Raamsdonk et al. 2005), les souris HdhCAG150 (Yu et al. 2003) et les souris HdhCAG70-80 (Li et al. 2000a). Les agrégats présents dans les souris HdhCAG150 ne contiennent pas de forme longue de l'huntingtine car ils ne sont pas reconnus par l'anticorps EM-121 (dirigé contre les acides aminés 342-456 de la protéine) (Yu et al. 2003). De même, chez les souris YAC72 (2511), les inclusions intranucléaires neuronales striatales ne sont reconnues que par l'anticorps EM-48 et pas par HD549 qui reconnaît les acides aminés 549-679 de l'huntingtine (Hodgson et al. 1999). En général, les inclusions intranucléaires neuronales contiennent de l'ubiquitine alors que les agrégats neuritiques n'en contiennent pas.

Il existe une importante controverse sur la toxicité des agrégats (Saudou et al. 1998; Kim et al. 1999). En effet, dans le modèle HD100, il y a une corrélation entre l'aggravation des symptômes moteurs et la présence de neurites dystrophiques et le marquage diffus nucléaire de l'huntingtine dans le cortex mais pas de corrélation avec la présence d'inclusions dans le striatum ou le cortex (Laforet et al. 2001). De même, dans un modèle neuronal d'expression de la forme courte de l'huntingtine mutée, la formation d'agrégats détectée par vidéomicroscopie prolonge leur survie et certains neurones meurent sans avoir formé des agrégats (Arrasate et al. 2004). Au contraire, dans les souris HdhCAG70-80 exprimant la forme entière de l'huntingtine mutée, il y a une corrélation entre la neurodégénérescence axonale des MSN et la présence d'agrégats dans le neuropile du striatum (Li et al. 2000a). Il est probable que les agrégats soient toxiques au niveau neuritique par l'altération de la transmission synaptique et du transport cellulaire alors que les inclusions nucléaires seraient responsables d'anomalies de la transcription.

2.5.5.2.4. Anomalies à l'échelle gliale

L'astrogliose se développe en parallèle de la perte neuronale. Au niveau microscopique, le nombre d'oligodendrocytes semble s'élever même avant l'atrophie striatale (Myers et al. 1991) et une microgliose est observée à tous les stades et s'accroît au cours du temps (Sapp et al. 2001). Elle existe parfois en parallèle d'une activation de cellules de type microgliales sécrétant des facteurs du complément, qui peuvent être toxiques au niveau neuronal (Singhrao et al. 1999) ou en induisant la dégradation de la gaine de myéline (Yamada et al. 1990).

2.5.6. Anatomopathologie corticale

L'atrophie corticale est progressive, très hétérogène selon les régions et atteint presque la totalité du cerveau, au stade terminal. L'atteinte corticale a été le sujet de controverse. En effet plusieurs groupes ont montré l'absence de différence morphométrique corticale (Hallervorden 1957; Vonsattel et al. 1985) et l'absence de perte cellulaire corticale (Dunlap 1927). Au contraire d'autres groupes ont mis en évidence un rétrécissement du ruban cortical parallèle à l'élargissement des sillons corticaux (de la Monte et al. 1988; Sotrel et al. 1991). De même, certains auteurs ont mis en évidence une perte neuronale corticale localisée dans certaines régions corticales (temporale, frontale et pariétale) et concernant des couches

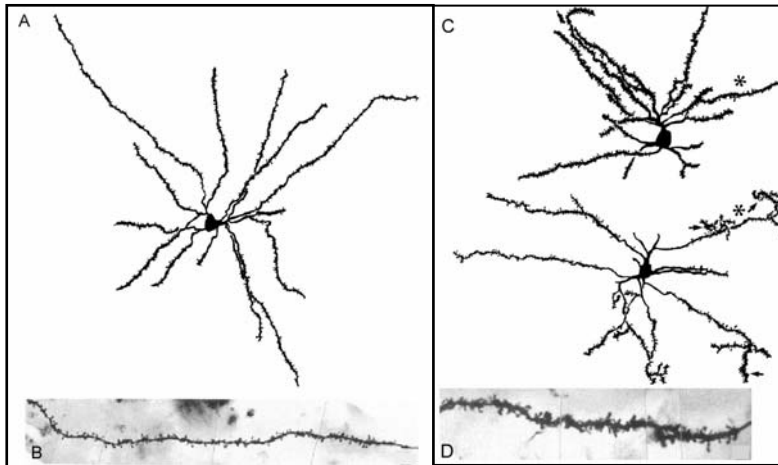


Figure 19 : Morphologie des neurones épineux au stade II de la maladie

A : représentation par dessin Camera Lucida d'un neurone épineux normal révélé par imprégnation argentique. B : photomontage d'une dendrite normale typique avec des épines nombreuses réparties sur toute la dendrite. C : représentation par dessin Camera Lucida de deux neurones épineux de patient au stade II de la maladie présentant une croissance anormale dendritique, un nombre élevé d'épines et un recourbement terminal de dendrites. D : photomontage montrant l'épaississement anormal de la dendrite et l'augmentation du nombre et du volume des épines dendritiques. Figure issue de ([Ferrante et al., 1991](#)).

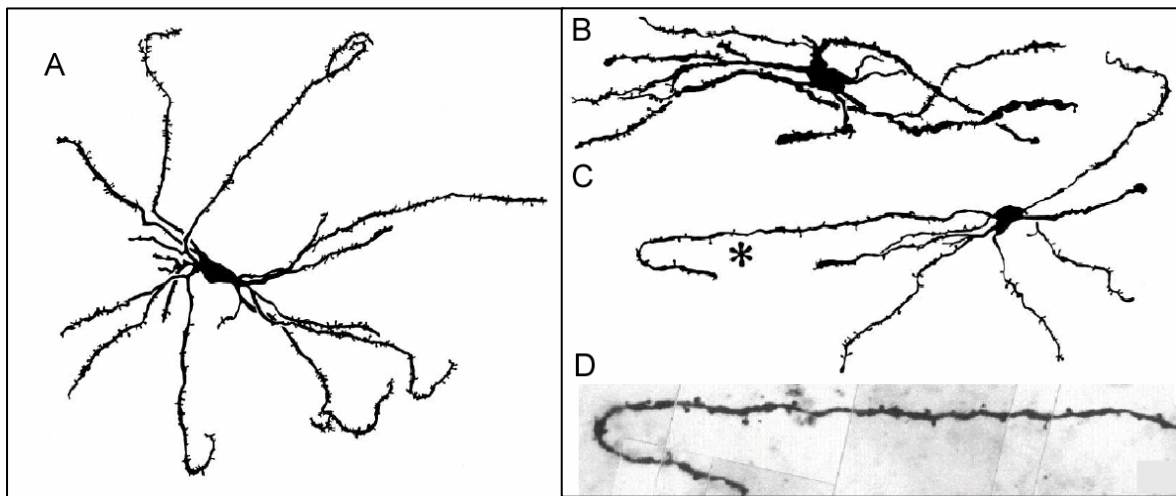


Figure 20 : Morphologie des neurones épineux au stade III et IV de la maladie

A et C : représentations par dessin Camera Lucida d'un neurone épineux au stade III. B Représentation par dessin Camera Lucida d'un neurone épineux au stade IV avec de nombreux renflements des dendrites et peu d'épines. D photomontage d'une dendrite avec un faible nombre d'épines et des zones d'interruption. Figure issue de ([Ferrante et al., 1991](#)).

corticales précises (couche III, V et VI) (Hedreen et al. 1991; Heinsen et al. 1994; Selemon et al. 2004).

La perte neuronale concerne les grandes cellules pyramidales du gyrus angulaire du lobe pariétal des patients (Macdonald et al. 1997). Celles-ci possèdent soit des projections longues dans le cortex moteur primaire soit des projections courtes dans le cortex prémoteur (Macdonald and Halliday 2002).

La perte neuronale est parfois accompagnée d'astrogliose (Selemon et al. 2004).

En accord avec l'atteinte corticale dans la maladie, le glutamate et le GABA sont en concentration réduite dans le cortex frontal et temporal des patients Huntington (Pearson and Reynolds 1994). En effet les projections corticostriatales en provenance de la couche V du cortex frontal ont été décrites comme provenant des neurones contenant une grande quantité de glutamate ou d'aspartate (Bellomo et al. 1998). Cette atteinte corticale ou la dysfonction du transport neuronal cortical serait responsable de la réduction du taux d'un facteur neurotrophique presque exclusivement produit par le cortex (Altar et al. 1997), le BDNF (Brain derived neurotrophic factor) de 53 à 82% au niveau du noyau caudé et du putamen des patients Huntington comparés aux contrôles (Ferrer et al. 2000).

Les atteintes cellulaires observées au niveau du cortex sont la présence d'inclusions intranucléaires et /ou intraneuritiques, d'indentations nucléaires, d'anomalies de l'appareil de Golgi et du réticulum, de neurites dystrophiques et de dépôts de fer.

Au niveau intracellulaire, la forme juvénile de la maladie présente un nombre plus élevé de neurones (38-52% des neurones) contenant la protéine huntingtine anormale sous forme d'agrégats nucléaires, ceci au niveau de toutes les couches corticales, comparée à la forme classique (2-6% des neurones). Ceux-ci sont absents au stade présymptomatique de la forme classique de maladie de Huntington (DiFiglia et al. 1997). Les agrégats intraneuritiques existent chez les patients atteints de la forme classique et au niveau des couches V et VI corticales, ils sont présents dès le stade présymptomatique dans la couche VI du cortex. Ils sont en nombre réduit dans la forme juvénile de la maladie (DiFiglia et al. 1997). En accord avec les anomalies nucléaires rencontrées dans le cortex des malades, des indentations nucléaires neuronales ont été détectées dans le cortex (Roos and Bots 1983).

Des neurites dystrophiques ont été mis en évidence dans les couches III, V et VI (Brodmann areas 8, 10, 24, 33, 28, 38, 7, 39, 18) (Jackson et al. 1995) alors qu'une compensation de la perte neuronale corticale a été observée dans la couche V du cortex comportant des cellules pyramidales avec une densité dendritique augmentée (Sotrel et al. 1993).

L'atteinte corticale participerait aux symptômes non choréiformes de la maladie, comme la démence, l'irritabilité, l'apathie et la dépression (Hedreen et al. 1991).

2.5.7. Anatomopathologie des autres structures

D'autres structures cérébrales semblent présenter des atteintes dans la maladie de Huntington.

Le globus pallidus présente une diminution de la densité en fibres striato-pallidales parallèle à une astrogliose réactive, sans diminution de la densité neuronale, même à un stade tardif de la maladie. La perte de neurones striataux projetant sur le globus pallidus externe serait à l'origine des mouvements choréiques observés dans la maladie (Wakai et al. 1993).

Dom et collaborateurs ont décrit une atteinte du thalamus au niveau ventrolatéral, caractérisée par une atrophie des cellules internunciales ou microneurones GABAergiques

(Dom et al. 1976). Cette atteinte serait surtout présente dans la forme juvénile de la maladie (Byers et al. 1973).

Kremer et collaborateurs ont mis en évidence une atteinte du noyau tubéral latéral hypothalamique, caractérisée par une réduction de 90% du nombre de neurones et de 40% du nombre d'oligodendrocytes parallèle à une astroglie réactionnelle (Kremer et al. 1990).

De plus, le noyau accumbens dans sa partie ventrale serait atteint au stade terminal de la maladie (Hedreen and Folstein 1995).

La région CA1 de l'hippocampe semble atteinte et pourrait expliquer en partie les démences chez les patients Huntington (Spargo et al. 1993).

Le nombre de cellules de Purkinje au niveau du cervelet est fortement réduit chez certains patients (Rodda 1981; Jeste et al. 1984).

2.6. Thérapie :

Il n'existe actuellement aucune thérapeutique curative de la maladie, seuls certains symptômes comme les troubles moteurs et les troubles psychiatriques sont corrigés par des thérapeutiques pharmacologiques symptomatiques. Les troubles cognitifs n'ont pas de thérapeutiques connues. Le point le plus important de la thérapeutique de cette maladie est le suivi, l'encadrement et le soutien moral apportés par des moyens non pharmacologiques d'aide à domicile des patients et de leur famille (Skirton and Glendinning 1997; Aubeeluck 2005) puis par l'hospitalisation lors du stade final.

Les seuls moyens thérapeutiques permettant l'amélioration partielle de la maladie ont été apportés par les essais cliniques. L'amélioration de l'état des patients lors des essais cliniques est tout d'abord corrélée au fait qu'ils sont plus régulièrement et plus longuement suivis par les médecins. A part cet aspect important de l'amélioration de l'état d'esprit des malades, quelques essais cliniques ont donné des résultats encourageants.

2.6.1. Thérapie des troubles moteurs :

Les troubles moteurs doivent être combattus avec des moyens non pharmacologiques, aussi longtemps que possible, pour éviter la survenue d'effets secondaires néfastes. Différentes approches médicales et paramédicales sont utilisées pour lutter contre les anomalies de motricité volontaire (élocution et déglutition, poursuite oculaire, marche et équilibre, alimentation) et involontaire (chorée, dystonies, rigidité et myoclonies).

Les mouvements volontaires sont ceux qui se dégradent petit à petit et qui participent pour beaucoup à la gêne fonctionnelle des patients, ils doivent être pris en charge par tous les moyens possibles. Ainsi, l'orthophoniste permet l'amélioration de l'élocution et de la déglutition. Le diététicien intervient aussi pour combattre la perte de poids du patient et adapter les aliments en fonction de ses difficultés motrices. Le kinésithérapeute participe à l'entretien de la marche et de l'équilibre. L'ergothérapeute intervient pour aider le patient à conserver de l'autonomie des gestes quotidiens, de la vie sociale et de la vie professionnelle comme s'alimenter, se déplacer, se servir d'outils de base (stylo, fourchette). Il donne des méthodes au patient pour explorer l'espace et agir sur son environnement. Il conseille la famille sur le choix du mobilier (sièges, bureaux, lits) afin d'assurer au patient des positions confortables et correctes et propose des solutions pour contourner le handicap. Le psychomotricien est présent pour aider le patient à se déplacer dans une pièce, à contrôler ses mouvements. Les infirmiers interviennent dans un stade plus avancé pour aider le patient à s'habiller, à se laver, à manger et à s'occuper de lui-même. Il est aussi important que le

Principe actif SPECIALITE PHARMACEU TIQUE	Mode d'action	Chorée	Dystonies /Rigidité	Myoclonies	Revue
Halopéridol HALDOL®	Neuroleptique de la classe des butyrophénones antagoniste D1 et D2	0,5 à 20 mg			(Gardner et al., 2005)
Pimozide ORAP®	Neuroleptique benzimidazole antagoniste dopaminergique	1 à 10 mg			
Clonazepam RIVOTRIL®	anti-épileptique agoniste des récepteurs des benzodiazépines	0,5 à 6 mg	0,25 à 4m g	Jusqu'à 15 mg	(Moroz, 2004)
Lorazepam TEMESTA®	Anxiolytique agoniste des récepteurs des benzodiazépines		0,5 à 8 mg		(Moroz, 2004)
Trihexiphenidyl ARTANE®	Anticholinergique antiparkinsonien		2 à 30 mg		
L-DOPA LEVODOPA®	Antiparkinsonien précurseur de la dopamine		250 mg à 4g		
Baclofène* LIORESAL®	Myorelaxant GABAergique		5 à 100 mg		
Tétrabenazine\$ NITOMAN® ou XENOZINE®	Inhibiteur du transporteur vésiculaire des monoamines		50 à 200 mg		(Carlsson, 1975)
Valproate de sodium DEPAKINE®	Antiépileptique inhibiteur de la GABA transaminase			1,2 à 2 g	(Pranzatel li and Nadi, 1995)
Primidone MYSOLINE®	Anticonvulsivant			0,5 à 1g	(Obeso, 1995)
Piracetam NOOTROPYL®	Nootrope Dérivé GABAergique			2,4 à 21,6 g	(Winblad, 2005)
Levetiracetam KEPPRA®	Analogue du GABA			1 à 3 g	(Nash and Sangha, 2001)

Figure 21 : Traitements des troubles moteurs dans la maladie de Huntington

Les doses indiquées sont les posologies journalières. Les revues indiquées concernent les indications, les doses et les propriétés pharmacologiques des principes actifs.* indique une contre-indication dans l'épilepsie et \$ indique la disponibilité sous autorisation temporaire d'utilisation en pharmacie hospitalière. Donnée issues de http://www-ulpmed.u-strasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/pathologie-motricite/ORIENTATION_DIAGNOSTIQUE_MOUVEMENTS.pdf

patient soit pris en charge socialement en tant qu'invalidé, dès que cela est nécessaire. La mauvaise réalisation de mouvements volontaires entraîne une anxiété qui peut être éliminée par un traitement anxiolytique rapide avec une benzodiazépine (Figure 21). Si cela devient nécessaire, les troubles choréïques peuvent être traités pharmacologiquement par l'halopéridol, le pimozide, le clonazepam, le lorazepam, le trihexyphénidyl, la levodopa, le baclophène, le valprotate de sodium, la primidone, le piracetam ou le leviracetam (Figure 21).

2.6.2. Thérapie des troubles psychiatriques :

Les troubles psychiatriques touchent plus de la moitié des patients atteints de la maladie de Huntington. Tout d'abord la psychothérapie et la relaxation sont des moyens efficaces pour lutter contre l'irritabilité, la dépression et l'anxiété. La dépression est le symptôme le plus courant et réponds aux traitements classiques en commençant à une faible dose pour éviter les effets indésirables. Les principes actifs les plus efficaces sont les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (IRSS), la sertraline, la fluoxétine, la paroxétine et le citalopram. Le bupropion, inhibiteur de recapture des cathécholamines à action antitabagique, est efficace dans la dépression (Figure 22).

2.7. Modèles d'étude de la maladie de Huntington :

La maladie de Huntington est une maladie modèle pour l'étude des maladies neurodégénératives, elle est circonscrite à une lésion striatale et consécutive à la mutation d'un gène. Il est plus facile de modéliser ce type de maladie que la plupart des maladies neurodégénératives, multiatrophiques (maladie d'Alzheimer) et d'origine indéterminée sauf pour certaines formes familiales le plus souvent minoritaires (maladie de Parkinson).

En effet de nombreux modèles ont été mis au point pour l'étudier et leur évolution a suivi les progrès scientifiques dans le domaine de la génétique et de la biologie moléculaire. Historiquement les premiers modèles animaux ont exploité le fait que le striatum est la région du cerveau lésée dans la maladie. Donc des modèles phénotypiques ont été mis au point par administration de neurotoxines chez le rat le plus souvent, la souris ou le hamster plus rarement (annexe 1) et chez les primates non humains (annexe 2) dont le cerveau est nettement plus proche de l'homme que celui des rongeurs. Les neurotoxines utilisées pour induire une lésion striatale sont les agonistes des récepteurs glutamatergiques comme le kaïnate, le NMDA, le quinolinate, le quisqualate, l'acide iboténique et l'acide L-homocystéique (Coyle and Schwarcz 1976; Beal et al. 1986; Hantraye et al. 1990; Beal et al. 1993a). Les autres toxines sont les dérivés du tryptophane comme le quinolinate et l'acide 3-hydroxykinurénique, les inhibiteurs des transporteurs du glutamate comme l'acide L-homocystéique, l'acide iboténique et le quisqualate, les antagonistes GABAergiques comme la bicuculline (Crossman et al. 1988) et les inhibiteurs du complexe II respiratoire mitochondrial comme le malonate et l'acide 3-nitropropionique (Brouillet et al. 1999; Brouillet et al. 2005).

Avec la découverte du gène muté dans la maladie, de nombreux modèles génétiques ont été mis au point au fur et à mesure des progrès réalisés pour manipuler un des gènes les plus longs actuellement connus (67 kb). Ces modèles ont été réalisés pour la plupart chez la souris (Bates et al. 1997; Menalled and Chesselet 2002; Rubinsztein 2002; Menalled 2005), et plus récemment chez le porc (Uchida et al. 2001), le rat (von Horsten et al. 2003), la drosophile (Marsh et al. 2003), le nématode (Parker et al. 2001) et le poisson zèbre (Miller et al. 2005) (annexe 3). Chez la souris, trois types de modèles génétiques ont été réalisés. Les modèles Knock-Out (KO), ont une inactivation du gène de l'huntingtine (Duyao et al. 1995;

Principe actif SPECIALITE PHARMACEU TIQUE	Mode d'action	Dépression	Anxiété	Irritabilité	Obsessions et troubles compulsifs	Psychose et paranoïa	Revue
Sertraline ZOLOFT®	IRSS	25 mg 200 mg	12,5 mg 200 mg	Mêmes ou plus faibles doses que pour la dépression	Souvent plus forte dose que pour la dépression		(Muijse et al., 2002) (Hoehn-Saric et al., 2000)
Fluoxétine PROZAC®	IRSS	5-10 mg 20-40 mg	5-10 mg 20-40 mg	5-10 mg 20 mg	5-10 mg 20-80 mg		(Hurst and Lamb, 2000)
Paroxétine DEROXAT®	IRSS	5-10 mg 20-40 mg	5-10 mg 20-40 mg	Mêmes ou plus faibles doses que pour la dépression	Souvent plus forte dose que pour la dépression 50-60 mg		(Gunasekara et al., 1998)
Citalopram SEROPRAM®	IRSS	10 mg 20-40 mg	10 mg 20-40 mg	Mêmes ou plus faibles doses que pour la dépression	Souvent plus forte dose que pour la dépression 20-60 mg		(Pollock, 2001)
Bupropion * ZYBAN®	Inhibiteur de recapture des cathécholamines	100 mg 150-450 mg	100 mg 150-450 mg				(Zimmerman et al., 2005)
Risperidone RISPERDAL®	Neuroleptique antagoniste D2, 5-HT2A et α1			0,5 mg 0,5-3 mg		0,5 mg 0,5-3 mg	(Gardner et al., 2005)
Olanzapine † ZYPREXA®	Neuroleptique de la classe des benzodiazépines antagoniste 5HT2, D2, M1 et H1			2,5-5 mg 10-20 mg		2,5-5 mg 10-20 mg	(Gardner et al., 2005)
Haloperidol HALDOL®	Neuroleptique de la classe des butyrophénonones			0,5 mg 1-5 mg		0,5 mg 1-5 mg	(Gardner et al., 2005)

Principe actif SPECIALITE PHARMACEU TIQUE	Mode d'action	Dépression	Anxiété	Irritabilité	Obsessions et troubles compulsifs	Psychose et paranoïa	Revue
	antago- niste D1 et D2						
Buspirone BUSPAR®	Anxiolyti- que Agoniste antago- niste partiel D2 et 5HT1A		<i>5 mg trois fois par jour</i> 15-60 mg				(Ohlse n and Pilows ky, 2005)
Lorazepam TEMESTA®	Anxiolyti- que agoniste des récepteurs des benzodia- zépines		<i>0,5 mg</i> 0,5-2 mg				(Moroz , 2004)
Clonazepam RIVOTRIL®	Anxiolyti- que anti- épileptique agoniste des récepteurs des benzodia- zépines		<i>0,5 mg</i> 0,5-3 mg				(Moroz , 2004)
Clomipramine ANAFRANIL®	Antidé- presseur tricyclique inhibiteur de recapture de la NA et de la 5HT, antago- niste choliner- gique			<i>25 mg</i> Jusqu'à 250 mg	<i>25 mg</i> Jusqu'à 250 mg		(Fineb erg and Gale, 2005)

Figure 22 : Traitements des troubles psychiatriques dans la maladie de Huntington

Les doses recommandées au début de traitement sont en italique et les doses maximales sont en gras (Moskowitz and Marder, 2001). * Le bupropion est contre-indiqué en cas de forme juvénile avec épisode épileptique. † L'Olanzapine provoque un gain de poids, plutôt bénéfique dans le cas de la maladie de Huntington. Les revues indiquées concernent les indications, les doses et les propriétés pharmacologiques des principes actifs.

Nasir et al. 1995; Zeitlin et al. 1995; Dragatsis et al. 2000). Les modèles transgéniques ont une forme mutée le plus souvent de l'huntingtine humaine (Goldberg et al. 1996b; Mangiarini et al. 1996; Davies et al. 1997; Reddy et al. 1998; Hodgson et al. 1999; Schilling et al. 1999; Yamamoto et al. 2000; Laforet et al. 2001; Slow et al. 2003). Les modèles Knock-In (KI) ont une mutation au niveau du gène murin de l'huntingtine qui code normalement une protéine avec 7 polyglutamines (White et al. 1997; Levine et al. 1999; Shelbourne et al. 1999; Wheeler et al. 2000; Auerbach et al. 2001; Lin et al. 2001). Les nombreux modèles de souris transgéniques se différencient par la taille de l'expansion polyglutamines introduite, par la taille de la protéine (forme tronquée ou entière), par le promoteur utilisé (spécifiquement neuronal), par le niveau d'expression du transgène par rapport à la forme endogène, par la présence ou non de séquence de régulation temporelle et par la présence ou non d'une étiquette ou d'un gène rapporteur. L'intégration du gène muté chez les animaux a évolué avec l'utilisation de chromosomes de levure puis celle de virus, permettant l'expression de la forme entière de la protéine de façon durable mais localement après administration striatale chez des espèces où la transgénèse classique est difficile, comme le rat.

Il faut préciser que chaque modèle, de part la construction génique introduite et son mode d'introduction en plus de son fond génétique (espèce hôte/souche), exprime un phénotype comportemental et une neuropathologie plus ou moins éloignés de la maladie humaine. Il est nécessaire d'utiliser différents types de modèles pour extrapoler chez l'homme une hypothèse physiopathologique ou une stratégie thérapeutique

A côté de ces modèles animaux, beaucoup de systèmes simplifiés sont utilisés pour étudier plus finement les anomalies de la signalisation cellulaire potentiellement mises en jeu dans la physiopathologie de la maladie. Parmi ceux-ci, nous trouvons des modèles cellulaires phénotypiques et génétiques. Les modèles phénotypiques font appel aux mêmes toxines que celles utilisées *in vivo*, et permettent d'obtenir plus facilement une mort cellulaire qu'avec l'introduction du gène de l'huntingtine mutée. Les modèles génétiques font appel à différents types de constructions géniques, introduites par transfection ou infection virale dans des cellules immortalisées ou des cultures primaires. La grosse difficulté rencontrée avec les modèles génétiques est le faible pourcentage de cellules portant la mutation, ce qui nécessite des moyens techniques d'observation très fins, cellule par cellule pour être certain que le phénomène observé est le fait de la mutation.

L'intermédiaire entre les modèles cellulaires et les modèles animaux est l'utilisation de tranches de cerveau particulièrement utilisées pour les études *ex vivo* de électrophysiologie. Dans ce cas, la transmission synaptique est étudiée après application de neurotoxines sur des tranches striatales, cortico-striatales ou hippocampales de cerveaux d'animaux transgéniques ou non. Les objectifs des études réalisées avec ces modèles sont de deux types : la compréhension de l'étiologie / de la physiopathologie de la maladie et le test de stratégies thérapeutiques. Pour cela une homogénéité du modèle dans l'apparition de la physiopathologie est souhaitable et elle fait défaut dans la plupart des modèles génétiques classiques. Plus récemment, l'utilisation de virus pour introduire le gène muté de l'huntingtine muté a permis une plus grande homogénéité de l'expression phénotypique et l'existence de modèle assez rapide chez le rat (Senut et al. 2000; de Almeida et al. 2002; Regulier et al. 2003).

2.8. Physiopathologie de la maladie de Huntington : hypothèses générales

La mutation de l'huntingtine est à l'origine de la perte de différentes fonctions cellulaires. Le rôle de l'huntingtine normale été partiellement élucidé notamment dans les études utilisant les modèles d'inactivation du gène. Des études ont mis en évidence le rôle de l'huntingtine dans le développement (Reiner et al. 2003), la transcription (Sugars and Rubinsztein 2003), la signalisation cellulaire, le transport cellulaire et la transmission synaptique (Smith et al. 2005a).

2.8.1. Développement et rôle antiapoptotique

L'huntingtine intervient à trois niveaux du développement : l'ontogénèse, la neurogenèse et l'hématopoïèse. Son rôle dans ces processus est probablement relié à sa fonction antiapoptotique.

Le rôle de l'huntingtine dans l'ontogénèse a été mis en évidence par la mort des embryons homozygotes au stade précédant l'émergence du système nerveux central, dans les modèles d'inactivation du gène (Duyao et al. 1995; Nasir et al. 1995; Zeitlin et al. 1995).

La léthalité embryonnaire est reversée par croisement de souris KO pour le gène de l'huntingtine avec les souris transgéniques YAC 46 ou 72 (Hodgson et al. 1999). Ceci implique d'une part, que l'expansion polyglutamines n'altère pas le développement embryonnaire et d'autre part, que la maladie de Huntington n'est pas une maladie développementale. Par contre, l'expression de l'huntingtine mutée sous le contrôle du promoteur de l'huntingtine est nécessaire pour que l'ontogénèse soit correcte, car des anomalies de l'ontogénèse ont été observées après le croisement des souris transgéniques exprimant l'huntingtine mutée sous le contrôle du promoteur CMV avec les souris KO (Hodgson et al. 1999).

Cependant la maladie de Huntington n'est pas la conséquence d'une perte d'expression complète du gène. Les modèles murins hétérozygotes pour l'inactivation du gène, mimant la perte de fonction due à l'allèle muté, ne montrent pas de perte neuronale striatale. Par contre une neurodégénérescence corticale et striatale et une stérilité ont été observées dans un modèle d'inactivation conditionnelle de l'huntingtine (Dragatsis et al. 2000). Il est donc possible que la perte de fonction de l'huntingtine soit responsable de la dégénérescence neuronale.

L'huntingtine a aussi un rôle dans la neurogenèse, mis en évidence par la présence de malformation du cerveau et la léthalité périnatale de souris KI homozygotes Hdh50Q, 92Q et 111Q à faible expression de l'huntingtine (White et al. 1997). Les anomalies de neurogenèse sont absentes chez les souris avec le gène humain de l'huntingtine possédant une expansion de 50 CAG, ce qui indiquerait que ce n'est pas la mutation qui est responsable des anomalies de neurogenèse mais plutôt l'absence d'expression de l'huntingtine.

Le rôle de l'huntingtine dans l'hématopoïèse a été mis en évidence par la réduction du nombre de progéniteurs hématopoïétiques et de leur expansion dans les cellules souches embryonnaires homozygotes et hétérozygotes pour l'inactivation du gène (Metzler et al. 2000).

La léthalité des embryons entre 8,5 et 10,5 jours de gestation chez les souris de Zeitlin invalidées pour le gène de l'huntingtine a été attribuée à l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques au niveau de la couche ectodermique, conséquence de l'absence de l'huntingtine

dans sa fonction anti-apoptotique (Zeitlin et al. 1995). Plusieurs éléments sont en faveur du rôle anti-apoptotique direct ou indirect de l'huntingtine.

Le premier élément est le rôle protecteur de l'huntingtine normale vis-à-vis de différents stimulus de mort *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, la surexpression de l'huntingtine normale protège de la mort les cellules neuronales de type striatal ST14A ou hippocampal HIB5 immortalisées exprimant de façon conditionnelle l'huntingtine mutée après induction de la mort par le 3-NP ou par retrait du sérum et stress thermique à 39°C (Rigamonti et al. 2000; Rigamonti et al. 2001). La neuroprotection des cellules par l'huntingtine normale est associée à une inhibition de l'augmentation de l'activité de la caspase 9, indépendante de la libération du cytochrome c à partir de l'espace intermembranaire. L'huntingtine a donc un rôle anti-apoptotique direct ou indirect par inhibition de la caspase 9 ou de la formation du complexe de l'apoptosome (Rigamonti et al. 2001). De même, l'expression de l'huntingtine normale chez les souris transgéniques YAC 46 et 72 protège de la dégénérescence les cellules des tubules séminifères et de la stérilité (Leavitt et al. 2001).

L'autre élément en faveur du rôle anti-apoptotique de l'huntingtine est l'interaction avec HIP-1, élément de l'hétérodimère HIP-1/Hippi (Hip-1 protein interactor) participant à l'activation de la caspase 8 et de l'apoptose. L'interaction de l'huntingtine avec HIP-1 est réduite par la présence d'une expansion de polyglutamine et permet ainsi l'activation de la mort cellulaire par une voie dépendante de la caspase-8 (Gervais et al. 2002).

2.8.2. La transcription

Plusieurs éléments corroborent le rôle de l'huntingtine dans la transcription cellulaire. Elle possède des motifs protéiques potentiellement associés à la transcription, elle a une localisation nucléaire et elle interagit avec des régulateurs de la transcription.

L'huntingtine possède les motifs protéiques HEAT (Huntingtin-Elongation-A subunit-TOR) et polyglutamine, communs aux cofacteurs de transcription et aux protéines associées aux chromosomes (Neuwalder and Hirano 2000).

L'huntingtine a une localisation nucléaire reliée à la présence de peptide signal de localisation nucléaire (Bessert et al. 1995) et la mutation de l'huntingtine est associée à la relocalisation nucléaire des fragments N-terminaux et des agrégats aussi bien dans les modèles *in vitro*, que *in vivo* (Li et al. 1999) et chez le patient (DiFiglia et al. 1997).

2.8.2.1. Protéines de régulation de la transcription en interaction avec l'huntingtine

L'huntingtine interagit avec différents types de régulateurs de transcription :

- des facteurs de transcription : HYP-C (Faber et al. 1998), NFκB (Takano and Gusella 2002), TBP (TATA-binding protein) (Huang et al. 1998), p53 (Steffan et al. 2000)
- des activateurs de transcription : CA-150 (Holbert et al. 2001), CBP (cAMP response element-binding protein-binding protein) (Steffan et al. 2000; Nucifora et al. 2001), SP1 (Dunah et al. 2002; Li et al. 2002), TAFII 130 (RNA polymerase II TATA-binding protein (TBP)-associated factor de 130kDa) (Dunah et al. 2002) ;

- des répresseurs de transcription : CtBP (C-terminal binding protein) (Kegel et al. 2002), N-CoR (nuclear receptor corepressor) (Boutell et al. 1999), REST/NRSF (repressor element-1 transcription factor/neuron restrictive silencer factor) (Zuccato et al. 2003) ;

- des facteurs d'épissage de l'ARN : HYP-A, B (Faber et al. 1998).

La mutation de l'huntingtine est associée à des modifications de l'interaction avec les facteurs de transcription (Martindale et al. 1998; Cha 2000).

2.8.2.2. Huntingtine mutée et modification des histones

La mutation de l'huntingtine a pour conséquence différents types de modifications au niveau des histones menant à une dérégulation de la transcription et modifie l'interaction avec les régulateurs de transcription.

La mutation de l'huntingtine entraîne une augmentation de l'interaction avec CBP, HYP-A, B et C, NCOR et SP-1 et une diminution de l'interaction avec CtBP et REST-NRSE (Li and Li 2004). Ces modifications d'interaction et la réduction de proportion d'huntingtine normale entraînent soit l'augmentation soit la diminution de la transcription de différentes familles de gènes (Cha 2000; Harjes and Wanker 2003; Sugars and Rubinsztein 2003; Li and Li 2004). Le mécanisme de diminution et d'augmentation de la transcription est souvent relié à des modifications des histones par acétylation, phosphorylation et ubiquitination ou à la SUMOylation des facteurs de transcription.

Le niveau d'acétylation des histones est diminué en cas de baisse de transcription et augmentée dans le cas contraire. Deux systèmes enzymatiques interviennent dans le niveau d'acétylation des histones : les histone-acétyl-transférases et les histone-déacétylases (Wade et al. 1997). Une réduction de l'activité des histone-acétyl-transférases a été observée dans des modèles cellulaires exprimant l'huntingtine mutée (Steffan et al. 2000; Nucifora et al. 2001; Wyttenbach et al. 2001; Sugars et al. 2004).

2.8.2.3. Huntingtine mutée et modification des facteurs de transcription

En dehors des modifications des histones, la transcription peut être modifiée par la SUMOylation de facteurs de transcription, ce qui entraîne une augmentation de la répression de la transcription (Verger et al. 2003). C'est en effet ce qui est observé dans un modèle de culture neuronale exprimant la forme SUMOylée de l'huntingtine mutée (Steffan et al. 2004). De plus, le croisement d'une souche de drosophile exprimant l'huntingtine mutée avec une souche de drosophile à activité de SUMOylation réduite à 50%, réduit significativement la neurodégénérescence des photorécepteurs (Steffan et al. 2004).

2.8.2.4. Augmentation ou diminution de l'interaction entre l'huntingtine et les facteurs de transcription

La mutation de l'huntingtine est associée à l'augmentation de l'interaction avec CBP qui ne peut plus jouer son rôle de facteur de transcription et d'histone-acétyl-transférase (Steffan et al. 2000; Nucifora et al. 2001; Wyttenbach et al. 2001; Sugars et al. 2004). L'inhibition de la fonction de CBP pourrait être associée à la baisse de transcription des gènes sous le contrôle de CREB (Kwok et al. 1994), comme l'oncogène JUN-B chez les souris transgéniques R6/2 (Luthi-Carter et al. 2000) et le BDNF chez les patients Huntington. Or la baisse de BDNF cortical est une des hypothèses pouvant expliquer la mort striatale neuronale par manque de facteur trophique (Zuccato et al. 2001).

La mutation de l'huntingtine est associée à l'augmentation de l'interaction avec les protéines à motif protéique en tandem de tryptophane (WW), HYP-A, B et C entraînerait des anomalies au niveau de l'épissage des pré-ARNm et de la transcription (Faber et al. 1998).

D'après des études d'immunoprécipitation et de double hybride, l'expansion polyglutamine augmente l'interaction entre l'huntingtine et la partie C-terminale de Sp1 (Dunah et al. 2002; Li et al. 2002). Chez les souris R6/2, Sp1 n'est pas présent dans les agrégats mais lie la forme soluble de l'huntingtine mutée et cette liaison entraîne, *in vitro*, un défaut de transcription de gènes par non fixation de Sp1 sur le promoteur des récepteurs du NGF (Li et al. 2002). De plus, la surexpression de Sp1 augmente la viabilité des cellules HEK293 exprimant l'huntingtine mutée au niveau nucléaire et il corrige partiellement l'extension neuritique des cellules PC-12 différenciées (Li et al. 2002). Chez le patient, dès le stade présymptomatique, l'interaction entre Sp1 et TAFII est réduite, ainsi que la liaison de Sp1 à l'ADN sur au niveau du noyau caudé (Dunah et al. 2002). La liaison de Sp1 à l'ADN est inhibée par l'huntingtine mutée et la transcription des récepteurs dopaminergiques D2, régulée par Sp1 est réduite en culture primaire striatale exprimant l'huntingtine mutée (Dunah et al. 2002). En outre, la coexpression de Sp1 et de TAFII dans les neurones primaires exprimant la forme entière de l'huntingtine mutée, reverse l'inhibition de la transcription des récepteurs D2 et la toxicité cellulaire.

Par immunoprécipitation, l'expansion polyglutamine diminue l'interaction entre l'huntingtine et le corepresseur de transcription C-tBP (Kegel et al. 2002). Il en résulte un niveau de transcription constitutivement diminué en présence du fragment N-terminal de l'huntingtine porteur de l'expansion polyglutamine pathologique ou en présence de la forme entière de l'huntingtine normale dans des cultures C33A (Kegel et al. 2002).

Par immunoprécipitation, l'expansion polyglutamine diminue l'interaction entre l'huntingtine et le REST/NRSF, répresseur de transcription ayant pour cible NRSE (neuron restrictive silencer element), contrôlant entre autre la transcription de gènes de la famille des neurotrophines comme le BDNF (Zuccato et al. 2003). Il en résulte également une diminution de la transcription des gènes régulés par NRSE, dont la synapsine 1, la dynamine 1 et l'isoforme beta2 du récepteur nicotinique en culture de lignée striatale ST14-A exprimant l'huntingtine mutée comme dans le cortex des souris YAC 72 par rapport aux YAC18 (Zuccato et al. 2003). Chez le patient, la transcription de la synapsine 1, l'isoforme beta2 du récepteur nicotinique ainsi que le BDNF est diminuée dans le cortex (Zuccato et al. 2003). En condition normale, la forme entière de l'huntingtine interagit avec REST dans le cytosol et empêche ainsi sa translocation nucléaire. En condition pathologique, l'interaction est plus faible et REST transloque dans le noyau où il réduit la transcription de nombreux gènes dont le BDNF.

2.8.2.5. Familles de gènes à la transcription modifiée

Les modifications des histones, la SUMOylation et les changements d'interaction entre l'huntingtine et les régulateurs de transcription ont pour conséquence la réduction ou l'augmentation de la transcription de nombreux gènes appartenant à de nombreuses familles (Cha et al. 1998; Cha et al. 1999; Luthi-Carter et al. 2000; Chan et al. 2002; Luthi-Carter et al. 2002; Sipione et al. 2002; Borovecki et al. 2005). Les gènes touchés sont les récepteurs, les neurotransmetteurs, les protéines de la signalisation cellulaire, les facteurs trophiques, les protéines du transport cellulaire, les protéines de structure synaptique et les facteurs d'inflammation.

2.8.3. Le transport intracellulaire

Trois éléments sont en faveur du rôle de l'huntingtine dans le transport intracellulaire. Elle possède des éléments structuraux en rapport avec cette fonction, elle colocalise avec les microtubules et interagit avec des protéines impliquées dans le transport cellulaire.

Elle possède des motifs protéiques reconnus pour leur rôle dans le transport cellulaire comme ENTH (epsin NH2-terminal homology) (Kay et al. 1999; Itoh et al. 2001) et HEAT.

L'huntingtine colocalise avec les microtubules (Gutekunst et al. 1995; Tukamoto et al. 1997). Les microtubules forment la structure de base du transport intracellulaire, sorte de rails sur lesquels les vésicules et les organelles transitent grâce à des moteurs moléculaires. Les microtubules sont formés de molécules d' α -tubuline et de β -tubuline dont l'assemblage et le désassemblage se fait plus rapidement du côté « plus » du microtubule, à l'extrémité de l'axone par rapport au côté « moins » vers le centre d'organisation des microtubules appelé centrosome. Les moteurs moléculaires sont des complexes multi-moléculaires de deux types, le complexe de la kinésine migrant vers la périphérie cellulaire (transport antérograde) et le complexe de la dynéine migrant vers le centrosome (transport rétrograde) (Figure 23) (Sheetz et al. 1998). Ils sont formés de deux chaînes lourdes globulaires ayant une activité ATPase, liant le microtubule et permettant le déplacement le long du microtubule par l'hydrolyse de l'ATP. L'autre extrémité formée de plusieurs chaînes légères, est en interaction directe ou indirecte avec une protéine enchâssée dans la membrane d'une vésicule ou d'une organelle.

L'huntingtine interagit avec la β -tubuline, particulièrement abondante dans les neurones, indépendamment de la taille de l'expansion CAG (Hoffner et al. 2002). Cette interaction, localisée préférentiellement vers les centrosomes autour du noyau, pourrait influencer la localisation préférentiellement périnucléaire et nucléaire des agrégats (DiFiglia et al. 1997).

L'huntingtine interagit avec des protéines impliquées dans le transport cellulaire, comme HAP-1 (Huntingtin-associated protein-1), PACSIN-1 (Protein Kinase C and casein kinase Substrate In Neurons 1), HIP-14 (huntingtin-interacting protein 14) et HIP-1 (huntingtin-interacting protein 1) (Crosby 2003).

L'huntingtine est en interaction avec HAP-1, renforcée par la présence de la mutation (Li et al. 1995). HAP-1 est une protéine associée au complexe de la dynactine par l'intermédiaire de la sous-unité p150^{Glued}, elle-même en interaction avec les microtubules et le complexe dynéine, dont la fonction est le transport rétrograde de vésicules et d'organelles (Engelender et al. 1997). Le complexe dynactine peut aussi interagir avec la kinésine II, dont la fonction est le transport antérograde de vésicules et d'organelles (Dell 2003). HAP-1 est aussi associée à PCM-1 (pericentriolar autoantigen protein 1), protéine impliquée dans l'assemblage des microtubules au niveau du centrosome (Engelender et al. 1997). Récemment, la mutation de l'huntingtine a été associée à une dysfonction du transport vésiculaire de BDNF par modification des interactions entre les microtubules et le complexe HAP-1/dynéine/dynactine (Figure 24) (Gauthier et al. 2004), ceci pourrait expliquer le manque de BDNF de source corticale au niveau du striatum des patients Huntington (Ferrer et al. 2000). HAP-1 intervient aussi dans la régulation de l'expression synaptique des récepteurs GABA_A (Kittler et al. 2004), dont l'expression est augmentée dans le globus pallidus externe puis interne selon les stades d'évolution de la maladie (Glass et al. 2000). Il a été récemment démontré que HAP-1 interagit avec la chaîne légère de la kinésine et qu'elle a un rôle dans le transport antérograde de vésicules, contenant le précurseur de la protéine amyloïde (APP), ce qui permet la croissance des neurites dans les cellules PC-12 (McGuire et al. 2006).

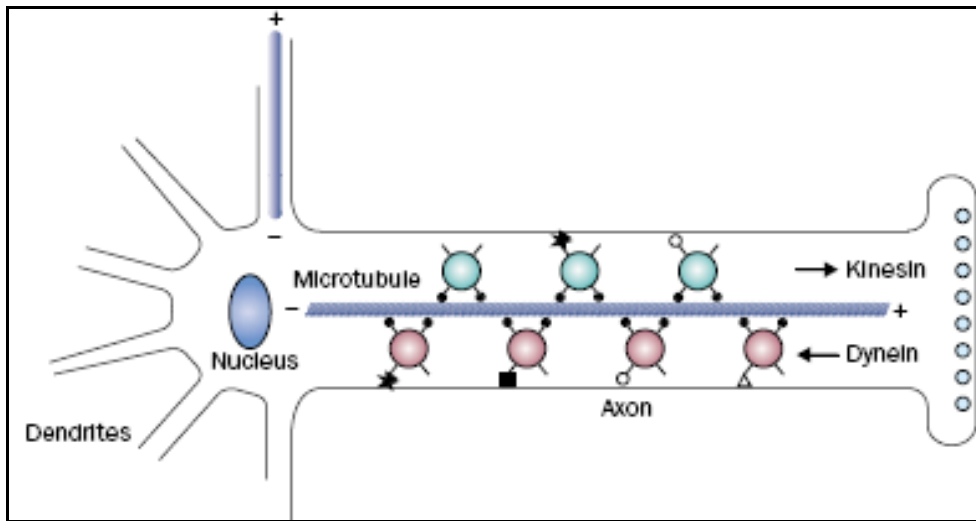


Figure 23 : Transport intracellulaire et protéines impliquées

Schéma des différents acteurs du transport intracellulaire rétrograde avec la dynéine pour le transport vers le centrosome et antérograde avec la kinésine pour le transport vers la synapse (Crosby, 2003)

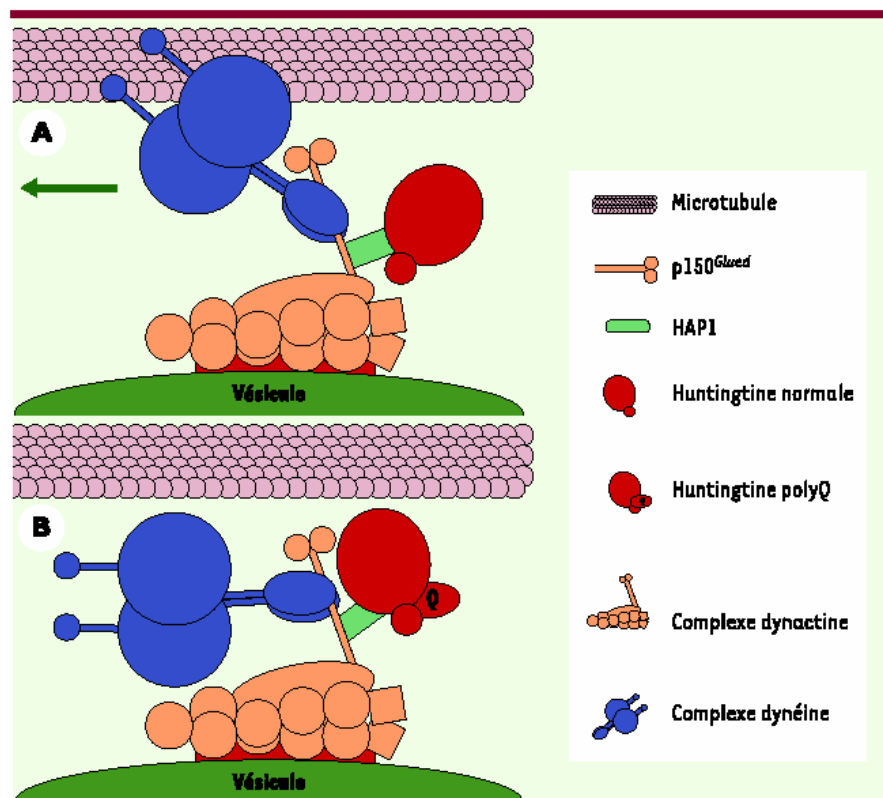


Figure 24 : Dysfonction du transport du BDNF en présence de l'huntingtine mutée

En A, transport normal du BDNF via le complexe dynactine/HAP-1/huntingtine/dynéine et en B, dysfonction du complexe dynactine/dynéine induite par la présence de polyQ modifiant l'affinité d'HAP-1/huntingtine avec le reste du complexe avec pour conséquence le transport réduit du BDNF (schéma réalisé par Fabrice P. Cordelières, Institut Curie, Orsay, France).

De même PACSIN-1 interagit plus fortement avec l'huntingtine quand l'expansion CAG est augmentée (Modregger et al. 2002). PACSIN-1 est une protéine normalement localisée au niveau des dendrites et des boutons synaptiques avec un rôle dans l'endocytose. Elle est relocalisée au niveau périnucléaire avec une disparition des varicosités synaptiques dès le stade présymptomatique de la maladie (Modregger et al. 2002).

Au contraire, l'interaction entre l'huntingtine et HIP-14 est inversement proportionnelle à la longueur de l'expansion CAG (Singaraja et al. 2002). HIP-14 est localisée vers l'appareil de Golgi et les endosomes et intervient dans la palmitoylation de diverses protéines synaptiques comme l'huntingtine, SNAP 25, PSD-95 (postsynaptic density protein 95 kDa), la synaptotagmine-1 et de l'enzyme de synthèse du GABA, GAD-65 (glutamic acid decarboxylase 2) (Huang et al. 2004). Ainsi la mutation de l'huntingtine pourrait affecter via HIP-14 la transmission synaptique et expliquer la réduction de la concentration de GABA dans les structure de projection du striatum des patients, comme la substance noire et le pallidum (Kanazawa et al. 1985).

HIP-1 interagit plus faiblement avec l'huntingtine mutée (Kalchman et al. 1997). HIP-1 intervient dans les processus d'endocytose dépendant de la clathrine en régulant la taille des vésicules par interaction avec la clathrine et les adaptine A et C (Waelter et al. 2001). Ainsi la modification de l'interaction entre HIP-1 et l'huntingtine entraînerait une dérégulation du recyclage des récepteurs comme les récepteurs gluR1 de l'AMPA (alpha-amino-5-méthyl-3-hydroxy-4-isoxazolepropionoate) (Metzler et al. 2003).

2.8.3.1. Mutation de l'huntingtine et transport cellulaire

Deux types de transport cellulaire semblent être perturbés par la mutation de l'huntingtine dans les modèles de la maladie, le transport axonal rapide rétrograde et antérograde des vésicules chez le calamar géant (Szebenyi et al. 2003) et la drosophile (Gunawardena et al. 2003; Lee et al. 2004) et le transport d'organelles comme les mitochondries chez les souris transgéniques (Trushina et al. 2004). Les anomalies de transport axonal ont été mises en évidence dans les cultures primaires striatales (Li et al. 2000a) et chez la drosophile (Lee et al. 2004), exprimant l'huntingtine mutée. Ils semblent être la conséquence de la formation d'agrégats cytosoliques contenant l'huntingtine mutée et différentes protéines à polyglutamines (Lee et al. 2004). D'autre part, Sapp et collaborateurs ont émis l'hypothèse du lien entre la présence d'agrégats cytosoliques neuronaux chez le patient HD et la dégénérescence corticostriatale (Sapp et al. 1997) en accord avec la réduction du BDNF en provenance du cortex, observée au niveau du striatum des patients (Ferrer et al. 2000).

2.8.4. La transmission synaptique

L'huntingtine ne semble pas jouer un rôle sur l'apparition de synapses fonctionnelles mais joue plutôt un rôle au niveau de la transmission synaptique de neurones matures. En effet les cultures de cellules souches embryonnaires invalidées pour le gène de l'huntingtine sont capables de se différencier en neurones matures postmitotiques exprimant des canaux ioniques activés par le voltage ou le GABA (Metzler et al. 1999). En parallèle, des courants postsynaptiques spontanés inhibiteurs et excitateurs, signature de synapses fonctionnelles sont observés dans 24% des neurones de cellules différenciées homozygotes ou sauvages (Metzler et al. 1999). Les cellules, avec ou sans l'huntingtine, expriment des récepteurs AMPA et

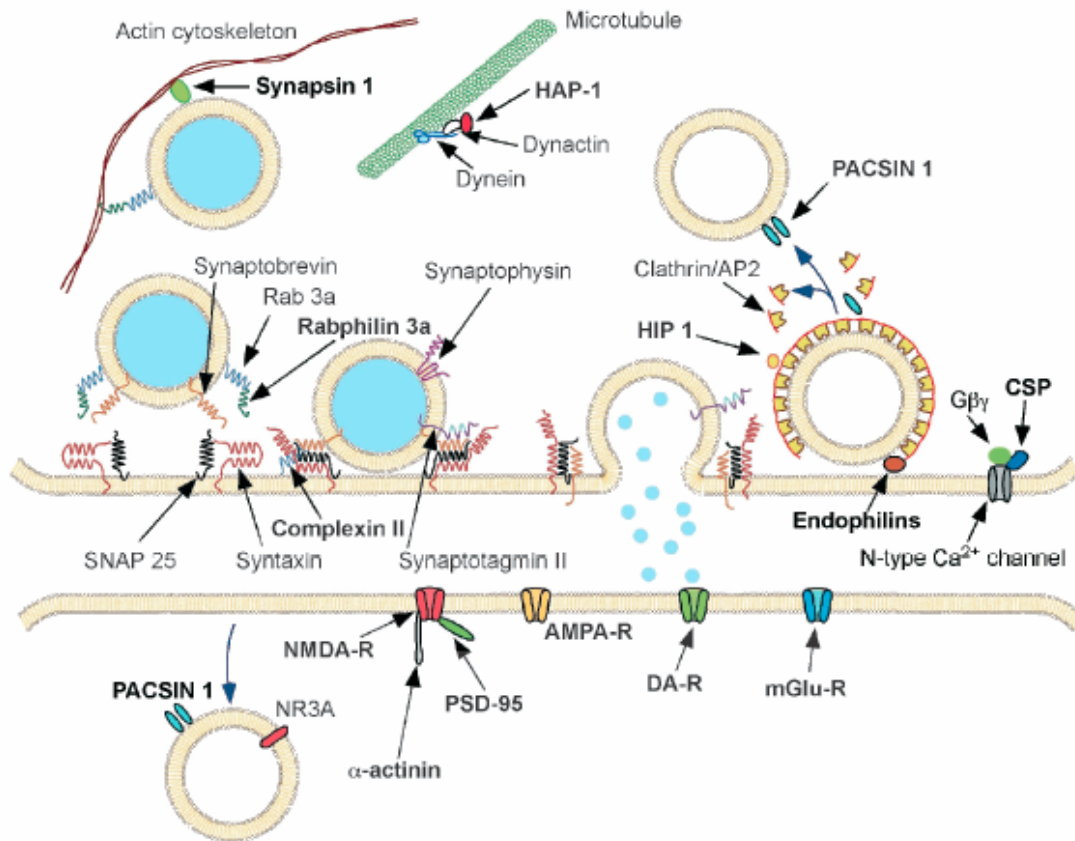


Figure 25 : Anomalies synaptiques dans la maladie de Huntington

Les protéines en gras sur le schéma seraient impliquées dans les anomalies synaptiques observées dans la maladie de Huntington. Schéma issu de (Smith et al., 2005a).

GABA fonctionnels aux propriétés identiques après 13, 16 ou 19 jours de culture alors que les récepteurs du NMDA sont fonctionnellement identiques après 11 et 14 jours de culture mais différent à 17 jours où la densité de courant est augmentée par l'absence de l'huntingtine (Metzler et al. 1999). Ceci est compatible avec le rôle de l'huntingtine sur la régulation de la transmission synaptique dans les synapses matures, notamment glutamatergique et l'apparition de phénomène excitotoxique lors de la mutation de la protéine.

Au niveau de la synapse mature, l'huntingtine régule de nombreux processus comme l'assemblage présynaptique, l'exocytose et l'endocytose, tous trois perturbés à différents niveaux par la présence de mutation de l'huntingtine (Figure 25) (Smith et al. 2005a).

L'assemblage présynaptique est perturbé soit par les anomalies de transcription, soit par les anomalies de transport cellulaire citées précédemment.

On observe aussi une diminution de l'expression des récepteurs CB1 sur les neurones GABAergiques de taille moyenne des souris R6/2 dont l'origine est mal définie (Glass 2001).

L'exocytose est le processus synaptique permettant la libération de neurotransmetteur par la fusion de la vésicule synaptique avec la membrane plasmique sous le contrôle de l'ATP et de la concentration de calcium synaptique (Figure 26) (Lin and Scheller 2000). Elle pourrait être perturbée à différents niveaux par l'huntingtine mutée. La formation de la réserve de vésicules synaptiques pourrait être perturbée par la baisse de l'interaction des vésicules synaptiques avec les filaments d'actine. En effet cette interaction est sous le contrôle de la synapsine I, phosphoprotéine dont la fonction est régulée par la phosphorylation/déphosphorylation par les kinases et les phosphatases (Greengard et al. 1993). La synapsine I sous forme déphosphorylée, en condition de repos, relie les vésicules synaptiques avec les filaments d'actine et les maintient ainsi dans le pool de réserve. Lors de l'activation neuronale, un message calcique entraîne la phosphorylation de la synapsine I qui permet la mobilisation des vésicules vers le pool d'exocytose. Or la synapsine I est anormalement phosphorylée au niveau des sites 3-5 dans le striatum et le cortex des souris transgéniques R6/2, à l'origine d'une réduction des vésicules synaptiques dans le pool de réserve. Cette augmentation de phosphorylation est vraisemblablement la conséquence d'un défaut de déphosphorylation par la calcineurine dont l'expression de la sous unité B est diminuée (Lievens et al. 2002). L'exocytose pourrait être augmentée par la baisse de transcription de la rabphiline 3A. La rabphiline 3A est une protéine inhibant l'exocytose par interaction avec la forme liée au GTP (Guanosine triphosphate) de Rab 3A (Ras-associated protein rab3a), et inhibition de son activité GTPase nécessaire à la fusion de la vésicule synaptique avec la membrane présynaptique (Kishida et al. 1993; Burns et al. 1998). Or une baisse de transcription de la rabphiline 3A progressive est observée au niveau du cortex des souris transgéniques R6/1 en parallèle de l'apparition des symptômes moteurs à partir de 15 semaines (Smith et al. 2005b). Le mécanisme de baisse de transcription de la rabphiline 3A par l'huntingtine n'est pas encore élucidé. Mais il est possible que cela entraîne une augmentation de la libération de glutamate cortical au niveau du striatum et l'excitotoxicité au niveau des cellules GABAergiques. L'exocytose pourrait aussi être diminuée par la baisse d'expression de la complexine II. La complexine II est un activateur de la libération de neurotransmetteur impliqué dans la fusion de la vésicule synaptique avec la membrane présynaptique par interaction avec le complexe protéique SNARE, récepteur de SNAP permettant la liaison de la synaptotagmine avec la syntaxine puis la fusion des membranes à l'aide du calcium (Reim et al. 2001). L'expression de la complexine II est diminuée chez les patients Huntington dès le stade I (DiProspero et al. 2004) et chez la souris transgénique (Morton and Edwardson 2001). La réduction de l'expression de la complexine II est directement reliée à la présence de l'huntingtine mutée et entraîne une diminution de la libération de neurotransmetteur dans un modèle cellulaire (Edwardson et al. 2003). On

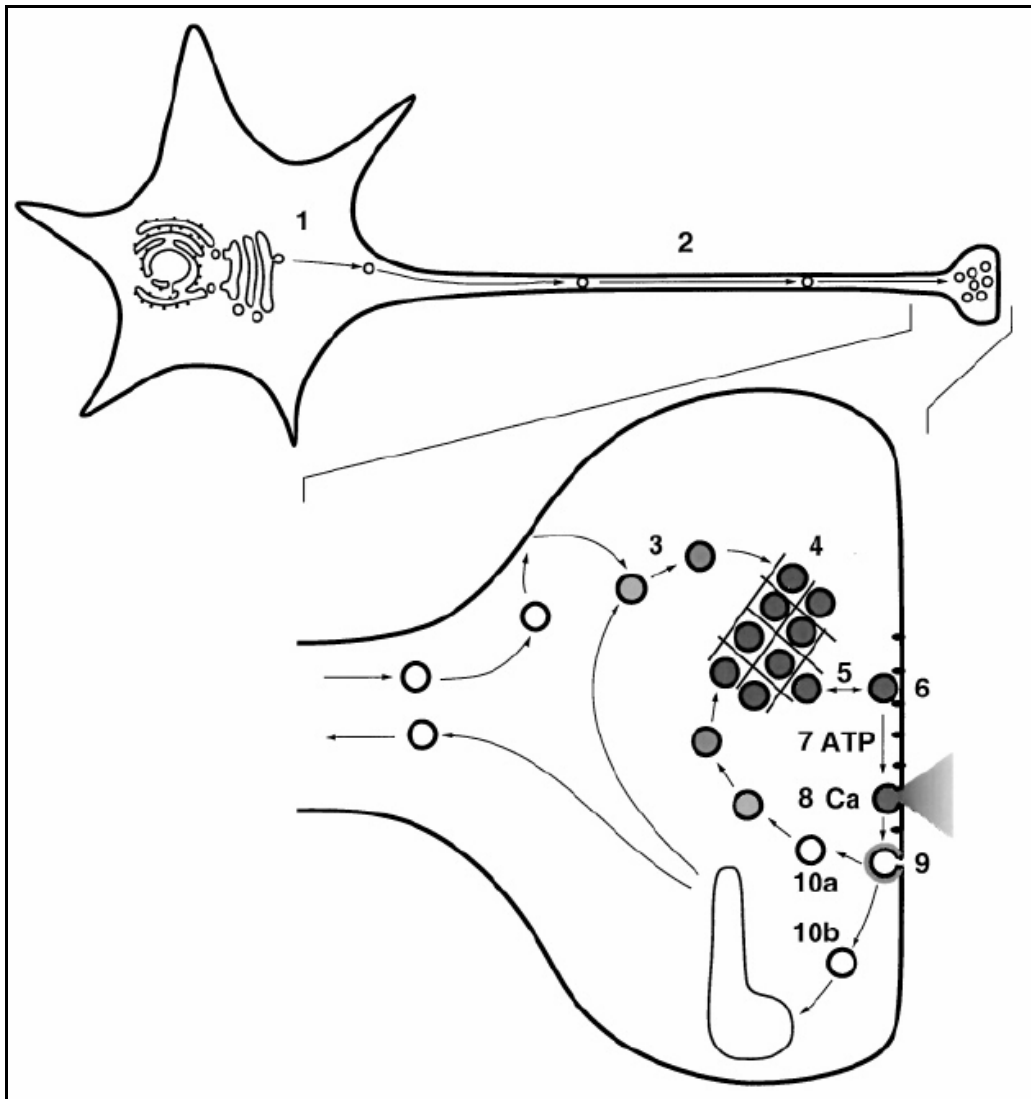


Figure 26 : Exocytose d'une vésicule synaptique et recyclage

Schéma représentant l'exocytose et le recyclage des vésicules synaptiques issu de (Lin and Scheller, 2000). Le cycle de vie d'une vésicule synaptique commence par l'assemblage des protéines associées à cette vésicule au niveau du corps cellulaire (étape 1), suivi du transport de la vésicule à la terminaison synaptique (étape 2). La vésicule subit une maturation par fusion membranaire et endocytose avant l'import du neurotransmetteur à travers la membrane (étape 3). La vésicule est stockée vers le cytosquelette dans une zone de réserve (étape 4) avant d'être mobilisée (étape 5) et de s'accoler à la membrane grâce à des complexes protéiques liant les deux membranes (étape 6). La fusion de la vésicule synaptique nécessite de l'ATP (étape 7) et du calcium (étape 8). Pendant la libération du neurotransmetteur, la vésicule est recyclée dans un processus d'endocytose (étape 9) dépendant en partie de la clathrine. Les vésicules perdent leur manteau de clathrine et importent directement le neurotransmetteur (étape 10a) ou suivent le circuit des endosomes avant un nouveau cycle d'exocytose (étape 10b).

pourrait donc avoir une diminution de la libération de neurotransmetteurs consécutivement à la diminution de l'expression de la complexine II induite par l'huntingtine mutée chez le patient.

Au niveau du recyclage des vésicules synaptiques et de l'endocytose postsynaptique, nous avons vu précédemment que les anomalies peuvent venir d'une modification des interactions de l'huntingtine mutée avec la PACSIN 1, HIP-14 et/ou HIP-1. Les endophilines comme l'endophiline B1 interviennent dans l'endocytose et la mutation de l'huntingtine entraîne leur séquestration notamment au niveau des agrégats (Sittler et al. 1998; Modregger et al. 2003). Cette séquestration de protéines associées aux vésicules a été décrite sur un modèle de culture cellulaire et entraîne un défaut d'internalisation de la transferrine (Qin et al. 2004).

Les perturbations au niveau de l'assemblage présynaptique, de l'exocytose et de l'endocytose sont à l'origine de l'augmentation ou de la diminution de transmission synaptique. Les anomalies de transmission synaptiques touchent différents systèmes : glutamatergique, GABAergique, dopaminergique, adénoenergique et cannabinoergique.

2.8.5. Anomalies de la transmission glutamatergique et excitotoxicité

Les anomalies de transmission glutamatergique ont été particulièrement étudiées pour corroborer l'hypothèse excitotoxique dans la maladie de Huntington. Les différents éléments en faveur de la présence d'une augmentation de la transmission glutamatergique excitatrice, autrement dit l'excitotoxicité, dans la maladie de Huntington, seront traités en détail dans le chapitre 4.

Les premiers modèles animaux de la maladie de Huntington ont été obtenus grâce à l'injection d'analogues du glutamate, le kaïnate et le quinolinate (Coyle and Schwarcz 1976; Beal et al. 1986). Les modèles suivants font appel à des neurotoxines mitochondriales, le 3-NP et le malonate, impliquant les récepteurs NMDA dans le mécanisme de neurodégénérescence (Beal et al. 1993b; Greene et al. 1993).

Par la suite, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été étudiés pour vérifier l'hypothèse de l'excitotoxicité via les récepteurs NMDA dans la maladie de Huntington. La mutation de l'huntingtine est associée à une hypersensibilité des neurones épineux de taille moyenne vis-à-vis de la mort induite par les agonistes glutamatergiques, observée sur différents modèles :

- Les cultures de neurones transfectés par l'huntingtine mutée (Chen et al. 1999a; Sun et al. 2001; Zeron et al. 2001; Song et al. 2003) ;
- Les cultures de neurones isolés à partir des souris transgéniques R6/2 (Cepeda et al. 2001; Starling et al. 2005) et N171Q82 (Cepeda et al. 2001; Zeron et al. 2002; Zeron et al. 2004) et des souris « knock in » HdhCAG94 (Levine et al. 1999) ;
- Les tranches striatales isolées à partir des souris transgéniques HD100 (Laforet et al. 2001), R6/2 (Cepeda et al. 2003) et N171Q82 (Li et al. 2004a).

Enfin, chez l'homme, l'hypothèse de l'excitotoxicité et ses mécanismes mis en jeu dans la maladie de Huntington (Beal 1992b, 1992c), ont été corroborés par différents éléments. En effet, ce sont les neurones épineux de taille moyenne porteurs des récepteurs NMDA qui dégénèrent préférentiellement dans la maladie (Young et al. 1988a; Albin et al. 1990). La transcription des isoformes NR1 et NR2B des récepteurs NMDA ainsi que celle du transporteur au glutamate GLT-1 est réduite dans le noyau caudé et le putamen des patients

alors que le nombre d'astrocytes exprimant GLT-1 est augmenté du fait de l'astrogliose et permettrait ainsi de compenser les anomalies glutamatergiques (Arzberger et al. 1997).

2.8.6. Anomalies des autres systèmes synaptiques : GABAergique, dopaminergique, adénosinergique et canabinergique

2.8.6.1. Transmission GABAergique

La transmission GABAergique correspondant aux connexions interneurones GABAergiques – neurones épineux de taille moyenne GABAergiques est augmentée dans les cultures striatales de tranches issues de souris R6/2 et R6/1 (Cepeda et al. 2004). Cette augmentation de transmission synaptique GABAergique est parallèle à l'augmentation de l'expression de la sous-unité 1 du récepteur GABA_A (Cepeda et al. 2004). D'autre part, une baisse d'expression des récepteurs CB1 présynaptiques inhibiteurs de la libération de GABA est probablement à l'origine l'augmentation de la transmission GABAergique dans le striatum des souris R6/2 (Centonze et al. 2005).

2.8.6.2. Transmission dopaminergique

La transmission dopaminergique est perturbée précocement dans la maladie de Huntington. En effet l'expression des récepteurs D2 est diminuée dans le noyau caudé, le putamen et le globus pallidus dès le stade 0 de la maladie et l'expression des récepteurs D1 est diminué aux stades 1,2 au niveau du noyau caudé, du putamen et de la substance noire (Glass et al. 2000). Cette diminution des récepteurs D1 et D2 striataux semble corrélée à l'évolution de la maladie (Ginovart et al. 1997). De plus, la baisse des récepteurs D2 striataux d'une part et la baisse des récepteurs D1 dans le cortex temporal d'autre part semblent corrélées à des anomalies de cognition chez l'homme (Backman et al. 1997; Lawrence et al. 1998). En parallèle, une diminution de la fixation du [¹¹C]- β-CIT au niveau du striatum des patients pourrait être reliée à une perte des transporteurs dopaminergiques ou autorécepteurs dopaminergiques signant la perte de terminaisons présynaptiques nigrostriatales (Ginovart et al. 1997). Dans les modèles transgéniques, la signalisation dopaminergique est perturbée avant l'apparition des symptômes et comprend la baisse de transcription des récepteurs D1 dès la 4^{ème} semaine chez les souris R6/2 (Cha et al. 1998) ainsi que la réduction de l'expression et de la phosphorylation de DARPP32 (dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein 32 kDa) dès la 6^{ème} semaine suite à la stimulation des récepteurs D1 sur des tranches striatales de souris R6/2 (Bibb et al. 2000). Au contraire, les souris transgéniques exprimant une forme longue de l'huntingtine (HD 46 et HD 100) ou la forme entière (YAC72) ne présentent pas d'anomalies du système dopaminergique à part une faible réduction des récepteurs D2 striataux vers 10-13 mois chez les souris HD100 (Chan et al. 2002). Ceci indique que les formes N-terminales tronquées de l'huntingtine pourraient être responsable de défaut de transcription précoce du système dopaminergique détecté au niveau des récepteurs D1, D2 et de DARPP32 dans les souris R6/2 (Chan et al. 2002). Au stade tardif, la diminution des récepteurs D2 est consécutive à la neurodégénérescence des MSN.

2.8.6.3. Transmission adénoenergique

L'adénosine synaptique provient soit de la dégradation de l'ATP par les ectonucléotidases extracellulaires, soit du milieu intracellulaire par les transporteurs. Elle est fortement augmentée dans l'ischémie (Pedata et al. 2001) ainsi que lors de l'activation des récepteurs NMDA (Manzoni et al. 1994). Les principaux récepteurs à l'adénosine sont les récepteurs A1 et A2A, ils diffèrent par leur localisation et leur fonction. Les récepteurs A1 de l'adénosine, préférentiellement situés sur les afférences striatales au niveau présynaptique des fibres glutamatergiques cortico-striatales, des fibres dopaminergiques nigrales et des fibres cholinergiques, inhibent la libération des neurotransmetteurs (Fredholm and Dunwiddie 1988). Au niveau postsynaptique, ils sont faiblement exprimés dans le striatum (Rivkees et al. 1995) mais ils induisent une hyperpolarisation membranaire contrebalançant l'activation de récepteurs NMDA. Les récepteurs A2A sont abondants dans le striatum par rapport aux autres régions du cerveau. Ils sont situés au niveau postsynaptique des neurones striataux projetant sur le pallidum et au niveau présynaptique des afférences glutamatergiques cortico-striatales, où ils contrôlent la libération du glutamate (Hettinger et al. 2001).

La transmission adénoenergique est augmentée via les récepteurs A2A par l'huntingtine mutée en culture de lignée avec une augmentation de la formation d'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) par modification de l'affinité des sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine Gs pour l'adénylate cyclase (Varani et al. 2001). Ceci pourrait être à l'origine de la dégénérescence des MSN. En effet, il a été décrit une perte des récepteurs A2A et une baisse de leur transcription dans le striatum des souris transgéniques R6/2 (Cha et al. 1999). De même, deux modèles rongeurs de la maladie de Huntington, l'un avec le 3-NP et l'autre avec le QA, présentent une perte de récepteurs A2A (Levivier and Przedborski 1998; Bordelon and Chesselet 1999; Blum et al. 2002). Chez l'homme la dégénérescence des projection striato-pallidales portant les récepteurs A2A est précoce et une diminution des récepteurs A2A a été observée dans le putamen, le noyau caudé et le globus pallidus dès le stade 0 de la maladie (Martinez-Mir et al. 1991; Albin et al. 1992; Glass et al. 2000). Le mécanisme de la baisse d'expression des récepteurs A2A a été évalué sur des cellules PC-12 et les cultures primaires striatales exprimant l'huntingtine mutée, celle-ci gêne la fixation de CREB sur le promoteur du récepteur et inhibe partiellement sa transcription (Chiang et al. 2005).

2.8.6.4. Transmission canabenergique

Parmi les récepteurs touchés, les récepteurs CB1 sont moins transcrits dans le striatum des souris transgéniques R6/2 et HD94Q (Denovan-Wright and Robertson 2000; Lastres-Becker et al. 2002), avec pour conséquence une baisse d'expression des récepteurs au niveau du striatum et des zones de projections comme le globus pallidus, le noyau entopédonculaire et la substance noire réticulée. Cette baisse de transcription précède l'apparition des symptômes chez les souris transgéniques et pourrait intervenir dans la neurodégénérescence des cellules striatales. En effet, il a été observé une perte précoce des récepteurs CB1 dans le noyau caudé, le putamen et le globus pallidus externe dès le stade 0 de la maladie de Huntington, probablement à l'origine de l'hyperkinésie (Glass et al. 2000). Cette perte de récepteurs CB1 a aussi été observée au niveau du striatum de modèles phénotypiques de la maladie de Huntington chez le rat intoxiqué par le 3-NP (Page et al. 2000; Lastres-Becker et al. 2001).

2.9. Les voies de neurodégénérescence

Les mécanismes de mort neuronale dans la maladie de Huntington ont été intensivement étudiés mais ils restent encore incomplètement élucidés. La mutation de l'huntingtine semble être reliée directement à la modification de signalisation intracellulaire impliquant des protéines kinases, conduisant à la neurodégénérescence. Les mécanismes de neurodégénérescence potentiellement mis en jeu sont l'activation des caspases et l'apoptose, l'activation des calpaïnes et la nécrose, l'activation des cathepsines et l'autophagie ou la mort cellulaire atypique de type TRIAD.

2.9.1. Kinases, huntingtine et mort cellulaire

Lorsqu'elle est mutée, l'huntingtine, est associée à une signalisation cellulaire mettant notamment en jeu des kinases intervenant dans la mort cellulaire apoptotique. D'une part, il a été montré que la mutation de l'huntingtine s'accompagne d'une activation de la kinase de la partie amino-terminale de c-Jun (jnk) précédant la mort apoptotique des cellules HN33, prévenue par son inactivation (Liu 1998). L'activation de la voie jnk pourrait être la conséquence de la diminution d'interaction entre la mixed-lineage kinase 2 (MLK2) et l'huntingtine mutée, permettant une activité augmentée de MLK2 activateur de jnk (Liu et al. 2000). Plus récemment, l'activation de jnk a été observée dans une culture primaire striatale exprimant l'huntingtine mutée sous forme tronquée, en présence de dopamine (Garcia et al. 2004; Charvin et al. 2005). En parallèle, l'activation de la voie jnk a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*, dans les modèles phénotypiques de la maladie de Huntington induits par l'inhibition du complexe II par le 3-NP (Garcia et al. 2002). Dans ces modèles, l'activation de jnk est suivie de la translocation nucléaire, de l'augmentation de la phosphorylation de c-Jun qui joue alors son rôle de facteur de transcription inducteur de l'apoptose (Herdegen and Waetzig 2001).

D'autre part, il a été montré que la mutation de l'huntingtine s'accompagne d'une diminution de l'expression de la protéine Akt (murine thymoma viral oncogene homolog 1) aussi bien au niveau du striatum de rat exprimant l'huntingtine mutée que dans les lymphoblastes des patients (Colin et al. 2005) et dans le striatum des patients (Humbert et al. 2002). Cette réduction d'expression d'Akt aurait deux conséquences :

- la réduction de la phosphorylation de l'huntingtine avec pour conséquence la diminution de la fonction antiapoptotique de l'huntingtine mutée ;
- la diminution du rôle antiapoptotique d'Akt.

Le premier mécanisme est sous-tendu par le fait que la phosphorylation de l'huntingtine sur la sérine 421 par Akt, activée par l'ajout d'IGF-1, permettait de diminuer la mort neuronale (Saudou et al. 1998; Humbert et al. 2002). La diminution du rôle antiapoptotique d'Akt comprendrait :

- La réduction de la phosphorylation de Bad, protéine proapoptotique inactive dans le cytosol sous forme phosphorylée et séquestrée par la protéine 14-3-3 (Datta et al. 1999) ;
- la réduction de la phosphorylation de la caspase 9, dont l'activité est réduite par la phosphorylation (Cardone et al. 1998);
- la réduction de la phosphorylation des facteurs de transcription de la famille Forkhead, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la transcription de facteurs proapoptotiques comme Bad (Brunet et al. 1999).

2.9.2. Caspases et apoptose

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée est impliquée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Friedlander 2003). Elle se caractérise morphologiquement par une condensation du cytoplasme et du noyau, la formation de corps apoptotiques et la fragmentation internucléosomale de l'ADN en fragments de 180 paires de bases, ceci en absence de rupture de la membrane plasmique (Figure 27A). Elle s'accompagne souvent de la réduction du potentiel de membrane mitochondrial, de l'acidification intracellulaire, de la formation de radicaux libres et de l'externalisation des résidus phosphatidylsérine (Friedlander 2003). Elle fait intervenir des protéases à cystéine, dans un premier temps, les caspases initiateuses parmi lesquelles on trouve les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 dont certaines sont activées selon le signal de départ (Thornberry and Lazebnik 1998). La caspase 8 est activée en cas de signal extracellulaire comme l'activation de récepteurs de la famille du TNF-R, la caspase 9 est activée à la suite d'une dysfonction d'origine mitochondriale et la caspase 12 est activée en cas de signal provenant du reticulum endoplasmique. Dans une seconde phase les caspases exécutoires interviennent pour activer des protéases et endonucléases et détruire la cellule, ce sont les caspases 3, 6, 7 et 14 (Thornberry and Lazebnik 1998).

Plusieurs éléments sont en faveur de l'existence de l'apoptose dans la maladie de Huntington (Hickey and Chesselet 2003). En premier lieu, un marquage TUNEL consistant à marquer les extrémités 3'OH des doubles et simples brins d'ADN, a été observé dans le striatum des patients (Dragunow et al. 1995; Portera-Cailliau et al. 1995; Thomas et al. 1995; Butterworth et al. 1998). Cependant l'étude de la fragmentation de l'ADN du striatum des patients par électrophorèse ne montre pas le profil typique de l'apoptose (Dragunow et al. 1995; Portera-Cailliau et al. 1995) et le marquage TUNEL peut être positif en cas de nécrose (Charriaut-Marlangue and Ben-Ari 1995). Deuxièmement, certaines caspases sont activées dans le striatum des patients comme la caspase 1 (Ona et al. 1999), la caspase 3, la caspase 6, la caspase 7 (Hermel et al. 2004), la caspase 8 (Sanchez et al. 1999) et la caspase 9 (Kiechle et al. 2002). D'autres caspases ont une expression augmentée dans le striatum des patients, c'est le cas des caspases 2, 6 et 7 (Hermel et al. 2004). Troisièmement, certains signaux activateurs de l'apoptose sont présents dans le striatum des patients, c'est le cas de la translocation du cytochrome c dans le cytosol à partir de la mitochondrie (Kiechle et al. 2002) et de l'augmentation de Bax dans le cytosol (Vis et al. 2005). Il a aussi été démontré que les lymphoblastes des patients présentaient une dépolarisation mitochondriale plus importante suite à l'addition d'un bloqueur du complexe IV mitochondrial (Sawa et al. 1999), ce qui a pour conséquence une activation des caspases 3, 8 et 9, qui apparaît plus importante dans les lymphoblastes des patients homozygotes (Maglione et al. 2006).

Par ailleurs les modèles phénotypiques de la maladie montrent des signes d'apoptose. Dans les modèles 3-NP, on observe la translocation du cytochrome c dans le cytosol (Antonawich et al. 2002; Bizat et al. 2003a), une augmentation de Bax (Vis et al. 2001), une activation de la caspase 9 (Bizat et al. 2003a) et un marquage TUNEL (Dautry et al. 2000; Ouary et al. 2000; Kim and Chan 2001; Vis et al. 2001; Bizat et al. 2003a). Dans le modèle de rat intoxiqué par le quinolinate, on observe une fragmentation de l'ADN de type apoptotique et nécrotique (Bordelon et al. 1999; Qin et al. 1999).

Les modèles génétiques montrent peu de signes d'apoptose du fait de l'absence de dégénérescence dans la majorité des modèles (Menalled et al. 2000; Turmaine et al. 2000). Les souris R6/2 présenteraient cependant une activation de la caspase 1 et des défauts d'expression de bcl-2 (Zhang et al. 2003). Cependant certains modèles rongeurs plus récents

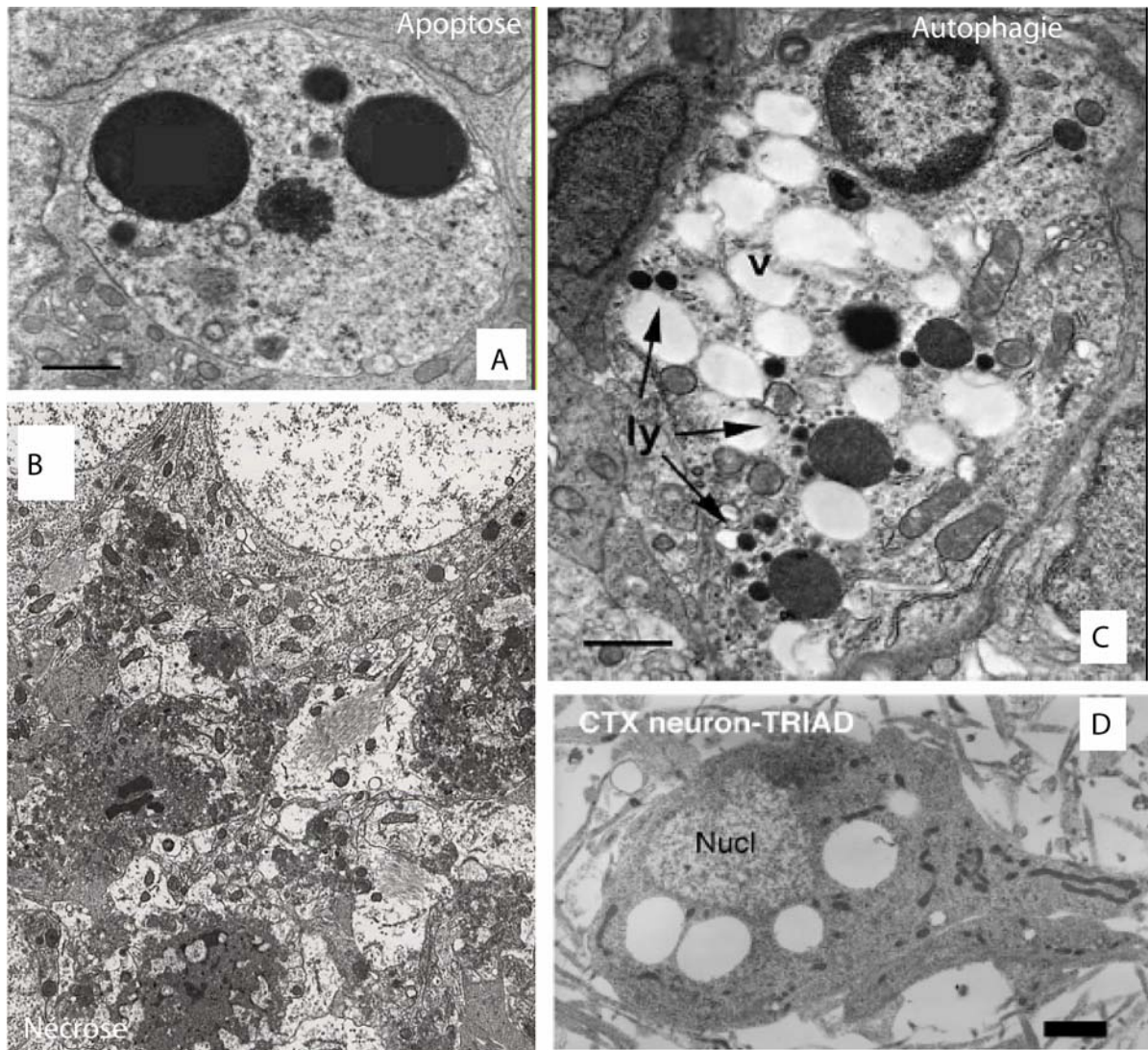


Figure 27 : Aspects des neurones lors des quatres types de mort cellulaire

Photographies de coupes tissulaires en microscopie électronique des différents types de mort neuronale. A : Cellule de cervelet de lapin en apoptose (Lossi and Merighi, 2003). B : Cellules neuronale d'hippocampe en nécrose <http://web.psych.ualberta.ca/~fcolbour/histology.html>. C : Cellule de cervelet de lapin en autophagie issue de (Lossi and Merighi, 2003). D : Cellule corticale en mort de type TRIAD avec des vacuoles cytoplasmiques et une absence de condensation de chromatine issue de (Hoshino et al., 2006). Ly : lysosome, v : vacuoles, Nucl : Noyau.

ayant un niveau élevé d'expression de l'huntingtine mutée et une neurodégénérescence montrent un marquage TUNEL (Reddy et al. 1998; Senut et al. 2000; de Almeida et al. 2002; Yu et al. 2003). D'autre part un modèle drosophile présente une morphologie neuronale nucléaire et cytosolique condensée de type apoptotique (Jackson et al. 1998).

Les signes d'apoptose associés à l'huntingtine mutée ont cependant été observés dans des modèles de culture cellulaires. Les cellules N2-A exprimant l'huntingtine mutée de façon inductible par l'ecdysone présentent une translocation du cytochrome c dans le cytosol et une activation des caspases (Wang et al. 1999; Jana et al. 2001). Les cellules PC-12 transfectées par l'huntingtine mutée ont une expression augmentée de caspase 1 et une activation des caspases (Li et al. 2000b). Les cellules HN33 exprimant la forme entière de l'huntingtine présentent des signes d'apoptose faisant suite à l'activation de la jnk (Liu 1998). Les cellules striatale x57 présentent aussi une mort apoptotique suite à l'activation des caspases (Kim et al. 1999). D'autre part la moindre interaction entre l'huntingtine mutée et HIP-1 pourrait être responsable de l'activation de la caspase 8 et d'une mort apoptotique (Hackam et al. 2000; Gervais et al. 2002). Il a été montré une activation des caspases 8, 9 et 3 après l'expression d'une protéine GFP fusionnée avec 56 glutamines (Miyashita et al. 1999) et les polyglutamines peuvent interagir avec la caspase 8 et la caspase 10 dans les agrégats nucléaires (U et al. 2001).

2.9.3. Calpaïnes et nécrose

La nécrose est un mécanisme classique de neurodégénérescence, surtout observé dans les situations aiguës, lors d'un traumatisme cérébral et d'une ischémie cérébrale. Elle est caractérisée morphologiquement par un gonflement de la mitochondrie et du noyau, une dissolution des organelles, une condensation périnucléaire de la chromatine puis par la rupture des membranes nucléaires et cytoplasmiques concomitantes à la dégradation de l'ADN (Figure 27B) (Friedlander 2003). Elle s'accompagne généralement d'une inflammation, conséquence de la libération du contenu cytosolique des cellules. Les acteurs principaux de la nécrose neuronale sont les calpaïnes, cystéine-protéases activées par le calcium dont il existe actuellement 14 isoformes (Liu et al. 2004b).

Les calpaïnes sont des protéases activées par le calcium et sont regroupées actuellement en une famille comptant au moins 15 membres (Huang and Wang 2001). Les deux isoformes principales sont constituées de deux sous-unités, une sous-unité régulatrice de 30 kDa ou calpaïne 4, codée par le chromosome 19 et une sous-unité catalytique de poids moléculaire de 81,9 kDa et codée par le chromosome 11 pour la μ -calpaïne ou calpaïne I et de 79,9 kDa et codée par le chromosome 1 pour la m-calpaïne ou la calpaïne II (Sorimachi et al. 1997). Elles sont activées par le calcium *in vitro*, à une concentration de l'ordre du μ molaire pour la μ -calpaïne et de l'ordre du millimolaire pour la m-calpaïne, via leur autolyse N-terminale de la petite et de la grande sous-unité (Sorimachi et al. 1997). Les isoformes 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 et 15 sont ubiquitaires et une forte expression des calpaïnes 5, 8 et 15 est observée au niveau du cerveau (Franco and Huttenlocher 2005). Ce sont des protéases à cystéine cytosoliques, inhibées par un substrat endogène, la calpastatine (Wendt et al. 2004). Elles ont des substrats variés et souvent communs à la caspase 3, dont les éléments du cytosquelette, les enzymes, des protéines nucléaires (Wang 2000; Tompa et al. 2004). Elles ont des fonctions diverses dans la régulation du « turn over » des protéines cytosoliques, la régulation de la mobilité cellulaire (Franco and Huttenlocher 2005), la différenciation neuronale (Grynszpan et al. 1997), le cycle cellulaire (Santella et al. 1998), la mort cellulaire (Liu et al. 2004b) et la vision (Biswas et al. 2005).

Plusieurs éléments sont en faveur de l'existence d'une nécrose dans la maladie de Huntington. Le premier signe de nécrose est l'existence d'une inflammation dans la maladie (Hedreen and Folstein 1995). Celle-ci met en jeu une astrogliose et une microgliose réactives avec une activation du complément d'origine microglial dans le noyau caudé des patients de stade III et IV (Singhrao et al. 1999). Un autre signe en faveur de la nécrose est la présence de mitochondries géantes dans les lymphoblastes des patients homozygotes pour la mutation (Squitieri et al. 2006). L'élément le plus en faveur de la nécrose dans la maladie de Huntington est la présence en grande quantité de la forme protéolysée de la petite sous-unité de la calpaïne de 21 kDa, signant l'activation de la protéase dans le noyau caudé des patients (Gafni and Ellerby 2002). D'autre part, la quantité totale de μ -calpaïne est augmentée dans le noyau caudé des patients et l'immunomarquage de leur noyau caudé montre une augmentation de l'expression de la μ -calpaïne comme de la m-calpaïne (Gafni and Ellerby 2002).

Chez les modèles animaux de la maladie de Huntington, une activation de la calpaïne parallèle à la protéolyse de l'huntingtine ont été détectées dans les souris HdhQ92 après une ischémie cérébrale (Namura et al. 2002). Dans un modèle 3-NP de la maladie, la neurodégénérescence striatale est associée à une activation de la calpaïne (Bizat et al. 2003a). Plus récemment, une augmentation de la quantité de calpaïne 5 a été observée en parallèle de fragment de l'huntingtine dans le striatum des souris KI (Gafni et al. 2004).

In vitro, la calpaïne contribue à la mort cellulaire nécrotique de cellules hippocampales en présence de 3-NP (Pang et al. 2003). Elle est activée et contribue à la mort de cellules striatales mais n'est pas activée dans les cellules corticales en présence de 3-NP (Galas et al. 2004). Une autre étude a montré une amplification de la mort cellulaire par l'huntingtine mutée, de type non-apoptotique, dans les cellules striatales en présence de 3-NP (Ruan et al. 2004).

2.9.4. Cathepsines et autophagie

L'autophagie est une forme de mort cellulaire assez courante au niveau neuronal (Larsen and Sulzer 2002), morphologiquement distincte de l'apoptose et de la nécrose. Elle est caractérisée par la présence d'autophagosomes : vacuoles cytosoliques à membrane double ou multiple, contenant du cytosol et/ou des organelles comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Figure 27C) (Klionsky and Emr 2000). Les autophagosomes fusionnent avec le compartiment lysosomal pour former les autolysosomes dans lesquels les enzymes lysosomiales comme les cathepsines B et D contribuent à la mort cellulaire.

Plusieurs éléments sont en faveur de l'existence de l'autophagie dans la maladie de Huntington. Le premier élément est l'augmentation significative de l'activité des cathepsines D, H et de l'activité dipeptidylaminopeptidase II ainsi que la tendance à l'augmentation de l'activité des cathepsine B et L dans le noyau caudé des patients (Mantle et al. 1995). L'huntingtine mutée est présente dans des compartiments vacuolaire de type endo-lysosomal dans le striatum des patients (Sapp et al. 1997). Les lymphoblastes des patients possèdent des autophagosomes dont la quantité est augmentée par l'ajout de staurosporine (Nagata et al. 2004).

In vitro, dans les cellules striatales x57 exprimant l'huntingtine mutée, des autophagosomes cytosoliques se forment avec l'huntingtine en périphérie des vacuoles, la cathepsine D au centre des vacuoles dont la proportion augmente avec la taille de l'expansion de CAG (Kegel et al. 2000). Ils sont formés de réarrangement de membrane de Golgi, de mitochondrie et de membrane nucléaire (Kegel et al. 2000). Les cellules striatales postnatales

de souris R6/2 meurent par autophagie après application d'une concentration toxique de dopamine (Petersen et al. 2001).

D'autres éléments sont plutôt en faveur d'une survie cellulaire augmentée par l'autophagie via la dégradation bénéfique de l'huntingtine mutée (Qin et al. 2003; Ravikumar et al. 2004; Iwata et al. 2005; Ravikumar et al. 2005; Yamamoto et al. 2006).

2.9.5. Mort atypique de type TRIAD

La mort cellulaire atypique induite par la répression de la transcription ou TRIAD, se distingue de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie, aussi bien morphologiquement que par les mécanismes biochimiques (Hoshino et al. 2006). En effet elle est caractérisée par l'inhibition de la transcription avec une mort cellulaire lente et indépendante des caspases, des calpaïnes et en absence de fragmentation de l'ADN. Elle présente une morphologie de vacuolisation du reticulum endoplasmique sans double membrane (Figure 27D), donc différente de l'autophagie et fait intervenir les facteurs de transcription de type YAP (Yes-associated protein) et le cofacteur de transcription p73 (Hoshino et al. 2006). L' α -amanitine et actinomycine D, inhibiteurs de la transcription dépendante de l'ARN polymérase II, ajoutés aux cellules Hela induisent la mort de type TRIAD.

Les éléments en faveur de la mort de type TRIAD dans la maladie de Huntington sont la présence d'une répression de la transcription (Sugars and Rubinsztein 2003), la lenteur de la neurodégénérescence et la présence de vacuoles cytosoliques (Sapp et al. 1997). De plus des vacuolisations cytosoliques ont été observées lors d'un défaut d'interaction de protéines à polyglutamines avec VCP/p97 (valosin-containing protein) et l'huntingtine interagit avec VCP (Hirabayashi et al. 2001). D'autre part, la forme phosphorylée active de p73 est surexprimée dans le striatum des patients et des souris R6/2 alors que l'isoforme tronquée du domaine d'activation de la transcription YAP Δ C est exprimée dans le striatum des patients (Hoshino et al. 2006).

2.10. Les formes toxiques de l'huntingtine et les voies de neurodégénérescence

L'huntingtine mutée semble exercer une toxicité par deux voies principales en étroite relation : la formation de fragments toxiques et l'agrégation (Hackam et al. 1998). Sa toxicité s'exerce aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme des neurones (Hackam et al. 1999).

La protéolyse de l'huntingtine influence la localisation subcellulaire des fragments (DiFiglia et al. 1997) et la formation d'agrégats (Martindale et al. 1998). Chez l'homme, la protéolyse de l'huntingtine au niveau du putamen est spécifiquement différente des régions corticales et du cervelet et seul le putamen a un profil différent de protéolyse de l'huntingtine lorsqu'elle est mutée (Mende-Mueller et al. 2001). Ces fragments spécifiques de 35, 38, 42 et 48kDa et 100, 120, 150, 210 et 250 kDa proviennent d'un site de coupure C-terminal entre les acides aminés 2146 et 2541. Les fragments N-terminaux de 20, 40, 43, 45 et 50 kDa sont communs au cortex et au putamen et résultent d'un site de coupure dans la partie N-terminale. Les fragments augmentés dans le putamen des patients sont les fragments C-terminaux de 42 et 48 kDa et les fragments N-terminaux 43, 45 et 50 kDa avec une augmentation de l'ubiquitination du fragment de 50 kDa N-terminal (Mende-Mueller et al. 2001). Les protéases intervenant ne sont pas totalement identifiées mais les cystéine-protéases de la famille des caspases (caspases 2, 3, 6, 7 et 8), de la famille des calpaïnes et de la famille des

cathepsines ainsi que les aspartyl-protéases sont capables de couper l'huntingtine avec une influence plus ou moins marquée de la taille de l'expansion CAG sur la vitesse de protéolyse (Figure 28).

2.10.1. Protéolyse de l'huntingtine par les caspases

La première caspase identifiée *in vitro* ayant pour substrat l'huntingtine, est la caspase 3 ou apopaine, capable de protéolyser plus rapidement la forme mutée que la forme normale (Goldberg et al. 1996a; Wellington et al. 1998). Des fragments de 552 acides aminés de l'huntingtine correspondant à la protéolyse par les caspases 2 ou 3 ont été isolés dans les cerveaux des patients et chez les souris YAC72 à des stades précoces (Kim et al. 2001b; Wellington et al. 2002; Hermel et al. 2004). Un site de coupure par la caspase 6 a été isolé à l'acide aminé 586 (Wellington et al. 1998; Wellington et al. 2000). La caspase 2 est capable de protéolyser l'huntingtine entière et tronquée à l'acide aminé 552 et est coimmunoprécipitée avec l'huntingtine en quantité augmentée par la longueur de l'expansion polyglutamine dans une culture de cellules HEK (Hermel et al. 2004). L'immunoprécipitation de la caspase 6 se fait avec la forme tronquée de l'huntingtine et les caspases 3, 8 et 9 ne coimmunoprécipitent pas avec l'huntingtine (Hermel et al. 2004). La caspase 7 est capable de protéolyser l'huntingtine à l'acide aminé 552 et est coimmunoprécipitée avec l'huntingtine tronquée et entière alors que la caspase 8 ne semble capable de protéolyser l'huntingtine qu'artificiellement (Hermel et al. 2004). Dans cette étude, il a aussi été montré que l'expression de forme inactive de caspase 2 ou de caspase 7 réversait totalement la toxicité de l'huntingtine mutée alors que l'inactivation de la caspase 6 la réversait partiellement sur culture de cellules HEK comme sur culture primaire striatale de souris YAC72. L'inactivation de la caspase 3, 8 ou 9 étant sans effet sur la toxicité de l'huntingtine mutée. Dans les cellules striatales de souris YAC72 en culture, l'huntingtine mutée colocalise avec la caspase 7 activée dans le réticulum et avec la caspase 2 activée dans le corps cellulaire et les neurites (Hermel et al. 2004). Chez les patients, une augmentation d'immunoréactivité de la caspase 6 active a été détectée dans les neurones striataux alors que la forme active de la caspase 3 semble augmentée dans les astrocytes striataux (Hermel et al. 2004).

2.10.2. Protéolyse de l'huntingtine par les calpaïnes

Les calpaïnes sont capable de protéolyser la forme entière de l'huntingtine et sa forme courte de 552 acides aminés après incubation en présence d'extrait de cerveau de souris (Kim et al. 2001b). Ces mêmes fragments de l'huntingtine de 65 et 55kDa issus de la protéolyse par la calpaïne II sont présents dans un modèle de culture de cellules X57 exprimant l'huntingtine et disparaissent en présence d'inhibiteurs des calpaïnes, l'ALLN (Acétyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal), l'ALLM (Acétyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-méthylleucinal) et la calpeptine (Kim et al. 2001b). Par la suite, Gafni et Ellerby ont mis en évidence, au niveau du striatum des patients, un fragment N-terminal de l'huntingtine de 65kDa de taille similaire à celui produit par la digestion de l'huntingtine entière avec 44 glutamines par la m-calpaïne *in vitro* (Gafni and Ellerby 2002). La protéolyse de l'huntingtine mutée par les calpaïnes a lieu en trois sites potentiels de coupure et forme *in vitro* quatre fragments N-terminaux de 67, 72, 77 et 82 kDa et un fragment C-terminal sans polyglutamine de 47 kDa (Gafni and Ellerby 2002; Gafni et al. 2004). De plus la protéolyse de l'huntingtine mutée est plus grande que celle de l'huntingtine

Huntingtine

Sites de coupure	Acide aminé P1	Séquence consensus	Protéase	Influence de l'expansion CAG	Références
a	513	DSL ^D	caspase 3	↗ Htt548aa = Htt FL	(Goldberg et al., 1996; Wellington et al., 1998; Kim et al., 2001; Wellington et al., 2002)
b	552	DLND	caspase 3 caspase 2 caspase 2 caspase 7	↗ Htt548aa ↗ Htt FL	(Wellington et al., 1998; Wellington et al., 2002; Hermel et al., 2004)
c	586	DGTD	caspase 6	= Htt FL = Htt548aa	(Wellington et al., 1998; Wellington et al., 2000; Hermel et al., 2004)
d	436, 438	VLS, SAY			
e	469	LTA	calpaïne	↗ Htt FL	(Kim et al., 2001; Gafni and Ellerby, 2002; Gafni et al., 2004)
f	536	SSS			
g	108-113		cathepsine D?	↘ Htt919aa	(Lunkes et al., 2000; Qin et al., 2003; Kim et al., 2006)
h	205-214 ? ?		cathepsine D cathepsine B cathepsine L		(Kim et al., 2006)
i	2146-2541		?	↗ Htt FL	(Mende-Mueller et al., 2001)

Figure 28 : Huntingtine, protéases et sites de protéolyse

(Htt FL : Huntingtine entière, = : vitesse non modifiée par l'expansion CAG, ↗ : vitesse augmentée par l'expansion CAG, ↘ : vitesse diminuée par l'expansion CAG)

normale et les fragments formés dépendent de la quantité d'enzyme présente, de la durée d'incubation et de la présence de calcium (Gafni and Ellerby 2002). Enfin, une augmentation de la petite sous-unité régulatrice, témoin de la présence d'une augmentation de la forme inactive et active de la calpaïne, ainsi que l'augmentation de la μ -calpaïne, ont été observées dans le noyau caudé des patients (Gafni and Ellerby 2002). Plus récemment, la mutation des acides aminés situés au niveau des sites de coupure potentiels des calpaïnes a permis de diminuer la protéolyse et l'agrégation de l'huntingtine mutée ainsi que l'activation de la caspase 3, témoin de mort cellulaire dans des cultures HEK exprimant l'huntingtine mutée, en présence de thapsigargine, agent augmentant le calcium intracellulaire (Gafni et al. 2004). De plus, les souris KI présentant des anomalies de motricité à l'âge de 11 mois, expriment des fragments de l'huntingtine mutée dans le striatum, un fragment de l'alpha-spectrine témoin de l'activation des calpaïnes légèrement augmenté et une augmentation de l'isoforme de la calpaïne 5 dans le striatum (Gafni et al. 2004).

2.10.3. Protéolyse de l'huntingtine par les cathepsines

Un site de coupure entre les acides aminés 104-114 de l'huntingtine mutée, absent en présence de la pepstatine, a été mis en évidence dans un modèle de culture de cellules NG-108 exprimant l'huntingtine mutée (Lunkes et al. 2002). Le fragment N-terminal formé est un composant majeur des agrégats intranucléaires et provient de la protéolyse de l'huntingtine par une aspartyl-protéase. Parmi les aspartyl-protéases inhibées par la pepstatine, la cathepsine D semble un bon candidat car elle colocalise avec l'huntingtine mutée dans des structures lysosomiales *in vitro* (Kegel et al. 2000) et son activité est augmentée dans le noyau caudé des patients (Mantle et al. 1995). Plus récemment, un fragment de l'huntingtine normale de 50 kDa a été identifié comme le résultat d'une protéolyse par la cathepsine D en culture de cellules PC-12 (Qin et al. 2003) mais la protéolyse semble ralentie par la présence de la mutation. Enfin, la cathepsine D et les cathepsines B, L appartenant à la famille des cystéine-protéases sont capables de protéolyser l'huntingtine mutée dans un modèle de culture de cellules x57 (Kim et al. 2006).

3. Dysfonction mitochondriale

Dans ce chapitre, seront présentés la physiologie de la mitochondrie avec l'historique, les fonctions principales de la mitochondrie puis les dysfonctions mitochondriales dans le contexte des maladies neurodégénératives et plus particulièrement dans celui de la maladie de Huntington.

3.1. Rappel historique sur la mitochondrie

Le mot « mitochondrie » provient de deux noms grecs *mitos*, signifiant fil ou filament et *chondros*, signifiant grain ou graine. Ce sont en effet les deux aspects typiques observés respectivement par Kölliker et Flemming en microscopie optique dès le XIX^{ème} siècle. Dans les neurones, elles ont une forme granulaire avec une longueur de 1 µm dans les axones et une forme de filament réticulé de longueur pouvant atteindre jusqu'à 36 µm dans les dendrites (Popov et al. 2005). En général, la mitochondrie est une structure plastique qui change souvent de forme par la fusion de deux mitochondries ou la fission d'une mitochondrie (Alberts et al. 2002). Dans les cellules postmitotiques, le nombre de mitochondries est fonction de l'activité cellulaire.

La mitochondrie serait d'origine exogène comme le chloroplaste des végétaux. Elle serait le résultat de l'intégration d'une protobactérie aérobie dans un système eucaryote possédant un noyau mais dépourvu de mitochondrie dans une archéobactérie anaérobie (Gray et al. 1999). Cette théorie appelée endosymbiose a été émise dans les années soixante par Lynn Margulis et repose sur le fait que cette organelle possède son propre ADN (Margulis 1970). Lors de l'évolution, l'ADN mitochondrial aurait perdu la capacité de coder certains gènes au profit de l'ADN nucléaire et évolué en faveur de la synthèse de translocases, enzymes de transfert de protéines d'origine nucléaire. C'est avec l'intégration de la mitochondrie dans la cellule que la vie aérobie est apparue avec la fonction respiratoire assurée par la mitochondrie.

La respiration et la découverte de l'oxygène ont été faites en 1774 par Antoine Lavoisier et Joseph Priestly (Brown 2005). La mitochondrie a été observée pour la première fois par Rudolph Kölliker, en 1857, avec un microscope optique au niveau des muscles. Par la suite, Richard Altmann a développé une méthode de coloration des mitochondries en 1890, qui deviendra spécifique avec le marquage au crystal violet par Carl Benda en 1898. En 1912, Otto Warburg identifie des enzymes de la respiration puis David Keilin identifie les cytochromes et la chaîne d'oxydoréduction entre 1923 et 1933. Le premier isolement des mitochondries a été réalisé dans les années 40 par Albert Claude qui a obtenu le prix Nobel en 1974, partagé avec George Palade pour la découverte, en 1952, en microscopie électronique des membranes internes, externes et des crêtes mitochondriales. Albert Lehninger a localisé la β-oxydation des acides gras, le cycle de Krebs et la chaîne d'oxydoréduction dans la mitochondrie entre 1948 et 1951. Le contrôle de la respiration mitochondriale a été étudié par Britton Chance dans les années 50 et Peter Mitchell a obtenu le prix Nobel, en 1978 pour l'élaboration de la théorie chimiosmotique en 1961. La théorie de la production radicalaire mitochondriale lors du vieillissement cellulaire a été élaborée par Denam Harman en 1972. David Nicholls a travaillé sur la force protonique mitochondriale et la régulation de la production de protéine du stress 1974. Fred Sanger a reçu un prix Nobel en 1980 pour le séquençage de l'ADN mitochondrial humain en 1977 et un peu plus tard, Kay Tanaka a mis en évidence la première maladie d'origine mitochondriale en 1986.

3.2. *Physiologie mitochondriale*

3.2.1. *Localisation cellulaire et subcellulaire de la mitochondrie dans le cerveau*

Il existe une grande hétérogénéité des mitochondries dans le cerveau, avec une présence plus élevée dans les régions fortement irriguées par les vaisseaux (Friede and Pax 1961). Cette hétérogénéité concerne aussi bien le nombre que le type de mitochondries, c'est-à-dire les protéines exprimées variant selon le type cellulaire. Les mitochondries sont entre 50 et 2500 par cellule et occupent un volume cellulaire moyen d'environ 25%, selon le type cellulaire (Koolman and Röhm 1994). Le cerveau est un organe vital dont le fonctionnement dépend en grande partie de l'apport énergétique, principalement sous la forme de glucose, provenant d'autres organes comme le foie. C'est donc un des organes avec le cœur qui consomme le plus d'énergie (20% de l'oxygène total et 50% des glucides de l'organisme), et qui contient le plus de mitochondries (Abood 1969). Le cerveau est constitué de quatre types cellulaires : les astrocytes, les neurones, les oligodendrocytes et la microglie.

Les neurones contiennent le plus grand nombre de mitochondries, pour assurer la transmission synaptique en plus des fonctions métaboliques de base et de la gestion du calcium (Abood 1969). Les oligodendrocytes possèdent aussi de nombreuses mitochondries pour assurer le renouvellement perpétuel de la gaine de myéline autour des neurones afin d'assurer une bonne transmission synaptique. Au contraire, les astrocytes comme les cellules microgliales sont moins riches en mitochondries. Au niveau neuronal, les mitochondries sont localisées au niveau périnucléaire, cytoplasmique, dendritique, axonal et dans les terminaisons synaptiques. Elles sont plus nombreuses au niveau des terminaisons nerveuses, du segment initial de l'axone et des nœuds de Ranvier pour assurer une bonne transmission synaptique (Abood 1969).

3.2.2. *Compartimentation de la mitochondrie*

La mitochondrie est délimitée par une enveloppe formée de deux membranes, la membrane externe et la membrane interne, et sépare trois compartiments différents : le cytoplasme extramitochondrial, l'espace intermembranaire et la matrice intramitochondriale (Figure 29).

La membrane externe est une bicouche lipidique composée de 50% de lipides, essentiellement des phospholipides et majoritairement de la phosphatidylcholine et de 50% de protéines (Cooper 2000). Elle est très perméable grâce à la présence de porines formant un canal hydrophile de 2-3 nm et permettant le passage de petites molécules de poids moléculaire entre 5 et 10 kDa. Cette membrane peut, dans certains cas, être commune à la membrane du réticulum (Popov et al. 2005).

L'espace intermembranaire a une composition proche du cytoplasme pour les petites molécules du fait de la grande perméabilité de la membrane externe.

La membrane interne est une bicouche lipidique particulière composée majoritairement de protéines (75%) et de lipides (25%), c'est-à-dire une protéine pour en moyenne 15 phospholipides. Elle contient un phospholipide particulier, synthétisé uniquement dans la mitochondrie à partir de la décarboxylation de la phosphatidylsérine, la cardiolipine qui joue un rôle dans la régulation de l'activité de la COX (cytochrome c oxydase). Elle a une perméabilité très sélective et est particulièrement imperméable aux petites molécules chargées. Elle possède une grande surface de contact entre l'espace intermembranaire et la

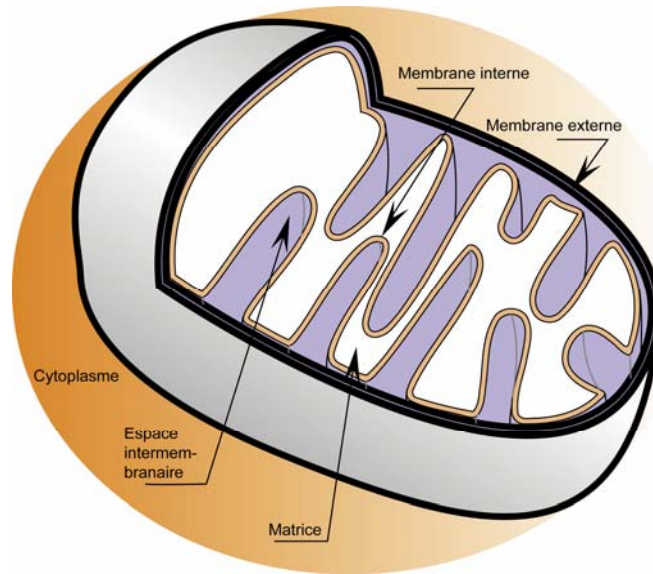


Figure 29 : Compartiments des mitochondries

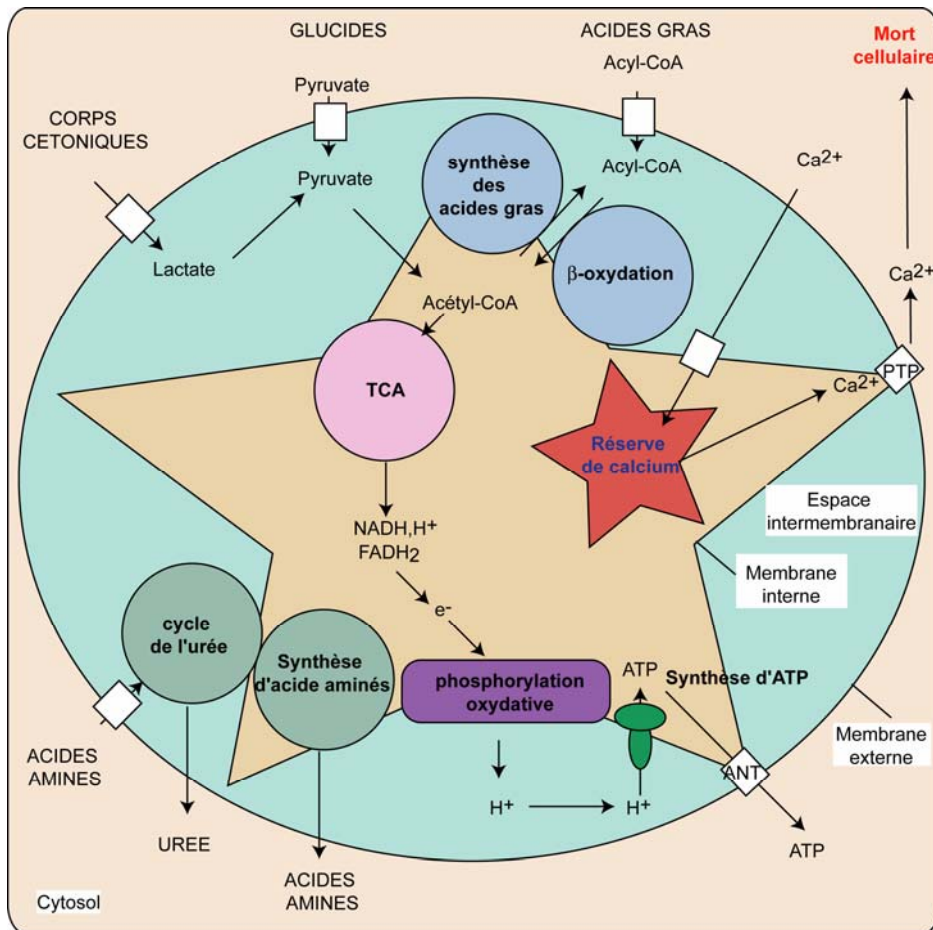


Figure 30 : Fonctions de la mitochondrie

Schéma des trois principaux rôles de la mitochondrie : le métabolisme (caractères en noir et gras), la réserve de calcium (bleu) et la mort cellulaire (rouge). TCA : cycle de l'acide citrique, ANT : adénine nucléotides translocase, PTP : pore de transition de perméabilité.

matrice par la formation de replis appelés crêtes mitochondriales (cristae). Les zones d'accolement de la membrane interne et de la membrane externe sont les points de contact impliqués dans la translocation des protéines et dans la formation de pore de transition de perméabilité mitochondrial, intervenant dans l'apoptose.

La matrice est l'espace situé à l'intérieur de la membrane interne et possède la consistance d'un gel, dû à sa forte concentration en protéines pouvant atteindre 500 mg/mL (Domingue 2006). Son volume a été estimé à 0,4 μ L par mg de protéines mitochondriales (Nicholls 1974). Elle contient en outre le génome mitochondrial codant des protéines, ARNr et ARNt indispensables aux fonctions mitochondriales.

3.2.3. Les fonctions de la mitochondrie

La mitochondrie neuronale est une organelle intracellulaire aux fonctions multiples assurées par des protéines codées par le génome nucléaire et mitochondrial. Les grandes fonctions de la mitochondrie sont la transcription/traduction de l'ADN, la fonction métabolique, la régulation des concentrations ioniques, la régulation du stress oxydatif et de la mort cellulaire (Sastry and Rao 2000; Polster and Fiskum 2004). La fonction métabolique de la mitochondrie est la fonction principale de la mitochondrie et regroupe la phosphorylation oxydative, le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs (TCA), la synthèse d'ATP, le cycle de l'urée, la synthèse et la dégradation des acides gras et la synthèse et la dégradation des acides aminés (Figure 30) (Koolman and Röhm 1994).

3.2.4. Capacité de traduction, transcription du génome mitochondrial

La mitochondrie est la seule organelle intracellulaire extranucléaire à posséder de l'ADN, qui s'accompagne de toute la machinerie de transcription et de traduction des gènes mitochondriaux. Il y a plusieurs copies de l'ADNmt dans chaque mitochondrie de cellules eucaryotes, variant selon la taille et le nombre des mitochondries. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est un ADN double brin circulaire comportant un brin H (heavy) riche en bases GC et un brin L. La transcription du brin H se fait dans le sens inverse du brin L (Figure 31). L'ADNmt humain est un des plus petit et contient 16,569 kb contre 200kb pour les plantes, et constitue moins de 1% de l'ADN total. Il code pour 37gènes, soit 2 ARN ribosomiaux (ARN 12S et 16S), 22 ARN de transfert et 13 protéines correspondant à des sous-unités des différents complexes respiratoires (Figure 31) (Anderson et al. 1981). Sept protéines appartiennent au complexe I ou NADH-déshydrogénase-coenzyme Q-oxydoréductase (ND): ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 et 6 (Figure 33). Une protéine appartient au complexe III ou coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase : le cytochrome b (Figure 31). Trois sous-unités appartiennent au complexe IV ou cytochrome c-oxydase : COX 1, 2 et 3 (Figure 31). Enfin deux protéines appartiennent à l'ATP synthase : A6 et A8 (Figure 31). Les ribosomes codés par la mitochondrie sont proches des ribosomes bactériens et sont insensibles au cycloheximide mais sensible au chloramphénicol. La transcription nécessite une machinerie de transcription simplifiée constituée d'une ARN polymérase de deux sous-unités, la grande sous-unité apparentée à l'ARN polymérase du bactériophage T7 et la petite, assimilée aux facteurs σ des ARN polymérases bactériennes. L'ADNmt est d'origine maternel car presque toutes les mitochondries au stade zygote proviennent de l'ovule. La transmission des pathologies neurodégénératives génétiques mitochondriales se fait donc de façon verticale.

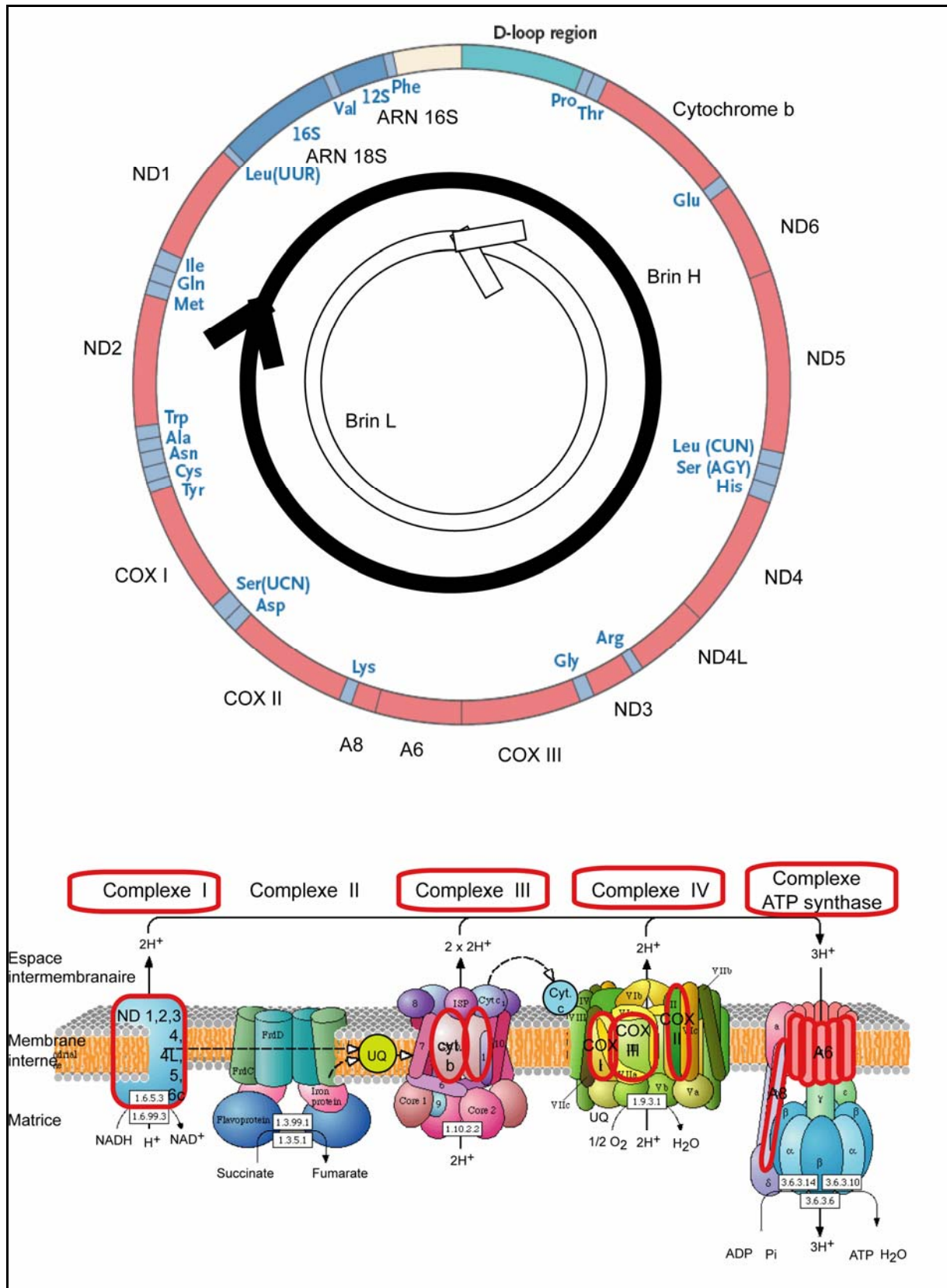


Figure 31 : ADN mitochondrial et protéines des complexes respiratoires

ADN mitochondrial avec le brin H noir transcrit dans le sens des aiguilles d'une montre et L dans le sens inverse. Les 37 gènes codés sont bleus pour les 2 ARNr et 22 ARNt et roses pour les 13 protéines correspondant aux complexes mitochondriaux schématisés en dessous avec les sous-unités codées par l'ADNmt entourées en rouge.

3.2.5. Fonctions métaboliques

Les neurones du système nerveux central sont très dépendants du catabolisme des sucres par rapport aux autres types cellulaires comme les astrocytes. En effet ils oxydent environ 85% du glucose contre 7 à 14% pour les astrocytes (Bonvento et al. 2002). L'oxydation du glucose par la mitochondrie est la fonction métabolique principale de la mitochondrie mettant en jeu la pyruvate déshydrogénase et le cycle de Krebs. Secondairement, les neurones peuvent utiliser d'autres substrats comme les corps cétoniques (Amiel 1995), le lactate (Schurr and Rigor 1998; Rice et al. 2002; Acosta and Kalloniatis 2005), la glutamine astrocytaire (Tildon et al. 1985) et peut être les acides gras (Koolman and Röhm 1994). La dégradation de ces métabolites par la mitochondrie permet le fonctionnement neuronal grâce à la synthèse d'ATP, carburant énergétique principal issu de la phosphorylation oxydative et de la F₀-F₁ATPase

3.2.5.1. Formation d'acétylCoA et Pyruvate déshydrogénase

La pyruvate déshydrogénase (PDH) catalyse la formation de l'acétylCoA et de NADH à partir du pyruvate, produit de la glycolyse cytosolique (Figure 32). C'est l'enzyme intermédiaire entre la glycolyse cytosolique et le cycle de Krebs mitochondrial. Elle est constituée de trois types enzymes, la pyruvate déshydrogénase E1, la dihydroliponamide acétyltransférase E2 et la dihydroliponamide réductase E3 et de cinq coenzymes : la thiamine-biphosphate, la liponamide, le FAD, le NAD⁺ et le coenzyme A. Elle est organisée en multimère de 20 à 30 hétérotétramères de E1, associés à 60 E2 et à 6 homodimères de E3. E1 est une protéine hétérotétramérique constituée de deux sous-unités α , de 43,3 kDa codée par le chromosome X (Ho et al. 1989; Koike et al. 1990) et de deux sous-unité β , de 39,2 kDa codée par le chromosome 3 (Ho and Patel 1990). Elle catalyse la décarboxylation du pyruvate et le transfert de l'hydroxyethyl sur la thiamine biphosphate. E2 est une enzyme de 65,8 kDa codée par le chromosome 11, catalysant la formation d'acétylCoA. E3 est une enzyme de 54,1 kDa homodimérique, codée par le chromosome 7 liant un FAD par sous-unité et permettant la formation de NADH (Pons et al. 1988).

3.2.5.2. Catabolisme des acides gras

Le métabolisme des acides gras serait une voie de secours pour l'apport énergétique aux neurones (Koolman and Röhm 1994). Il met en jeu la navette carnitine/acylcarnitine au niveau des membranes mitochondriales, les AcylCoA Synthétase cytosoliques, peroxisomales et mitochondriales et quatre systèmes enzymatiques mitochondriaux communs à la dégradation des acides gras ou β -oxydation des acides gras et à la biosynthèse des acides gras (Bhaumik et al. 2005) (Bartlett and Eaton 2004). Ce sont la 2,3 acylCoAdéshydrogénase ou la 2,3 enoylréductase ; la 2-enoylCoA hydratase ou la 3-hydroxyacyl déshydratase ; la 3-hydroxyacyl déshydrogénase ou la 3-cétoacyl réductase et la 3-oxoacylCoA thiolase ou la 3-cétoacylCoA synthase (Figure 33). La voie de dégradation dépend du Coenzyme A et du FAD et du NAD⁺, alors que l'élongation dépend du transporteur d'acylCoA et du NADPH, H⁺ (Bhaumik et al. 2005). Le taux d'oxydation des acides gras est supérieur à l'utilisation de l'acétylCoA dans le cycle de Krebs, c'est pourquoi il peut entrer dans la formation des corps cétoniques, substrats de secours des neurones lors d'un jeûn prolongé (Koolman and Röhm

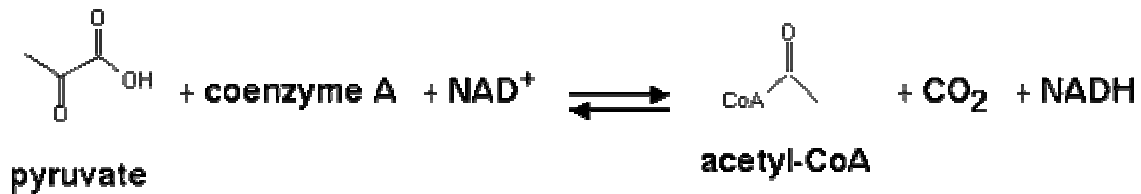


Figure 32 : Réaction catalysée par le complexe de la pyruvate déshydrogénase

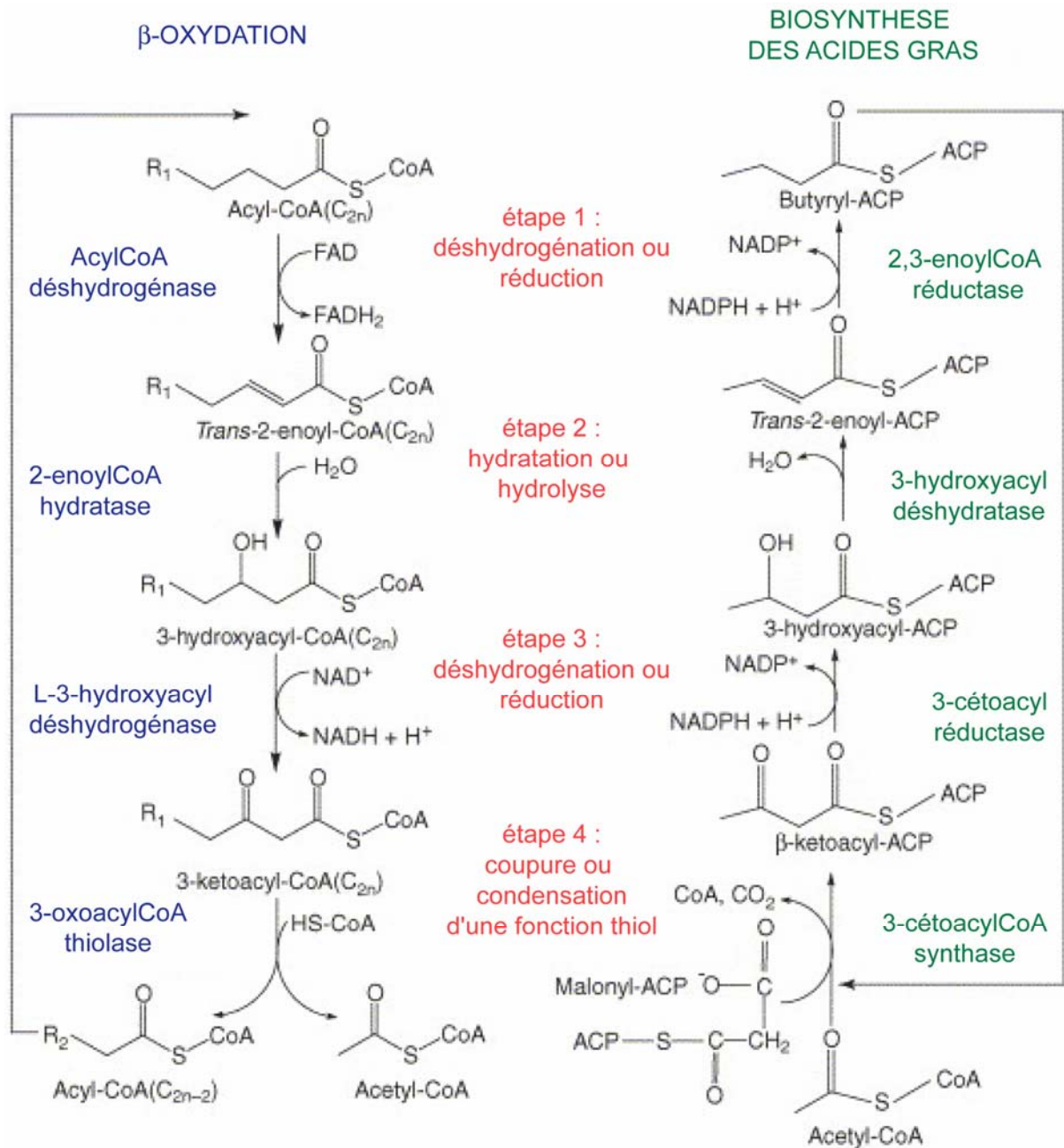


Figure 33 : β-oxydation des acides gras et biosynthèse

Schéma adapté de (Bhaumik et al. 2005). En bleu, les enzymes de la β-oxydation des acides gras et en vert, les enzymes de synthèse et en rouge la réaction catalysée.

1994). Le bilan énergétique de la dégradation d'un acide gras comme l'acide palmitique (C16) est de 129 liaisons riches en énergie formées soit 3935 kJ par mole d'acide palmitique (Koolman and Röhm 1994).

3.2.5.3. Cycle de Krebs

Les enzymes du cycle de Krebs ou du cycle de l'acide citrique ou des acides tricarboxyliques sont chargées de l'oxydation des acétylCoA, provenant de la dégradation des sucres par la pyruvate déshydrogénase et de la β -oxydation des acides gras, en dioxyde de carbone CO₂ et équivalents réducteurs sous forme de NADH. Le bilan énergétique de la dégradation d'un acétylCoA correspond à la formation de 3 NADH, d'un GTP, d'un ubiquinol et de 2 CO₂ permettant la formation de 12 ATP, en final. En parallèle le cycle de Krebs intervient dans de nombreuses voies anaboliques comme la synthèse des porphyrines à partir du succinyl CoA et la synthèse des acides aminés (Koolman and Röhm 1994). Les intermédiaires du cycle de Krebs sont maintenus à un taux constant grâce à des voies anaplérotiques, essentiellement constituées par le catabolisme des acides aminés (Koolman and Röhm 1994). Ainsi, l'alanine, la sérine, la thréonine, la cystéine et la glycine permettent la formation du pyruvate. L'aspartate et l'asparagine fournissent l'oxaloacétate. L'histidine, la proline, l'arginine, la glutamine et le glutamate fournissent l' α -cétoglutarate. L'isoleucine, la valine, la méthionine et le tryptophane fournissent le succinyl-CoA. Enfin, l'aspartate, la phénylalanine et la tyrosine fournissent le fumarate. Le cycle de Krebs fait intervenir 8 enzymes (Figure 34) : la citrate synthase, l'aconitase, l'isocitrate déshydrogénase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase, la succinylCoA ligase, la succinate déshydrogénase ou complexe II mitochondrial, la fumarase et la malate déshydrogénase.

3.2.5.4. Biosynthèse des corps cétoniques

La biosynthèse des corps cétonique se fait dans la mitochondrie, au niveau de la matrice mitochondriale. Elle permet au cerveau, en cas de jeûn prolongé et donc d'hypoglycémie, l'utilisation des corps cétoniques, c'est-à-dire l'acétoacétate et le 3-hydroxybutyrate pour la production d'énergie. Les corps cétoniques sont, avec le lactate, les substrats de secours du cerveau, surtout utilisés dans des situations pathologiques (Amiel 1995). La biosynthèse met en jeu quatre enzymes dont la première est commune à la synthèse des acides gras, la 3-cétoacylCoA synthase ou 3-oxoacylCoA thiolase à chaîne courte ou l'acétylCoA acyltransférase (Figure 35)(Koolman and Röhm 1994). Les trois autres enzymes sont l'hydroxyméthylglutarylCoA synthase (Figure 36), l'hydroxyméthylglutarylCoA lyase (Figure 37) et la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase (Figure 38).

3.2.5.5. Dégradation de la glutamine

La glutamine est un autre substrat de secours pour les neurones, provenant du glutamate synaptique capté par les astrocytes et transformé par le glutamine synthase en glutamine (Tildon et al. 1985; Bonvento et al. 2002). La glutamine aminotransférase K ou kynurénine aminotransférase I (KAT I), encore appelée β -lyase des conjugué à cystéine, est une enzyme de dégradation de la glutamine et une des enzymes de la synthèse du neurotransmetteur glutamatergique et de l'acide kynurénique, antagoniste endogène des récepteurs glutamatergiques. KAT I a pour cosubstrat préférentiel de la kynurénine, le

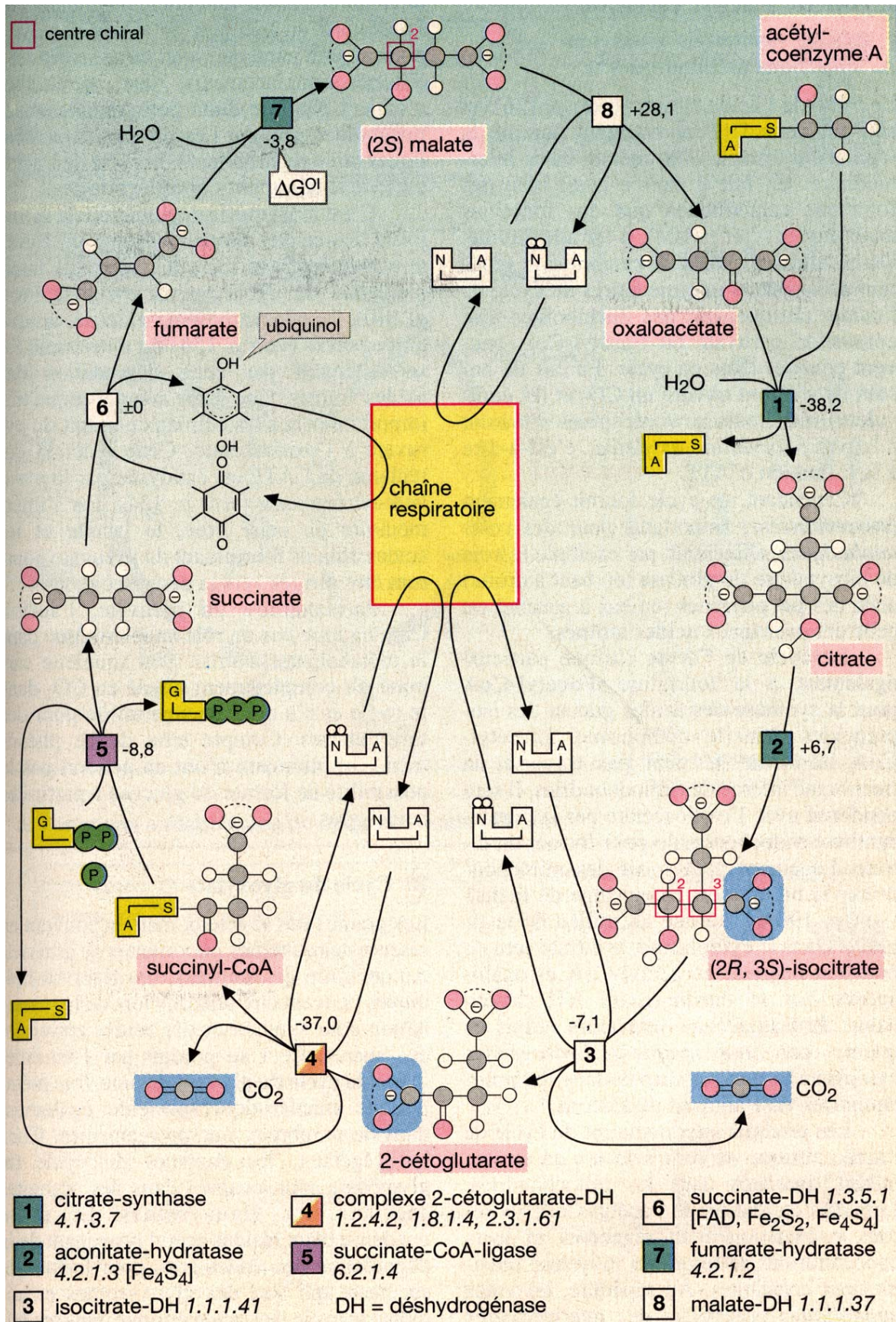


Figure 34 : cycle de Krebs

pyruvate et forme l'acide kynurénique (Okuno et al. 1990; Guidetti et al. 1997). Elle catalyse aussi la dégradation de la 3-hydroxykynurénine et du pyruvate en acide xanthurénique (Chiarugi et al. 1999). Cette enzyme est inhibée par la glutamine, probablement parce qu'elle s'oriente vers la troisième réaction catalysée, la dégradation de la glutamine et du pyruvate en α -cétoglutarate et L-alanine (Figure 39). Elle a pour cosubstrat, l' α -cétoglutarate et catalyse la formation de l'acide kynurénique à partir de la kynurénine ou la formation d'acide xanthurénique à partir de la 3-hydroxykynurénine. La glutamine aminotransférase K participe à la biosynthèse du glutamate via la dégradation de la glutamine en α -cétoglutarate, qui est transformé en α -cétoglutarate par l' ω -amidase. Ces deux enzymes sont fortement exprimées dans le cerveau et plus particulièrement dans le plexus choroïdes où elles ont une activité métaboliques conjointe (Cooper et al. 1993). L' α -cétoglutarate avec l'aspartate sont ensuite transformé en glutamate et oxaloacétate par l'aspartate aminotransférase mitochondriale, élément de la navette malate aspartate.

La glutaminase activée par le phosphate est une enzyme responsable de la dégradation de la glutamine et la principale voie de synthèse du neurotransmetteur glutamatergique (Torgner and Kvamme 1990), permettant, avec la recapture synaptique, la constitution des pools synaptiques. La glutaminase catalyse la dégradation de la glutamine avec une molécule d'eau en glutamate et ammonium NH_4^+ (Figure 40). L'ajout de calcium et de phosphate active l'hydrolyse de la glutamine sans en affecter le transport par le transporteur de glutamine mitochondrial (Kvamme et al. 1991; Roberg et al. 1995).

3.2.5.6. Phosphorylation oxydative et enzymes de la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire mitochondriale constitue une partie de la phosphorylation oxydative avec l'ATP synthétase et catalyse le transfert d'électrons du NADH et de l'ubiquinone réduite, encore appelée hydroubiquinone ou coenzyme Q réduite, sur l'oxygène moléculaire O_2 . La grande différence de potentiel entre l' O_2 et les donneurs d'électrons permet la formation d'énergie, utilisée pour la formation du gradient électrochimique qui permet la formation d'ATP par l'ATP synthétase (Koolman and Röhm 1994). Le gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne fournit 24 kJ par mole de proton. La phosphorylation oxydative est la voie d'oxydoréduction permettant la synthèse d'ATP en condition aérobie. C'est elle qui fournit l'énergie aux neurones.

La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée de quatre complexes protéiques, insérés dans la membrane interne mitochondriale (Figure 41) :

- Le complexe I ou NADH-déshydrogénase (EC 1.6.5.3) de 700 à 800 kDa, constitué d'une quarantaine de sous-unités ;
- Le complexe II ou succinate déshydrogénase (EC 1.3.5.1) de 125 kDa, constitué de 4 sous-unités ;
- Le complexe III ou ubiquinol-cytochrome c-réductase (EC 1.10.2.2) de 400 kDa, constitué de 11 sous-unités ;
- Le complexe IV ou cytochrome c-oxydase (EC 1.9.3.1) de 200 kDa, constitué de 8 à 13 sous-unités.

A ces complexes sont associées des protéines mobiles comme l'ubiquinone et le cytochrome c de 12 kDa, ainsi que le complexe V ou ATP synthétase ou F_0F_1 -ATPase de 400 kDa (EC 3.6.1.34), constituée de 8 à 16 sous-unités. Le Coenzyme Q possède une chaîne

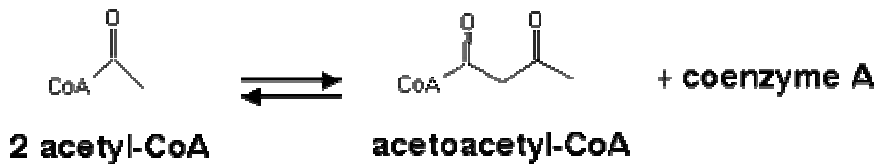


Figure 35 : Synthèse des corps cétoniques par l'acétylCoA acyltransférase

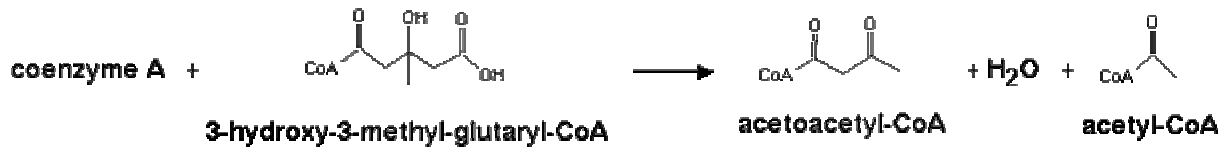


Figure 36 : Synthèse des corps cétoniques par l'hydroxyméthylglutarylCoA synthase

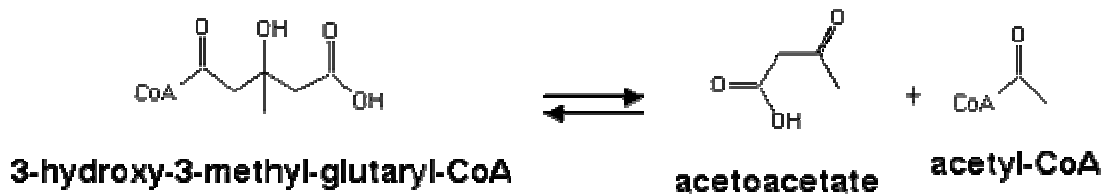


Figure 37 : Synthèse des corps cétoniques par l'hydroxyméthylglutarylCoA lyase

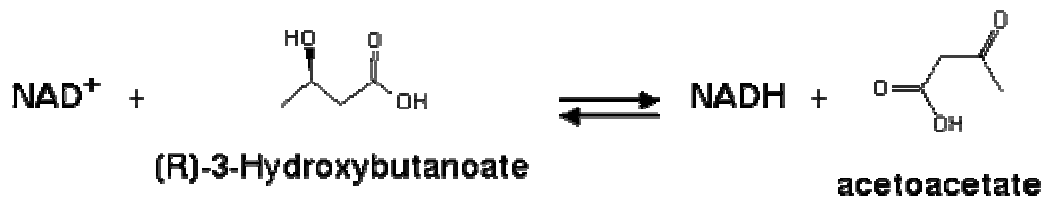


Figure 38 : Synthèse des corps cétoniques par la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase

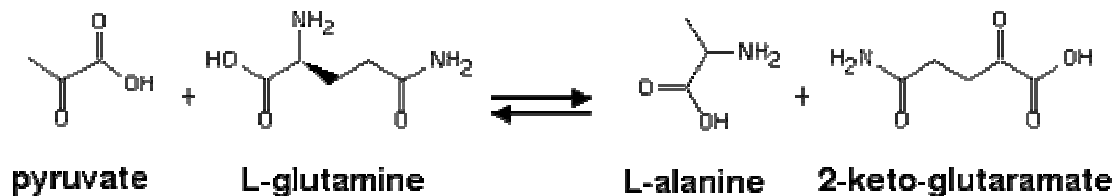


Figure 39 : Réaction de la glutamine aminotransférase K ou KAT I

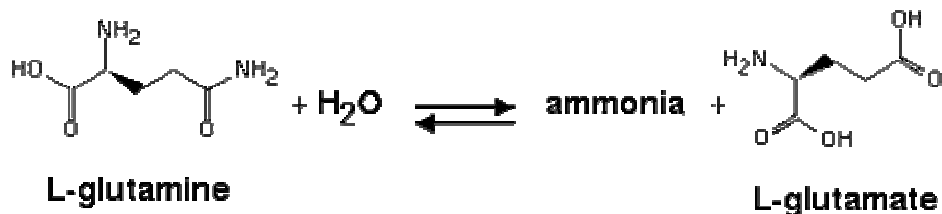


Figure 40 : Réaction de la glutaminase K activée par le phosphate

latérale apolaire lui permettant un déplacement libre dans la membrane interne mitochondriale alors que le cytochrome c se déplace à la face externe de la membrane interne mitochondriale.

3.2.5.6.1. Complexe I

Le complexe I est le plus gros complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale avec sept protéines codées par le génome mitochondrial et environ 39 codées par le génome nucléaire. Il catalyse la réaction d'oxydo-réduction réversible de 2 NADH et de l'ubiquinone en présence de 2H^+ en 2 NAD^+ et ubiquinol. Il a été isolé à partir de mitochondries cardiaques de bœuf et comporte des cofacteurs d'oxidoréductions constitués par deux molécules de FMN, liées non covalentement, deux centres Fer-Soufre $\text{Fe}_2\text{-S}_2$ et 6 centres Fer-Soufre $\text{Fe}_4\text{-S}_4$ (Hatefi and Galante 1977). Il est aussi capable de catalyser l'oxydoréduction du NADPH (Hatefi and Galante 1977). C'est le point d'entrée obligatoire du transfert des électrons à partir du NADH sur l'ubiquinone qui permet le passage de H^+ vers l'espace intermembranaire.

3.2.5.6.2. Complexe II ou SDH

Le complexe II mitochondrial est le plus petit des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et possède la particularité d'être codé uniquement par le génome nucléaire. Il est composé de 4 types de sous unités organisées en hétérotétramère ou hétérohéxamère : la succinate déshydrogénase A (SDH A), SDH B, SDH C et SDH D. Il est aussi nommé succinate déshydrogénase ou succinate ubiquinone oxidoréductase. Les deux sous unités A et B forment la partie catalytique du complexe alors que les sous-unités C et D permettent l'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale (Figure 42A). La SDH A est une flavoprotéine (Fp) de 78 kDa codée par le chromosome 5 dont l'activité est stimulée par la liaison du FAD provenant des intermédiaires du cycle de Krebs et de la β -oxydation des acides gras (Figure 42B) (Hirawake et al. 1994). La SDH B est une protéine à centres Fer-Soufre de plusieurs types 2Fe-2S , 3Fe-4S et 4Fe-4S , (Ip) de 31,6 kDa codée par le chromosome 1, permettant le transfert des électrons du FADH_2 et l'oxidoréduction réversible du succinate en présence de l'ubiquinone en fumarate et ubiquinol (Figure 42C) (Kita et al. 1990). La SDH C est une protéine de 18,6 kDa codée par le chromosome 1, constituant la grande sous unité membranaire du cytochrome b556, qui permet l'ancrage et l'assemblage du complexe ainsi que le transfert des électrons du succinate à l'ubiquinone (Hirawake et al. 1997). La SDH D est une protéine de 17 kDa codée par le chromosome 11, constituant la petite sous-unité du cytochrome b556 et permettant l'ancrage du complexe dans la membrane (Hirawake et al. 1997).

3.2.5.6.3. Complexe III

Le complexe III est un complexe constitué de 10 sous-unités codées par le génome nucléaire et d'une sous-unité codée par la mitochondrie, le cytochrome b. Il catalyse la réaction d'oxydo-réduction de l'ubiquinol et du cytochrome. Il comporte deux centres Fer-Soufre ($\text{Fe}_2\text{-S}_2$), 2 hèmes b et 1 hème c1. Il transfère les électrons de l'ubiquinol intramembranaire au cytochrome c de l'espace intermembranaire et permet un flux de protons de la matrice à l'espace intermembranaire.

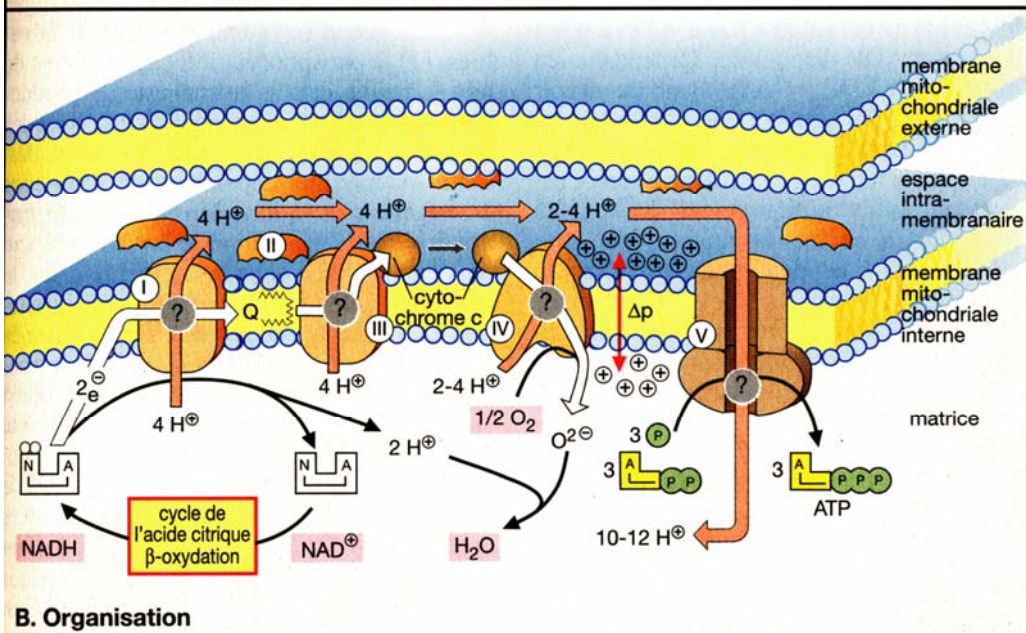
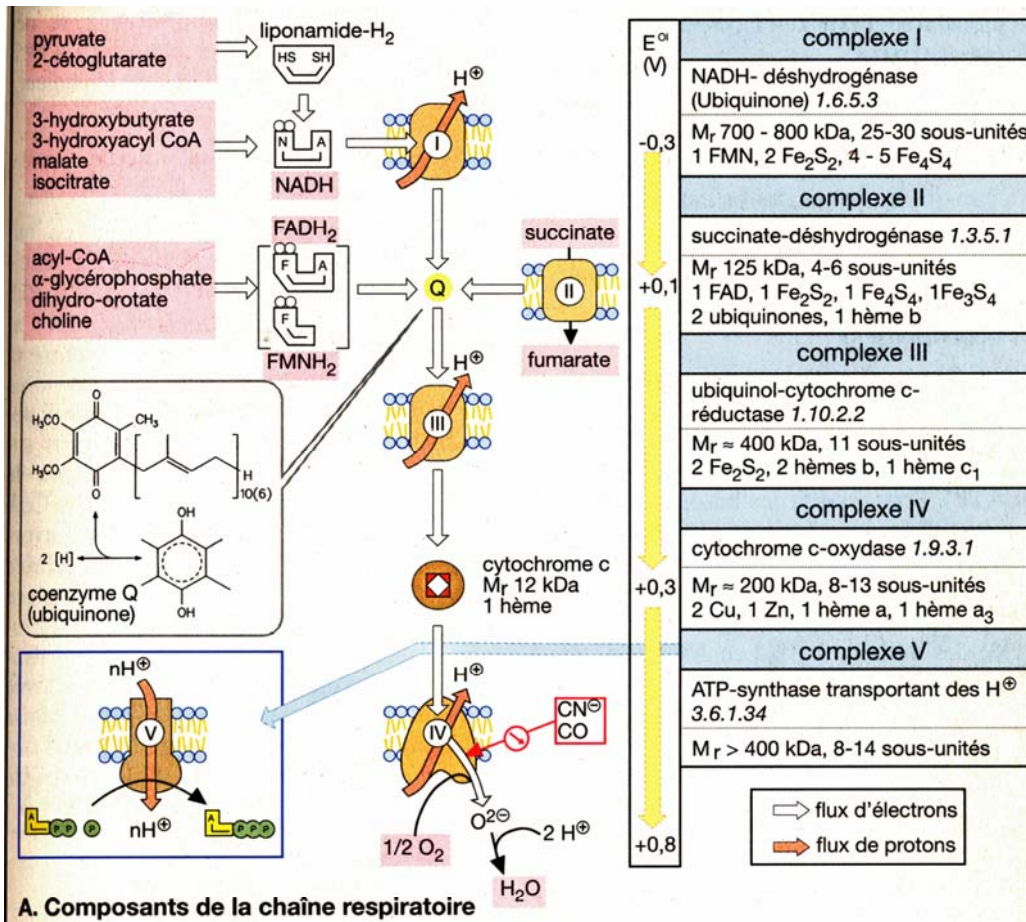


Figure 41 : Chaîne respiratoire : complexes mitochondriaux, flux d'électrons et de protons et organisation

A : Composants de la chaîne respiratoire : 5 complexes, deux cofacteurs d'oxydoréduction, le cytochrome c et l'ubiquinone, des substrats divers source d'équivalents réducteurs sous la forme de NADH, FADH₂ et FMNH₂. E⁰ indique le potentiel d'oxydoréduction des couples d'oxydoréduction permettant le transfert d'électrons. B : Organisation spatiale de la chaîne respiratoire. (Koolman and Röhm 1994)

3.2.5.6.4. Complexe IV

Le complexe IV est un complexe constitué de 10 sous-unités codées par le génome nucléaire et de trois sous-unités codées par la mitochondrie, les cytochromes c oxydases I, II et III. Il catalyse la réaction d'oxydo-réduction du cytochrome c en présence d'O₂ permettant la formation d'H₂O. Il comporte deux sites de fixation du cuivre, un site de fixation du zinc, 1 hème a et 1 hème a₃. Il transfère les électrons du cytochrome c de l'espace intermembranaire sur l'oxygène qui réagit immédiatement sous forme de O²⁻ avec les H⁺ pour former l'H₂O et permet un flux de protons de la matrice à l'espace intermembranaire.

3.2.5.7. Synthèse d'ATP par la F₀-F₁ ATPase

L'ATP est le métabolite indispensable au maintien des gradients ioniques par les ATPases membranaires dont la Na⁺/K⁺ ATPase consommant respectivement environ 47% de l'ATP pour générer un potentiel d'action et 34% au niveau postsynaptique lors de la transmission glutamatergique ([Attwell and Laughlin 2001](#)). De plus l'ATP joue le rôle de commutateur du type de mort cellulaire, il est indispensable à l'apoptose ([Leist et al. 1997](#)).

Le complexe V mitochondrial ou F₀-F₁ ATPase ou ATP synthase est un complexe multimérique composé d'un canal protonique F₀ formée de différentes protéines et d'un complexe protéique F₁, chargé de former de l'ATP à partir de l'ADP et du Pi. Le complexe V est formé de 10 à 16 sous-unités codées par l'ADN nucléaire et de deux sous-unités codées par l'ADN mitochondrial, l'ATP synthase 6 et 8. Il permet le passage de flux de protons selon le gradient électrochimique et permet l'apport d'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP et constitue l'unique source d'ATP en condition aérobie. En cas de stress comme lors de l'hypoxie, les neurones comme les cellules de la rétine sont capables de réduire l'activité de l'aspartate aminotransférase et d'augmenter l'activité de la lactate déshydrogénase pour maintenir le niveau d'ATP grâce aux lactates, nécessaire au fonctionnement des ATPases ([Acosta and Kalloniatis 2005](#)).

3.2.5.8. Capacité de transport des métabolites

De nombreuses molécules entrant dans le métabolisme mitochondrial, indispensables au fonctionnement énergétique cellulaire doivent transiter à travers la membrane interne mitochondriale pour rejoindre la matrice et être métabolisés.

La navette malate-aspartate permet le transfert du NADH cytosolique vers la matrice mitochondriale où il est utilisé dans la chaîne de transfert d'électrons pour produire de l'ATP ([McKenna et al. 2006](#)). Elle est constituée de deux transporteurs, le transporteur de l' α -cétoglutarate/malate et le transporteur du glutamate/aspartate, ainsi que des deux isoformes cytosoliques et mitochondriales de deux enzymes, la malate déshydrogénase et l'aspartate aminotransférase (Figure 43). Le NADH provient de la glycolyse cytosolique et doit être régénéré en NAD⁺, pour éviter un déséquilibre du rapport NADH/NAD⁺ en faveur du NADH qui entraîne une dégradation du pyruvate en lactate, contournant ainsi la métabolisation du pyruvate par le cycle de l'acide citrique, beaucoup plus efficace à fournir de l'énergie à la cellule. Le transporteur AGC1 neuronal (Aspartate-Glutamate carrier 1) et l'activité aspartate aminotransférase semblent de plus avoir un rôle important dans la biosynthèse du neurotransmetteur glutamatergique ([Palaiologos et al. 1988](#)).

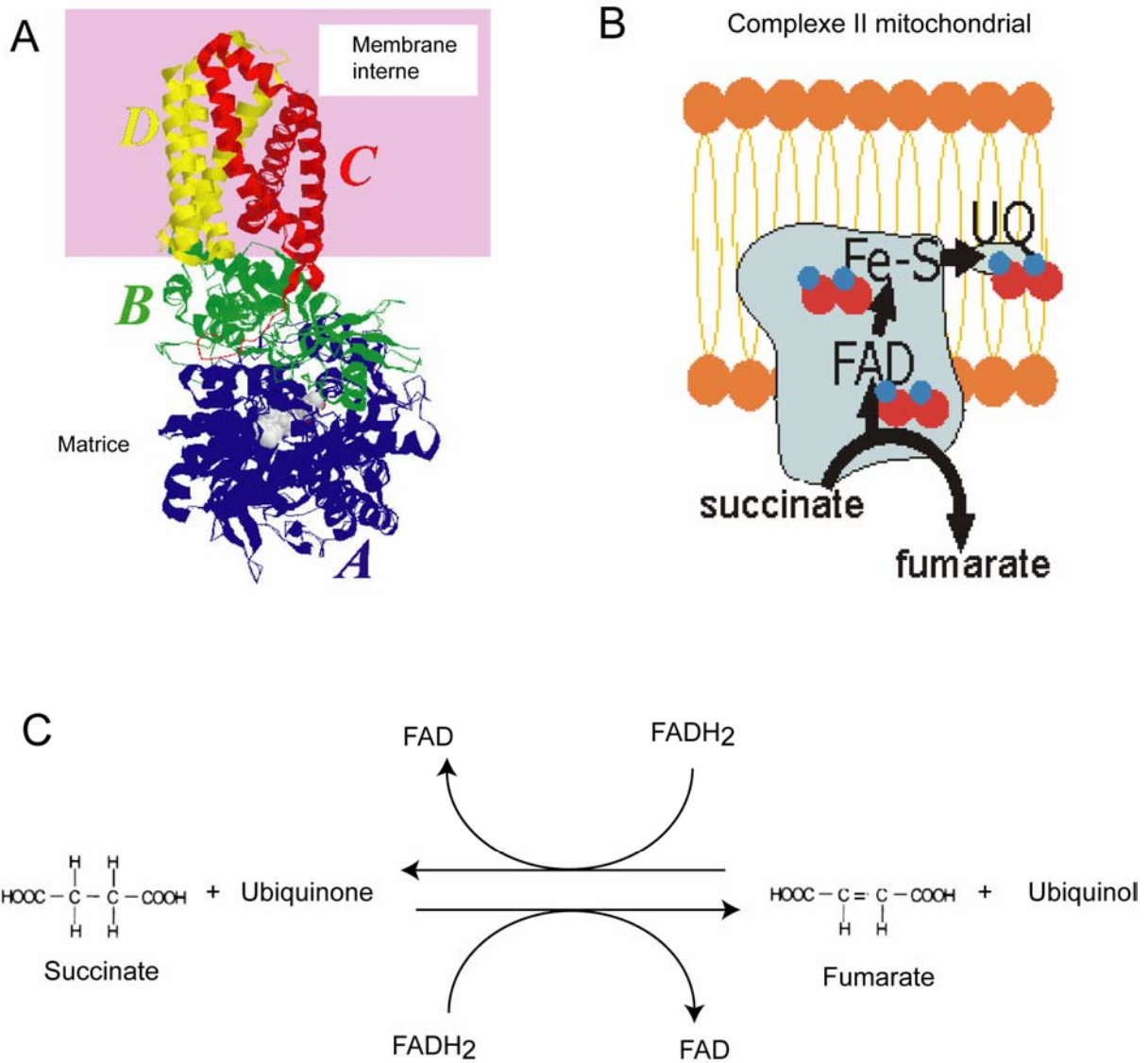


Figure 42 : Complexe II mitochondrial, structure et réaction d'oxydoréduction catalysée

A : Structure 3D, issue de la Protein data bank, des 4 sous-unités du complexes II mitochondrial ou succinate déshydrogénase (SDH) avec la SDH D en jaune, la SDH C en rouge dans la membrane interne et SDH B en vert et SDH A en bleu formant la partie catalytique du complexe II. B Chemin de transfert des électrons à partir du FAD vers le centre Fer-Soufre (Fe-S) et l'ubiquinone (UQ). C : réaction catalysée par la succinate déshydrogénase.

La navette carnitine/acylcarnitine est constituée de quatre enzymes à fonction carnitine acyltransférase, les carnitine palmitoyltransférase 1 et 2, la carnitine octanoyltransférase, la carnitine acétyltransférase (Figure 44) (van der Leij et al. 2000) et d'un transporteur, la carnitine/acylcarnitine translocase. Elle a pour but l'apport mitochondrial des acides gras provenant du cytosol et des peroxysomes dans le but de les dégrader par la β -oxydation.

La navette glycérol-3-phosphate permet le transfert du NADH cytosolique vers la mitochondrie par des intermédiaires métaboliques (McKenna et al. 2006). Elle fait intervenir les deux isoformes cytosoliques et mitochondriales de glycérol 3-phosphate déshydrogénase et ferait intervenir une perméase spécifique située au niveau de la membrane externe mitochondriale (Bartoloni et al. 2000). Dans le cytosol, la glycérol 3-phosphate déshydrogénase permet la formation de glycérol-3-phosphate (G3P) à partir de dihydroxyacétone-phosphate et de NADH. Le G3P transiterait par un transporteur spécifique identifié récemment chez l'homme, la perméase du glycérol-3-phosphate (G3PP), transporteur antiport dépendant du Pi codée par le chromosome 21 et exprimée dans le cerveau humain (Bartoloni et al. 2000). Le G3P est ensuite transformé à son tour par l'enzyme localisée du côté externe de la membrane interne mitochondriale. Celle-ci convertit le G3P en dihydroxyacétone-phosphate et FADH₂ (Flavine adénine dinucléotide), dont les équivalents réducteurs sont transférés au coenzyme Q de la chaîne respiratoire en régénérant le FAD. Cette navette est activée au niveau mitochondrial, par le calcium avec deux sites de liaison possibles, un domaine proche de la troponine et un domaine « EF-Hand » (Rutter et al. 1992) et l'isoforme mitochondriale est enrichie au niveau des neurones (Nguyen et al. 2003).

Le transporteur du pyruvate est indispensable à l'oxydation du glucose et au métabolisme d'acide aminés (Hildyard and Halestrap 2003) et permet aussi le transport des corps cétonique comme l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate dans la mitochondrie (Halestrap 1975, 1978).

Le transporteur de la glutamine permet le transport de glutamine vers la matrice mitochondriale des neurones (Minn 1982; Steib et al. 1986; Dolinska et al. 1996). Il est important dans les mitochondries tissulaires car il participe à la synthèse des nucléotides de type purine (Ziegler et al. 1989) et pyrimidine (Visek 1992), des protéines (Irwin 1985) et à la synthèse d'intermédiaire du cycle de Krebs comme l' α -cétoglutarate et le fumarate. En parallèle, dans le cerveau elle est le précurseur des deux neurotransmetteurs principaux, le glutamate et le GABA. De plus, elle permet la détoxification de l'ammoniac et c'est un des substrat énergétique principaux du cerveau (Tildon et al. 1985) qui peut se substituer au glucose, après sa synthèse spécifiquement astrocytaire à partir du glutamate (Peng et al. 1993). Sa concentration dans le cerveau de 5mM est dix fois plus élevée que dans le liquide cérébrovasculaire (Gjessing et al. 1972).

3.2.6. Capacité de transport des protéines

La mitochondrie possède un système d'import des protéines membranaires mitochondriales, intermembranaires et matricielles, codées par le génome nucléaire, soit plus de 95 % des protéines mitochondriales dont 650 sont identifiées (Taylor et al. 2003). Ce système est constitué des protéines Tom (translocase outer membrane) dans la membrane externe, de petites Tim dans l'espace intermembranaire et de Tim dans la membrane interne (translocase inner membrane) et fait appel aux protéines chaperonnes HSP70 (70 kDa Heat shock protein) à partir du cytosol et HSP60 mitochondriale (60 kDa Heat shock protein) (Koehler 2004; Pfanner et al. 2004).

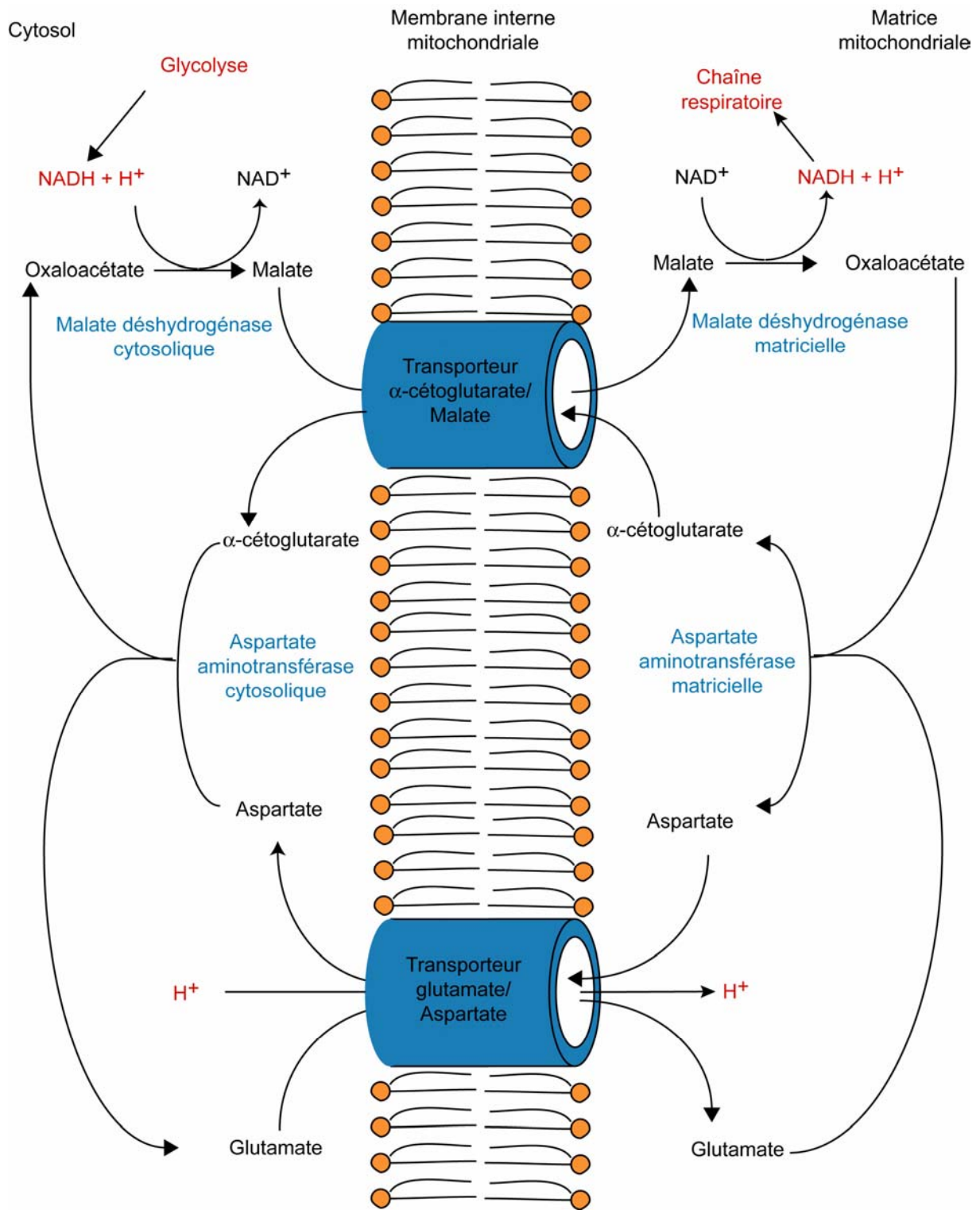


Figure 43 : Navette malate-aspartate

3.2.7. Capacité de régulation de la concentration des ions intracellulaires

La mitochondrie est impliquée dans la régulation des concentrations ioniques intracellulaires du calcium, du sodium, du potassium, du magnésium et des chlorures (tableau 1), grâce à des canaux ioniques situés dans la membrane interne mitochondriale. D'autres canaux, les protéines découplantes, sont impliqués dans le gradient de protons indispensable à la formation d'ATP.

ion	Extracellular [C]	cytosolic[C]	Intramitochondrial [C]
Na ⁺	150 mM	5 mM	
K ⁺	5,5 mM	150 mM	150 mM
Ca ²⁺	1,5 mM	0,0001 mM	
Mg ²⁺	1 mM	1mM	0,2 à 1,5mM
Cl ⁻	125 mM	9mM	

Tableau 1 : Concentrations ioniques cytosoliques maintenues en partie par la mitochondrie par rapport à un déséquilibre ionique provenant du milieu extracellulaire

3.2.8. Capacité de régulation de la concentration du calcium

La régulation calcique intracellulaire est une fonction capitale de la mitochondrie, qui fait intervenir deux types de canaux : les canaux d'import du calcium constitué par le canal uniporteur et les canaux d'export du calcium, constitué par les échangeurs Na⁺/Ca²⁺, H⁺/Ca²⁺ et le PTP (Figure 45A) (Gunter et al. 2000; Carafoli 2003).

Le transport calcique mitochondrial a un rôle fondamental car il régule la synthèse d'ATP, la synthèse d'agents réducteurs comme le NADH par les enzymes du cycle de Krebs (Hansford 1985; McCormack et al. 1990), la concentration cytosolique de Ca²⁺ reliée à la signalisation calcique intracellulaire et à la mort cellulaire (Carafoli 2004; Nicholls 2005). L'augmentation de la synthèse de l'ATP par le calcium se fait à trois niveaux : celui du transport des électrons soit directement au niveau du complexe I et du complexe II (McCormack et al. 1990; Kotlyar et al. 1992) soit indirectement sur le complexe I par réduction du potentiel de membrane (Panov and Scaduto 1995), celui du transport des nucléotides par l'ANT (Moreno-Sanchez 1985) et celui de la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase (Brown 1992; Das 2003) (Figure 45B). La synthèse de NADH est régulée par le calcium mitochondrial, au niveau de trois enzymes du cycle de krebs : la pyruvate deshydrogénase (Denton et al. 1972; Hansford and Castro 1985), l'isocitrate deshydrogénase (Denton et al. 1978) et l' α -cétoglutarate deshydrogénase (McCormack and Denton 1979, 1984) (Figure 45B). Le transport de calcium régule quantitativement la concentration de Ca²⁺ cytosolique et matriciel (Nicholls 2005). Au niveau neuronal, le transport du calcium mitochondrial permet la synchronisation de la libération de neurotransmetteurs des motoneurones (David and Barrett 2003; Talbot et al. 2003), ainsi que la régulation de la transmission glutamatergique pour éviter le phénomène d'excitotoxicité (Nicholls 2005).

3.2.8.1. Canal Ca²⁺ uniporteur

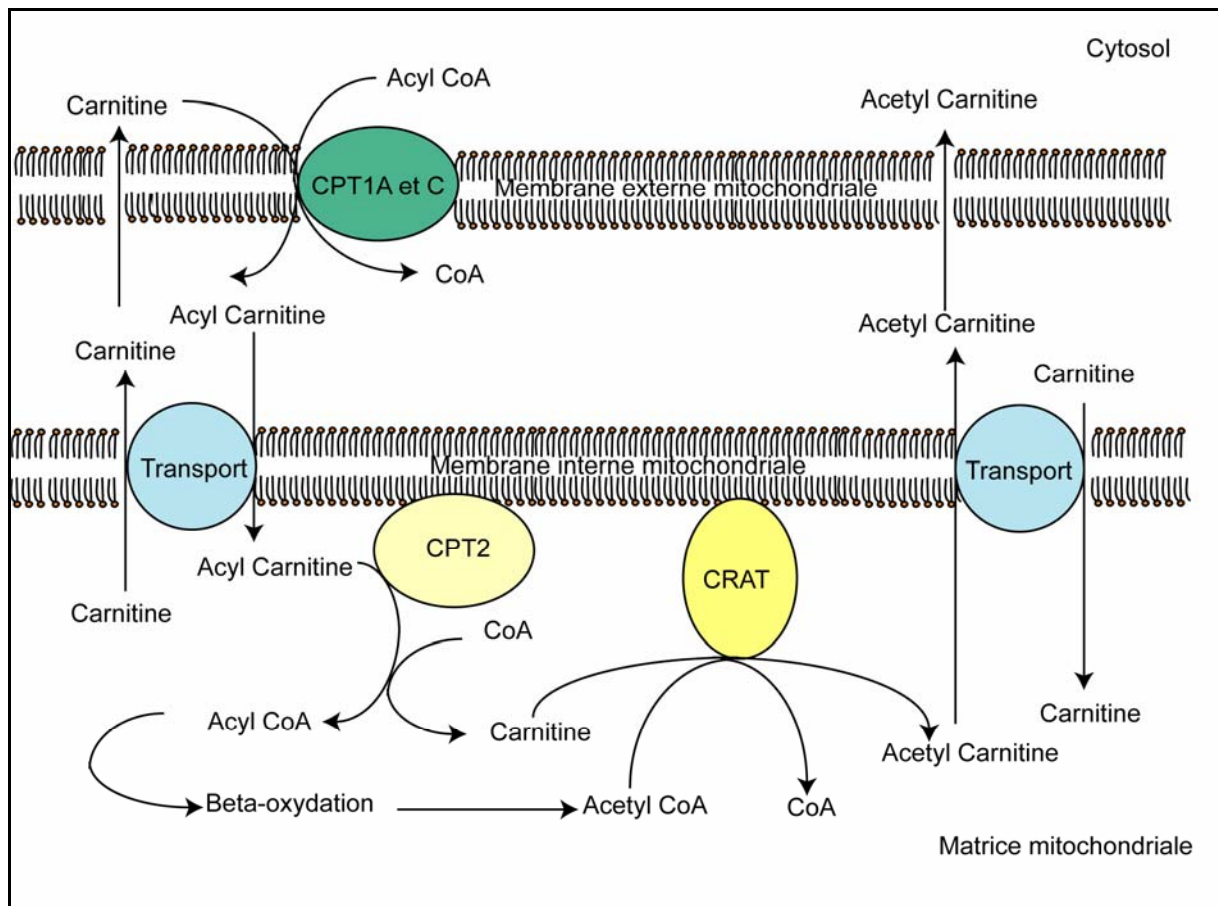


Figure 44 : Navette carnitine/acylcarnitine

CPT : Carnitine palmitoyltransférase, CRAT : carnitine acetyltransférase

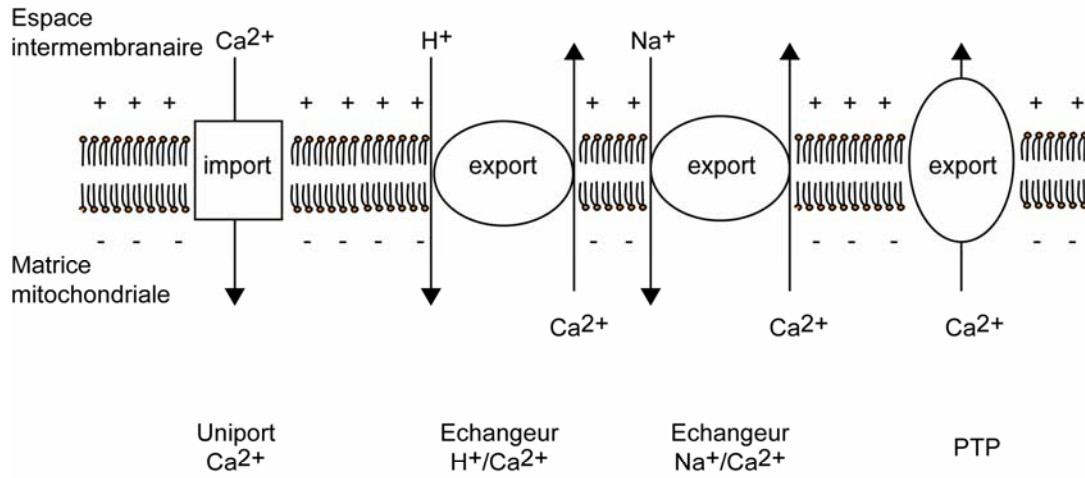
Le canal uniporteur de calcium mitochondrial est la voie unique d'import du calcium intermembranaire, provenant du cytosol par le VDAC, vers la matrice mitochondriale. Il comprends deux ou plusieurs sous-unités d'une protéine de 40 kDa (Saris et al. 1993; Mironova et al. 1994) mais n'a toujours pas été cloné. Il est localisé au niveau de la membrane interne mitochondriale (Gunter and Gunter 1994). Le canal uniporteur Ca^{2+} a une très haute affinité pour le calcium avec une constante de dissociation de 2 nM (Kirichok et al. 2004) et permet l'entrée de calcium de façon dépendante du voltage et non saturable, si la concentration cytosolique est supérieure à 200 nM (Gunter and Pfeiffer 1990). Il permet aussi le passage sélectif de cations apparentés comme le Sr^{2+} , et avec une moindre affinité, le Mn^{2+} , le Ba^{2+} , le Fe^{2+} et le La^{3+} (Drahota et al. 1969; Vainio et al. 1970; Kirichok et al. 2004). Il est inhibé par le rouge ruthénium et les lanthanides (Rossi et al. 1973; Reed and Bygrave 1974) et activé par les polyamines comme la spermine (Nicchitta and Williamson 1984; Rustenbeck et al. 1998b; Rustenbeck et al. 1998a). Dans les cas extrêmes comme lors d'une dépolarisation mitochondriale prolongée, l'uniporteur peut fonctionner dans le sens inverse pour exporter le Ca^{2+} mitochondrial (Montero et al. 2001). Dans ce cas là, l'ATP comme le Mg^{2+} sont capables d'inhiber la libération de calcium mitochondrial, en se fixant du côté intermembranaire du canal (Litsky and Pfeiffer 1997). La vitesse d'entrée du calcium dans la mitochondrie est de deux types : rapide ou très rapide (RaM) mais il n'a pas été déterminé si deux types d'uniporteurs existaient. Les deux modes d'entrée sont cependant sensibles aux mêmes inhibiteurs et activateurs, ce qui est en faveur d'une différence de conformation plutôt que d'une différence d'isoforme (Gunter et al. 2000). La capacité de la mitochondrie à accumuler le Ca^{2+} est énorme et pourrait excéder 1000 nmoles/mg de protéines (Nicholls 2005).

Au niveau neuronal, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire provenant du milieu extracellulaire est reliée à une augmentation du transport du Ca^{2+} par le canal uniporteur, suivie d'une augmentation du Ca^{2+} mitochondrial (Peng et al. 1998; Wang and Thayer 2002) et d'une réduction du potentiel de membrane (Duchen 1992; Hayakawa et al. 2005). Il en résulte une activation du métabolisme énergétique avec augmentation de la consommation d'oxygène pour rétablir le potentiel de membrane mitochondrial et le potentiel de membrane plasmique (Duchen 1992; Hayakawa et al. 2005). En effet, la régulation du Ca^{2+} intracellulaire se fait aussi au niveau de la membrane plasmique par l'activation des Ca^{2+} -ATPases chargées d'expulser le calcium en échange de la consommation d'ATP. C'est une des raisons de la demande accrue d'énergie, avec la réduction du potentiel de membrane mitochondrial, expliquant l'activation du métabolisme énergétique. Il est probable que c'est la perte du potentiel de membrane mitochondrial et l'activation du PTP, suite à l'activation du transporteur qui soit responsable de la mort neuronale. Ceci expliquerait l'absence de mort neuronale excitotoxique observée en présence d'un inhibiteur de la capture du calcium par la mitochondrie (Stout et al. 1998).

3.2.8.2. Echangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$

Il existe quatre possibilités d'efflux du calcium mitochondrial. Trois modes d'efflux interviennent en situation physiologique : l'échange du calcium mitochondrial contre le Na^+ cytosolique par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, celui contre le H^+ par l'échangeur $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, celui du passage par le PTP à faible conductance. Les deux autres modes d'efflux, représentés par le PTP à forte conductance et la réversion de l'uniporteur du Ca^{2+} (paragraphe précédent), sont mis en place dans les situations pathologiques.

A Canaux calciques mitochondriaux



B Canaux calciques mitochondriaux et régulation du métabolisme mitochondrial

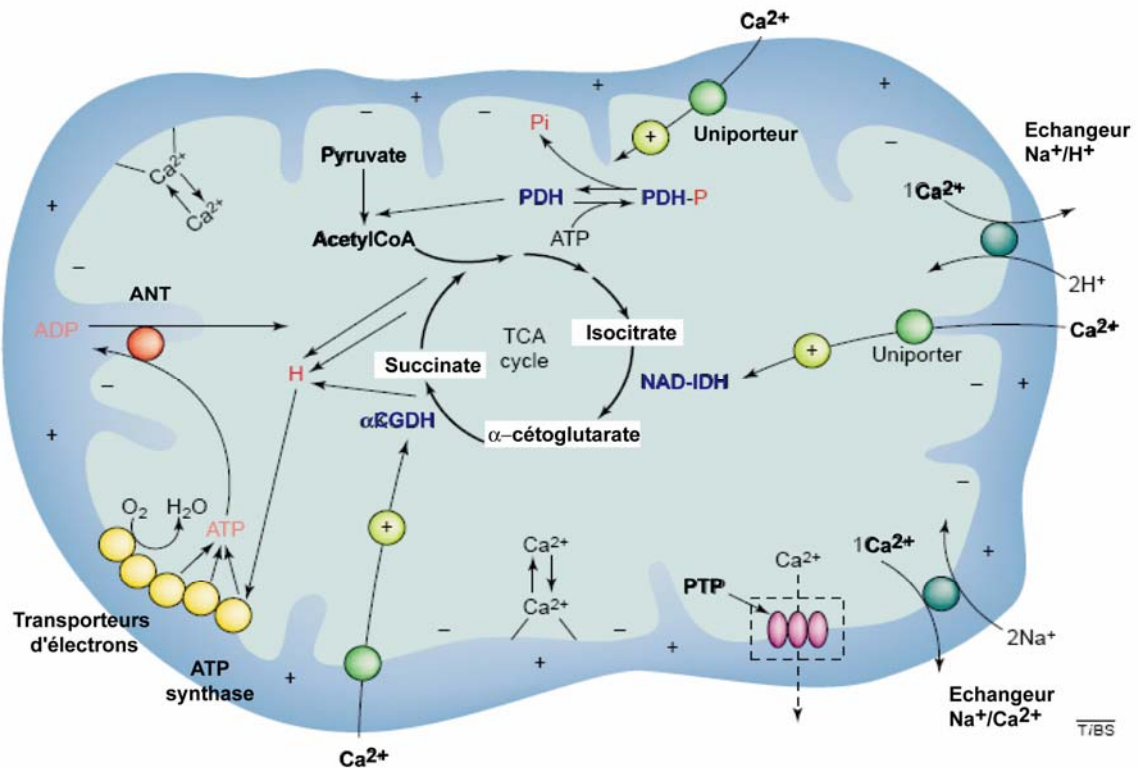


Figure 45 : Canaux calciques mitochondriaux

En A : les canaux mitochondriaux perméables au calcium et en B : leur relation avec le métabolisme mitochondrial. En bleu les enzymes activées par le calcium : l' alphacétoglutarate déshydrogénase (α -CGDH), la pyruvate déshydrogénase (PDH) et l'isocitrate déshydrogénase (NAD-IDH). TCA cycle : cycle de Krebs ou des acides tricarboxyliques. Schéma issu de (Carafoli 2003)

L'efflux du Ca^{2+} à partir de la matrice mitochondriale se fait contre le potentiel de membrane, négatif du côté matriciel et nécessite une quantité importante d'énergie d'environ 33kJ, soit l'équivalent énergétique apporté par l'hydrolyse d'une mole d'ATP (Gunter and Pfeiffer 1990). Cette énergie est apportée par le Na^+ intermembranaire, le gradient de pH, l'oxydation ou l'hydrolyse de l'ATP. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est l'isoforme majoritairement active dans le cerveau (Crompton et al. 1978) par rapport à l'échangeur $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, plutôt active dans le foie et le rein (Wingrove and Gunter 1986b).

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a été découvert dans la mitochondrie cardiaque et permet l'échange d'un ion Ca^{2+} de la matrice contre un ion Ca^{2+} ou deux ou trois ions Na^+ de l'espace intermembranaire (Crompton et al. 1977; Baysal et al. 1994; Jung et al. 1995). Il est capable de transporter lentement un ion Sr^{2+} parallèlement à l'inhibition du transport du Ca^{2+} (Saris and Bernardi 1983). Il n'expulse pas le Mn^{2+} mais est inhibé par celui-ci ce qui explique que le Mn^{2+} entré par le canal Ca^{2+} uniporteur s'accumule dans la mitochondrie, en parallèle du Ca^{2+} , dans laquelle il inhibe l'ATPase et le complexe I mitochondrial à l'origine de la neurotoxicité du manganèse (Gavin et al. 1999). Il est inhibé par de nombreux produits utilisés le plus souvent en tant qu'inhibiteur calcique ou diurétique dans l'indication de l'hypertension artérielle, comme le diltiazem (Chiesi et al. 1987), le vérapamil (Wolkowicz et al. 1983; Sordahl et al. 1984) et les dérivés de l'amiloride (Jurkowitz et al. 1983).

Il existe trois isoformes d'échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou NCX (sodium-calcium exchanger) dont les isoformes NCX1 de 108,5 kDa codé par le chromosome 2 (Komuro et al. 1992) et NCX2 de 100,4 kDa codé par le chromosome 19 (Li et al. 1994b; Kikuno et al. 1999) sont fortement transcrites dans le cerveau. L'isoforme NCX3 de 103 kDa, codé par le chromosome 14 (Nicoll et al. 1996) a été isolé à partir de neuroblastome SH-SY5Y et un rôle important dans la transmission neuromusculaire (Gabellini et al. 2002). Les différentes isoformes semblent impliquées dans les processus physiopathologiques de l'ischémie cérébrale et de la maladie d'Alzheimer (Annunziato et al. 2004). Ces échangeurs sont a priori localisés à la membrane plasmique et leur localisation mitochondriale n'a pas été mise en évidence. Si les échangeurs mitochondriaux sont différents des NCX, ils n'ont pas encore été clonés. Récemment, le lithium possédant la caractéristique d'activateur des NCX (Iwamoto and Shigekawa 1998), a permis d'inhiber la mort cellulaire induite par le glutamate sur des neurones corticaux, hippocampaux et cérébelleux en culture (Nonaka et al. 1998).

L'échangeur Ca^{2+} ne dépendant pas du Na^+ , permet le passage d'un ion Ca^{2+} , Mn^{2+} ou Sr^{2+} de la matrice vers l'espace intermembranaire, contre le gradient électrochimique. Cet échange est électroneutre mais aucun transfert de cation de l'espace intermembranaire à la matrice ni de cotransport d'anion vers l'espace intermembranaire n'a été mis en évidence (Fiskum et al. 1979; Gunter et al. 1983). C'est pourquoi l'hypothèse de l'échange du Ca^{2+} contre deux H^+ provenant de l'espace intermembranaire semble la plus plausible (Fiskum and Lehninger 1979). Cependant un autre facteur semble intervenir car l'échange est diminué par l'augmentation du pH mitochondrial et l'échange est possible même lorsque l'énergie nécessaire est deux fois plus élevée que celle fournie par la force protonique (Gunter et al. 1991). Cet échangeur est inhibé par le Mn^{2+} (Gavin et al. 1999), le cyanure (Gunter and Pfeiffer 1990), des agents découplants à faible concentration comme le CCCP et le ruthénium rouge à forte concentration (Wingrove and Gunter 1986a).

3.2.9. Capacité de régulation de la concentration des autres ions

3.2.9.1. Capacité de régulation de la concentration du sodium

Les canaux sodiques mitochondriaux sont représentés par un uniporteur Na^+ permettant l'influx de Na^+ dans la mitochondrie et un échangeur Na^+/H^+ spécifique du Na^+ permettant l'efflux du Na^+ et la régulation du pH.

L'uniporteur Na^+ mitochondrial a une sélectivité pour le Na^+ et le Li^+ , une imperméabilité au K^+ et une inhibition compétitive par le Mg^{2+} se fixant à sa surface, de l'ordre du nM (Bernardi et al. 1990). Il est stimulé par des concentrations physiologiques d'ATP et ne fonctionne que dans une zone de pH comprise entre 7,5 et 8, et un potentiel de membrane inférieur ou égal à -140 mV.

L'échangeur Na^+/H^+ mitochondrial ou NHE6 (Na^+ exchanger 6) est un canal antiport situé au niveau de la membrane interne, permettant le passage du Na^+ de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, contre le H^+ intermembranaire, provenant de la phosphorylation oxydative. Il est très spécifique pour le Na^+ et ne permet pas l'efflux du K^+ (Nakashima and Garlid 1982). C'est une protéine de 74,2 kDa codée par le chromosome X, dont l'expression est ubiquitaire avec un niveau particulièrement élevé de transcription dans le cerveau humain (Numata et al. 1998). Des localisations extramitochondriales ont été décrites pour cette protéine, notamment au niveau du réticulum endoplasmique (Miyazaki et al. 2001), compartiment de maturation de la protéine et des endosomes, compartiment de recyclage vésiculaire (Brett et al. 2002). Il faut noter qu'il existe une dizaine d'isoformes d'échangeurs Na^+/H^+ (NHE1 à 10), situés au niveau de la membrane plasmique, des membranes du Golgi et des lysosomes. Ces isoformes ont un rôle de régulation du volume cellulaire et du pH intracellulaire et intravésiculaire. L'isoforme mitochondriale a un rôle particulier dans la régulation du Ca^{2+} matriciel, car c'est le sodium de l'espace intermembranaire qui permet la sortie du calcium matriciel par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Il interviendrait aussi dans la régulation du pH et du volume mitochondrial. Il permet de maintenir un niveau faible de concentration du Na^+ matriciel et d'équilibrer le gradient de Na^+ au niveau du gradient de H^+ (Brierley et al. 1994).

3.2.9.2. Capacité de régulation de la concentration du potassium

Les échanges potassiques au niveau de la mitochondrie interviennent dans la régulation du volume mitochondrial et la régulation des H^+ (Garlid and Paucek 2003). Les canaux potassiques mitochondriaux sont de deux types : uniporteur ou échangeur K^+/H^+ . A l'état basal, il y a un équilibre entre l'influx de K^+ par les uniporteurs et l'efflux de K^+ par l'échangeur K^+/H^+ (Nakashima et al. 1982).

L'influx de K^+ dans la mitochondrie via les uniporteurs entraîne la diffusion d'eau et la capture d'un contre-anion souvent le Pi , qui entraîne un gonflement de la matrice mitochondriale (Garlid and Paucek 2003). Cette fonction est assurée par trois types de canaux K^+ uniporteurs : sensible à l'ATP et au glibenclamide, sensible au ruthénium et uniporteur classique (Brierley et al. 1994). Il n'est pas certain que l'uniporteur classique soit différent de

celui sensible à l'ATP, et on peut simplifier la classification en deux catégories : l'uniporteur K⁺ sensible à l'ATP et l'uniporteur sensible au Ca²⁺ (Facundo et al. 2006).

L'uniporteur K⁺ mitochondrial sensible à l'ATP est caractérisé par une faible conductance au K⁺ mais est très spécifique pour le K⁺ (Inoue et al. 1991). Il a ensuite été partiellement purifié sous la forme d'une protéine de 54 kDa (Paucek et al. 1992) et est six à sept fois plus exprimé dans le cerveau que dans le foie ou le cœur (Bajgar et al. 2001). L'uniporteur K⁺ sensible à l'ATP est fortement inhibé par des esters d'AcylCoA à longue chaîne comme l'oléylCoA (Ki 260nM) et le palmitoylCoA (Ki 80nM) (Paucek et al. 1996). Il est aussi inhibé par la quinine (Ki <100μM) (Bednarczyk et al. 2004). En cas de déficit en ATP dans la matrice, le canal uniporteur est activé et responsable d'une dépolarisation de la membrane mitochondriale (Inoue et al. 1991), et d'une activation de la consommation d'oxygène (Bajgar et al. 2001), mais elle est insuffisante pour interrompre la synthèse d'ATP (Kowaltowski et al. 2001).

Par ailleurs, la diminution de l'activité des canaux K⁺ sensibles à l'ATP interviendrait dans l'ischémie cérébrale car leur activation a un effet neuroprotecteur, bloqué par le glibenclamide. En effet, la chromakiline reverse l'ischémie induite par le iodoacétamide dans une culture primaire neuronale (Reshef et al. 1998). De plus, la chromakiline, le nicorandil et le pinacidil sont neuroprotecteurs dans un modèle d'ischémie de l'hippocampe chez le rat par un mécanisme d'inhibition de l'expression des gènes c-Fos et c-jun (Heurteaux et al. 1993).

En outre, l'activation de ces canaux serait associée à l'absence de sensibilité des interneurons cholinergiques au 3-NP contrairement aux MSN dans des tranches striatales (Marti et al. 2003). Le mécanisme potentiel d'insensibilité des interneurons au 3-NP serait associé à une baisse de production de radicaux libres et une réduction de l'ouverture du PTP (Facundo et al. 2005).

L'uniporteur K⁺ mitochondrial activé par le Ca²⁺ s'ouvre en présence d'une concentration μM de Ca²⁺ (Siemen et al. 1999). Il a aussi été démontré que leur activation par le NS-1619 permettait une protection de l'ischémie cardiaque reliée à la baisse du potentiel de membrane mitochondrial (Xu et al. 2002).

L'échangeur K⁺/H⁺ permet l'efflux du K⁺ intramitochondrial contre l'entrée du H⁺ intermembranaire (Martin et al. 1984). Il a un rôle essentiel dans la régulation du volume mitochondrial, notamment dans les situations d'excès de Ca²⁺ mitochondrial (Brierley et al. 1994). Une délétion du gène LETM1 codant un échangeur K⁺/H⁺ de 83,5 kDa, situé sur le bras court du chromosome 4 à côté du gène de l'huntingtine serait impliqué dans la maladie de Wolf-Hirschhorn, caractérisée par un retard de croissance pré et postnatal, un retard mental, une microcéphalie et des anomalies du tonus musculaire (Endele et al. 1999)..

3.2.9.3. Capacité de régulation de la concentration du magnésium

Les mitochondries sont capables d'importer et d'exporter du Mg²⁺, par des voies actuellement mal définies (Jung and Brierley 1994). L'influx de Mg²⁺ est médié par un transport saturable et dépendant de la concentration, activé par le potentiel de membrane et dépendant de la respiration (Jung et al. 1997). L'efflux de Mg²⁺ est activé par l'absence de Mg²⁺ intracellulaire et nécessite un gradient de pH, ce qui oriente vers un efflux dépendant d'un échangeur Mg²⁺/H⁺ (Rutter et al. 1990). Récemment, par homologie avec la protéine bactérienne CorA de transport du Mg²⁺, la protéine Mrs2p de 54 kDa a été identifiée comme le transporteur responsable de l'influx du Mg²⁺ chez la levure, dont l'expression influence la capacité de capture du Mg²⁺ (Kolisek et al. 2003). La régulation du Mg²⁺ est importante pour

le transfert des nucléotides (Moreno-Sanchez 1985), l'activité des canaux ioniques mitochondriaux et celle des enzymes matricielles et de la chaîne respiratoire sensibles au Mg^{2+} (Rodriguez-Zavala and Moreno-Sanchez 1998).

3.2.9.4. Capacité de régulation de la concentration du chlorure

Un agent découplant, le cérébrocast est capable d'induire l'influx de H^+ en cotransport avec le Cl^- en s'incorporant dans la membrane interne mitochondriale (Fernandes et al. 2005). Des canaux Cl^- de deux types ont été mis en évidence dans le tissu adipeux : un canal inhibé par le GDP (guanosine 5'-diphosphate) et un canal inhibé par le DCCD et les amines amphiphiles et activé par l'alcalinisation de la matrice ou la déplétion en Mg^{2+} (Jezek et al. 1989). Dans ce même tissu, chez le hamster, le canal Cl^- sensible au GDP a été isolé comme un uniprotéine de 32 kDa perméable au Cl^- , Br^- , nitrate et F^- (Jezek et al. 1990). Ces canaux n'ont pas été clonés ni isolés dans les mitochondries mais il est possible qu'ils soient en fait identiques aux UCP (Jezek et al. 1994).

3.2.9.5. Capacité de régulation du gradient de protons par les protéines découplantes

Les protéines découplantes mitochondriales UCP (uncoupling carrier protein) sont chargées de découpler le transport d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale de la synthèse d'ATP. Pour ce faire, les UCP dissipent le gradient de protons existant entre l'espace intermembranaire riche en H^+ et la matrice mitochondriale, créé par la phosphorylation oxydative dont la fonction est de former de l'ATP (Nicholls 1974). Cette voie de fuite de H^+ est utile lorsque l'ATP synthase ne fonctionne pas, par exemple en cas de manque d'ADP dans la matrice mitochondriale. Ils sont, en outre, perméables aux chlorures et les acides gras anioniques, tout en étant inhibés par l'ATP, l'ADP, le GTP et le GDP et sont activés par les acides gras et les superoxydes (Krauss et al. 2005). Il existe cinq isoformes de protéines découplantes mitochondriales dont l'isoforme UCP2 ubiquitaire de 33,2 kDa, codée par le chromosome 11 (Fleury et al. 1997) et les deux isoformes fortement exprimées dans le cerveau, UCP4 de 36 kDa codée par le chromosome 6 (Mao et al. 1999) et UCP5 ou BMCP1 (Brain mitochondrial carrier protein 1) de 36,2 kDa codée par le chromosome X (Sanchis et al. 1998). La protéine UCP5 est fortement exprimée dans les ganglions de la base et semble être exclusivement neuronale (Kim-Han et al. 2001).

Au niveau neuronal, les protéines UCP assureraient d'augmentation de la transmission synaptique, de diminution du potentiel de membrane mitochondrial et de régulation de l'homéostasie calcique et de la production de superoxydes.

En effet, la régulation de la transmission dopaminergique a été observée au niveau du noyau accumbens, consécutivement à la production de chaleur par UCP2 permettant d'accélérer l'accès de la dopamine aux récepteur D1 (Fuxe et al. 2005).

Par ailleurs, le rôle des UCP dans la diminution du potentiel membranaire mitochondrial a été mis en évidence par l'observation d'un taux d'ATP et d'un potentiel de membrane plus élevé dans les souris invalidées pour UCP2 (Krauss et al. 2002). De plus la surexpression d'UCP2, d'UCP4 ou de BMCP1 réduit le potentiel de membrane mitochondrial (Mao et al. 1999; Kim-Han et al. 2001; Yamada et al. 2003). Ce rôle sur le potentiel de membrane est important pour l'homéostasie calcique cellulaire car la diminution du potentiel de membrane par les agents découplants comme le DCCP et le 2,4-dinitrophénol, permet la

réduction de la capture du calcium par la mitochondrie parallèle à une réduction de la mort cellulaire excitotoxique induite par le glutamate (Stout et al. 1998). De même, l'expression de UCP2 dans le cerveau immature protège de l'excitotoxicité et de la production de radicaux libres induites par l'acide kaïnique (Sullivan et al. 2003).

Enfin, le rôle des UCP dans la réduction de la production de superoxydes pour prévenir un excès de radicaux libres a été mise en évidence par la mesure d'une augmentation des superoxydes en présence d'un ARN antisens dirigé contre UCP2 (Duval et al. 2002).

3.2.10. Régulation du stress oxydatif par la mitochondrie

La mitochondrie est un lieu de formation des radicaux libres oxygénés, au niveau de la chaîne respiratoire et de l' α -cétoglutarate-déshydrogénase (Adam-Vizi 2005). Elle permet aussi la détoxification des radicaux libres au niveau de l'ubiquinone, des superoxydes dismutases 1 et 2 (SOD), de la glutathion peroxydase 4 et de la glutathion réductase. De plus, elle régule la formation des radicaux libres au niveau des protéines découplantes mitochondriales.

Le stress oxydatif est probablement un élément mécanistique participant à la neurodégénérescence notamment dans les pathologies neurodégénératives chroniques associées à des dysfonctions mitochondriales comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer (Beal 2004b), la SLA (Beal 2001) et la maladie de Huntington (Browne et al. 1999) mais aussi dans les pathologies potentiellement associées à l'excitotoxicité (Coyle and Puttfarcken 1993). Les anomalies du stress oxydatif dans les maladies neurodégénératives seront abordées dans le chapitre excitotoxicité (paragraphe 4.10.3).

3.2.10.1. Formation des radicaux libres au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale est le lieu de génération de radicaux libres oxygénés (ROS). Il est en effet estimé qu'un à quatre pourcents de l'oxygène moléculaire O_2 se retrouvent réduits par un électron e^- sous la forme d'un anion superoxyde O_2^- (Boveris 1977). Il est encore actuellement difficile d'isoler les sites de formation de ces radicaux libres, mais il est nécessaire pour cela d'apporter des substrats et d'avoir des coenzymes d'oxydoréduction capables de transférer un électron sur l'oxygène moléculaire (Adam-Vizi 2005). Dans les mitochondries isolées à partir de cerveau, la production de ROS existe au repos et le taux de production de ROS est différent selon le substrat apporté, c'est-à-dire le succinate ou le glutamate/malate (Adam-Vizi 2005). Elle aurait lieu au niveau des complexes I et III, lors d'un apport de succinate et en présence d'un inhibiteur du complexe I, la roténone ou en présence d'un inhibiteur du complexe III, l'antimycine A (Kudin et al. 2004).

Le mécanisme de formation des ROS au niveau du complexe I n'est pas totalement élucidé, mais il pourrait avoir lieu au niveau des FMN (Liu et al. 2002; Kudin et al. 2004), des centres Fer-Soufre et de la semiquinone QH^- , intermédiaire de la formation de l'ubiquinol (Figure 46) (Kudin et al. 2004; Adam-Vizi 2005). La production de radicaux libres par les mitochondries du cerveau serait plutôt associée au site FMN car sa production est inhibé par le diphenylèneiodonium, inhibiteur spécifique de ce site (Liu et al. 2002).

Le complexe III est le lieu de formation de radicaux libres sous forme de superoxydes, particulièrement important dans le cœur et les poumons mais aussi dans le cerveau, l'inhibiteur de la réoxydation du cytochrome b du complexe III, l'antimycine A ne bloque pas

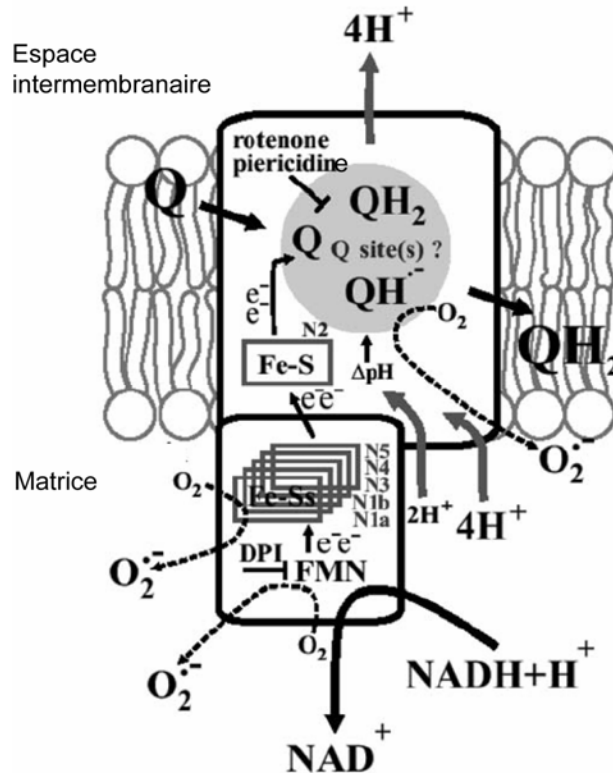


Figure 46 : Sites possibles de formation de ROS au niveau du complexe I

La génération de superoxydes au niveau du complexe I peut se faire à trois niveaux : la sous-unité contenant la flavine FMN, les centres Fer-Soufre et la semiquinone. FMN : Flavine mononucléotide, DPI : diphenylèneiodonium, Fe-S : centre Fer-Soufre, Q : ubiquinone, QH⁻ : semiquinone, QH₂ : ubiquinol. Schéma tiré de (Adam-Vizi 2005)

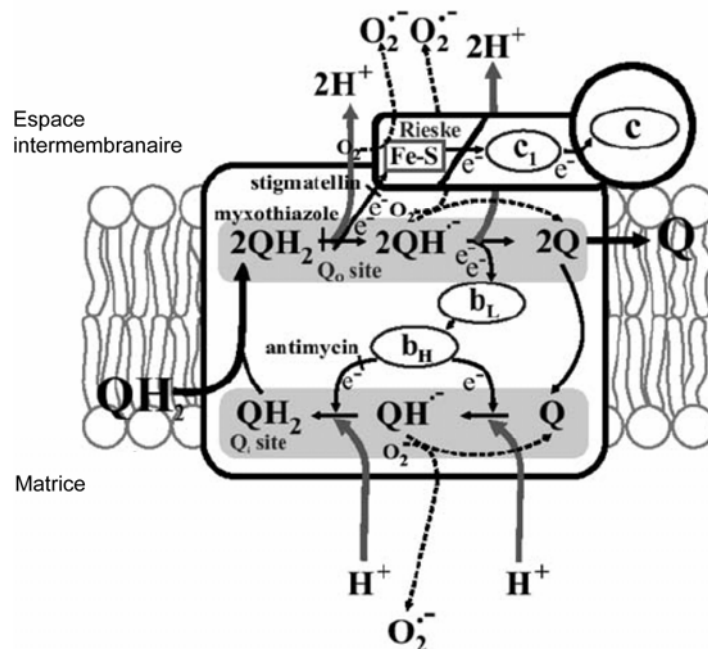


Figure 47 : Complexe III et sites de formation des ROS

La génération de superoxydes au niveau du complexe III peut se faire à deux niveaux : les centres Fer-Soufre et la semiquinone. Schéma tiré de (Adam-Vizi 2005)

la production de superoxydes en présence de succinate (Votyakova and Reynolds 2001). Au contraire, le myxothiazole, inhibiteur de la fixation de l'ubiquinol sur le complexe III et I bloque la formation de radicaux libres donc l'ubiquinol pourrait être le métabolite principal responsable de la formation des radicaux libres (Votyakova and Reynolds 2001). Le mécanisme de formation des ROS au niveau du complexe III pourrait avoir lieu au niveau des complexes Fer-Soufre et de la semiquinone (Figure 47) (Adam-Vizi 2005).

3.2.10.2. α -cétoglutarate déshydrogénase et formation de radicaux libres

l' α -cétoglutarate déshydrogénase est une enzyme du cycle de Krebs catalysant la décarboxylation oxydative de l' α -cétoglutarate en présence de CoA en succinylCoA, CO₂ et NADH (Figure 48). Elle est impliquée dans la formation de radicaux libres comme les superoxydes et H₂O₂, dans les mitochondries isolées à partir de cerveau (Starkov et al. 2004). C'est un complexe multi-enzymatique comportant trois types d'enzyme : l' α -cétoglutarate déshydrogénase (E1), la dihydrolipoamide succinyltransférase (E2) et la lipoamide déshydrogénase (E3). La production d'H₂O₂ est maximale quand le rapport NADH/ NAD⁺ est élevé et se ferait au niveau de E3 (Tretter and Adam-Vizi 2004).

3.2.10.3. Détoxification des radicaux libres

Plusieurs systèmes enzymatiques mitochondriaux, comme les superoxyde dismutases 1 et 2 (SOD), la glutathion peroxydase 4 et la glutathion réductase, sont impliqués dans la détoxification des radicaux libres.

La SOD1 est une enzyme de 15,8 kDa codée par le chromosome 21, fixant un ion Cu⁺ et un ion Zn⁺ par sous-unité, catalysant la détoxification de deux ions superoxydes en présence de 2H⁺ en un peroxyde d'hydrogène et O₂ (Figure 49) (Lieman-Hurwitz et al. 1982).

La SOD 2 est une protéine de 24,7 kDa homotétramérique matricielle codée par le chromosome 6, liant un ion Mn²⁺ par sous-unité (Beck et al. 1987).

La glutathion peroxydase 4 est l'isoforme de 22,1 kDa codée par le chromosome 19 (Kelner and Montoya 1998), présente dans la matrice mitochondriale après initiation au niveau des méthionines 1 et 28, catalysant la réaction de détoxification des lipides hydroperoxydés. Elle permet en présence du glutathion réduit, la transformation du lipide peroxydé en lipide et glutathion oxydé (Figure 50).

La glutathion réductase est une enzyme homodimérique de 56 kDa codée par le chromosome 8 et exprimé dans le cytosol et la mitochondrie selon l'initiation (Kelner and Montoya 2000). Elle lie un FAD et un NADPH par sous-unité et catalyse la formation de glutathion oxydé et de NADPH, H⁺ en présence de NADPH et glutathion réduit (Figure 51).

3.3. Régulation de la mort cellulaire par la mitochondrie dans les maladies neurodégénératives

La mitochondrie est un lieu de régulation de la mort cellulaire neuronale et d'orientation vers un type de mort apoptotique (Sastry and Rao 2000; Polster and Fiskum 2004) ou nécrotique (Ankarcrona et al. 1995; Liu et al. 2004b), ou autophagique (Lemasters et



Figure 48 : Réaction catalysée par l' α -cétoglutarate déshydrogénase

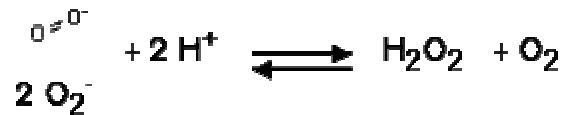


Figure 49 : Réaction catalysée par les superoxide dismutases 1 et 2

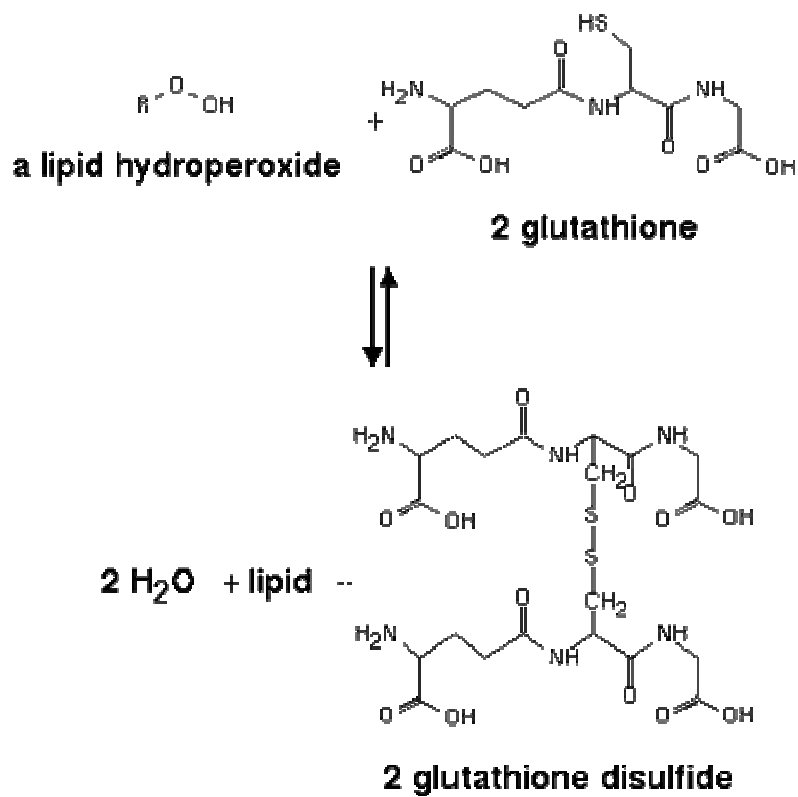


Figure 50 : Réaction catalysée par la glutathion peroxydase

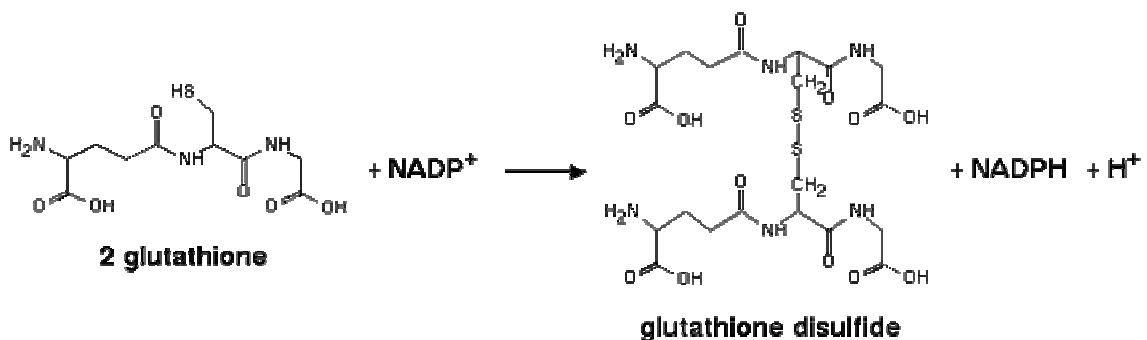


Figure 51 : Réaction catalysée par la glutathion réductase

al. 1998). La régulation de l'apoptose par les mitochondries fait intervenir différentes protéines membranaires participant à la formation de canaux, permettant la perméabilité transitoire mitochondriale (mPT) et la relocalisation cytosolique de protéines proapoptotiques activant de caspases effectrices. A côté de cette cascade d'activation de mort cellulaire, des protéines antiapoptotiques de la famille de bcl-2 sont chargées d'inhiber la mort neuronale par une action au niveau de la membrane externe mitochondriale. La régulation de la nécrose par la mitochondrie se fait au niveau de la régulation du calcium et de la perméabilisation membranaire (Liu et al. 2004b). La régulation de l'autophagie peut aussi se faire au niveau de la mitochondrie, par la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Lemasters et al. 1998).

3.3.1. Mécanisme de la perméabilisation membranaire mitochondriale

Les protéines pouvant participer à la formation des canaux responsables de la libération de protéines proapoptotiques sont de deux types, le pore de transition de perméabilité dépendant du calcium (PTP) (Szabo and Zoratti 1993) et les canaux formés par Bax (Dejean et al. 2005). Le PTP est une structure multiprotéique pas totalement éclaircie dont les composants sont le canal anionique dépendant du voltage (VDAC), dans la membrane externe mitochondriale (Colombini 2004), la translocase à adénine (ANT) dans la membrane interne mitochondriale (Nury et al. 2006). Ils seraient associés à leur tour avec la protéine IBP (isoquinoline binding protein), constituant des récepteur des benzodiazépines (PBR) (McEnery et al. 1992). L'ANT et le VDAC, associées avec des protéines cytosoliques comme l'hexokinase cytosolique et à la glycérol kinase cytosolique, la créatine kinase et à l'adénylate kinase de l'espace intermembranaire, la cyclophiline D dans la matrice constitueraient le PTP (Figure 52)(Szabo and Zoratti 1993).

Le VDAC est un canal anionique, activé par une dépolarisation et permettant le passage de petites molécules hydrophiles de poids inférieur à 10 kDa et des ions (Colombini 2004). Il est plutôt sélectif aux anions mais permet aussi le passage de Na^+ , de K^+ et de Ca^{2+} . Il est imperméable aux anions organiques comme les substrats de la chaîne respiratoire comme le pyruvate, le citrate et le succinate (succinate^{2-}) ainsi que le phosphate de créatine (PC^{2-}), l'ATP (ATP^{4-}), l'ADP et le Pi ($\text{H}_3\text{PO}_4^{2-}$). L'ANT est une protéine perméable aux nucléotides à adénine, régulant l'échange de l'ADP cytosolique essentiel à la phosphorylation oxydative mitochondriale contre l'ATP de la matrice mitochondrial, essentiel à la plupart des réactions enzymatiques demandeuses d'énergie (Nury et al. 2006). En parallèle, l'ANT est associée à la cardiolipine dont la peroxydation, permettant la libération du cytochrome c par le VDAC, lors d'un stress oxydatif (Nakagawa 2004). La cyclophiline D dans la matrice est impliquée dans la régulation de la nécrose neuronale induite par le NO (Li et al. 2004b). L'IPB, au niveau de la membrane externe mitochondriale, est associé à l'ouverture du PTP, à la phase initiale de l'apoptose et au stress oxydatif dans les cellules neuronales en culture (Jayakumar et al. 2002; Jorda et al. 2005). Il interviendrait par régulation de la phosphorylation de protéines par la calcium-calmoduline kinase et la PP2B sous le contrôle du PTP et du calcium (Azarashvili et al. 2005).

L'ouverture du PTP est conditionnée par une forte concentration du Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale ou un stress oxydatif (Saris and Carafoli 2005). Sa perméabilité est régulée par le glutamate, le NADH, le NADPH, l'ATP, l'état de phosphorylation par la PKA, l'actine G, la famille des protéines Bcl-2 dont Bcl-x_L, la chaîne légère de la dynéine et HSP70

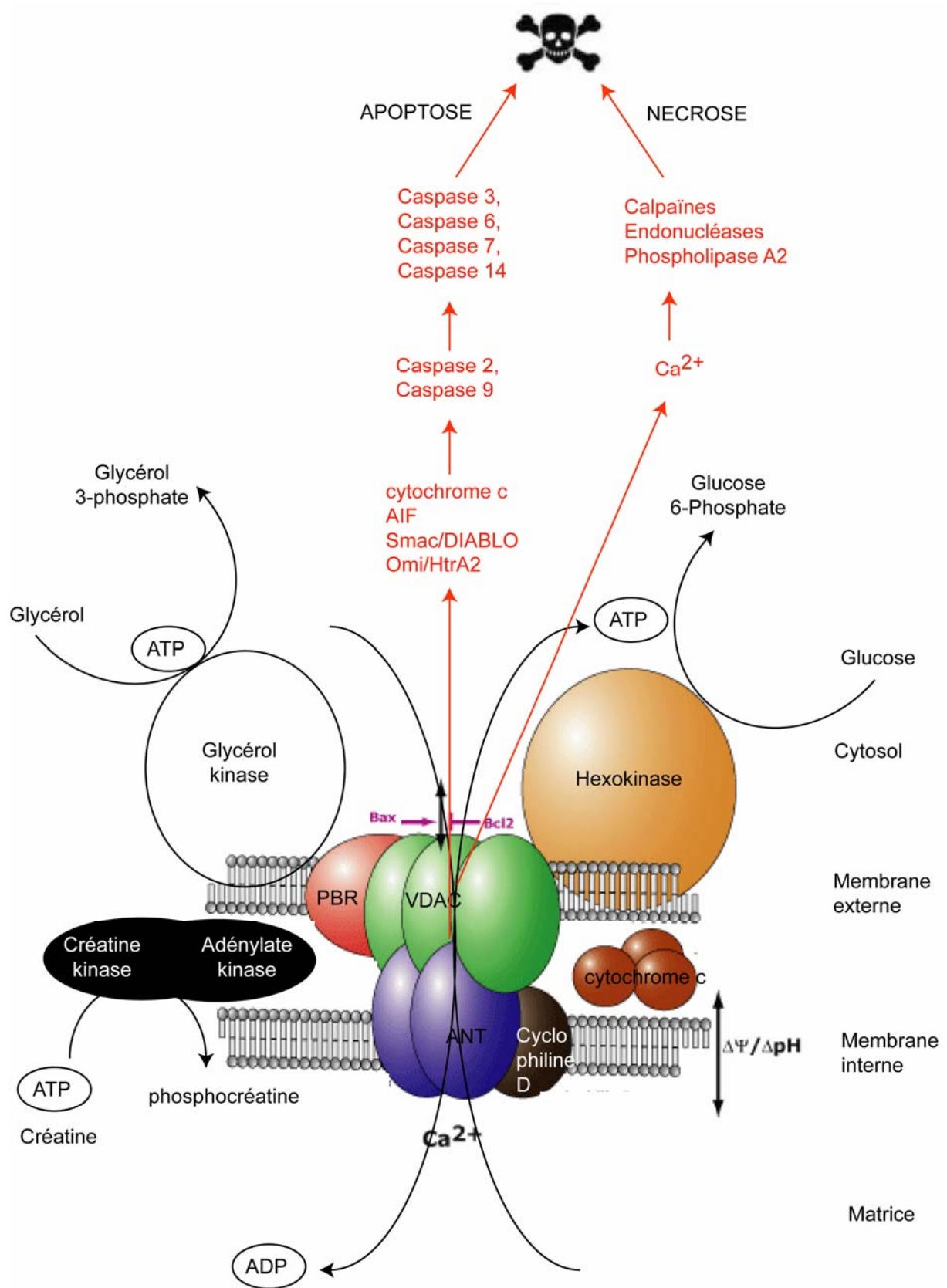


Figure 52 : PTP

Structure du PTP adapté de http://www.mitosciences.com/other_complex.html

mitochondriale (Colombini 2004). Le PTP est impliqué dans la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose selon le niveau d'ATP (Leist et al. 1997). Il induit la libération du cytochrome c et de AIF (apoptosis inducing factor) dans le cytosol à partir de l'espace intermembranaire (Cai et al. 1998) et l'activation des caspases 2 et 9 (Susin et al. 1999a).

Le second type de canal est formé par Bax, protéine cytosolique se relocalisant à la membrane externe mitochondriale, avec ou sans porine, sous forme de polymère constituant le MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel), perméable au cytochrome c intermembranaire et permettant l'initiation de l'apoptose (Dejean et al. 2005).

3.3.2. Protéines proapoptotiques libérés dans le cytosol

Les protéines proapoptotiques libérées dans le cytosol à partir de l'espace intermembranaire par la mitochondrie sont le cytochrome c (Liu et al. 1996), AIF (apoptosis inducing factor) (Susin et al. 1999b) ainsi que de Smac/DIABLO (Du et al. 2000) et de Omi/HtrA2 (Suzuki et al. 2001; Suzuki et al. 2004).

Le cytochrome c active la formation de l'apoptosome par liaison et activation de APAF1 (Zou et al. 1997) et de la procaspase 9 grâce à l'ATP (Li et al. 1997a), activant ensuite la caspase 3. AIF a une action directe sur le noyau en induisant la condensation nucléaire (Susin et al. 1999b). Smac/DIABLO active la procaspase 9 par liaison de ses inhibiteurs IAP comprenant XIAP (inhibitor of apoptosis protein X-linked), c-IAP1 et c-IAP2 et la survivine (Du et al. 2000) et la caspase 3 (Chai et al. 2000). Omi a pour substrat non spécifique la β -caséine et joue un rôle proapoptotique lors de sa libération de l'espace intermembranaire, permettant sa fixation inhibitrice sur XIAP avec induction de l'activation de caspases et mort cellulaire atypique (Suzuki et al. 2001; Suzuki et al. 2004). Les caspases effectrices activées par les protéines proapoptotiques et la caspase 9 initiateur sont les caspases 3, 6, 7 et 14 (Thornberry and Lazebnik 1998).

3.3.3. Perméabilité transitoire mitochondriale et maladies neurodégénératives

L'ouverture du PTP interviendrait dans l'ischémie cérébrale car l'inactivation du gène de la cyclophiline D (Schinzel et al. 2005) ou l'utilisation de la cyclosporine A, inhibiteur du pore sont efficaces à bloquer la mort cérébrale (Butcher et al. 1997). Dans les modèles *in vitro* de la maladie de Parkinson, la cyclosporine permet l'inhibition de l'apoptose induite par le MPP⁺ (Seaton et al. 1998). Une augmentation de la mPT induite par le calcium a été observée au niveau des mitochondries des lymphoblastes des patients atteints de la maladie de Huntington (Panov et al. 1999; Panov et al. 2002). La cyclosporine A protège partiellement de la libération du cytochrome c par les mitochondries en présence d'APP, protéine impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Kim et al. 2002). Dans le modèle murin de la SLA, la cyclosporine A allonge la survie des souris (Keep et al. 2001). Par ailleurs, l'augmentation de la fixation du ligand des PBR, PK-11195 dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Owen et al. 1983; McGeer et al. 1988) est compatible avec une augmentation d'expression du PTP.

La surexpression de Bax dans les régions lésées des cerveaux de patients atteints de maladies neurodégénératives chroniques est en faveur de l'implication de Bax dans la

libération du cytochrome c dans la maladie de Parkinson ([Hartmann et al. 2001a](#)), la maladie d'Alzheimer ([Paradis et al. 1996](#)).

3.3.4. Protéines proapoptotiques mitochondriales libérées dans les maladies neurodégénératives

La libération du cytochrome c serait impliquée dans l'ischémie cérébrale, dans la maladie de Parkinson, la SLA et la maladie d'Alzheimer.

En effet, l'expression du cytochrome c est augmentée dans les neurones en voie de dégénérescence dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat ([Krajewski et al. 1995](#); [Cao et al. 2001](#)). Par ailleurs, le cytochrome c se relocalise dans le cytosol et permet l'activation de la caspase 9, de la caspase 8 et de la caspase 3 dans le modèle de maladie de Parkinson induit par l'inhibition du complexe I mitochondrial par le MPP⁺ ([Cassarino et al. 1999](#); [Hartmann et al. 2001b](#); [Viswanath et al. 2001](#)). Par ailleurs, le cytochrome c est libéré dans le cytosol dans un modèle murin de SLA ([Zhu et al. 2002](#)) ainsi que par les mitochondries du cortex de souris après ajout de l'APP ([Kim et al. 2002](#)).

La translocation d'AIF dans le noyau interviendrait dans l'ischémie et dans l'excitotoxicité, car a été observée dans un modèle d'ischémie chez le rat ([Cao et al. 2003](#)) et dans une culture corticale en présence de NMDA ([Wang et al. 2004](#)).

La libération de smac/DIABLO dans le cytosol interviendrait dans la maladie d'Alzheimer et l'ischémie cérébrale. En effet, il est libéré dans le cytosol, dans un modèle de cellules endothéliales exprimant la forme toxique de l'APP ([Yin et al. 2002](#)) et dans un modèle murin d'ischémie cérébrale ([Shibata et al. 2002](#)).

La mutation non-sens du gène du chromosome 6 codant la protéine Omi est associée chez la souris *mnd2* (motor neuron degeneration 2) à une neurodégénérescence striatale, accompagnée d'une astrogliose et d'une activation microgliale et évoluant vers la mort à 4 semaines ([Rathke-Hartlieb et al. 2002](#)). Les symptômes associés à cette neurodégénérescence sont proches de ceux de la maladie de Huntington et incluent des mouvements anormaux involontaires, des positions anormales et une akinésie ([Jones et al. 2003](#)). Cette mutation est associée à une diminution de l'activité sérine-protéasique qui a pour conséquence l'augmentation de la sensibilité de la mitochondrie au stress avec augmentation de la probabilité d'ouverture du PTP et formation de radicaux libres ([Jones et al. 2003](#)). Par ailleurs, la mutation de la protéine Omi est associée à une augmentation du risque de développer une maladie de Parkinson ([Strauss et al. 2005](#)).

3.4. Dysfonctions mitochondriales et maladie de Huntington

Plusieurs types de dysfonctions mitochondriales sont associés à la maladie de Huntington et trois éléments sont en faveur de l'induction de dysfonctions mitochondriales par l'huntingtine mutée. En premier lieu, des anomalies ultrastructurales ont été observées en microscopie électronique dans le striatum des patients atteints précocement de la maladie ([Goebel et al. 1978](#)). Deuxièmement, l'huntingtine mutée se relocalise vers les mitochondries notamment sous forme d'agrégats chez les souris YAC72 (Figure 53a) et pas chez les souris YAC18 (Figure 53b) ([Panov et al. 2002](#)). Troisièmement, des anomalies de transport des mitochondries sont observées dans des cultures primaires corticales exprimant l'huntingtine mutée ([Chang et al. 2006](#)) et dans les neurites des MSN de souris YAC72 ([Trushina et al. 2004](#)). Ces anomalies de transport des mitochondries semblent en outre associées à la

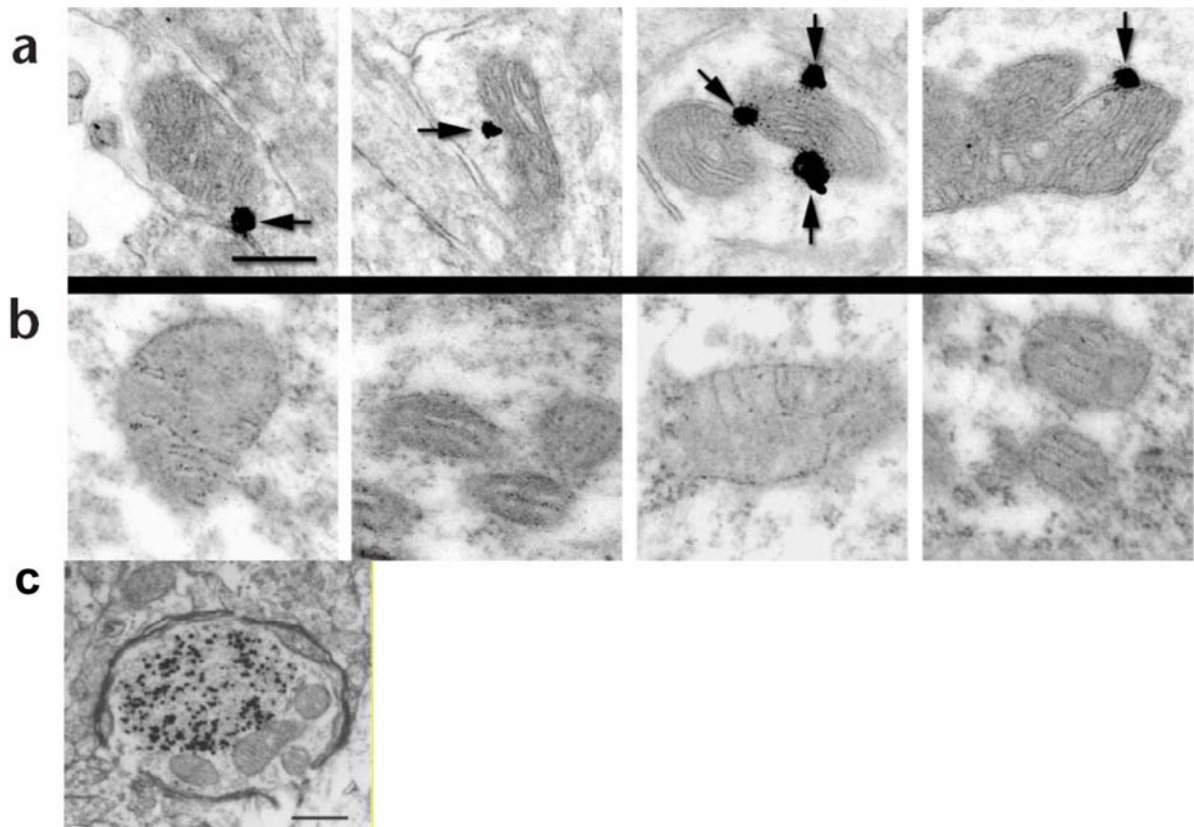


Figure 53 : Localisation de l'huntingtine mutée sous forme d'agrégats à la membrane mitochondriale

Mitochondries de cerveau de souris YAC72 (a) et YAC18 (b) visibles en microscopie électronique après un marquage de l'huntingtine mutée avec l'anticorps EM48. Flèches montrant 2 à 5 particules d'immunogold (Panov et al. 2002). C accumulation des mitochondries dans la section entière de l'axone en présence des agrégats d'huntingtine dans le cerveau de souris Hdh150CAG à 9 mois. Echelle de 1µm en a, b et 5µm en c.

présence d'agrégats d'huntingtine, observées dans les culture striatale et dans le cerveau des souris KI Hdh150, dont la section axonale montre une accumulation de mitochondries parallèle à un remplissage quasi complet de la section de l'axone par les agrégats (Figure 53c) (Li et al. 2003).

3.4.1. Perméabilité transitoire mitochondriale et libération de protéines proapoptotiques dans maladie de Huntington

Deux types de libérations de protéines proapoptotiques seraient mis en jeu dans la maladie de Huntington, via le PTP et via le canal de multimère de Bax. L'ouverture du PTP interviendrait dans la maladie de Huntington car l'utilisation de la cyclosporine A, inhibiteur du pore est efficace dans des modèles de dysfonction mitochondriale mimant la maladie de Huntington (Leventhal et al. 2000). De plus l'augmentation de la fixation du ligand des PBR, PK-11195 dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Huntington est en faveur d'une augmentation de l'expression du PTP (Messmer and Reynolds 1998). En parallèle l'injection de ce ligand permet l'atténuation de lésion excitotoxique hippocampale induite par l'injection de kainate chez la souris (Veenman et al. 2002) ou par l'injection de quinolinate dans le striatum de rat (Ryu et al. 2005). La surexpression de Bax dans le striatum du modèle rongeur 3-NP de la maladie de Huntington et dans le striatum de patients atteints de la maladie de Huntington impliquerait le MAC dans la libération de facteurs proapoptotiques (Vis et al. 2005).

Les protéines proapoptotiques libérées par la mitochondrie potentiellement impliquées dans la maladie de Huntington sont le cytochrome c, smac/DIABLO et Omi. En effet, la libération cytosolique du cytochrome c est observée dans une lignée cellulaire exprimant l'huntingtine mutée (Jana et al. 2001), dans les cellules striatales de souris KI (Choo et al. 2004) et dans le striatum de rat intoxiqués par le 3-NP (Antonawich et al. 2002; Bizat et al. 2003b). Enfin smac/DIABLO comme la protéine Omi seraient impliquées dans la maladie de Huntington car elle sont anormalement relocalisées dans le cytosol des cellules exprimant l'huntingtine mutée (Goffredo et al. 2005).

3.4.2. Dysfonctions métaboliques dans la maladie de Huntington

Les dysfonctions métaboliques observées dans les modèles de la maladie ou dans la maladie de Huntington concernent des modifications de la quantité de métabolites, la dysfonction de la PDH, du catabolisme des acides gras, du cycle de Krebs, des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et du catabolisme de la glutamine.

3.4.2.1. Modification de la quantité de métabolites

Un déficit du métabolisme du glucose a été mis en évidence par TEP au FDG, chez le patient atteint de la maladie de Huntington avant l'apparition d'une atrophie du noyau caudé et du putamen (Kuhl et al. 1982).

Un déficit de taux d'ATP a été observé dans les cultures de cellules striatales de souris KI pour l'huntingtine mutée (Milakovic and Johnson 2005; Seong et al. 2005). De plus, Chez le patient atteint de la maladie de Huntington, la réduction du taux d'ATP a été observé par spectroscopie RMN, au niveau du muscle au repos ou après un effort (Lodi et al. 2000; Saft et

al. 2005). De même une diminution du ratio phosphocréatine/Pi est observé dans les muscles au repos chez le patient atteint de la maladie de Huntington (Koroshetz et al. 1997).

Une augmentation du taux de lactates et une diminution du taux de pyruvates a été observé par spectroscopie RMN dans le striatum (Jenkins et al. 1993; Jenkins et al. 1998) et le LCR (Koroshetz et al. 1997) des patients atteints de la maladie de Huntington.

Une diminution du citrate et du lactate a été observé par spectroscopie RMN dans le LCR des patients atteints de la maladie de Huntington, ce qui signerait la dysfonction de la glycolyse et du cycle de Krebs (Garseth et al. 2000).

3.4.2.2. Dysfonction de la PDH

Une réduction de l'activité de l'activité de la PDH, catalysant la formation d'acétylCoA, a été observée dans des échantillons *post mortem* de noyau caudé et de putamen, mais pas dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Huntington (Sorbi et al. 1983). De plus, la baisse d'activité dans le noyau caudé des patients est proportionnelle à l'évolution de la maladie (Butterworth et al. 1985).

3.4.2.3. Dysfonction du catabolisme des acides gras

Plusieurs éléments sont en faveur d'un défaut de métabolisme des acides gras dans la maladie de Huntington. La culture de fibroblastes de patients en milieu sérique déplété en acides gras est beaucoup plus lente que celle des sujets sains et elle peut être restaurée par l'ajout d'acide linoléique et linoléique, acides gras à longue chaîne (C18) (Menkes and Hanoch 1977). Il a aussi été montré une association entre un déficit de complexe II mitochondrial respiratoire et un blocage de l'oxydation des acides gras relié à un dysfonctionnement de l'acylCoA déshydrogénase à chaîne courte (C6 et C4) ou SCAD et de l'acylCoA déshydrogénase à chaîne moyenne (C4 à C12) MCAD (Gargus et al. 2003). Il est donc possible que des défauts de β -oxydation mitochondriale soient présents dans la maladie de Huntington, en conséquence de la dysfonction du complexe II.

3.4.2.4. Dysfonction du cycle de Krebs

La vitesse du cycle de Krebs semble réduite dans certains modèles de la maladie de Huntington et une diminution de l'activité de certaines enzymes du cycle de Krebs comme l' α -cétoglutarate déshydrogénase, la succinate déshydrogénase (paragraphe suivant) et l'aconitase est observée dans la maladie de Huntington. La vitesse du cycle de Krebs est réduite par le 3-NP avec une accumulation du succinate provenant du catabolisme du glucose marqué au carbone 13 dans les neurones GABAergiques striataux de souris (Hassel and Sonnewald 1995). Au contraire, le cycle de Krebs astrocytaire ne semble pas perturbé car l'accumulation de succinate astrocytaire, formé à partir de l'acétate marqué au carbone 13 est faible (Hassel and Sonnewald 1995). Une réduction de l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase, catalysant la décarboxylation de l' α -cétoglutarate en succinylCoA est observée dans des échantillons *post mortem* de putamen de patients atteints de la maladie de Huntington (Klivenyi et al. 2004). L'activité de l'aconitase 2 ou l'aconitate hydratase, catalysant l'hydratation de cis-aconitate en isocitrate, est spécifiquement réduite dans les échantillons *post mortem* de noyau caudé (8%), de putamen (27%) et de cortex frontal et

temporal (52%) de patients atteints de la maladie de Huntington (Tabrizi et al. 1999). Elle n'est pas modifiée dans le cervelet de ces mêmes patients (Tabrizi et al. 1999).

3.4.2.5. Dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les dysfonctions de la chaîne respiratoire mitochondriale dans la maladie de Huntington touchent principalement la SDH et secondairement les complexes I, III et IV ainsi que l'ubiquinone.

La réduction de l'activité de la SDH serait la principale étiologie du déficit énergétique observé dans la maladie de Huntington. En effet, l'oxydation du succinate, reflet de l'activité combinée du ComplexeII-III, est réduite de 39% dans des homogénats *post mortem* de noyau caudé et de cortex de 4 patients décédés de la maladie de Huntington (Brennan et al. 1985). De même, l'inhibition combinée de l'activité du ComplexeII-III atteint 53-59% dans des homogénats *post mortem* de noyau caudé de 10 patients atteints de la maladie de Huntington (Gu et al. 1996). Cette inhibition n'est pas observée au niveau des plaquettes de ces mêmes patients et semble donc présente qu'au niveau du cerveau (Gu et al. 1996). Par la suite, des études ont évalué l'activité de la SDH en fonction des stades de la pathologie. Ainsi, une réduction de l'activité de la SDH a été mise en évidence dans le striatum de 8 patients atteints de la maladie de Huntington, décédés au stades 0/1 (Seo et al. 2004). D'autre part, une étude a montré l'absence de réduction de l'activité de la SDH au stade présymptomatique, suivie d'une diminution de l'activité de la SDH de 20% dans le putamen au stade II pour atteindre une réduction de 64% dans le néostriatum (Guidetti et al. 2001). Par ailleurs, l'extraction des mitochondries de différentes régions cérébrales issues de 18 patients de grade III et IV, a mis en évidence une réduction spécifique de l'activité des complexe II/III au niveau du noyau caudé (29%) et du putamen (67%), non observée au niveau du cortex frontal, pariétal et du cervelet (Browne et al. 1997). Il y a donc une corrélation entre la neurodégénérescence spécifique du noyau caudé et du putamen et la réduction de l'activité du complexeII/III. D'autre part, l'expression des deux sous-unités catalytiques du complexe II, la SDHA et B est réduite dans le noyau caudé et le putamen des patients (Benchoua et al. 2006). Il a aussi été montré que l'expression de l'huntingtine mutée dans des cultures primaires striatales est associée à une diminution de l'expression de la SDH précédant la neurodégénérescence cellulaire (Benchoua et al. 2006). De plus, la surexpression de l'une ou l'autre des sous-unités catalytique permet d'induire une neuroprotection dans un modèle cellulaire exprimant l'huntingtine mutée (Benchoua et al. 2006).

Une diminution de l'activité du complexe I a été mise en évidence dans les plaquettes de patients atteints de la maladie de Huntington. Par contre, au niveau des régions cérébrales lésées dans la maladie de Huntington, l'activité du complexe I ne semble pas réduite (Gu et al. 1996; Browne et al. 1997).

Une réduction de l'activité du complexe IV mitochondrial atteint 32% dans des homogénats *post mortem* de noyau caudé de 10 patients atteints de la maladie de Huntington (Gu et al. 1996). Au contraire, au niveau des plaquettes, une augmentation de l'activité du complexe IV de 64% a été observée (Gu et al. 1996). Par la suite, une extraction des mitochondries de différentes régions cérébrales issues de 18 patients de grade III et IV, a permis de mettre en évidence une réduction spécifique de l'activité des complexe IV au niveau du putamen (62%), non observée au niveau du noyau caudé ni du cortex frontal, pariétal et du cervelet (Browne et al. 1997).

Un déficit en ubiquinone pourrait exister dans la maladie de Huntington car une réduction du taux de l'ubiquinone a été observée dans le sérum des patients atteints de la maladie de Huntington (Kumar and Kurup 2002). D'autre part, l'ubiquinone s'est montrée neuroprotectrice chez les souris R6/2 (Ferrante et al. 2002) et est en cours d'évaluation chez les patients atteints de la maladie de Huntington.

3.4.2.6. Dysfonction du catabolisme de la glutamine

Un déficit de l'activité de la glutaminase activée par le phosphate, enzyme de la dégradation de la glutamine et principale voie de synthèse du neurotransmetteur glutamatergique (Torgner and Kvamme 1990), a été observé dans les échantillons *post mortem* de noyau caudé des patients atteints de la maladie de Huntington (Butterworth et al. 1985). Par ailleurs, l'augmentation de l'acide kynurénique dans le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington pourrait être consécutif à une réduction de l'activité de la glutamine aminotransférase K ou kynurénine aminotransférase I (KAT I), enzyme de dégradation de la glutamine, de la dégradation du tryptophane et de conjugaison des alcanes ou des alcènes. (Cooper et al. 1993).

3.4.2.7. Dysfonction de la navette carnitine/acylcarnitine

Une dysfonction de la navette carnitine/acylcarnitine pourrait exister dans la maladie de Huntington, secondairement à la diminution de l'activité de la SDH. En effet, les patients atteints d'une mutation du complexe II mitochondrial ont une réduction du niveau de carnitine dans le muscle (Arpa et al. 1994) et la L-carnitine a un effet neuroprotecteur dans le modèle de la maladie de Huntington induit par l'injection du 3-NP chez le rat (Binienda et al. 2004).

3.4.3. Maladie de Huntington et défaut de gestion du calcium par la mitochondrie

Différents défauts de signalisation calcique neuronale ont été mis en évidence dans la maladie de Huntington (Bezprozvanny and Hayden 2004). Le premier défaut de signalisation calcique mis en évidence chez les patients atteints de la maladie de Huntington, est l'existence d'une dépolarisation membranaire mitochondriale anormale des lymphoblastes en présence de calcium (Panov et al. 2002). Il faut moins de calcium pour obtenir une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial chez le patient que chez le sujet sain (Panov et al. 2002). En effet, pour observer un même niveau de dépolarisation, il faut une concentration de calcium de 30 nmoles/mg chez les patients déclarant la maladie précocement, contre 65 nmoles/mg chez les patients atteints de la forme classique et 100 nmoles/mg chez les sujets sains (Panov et al. 2002). En parallèle, une augmentation de la sensibilité de la membrane mitochondriale à la dépolarisation en présence de calcium, est observé dans les mitochondries de cerveau de souris YAC72 par rapport aux souris YAC18, avec un effet directement proportionnel au taux d'expression de l'huntingtine mutée (Panov et al. 2002). De même, l'huntingtine mutée augmente la mPT induite par le calcium dans un système cellulaire (Choo et al. 2004).

3.5. Dysfonctions mitochondriales et maladies neurodégénératives autres que la maladie de Huntington

Des dysfonctions mitochondriales consécutives à une mutation génétique d'une protéine exprimée au niveau mitochondrial sont associées à des maladies caractérisées par une symptomatologie principale neurologique.

D'autre part, certaines maladies neurodégénératives sont associées à une mutation génétique responsable d'une relocalisation mitochondriale anormale de la protéine et/ou d'une dysfonction mitochondriale.

Enfin, les maladies neurodégénératives liées à l'âge sont souvent associées à des dysfonctions mitochondriales.

3.5.1. Mutation de gènes codant des protéines mitochondriales associée à des symptômes neurologiques

Différents types de gènes nucléaires ou mitochondriaux sont associés à des maladies neurologiques, lorsqu'ils sont mutés. Parmi ceux-ci, on retrouve l'ADN polymérase 1 impliquée dans la réplication de l'ADN mitochondrial, des protéines de transport de métabolites et de protéines, des sous-unités de complexes respiratoires mitochondriaux, la pyruvate déshydrogénase, des enzymes du cycle de Krebs et du métabolisme des acides gras et des corps cétoniques.

3.5.1.1. Maladies neurodégénératives associées à la mutation de l'ADN polymérase

L'ADN polymérase γ mitochondriale hétérodimérique, assurant la réplication de l'ADNmt est mutée au niveau de la sous-unité 1 POLG1 de 139,5 kDa (Ropp and Copeland 1996), codée par le chromosome 15 dans différentes pathologies neurodégénératives :

- Une ophtalmoplégie progressive externe (Lamantea et al. 2002) ;
- Une forme de Parkinsonisme visible en imagerie TEP par la perte dopaminergique (Luoma et al. 2004) ;
- Une neuropathie sensorielle ataxique et épilepsie avec perte neuronale détectée dans le cervelet et le thalamus en IRM (Van Goethem et al. 2004; Winterthun et al. 2005) ;
- Un syndrome hépatocérébral infantile (Ferrari et al. 2005).

3.5.1.2. Maladies neurodégénératives associées à la mutation de transporteurs mitochondriaux

Des maladies neurodégénératives sont associées à la mutation de Tim8A, du transporteur du 2-oxoadipate, du transporteur du citrate, du transporteur de l'ornithine et du transporteur des déoxynucléotides.

La mutation de Tim 8A, protéine de l'espace intermembranaire participant à l'assemblage du complexes d'import des protéines de la membrane interne Tim 23, codée par

le chromosome X, est associée au syndrome de Mohr-Tranebjaerg, maladie neurodégénérative caractérisée par une surdité neurosensorielle pré- ou post-verbale, une dystonie progressive et des troubles de la vision (Tranebjaerg et al. 1995; Jin et al. 1996). Des symptômes psychiatriques, des difficultés d'apprentissage et des troubles du comportement peuvent également être présents.

Chez l'homme, les retards mentaux et épilepsies accompagnés d'une acidurie au 2-oxoadipate (Casey et al. 1978; Hasbini et al. 2001) pourraient être la conséquence d'une mutation du transporteur du 2-oxoadipate, codé par le chromosome 14 (Fiermonte et al. 2001).

L'hémizygotie du transporteur du citrate, transportant les acides tricarboxyliques comme codé par le chromosome 22, pourrait être à l'origine du syndrome de Di-George caractérisé par un déficit mental (Heisterkamp et al. 1995).

Les mutations de l'isoforme1 du transporteur de l'ornithine, codé par le chromosome 13 (Camacho et al. 1999), sont responsables d'une maladie récessive autosomique, le syndrome HHH pour hyperornithinémie-hyperammoniémie-hypercitrullinurie. C'est un syndrome caractérisé par un retard mental et retard de croissance et de développement avec des périodes de confusion et d'ataxie (Camacho et al. 1999; Tsujino et al. 2001; Miyamoto et al. 2002a).

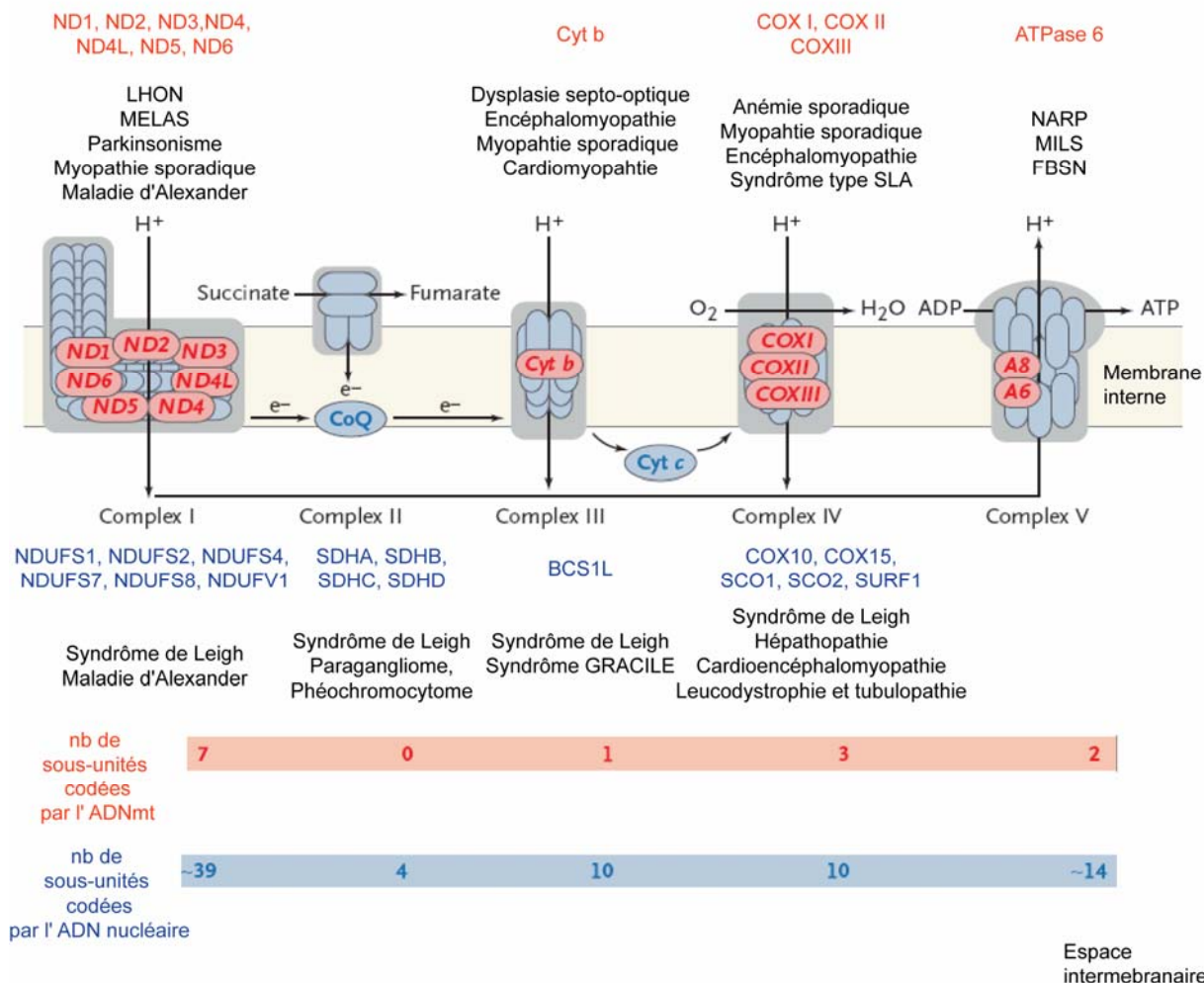
La mutation du transporteur des déoxynucléotides, codé par le chromosome 17 (Iacobazzi et al. 2001), a été incriminée dans la microcéphalie congénitale chez les Amish caractérisée par une sévère atrophie du cerveau, une augmentation de l' α -cétoglutarate urinaire et la mort prématurée (Rosenberg et al. 2002).

3.5.1.3. Maladies neurodégénératives associées à la mutation d'un complexe respiratoire mitochondrial

Des maladies neurodégénératives sont associées à la mutation de différentes sous-unités des différents complexes respiratoires mitochondriaux (Figure 54) (DiMauro and Schon 2003).

Des mutations des gènes codant pour les sous-unités du complexe I d'origine mitochondriale sont associées à la neuroatrophie optique héréditaire de Leber (LHON) (McKusick 2006b) seule ou associée à une dystonie proche du Parkinsonisme et au syndrome MELAS (McKusick 2005). Le syndrome MELAS est caractérisé par une myopathie, une encéphalopathie avec acidose lactique et est associé à des accidents vasculaires cérébraux.

Des mutations des gènes codant pour les protéines du complexe I d'origine nucléaire sont associées au syndrome de Leigh et à la maladie d'Alexander. Le syndrome de Leigh est une encéphalopathie nécrosante subaiguë à évolution rapide sur deux ans, touchant le plus souvent les jeunes enfants et rarement l'adulte (Kniffin 2006b). Il est caractérisé par une nécrose subaiguë des régions sous-corticales du système nerveux central incluant le thalamus, les ganglions de la base et la moelle épinière avec une démyélinisation, une gliose et une prolifération vasculaire des régions atteintes. Il s'accompagne de la perte des capacités motrices déjà acquises, de la perte de contrôle des mouvements de la tête, d'une hypotonie, de vomissements, de crises d'épilepsie, de régression mentale et de pleurs continus. La maladie d'Alexander est une maladie neurodégénérative consécutive à une perte myélinique avec des fibres de Rosenthal associée à une mégalencéphalie progressive (parfois une hydrocéphalie), un retard du développement psychomoteur ou une régression, des signes pyramidaux, une ataxie et des crises convulsives (Kniffin 2006a).



Espace intermembranaire

Figure 54 : Complexes mitochondriaux et mutations associées à des pathologies

Schéma des différentes sous-unités des complexes respiratoires dont les mutations sont associées à des conditions neurodégénératives. En bleu les sous-unités codées par l'ADN nucléaire et en rouge celles codées par la mitochondrie. ND : NADH déshydrogénase, NDUFS : NADH déshydrogénase ubiquinone oxidoréductase, SDH : succinate déshydrogénase, BCSL1 : complexe d'assemblage du cytochrome b-c, COX : cytochrome oxydase, SURF : Gène Surfheit, LHON : Neuroatrophie optique héréditaire de Leber, MELAS : myopathie, encéphalopathie avec acidose lactique et accidents vasculaires cérébraux, GRACILE : retard de croissance, aminoacidurie, acidose lactique et mort précoce, SLA : sclérose latérale amyotrophique, NARP : Neuropathie, ataxie et rétinite pigmentée, MILS : syndrome de Leigh d'origine maternelle, FBSN : nécrose bilatérale striatale familiale (DiMauro, 2003).

Des mutations des gènes codant pour les protéines du complexe II d'origine nucléaire sont associées au syndrome de Leigh et aux paragangliomes. Le syndrome de Leigh peut être consécutif à la mutation de la SDHA (Bourgeron et al. 1995). Les paragangliomes sont caractérisés par une tumorigénèse des tissus paraganglionnaires au niveau de la tête (glomus tympanicum et jugulaire) et du cou (glomus carotidien et vagal). Les paragangliomes de type 1 et 2 sont la conséquence de la mutation de la SDHD alors que celui de type 3 est dû à la mutation de la SDHC et le type 4, à celle de la SDHB (Baysal 2004).

Une mutation du gène mitochondrial codant le cytochrome b, sous-unité du complexe III est associée à la dysplasie septo-optique et à une encéphalomyopathie (DiMauro and Schon 2003).

Des mutations des gènes codant pour les protéines BCSL1 (complexe d'assemblage du cytochrome b-c) et UQCRB du complexe III d'origine nucléaire sont associées au syndrome de Leigh et au syndrome GRACILE. Le syndrome GRACILE est caractérisé par un retard de croissance, une aminoacidurie, une acidose lactique et une mort précoce (McKusick 2002).

Des mutations des gènes codant pour les protéines COX I, II et III du complexe IV d'origine mitochondriale, sont associées à des encéphalopathies et à un syndrome de type SLA. La SLA ou maladie de Charcot ou syndrome de Lou-Gehrig est une affection neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence progressive des motoneurons de la moelle épinière, associée à des paralysies musculaires, des troubles de la déglutition et de la phonation, évoluant rapidement vers la mort (McKusick 2006a).

Des mutations des gènes codant pour les protéines COX10, COX15, SCO1, SCO2 et SURF1 du complexe IV d'origine nucléaire sont associées au syndrome de Leigh, à une cardio-encéphalomyopathie et à une leucodystrophie. La leucodystrophie avec tubulopathie est caractérisée par un défaut de myélinisation.

La mutation du gène mitochondrial codant l'ATPase 6, constituant du canal protonique de la F₀-F₁ ATPase est associée à trois pathologies (Holt et al. 1990; Uziel et al. 1997) : la neuropathie avec ataxie et rétinite pigmentée ou NARP, le syndrome de Leigh d'origine maternelle ou MILS et la nécrose striatale bilatérale familiale FBSN.

3.5.1.4. Maladies neurodégénératives associées à la mutation de la PDH

La mutation des sous-unités α et β de l'enzyme E1 du complexe de la PDH est associée à la forme la plus fréquente d'acidose lactique chez l'enfant avec un pronostic fatal associé à des malformations neurologiques et à avec certaines formes de maladie de Leigh liées à X (Brown et al. 2004).

3.5.1.5. Maladies neurodégénératives associées à la mutation d'enzymes du cycle de Krebs

La mutation de la fumarase, codée par le chromosome 1 et catalysant la formation du malate à partir du fumarate est impliquée dans la fumarase acidurie caractérisée par une encéphalopathie progressive, un retard de développement avec atrophie cérébrale, une dystonie et une acidémie lactique et pyruvique (Bourgeron et al. 1994).

La mutation de la sous-unité γ de l'isocitrate déshydrogénase, permettant la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en présence de NAD⁺ en α -cétoglutarate et codée par le chromosome X, est associée à une hétérotopie nodulaire périvericulaire héréditaire.

C'est une maladie caractérisée par la présence de neurones extracorticaux dans la substance blanche, associée à une épilepsie partielle et à un léger retard mental (Fink et al. 1997).

3.5.1.6. Maladies neurodégénératives associées à la mutation d'enzymes du métabolisme des acides gras

Des mutations portant sur les trois enzymes du métabolisme des acides gras sont responsables de maladies neurodégénératives.

Les mutations des enzymes acceptant les équivalents réducteurs en provenance de la β -oxydation des acides gras est associée à l'acidurie glutarique de type IIA, IIB et IIC, selon l'enzyme mutée, aussi appelée déficience multiple en AcylCoA déshydrogénation (Olsen et al. 2003). Les enzymes mutées sont :

- la flavoprotéine de transfert d'électrons (ETF), enzyme hétérodimérique localisée au niveau de la matrice mitochondriale et constituée de deux sous-unité α et β ou ETFA et ETFB, codées par les chromosomes 15 et 19, accepteuses d'électrons des déshydrogénases à FAD comme les acylCoA déshydrogénases, la glutarylCoA déshydrogénase et la sarcosine déshydrogénase.
- la flavoprotéine de transfert d'électrons ubiquinone-oxidoreductase (ETFHD), codée par le chromosome 4 et présente dans la membrane interne mitochondriale acceptant les électrons de l'ETF.

L'acidurie glutarique est une maladie autosomale récessive caractérisée par une acidose, une hypoglycémie, une acidurie organique, une odeur aigre douce avec une absence de β -oxydation des acides gras responsable de malformations congénitales rénales, cardiaques et cérébrales (Gordon 2006). L'acidurie organique est la conséquence d'une accumulation d'acides glutarique, lactique, éthylmalonique, butyrique, isobutyrique, 2-méthylbutyrique et isovalérique, ce dernier étant responsable de l'odeur (Gordon 2006). Les malformations congénitales cérébrales sont caractérisées par une hypoplasie bilatérale des lobes temporaux du cortex avec perte axonale et hypomyélinisation, détectée en IRM et postmortem (Stockler et al. 1994).

La mutation de l'isoforme1 de la 3-hydroxyacylCoA déshydrogénase, codée par le chromosome 4 et catalysant la troisième étape de dégradation des acides gras, est associée à des encéphalopathies hypoglycémiques (Vredendaal et al. 1996).

3.5.2. Mutation de gènes responsables de maladies neurodégénératives

Plusieurs pathologies neurodégénératives ont été identifiées comme étant la conséquence de la mutation d'une protéine n'intervenant pas dans le métabolisme ou le transport mitochondrial, ce sont l'ataxie de Friedreich, les paraplégies spastiques 7 et 13 (SPG), certaines formes héréditaires de maladie de Parkinson, la neuropathie optique dominante et la SLA.

La frataxine est une protéine matricielle de 18 kDa, codée par le chromosome 9, impliquée dans le stockage du fer intracellulaire et dans la maturation des enzymes à centre Fer-Soufre, comme la SOD 2, les complexes I-III mitochondriaux et l'aconitase (Cavadini et al. 2002). Elle est particulièrement exprimée dans le cervelet et la moelle épinière et son

absence dans les mitochondries des souris KO est reliée à une augmentation du fer libre mitochondrial et à une réduction d'activité des enzymes à centre Fer-Soufre (Puccio et al. 2001). La mutation de la frataxine par une expansion de GAA est associée à l'ataxie de Friedreich, ataxie autosomale récessive neurodégénérative la plus commune caractérisée par des troubles de la coordination des mouvements, de l'articulation, associés à d'autres signes neurologiques (abolition des réflexes, troubles de la sensibilité profonde, pieds creux et scoliose) ainsi qu'à une cardiomyopathie et parfois à un diabète (Delatycki et al. 2000). La réduction d'activité de la frataxine entraîne vraisemblablement un stress oxydatif via la réaction de Fenton par l'accumulation du fer d'une part et la baisse d'activité de la SOD, d'autre part. En effet il y a une faible expression de la SOD2 dans les cellules des patients (Chantrel-Groussard et al. 2001) et l'idébénone, produit antioxydant est efficace sur la cardiomyopathie des patients (Rustin et al. 2002).

La mutation de la paraplégine, codé par le chromosome 16, homologue d'une métalloprotéase de levure localisée dans la matrice mitochondriale, est associée à la paraplégie spastique héréditaire autosomale récessive ou SPG7 (Casari et al. 1998).

La mutation de hsp60, codée par le chromosome 2, à activité de chaperon dans la matrice mitochondriale participant à la maturation des protéines mitochondriales, associée à la paraplégie spastique héréditaire autosomale dominante ou SPG13 (Hansen et al. 2002).

La parkine est une ubiquitine-protéine ligase impliquée dans la dégradation des protéines, associée à la membrane externe mitochondriale, codée par le chromosome 6. La mutation de la parkine est associée à une forme juvénile, autosomale et récessive de la maladie de Parkinson (Kitada et al. 1998). Elle aurait un rôle neuroprotecteur vis-à-vis de la translocation du cytochrome c dans le cytosol et du gonflement de la mitochondrie stimulés par les radicaux libres (Darios et al. 2003).

La mutation de l'oncogène DJ-1, codé par le chromosome 1 est associée à une forme juvénile, autosomale et récessive de la maladie de Parkinson (Bonifati et al. 2003). Elle participerait aussi à la protection vis-à-vis d'un stress oxydatif car la forme oxydée de DJ-1 se localise à la mitochondrie et bloque la toxicité induite par le MPP⁺ (Canet-Aviles et al. 2004).

La mutation de la PINK-1 (kinase induite par l'homologue de la phosphatase et de la tensine PTEN), codé par le chromosome 1 et localisée dans la mitochondrie, est associée à une forme juvénile, autosomale et récessive de la maladie de Parkinson (Valente et al. 2004).

La mutation de Mgm1/Opa1, codée par le chromosome 3 est associée à une atrophie optique dominante (Chen and Chan 2005). Opa1 est une protéine GTPase de la famille de la dynamine qui serait impliquée dans la morphologie membranaire et la fusion des mitochondries. La réduction de l'expression de Opa 1 dans les cellules HeLa entraîne une fragmentation des mitochondries accompagnée d'une réduction du potentiel de membrane mitochondrial, suivie d'une libération du cytochrome c et d'une activation des caspases avec induction d'une mort apoptotique (Olichon et al. 2003). En parallèle, les patients présentant une mutation de Opa1 ont un déficit de reconstitution du stock de phosphocréatine après un effort musculaire, témoin d'un défaut de synthèse de l'ATP (Lodi et al. 2004).

La mutation du gène de la SOD1, enzyme de détoxification des radicaux libres, est associée à 15 à 20% des formes familiales autosomales dominantes de SLA (Siddique et al. 1991; de Belleruche et al. 1995). La SOD1 est normalement localisée au niveau cytosolique mais se relocalise au niveau de l'espace intermembranaire anormalement vacuolisées des neurones corticaux et de la moelle épinière (Jaarsma et al. 2001; Higgins et al. 2003; Sasaki et al. 2004; Jaarsma 2006) dans un modèle transgénique de mutation non-sens de la SOD1, la souris G93A. La mutation de la SOD1 est associée à la formation d'agrégats piégeant les protéines hsp, alors incapables d'entrer dans la mitochondrie, ce qui perturbe l'import des protéines mitochondriales (Okado-Matsumoto and Fridovich 2002). D'autre part, la mutation

diminue le transfert d'électrons chez la levure ainsi que la respiration mitochondriale (Gunther et al. 2004), la synthèse d'ATP chez les souris, s'accompagnant d'une augmentation de la production de radicaux libres avec attaque radicalaire des protéines et des lipides (Mattiuzzi et al. 2002). En parallèle, la capture du calcium par la mitochondrie est diminuée avant l'apparition des symptômes moteurs chez les souris 93A (Damiano et al. 2006)

3.5.3. Dysfonctions mitochondriales observées dans les maladies neurodégénératives liées à l'âge autre que la maladie de Huntington

Différentes maladies neurodégénératives liées à l'âge dont les symptômes apparaissent lors du vieillissement sont associées à des dysfonctions du métabolisme énergétique, observées au niveau des complexes respiratoires I et IV, de la PDH, du cycle de Krebs, du métabolisme des acides gras, des acides aminés et des corps cétoniques.

Plusieurs maladies neurodégénératives sont associées à une réduction de l'activité du complexe I. En effet, une diminution de l'activité du complexe I a été mise en évidence dans des échantillons *post mortem* de substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson (Parker et al. 1989; Schapira et al. 1990a; Schapira et al. 1990b). Il faut noter que la réduction de l'activité observée chez les Parkinsoniens est spécifique de la région cérébrale lésée dans la maladie et que cette baisse d'activité n'est pas observée dans d'autres pathologies associées à une neurodégénérescence de la substance noire (Schapira et al. 1990b). Une diminution de l'expression de sous-unité du complexe I a été observée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et du syndrome de Down (Aksenov et al. 1999; Kim et al. 2001a).

Une réduction de l'activité de du complexe IV a été observée dans des échantillons *post mortem* de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Casley et al. 2002).

Une réduction de l'activité de la PDH de 70% a été observée dans des échantillons *post mortem* de cortex temporal, mais pas dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Sorbi et al. 1983; Butterworth and Besnard 1990; Casley et al. 2002).

Une diminution de l'activité de l' α -cétoglutarate déshydrogénase est observée dans la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. L' α -cétoglutarate déshydrogénase, permettant la décarboxylation oxydative de l' α -cétoglutarate en présence de CoA en succinylCoA, est inhibée par le peptide β -amyloïde (Casley et al. 2002) et une réduction de l'activité de cette enzyme de 70% a été observée dans des échantillons *post mortem* de cortex temporal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Butterworth and Besnard 1990). De plus le score de démence est relié au niveau d'inhibition de l' α -cétoglutarate déshydrogénase (Gibson et al. 2000). Dans la maladie de Parkinson, une réduction de l'activité de l'enzyme est observée dans des échantillons *post mortem* de substance noire (Mizuno et al. 1990; Gibson et al. 2003) avec une corrélation entre la sévérité de la neurodégénérescence et l'inhibition enzymatique (Mizuno et al. 1994).

L'isoforme2 de la 3-hydroxyacylCoA déshydrogénase codée par le chromosome X et possédant une activité de 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase, et impliquée dans la B-oxydation des acides gras, a été isolée comme un interacteur de l'APP (Yan et al. 1997). Elle intervient dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, par une mauvaise dégradation des acides gras branchés et de l'isoleucine (Yang et al. 2005).

La déficience en hydroxyméthylglutarylCoA lyase (HMGCoA lyase) est associée à l'apparition de coma hypoglycémique et hypocétonique et acidose métabolique. Elle est aussi

associée à différentes anomalies cérébrales détectables en imagerie, comme un hypersignal T2 en IRM dans la substance blanche cérébrale et les ganglions de la base, c'est-à-dire le globus pallidus, le putamen et le noyau caudé (van der Knaap et al. 1998). Elle s'accompagne d'une atrophie corticale des lobes occipitaux avec un hypersignal T2 et un hyposignal T1 en IRM (van der Knaap et al. 1998). La 3-hydroxybutyrate déshydrogénase a un rôle primordial en cas de déficit énergétique et permet la formation de NADH en dégradant le 3-hydroxybutyrate. L'apport de ce substrat s'est montré neuroprotecteur dans des conditions de stress énergétique ou dans des modèles de maladie neurodégénératives chroniques, comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Smith et al. 2005c).

3.6. Toxines mitochondriales mimant la neurodégénérescence

En parallèle, des dysfonctions mitochondriales énergétiques observées dans les maladies neurodégénératives chroniques, des toxines mitochondriales inhibant le complexe I ou le complexe II de la chaîne respiratoire sont capables d'induire une neurodégénérescence mimant respectivement la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington. En parallèle, l'inhibition du complexe IV induit une neurodégénérescence.

3.6.1. Neurotoxines inhibant le complexe I et maladie de Parkinson

Le complexe I est inhibé par le MPP⁺, la roténone (Bove et al. 2005), l'amital et la piéricidine (Davies and Doroshov 1986) et le diphénylèneiodonium (Liu et al. 2002).

L'injection intraveineuse accidentelle de MPTP, produit secondaire de la synthèse de l'héroïne, chez les toxicomanes a provoqué un Parkinsonisme chronique (Langston et al. 1983). Le MPP⁺ est le métabolite actif du MPTP (1-Méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) formé par deux réactions enzymatiques dont la première est catalysée par la monoamine oxygénase B (MAOB) (Przedborski et al. 2004). Il bloque le transfert des électrons au niveau du dernier centre Fer-Soufre à l'ubiquinone, le site N2 (Ramsay et al. 1987). Par la suite le MPTP a été utilisé chez les souris comme les primates, pour mimer la neurodégénérescence dopaminergique et les signes cliniques observés dans la maladie de Parkinson (Heikkila et al. 1984; Langston and Irwin 1986). Parallèlement, des études épidémiologiques ont montré une augmentation du risque de développer une maladie de Parkinson suite à une exposition à des pesticides (Butterfield et al. 1993; Gorell et al. 1998).

En accord avec le fait que les pesticides pourraient être à l'origine de certains cas de maladie de Parkinson, la roténone appartenant à la classe des pesticides est capable de mimer avec succès la maladie de Parkinson, en induisant une neurodégénérescence dopaminergique striatale préférentielle chez le rat, après une administration par voie systémique (Betarbet et al. 2000). La roténone inhiberait le complexe I au niveau du site ou proche de la liaison de l'ubiquinone, en empêchant la réoxydation de la flavoprotéine par le coenzyme Q (Okun et al. 1999; Lambert and Brand 2004).

Les mécanismes de neurodégénérescence induits par la réduction de l'activité du complexe I seraient de deux types. Le premier mécanisme est la réduction du taux d'ATP, mis en évidence dans les souris intoxiquées par le MPTP (Chan et al. 1991). Il faut cependant noter que dans un système de culture de cellules PC12 en présence de roténone, l'inhibition du complexe I doit être supérieure à 25% pour réduire le taux de synthèse d'ATP et la consommation d'O₂ (Davey et al. 1998). Ce taux d'inhibition du complexe I minimal pour

réduire la synthèse d'ATP et la consommation d'O₂ au niveau des mitochondries « synaptiques » est bien inférieur à celui de 72% observé au niveau des mitochondries non synaptiques du cerveau de rat (Davey and Clark 1996). Ceci montre qu'un stress au niveau du complexe I est beaucoup plus dramatique sur le fonctionnement synaptique mitochondrial neuronal que sur le fonctionnement des neurones au niveau extrasynaptique et des autres types cellulaires. Le second mécanisme de mort neuronale relié à l'inhibition du complexe I, est la production de radicaux libres mis en évidence en incubant du MPTP avec des mitochondries isolées (Rossetti et al. 1988).

3.6.2. Neurotoxines inhibant le complexe IV et dégénérescence striatale

Le complexe IV est inhibé par le cyanure au niveau de l'oxydation du cytochrome a₃, et le sulfure d'hydrogène responsables dans le premier cas d'un arrêt respiratoire et de coma et dans le second cas d'un coma réversible (Browne and Beal 2002). L'azide de sodium est aussi un inhibiteur du complexe IV, utilisé chez les rongeurs et les primates pour induire une neurodégénérescence striatale spécifique par administration systémique alors que les autres régions du cerveau comme le cervelet, le cortex et les plexus choroïdes sont épargnées (Hicks 1950; Brouillet et al. 1994). Celle-ci s'accompagne d'akinésie et de posture anormale chez le singe, ainsi que d'une toxicité cardiaque et pulmonaire.

3.6.3. Les inhibiteurs du complexe II et la maladie de Huntington

La succinate déshydrogénase est inhibée par l'oxaloacétate, le 3-NP, le malonate, le méthylmalonate, le cyanure et le sulfure d'hydrogène à fortes doses (Browne and Beal 2002) et le 1,3-dinitrobenzène.

Le malonate est un inhibiteur de la respiration mitochondriale connu dès le début du XX^{ème} siècle. En effet, Lund a d'abord observé que le malonate inhibait la respiration musculaire de la grenouille et Quastel et Whetnan ont mis par la suite en évidence qu'il était un inhibiteur compétitif de la SDH (Sanberg et al. 2000). C'est un inhibiteur endogène, formé en parallèle de l'acétylCoA lors de l'oxydation des acides gras à partir du malonylCoA et de l'acétate, grâce à la malonylCoA transférase. Le malonate inhibe la SDHA sous sa forme dianionique au niveau du thiol présent vers le site de fixation du FAD (Coles et al. 1979). C'est aussi un inhibiteur de la fumarate réductase, de la malate deshydrogénase qui sont des enzymes du cycle de Krebs et de la navette malate/aspartate (Sanberg et al. 2000). C'est un inhibiteur de l'oxaloacétate décarboxylase, enzyme de dégradation du glyoxylate catalysant la dégradation de l'oxaloacétate en pyruvate, et un inhibiteur de l'isocitrate lyase. En complément, il inhibe les glutamate décarboxylases 1 (GAD 67) et 2 (GAD65), enzymes de dégradation du glutamate en 4-aminobutyrate (Fonda 1972). Ce sont des enzymes fortement exprimées dans le cerveau, impliquées dans la synthèse du GABA (acide gamma-aminobutyrique), neurotransmetteur inhibiteur principal du cerveau, présent notamment dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum (Erlander et al. 1991). Un excès de malonate est observé dans les cas de déficience en malonylCoA transférase, caractérisée par un retard mental et des crises épileptiques (Riley et al. 1991). Le malonate est utilisé comme le 3-NP, pour mimer la maladie de Huntington, mais son administration doit se faire en

intrastriatal du fait de son absence de passage à travers la BHE (Beal et al. 1993a; Bazzett et al. 1995).

L'oxaloacétate est un intermédiaire du cycle de Krebs, dont l'excès est le résultat d'un emballement de la réaction de la fumarate hydratase sur le fumarate. Cette réaction est couplée à l'oxydation du succinate en fumarate par la SDH et l'inhibition réversible de la SDH par l'oxaloacétate permet la régulation de la vitesse du cycle de Krebs. Le mécanisme d'inhibition réversible de la SDH par l'oxaloacétate est la formation d'un thiohémiacétal au niveau du site de liaison du FAD de la SDHA (Coles et al. 1979).

Le Méthylmalonate est un autre inhibiteur endogène compétitif et réversible de la SDH, neurotoxique après injection intrastriatale (Dutra et al. 1993; Narasimhan et al. 1996). Il est formé à partir du méthylmalonylCoA grâce à la méthylmalonylCoA hydrolase. Le mécanisme d'inhibition de la SDH n'est pas élucidé et l'inhibiteur pourrait être le méthylmalonate comme le malonate, formé par hydrolyse (Sanberg et al. 2000).

Le cyanure est un inhibiteur des enzymes à centre ferrique Fe^{3+} , c'est-à-dire la COX, la succinate déshydrogénase et les SOD mitochondriale et cytoplasmique (Browne and Beal 2002). C'est un produit présent dans certains noyaux de fruits comme l'abricot, utilisé dans des procédés de synthèse du polyuréthane et détourné dans le but de se donner la mort. Une intoxication par le cyanure entraîne rapidement une agitation, un délire, des maux de tête puis un coma suivi d'un décès par arrêt respiratoire suite à l'inhibition des motoneurones. L'atteinte préférentielle du système nerveux semble due au fort taux d'utilisation de la chaîne respiratoire pour la production d'énergie. En parallèle des lésions du putamen et du globus pallidus sont observées, illustrant la grande sensibilité des ganglions de la base à une inhibition de la chaîne respiratoire.

Le sulfure d'hydrogène H_2S est un inhibiteur des enzymes à centre ferrique Fe^{3+} , dont le complexe IV et à forte dose le complexe II (Browne and Beal 2002). C'est une toxine environnementale dont les effets sont très proches du cyanure mais souvent réversibles. Dans les cas graves, des lésions du putamen et du globus pallidus sont observées.

Le 1,3-dinitrobenzène est un inhibiteur du complexe II responsable de lésions gliovasculaires et d'œdème confinés aux noyaux de la base, chez les rongeurs (Phelka et al. 2003). Il est capable d'inhiber la SDH des astrocytes corticaux comme ceux des noyaux de la base mais c'est uniquement dans ces derniers que l'inhibition est reliée à la perméabilité de transition mitochondriale (Phelka et al. 2003).

3.7. Le 3-NP, inhibiteur du complexe II et maladie de Huntington

3.7.1. Historique de la découverte du 3-NP en tant que neurotoxine associée à une dégénérescence striatale

Le 3-NP est un dérivé nitroaliphatique dont la biosynthèse a été mise en évidence dans les plantes de la famille des *Astragalus* et des *indigofera* (Candlish et al. 1969) ainsi que dans les champignons de la famille des *Arthrimum* (Hu 1986) (Figure 55B). Il est responsable d'encéphalopathies aiguës chez les ruminants ayant consommé des *Astragalus* et des *indigofera* (Candlish et al. 1969). Ces intoxications sont reliées à une phase aiguë symptomatique caractérisée par une irritation intestinale, des convulsions, la perte de conscience avec un coma persistant parfois plusieurs jours. Une phase symptomatique retardée et chronique apparaît 11 jours après l'intoxication et est caractérisée par une dystonie, des mouvements involontaires incoordonnés proche de la chorée parallèle à l'observation en imagerie de dégénérescence bilatérale des ganglions de la base (Ludolph et

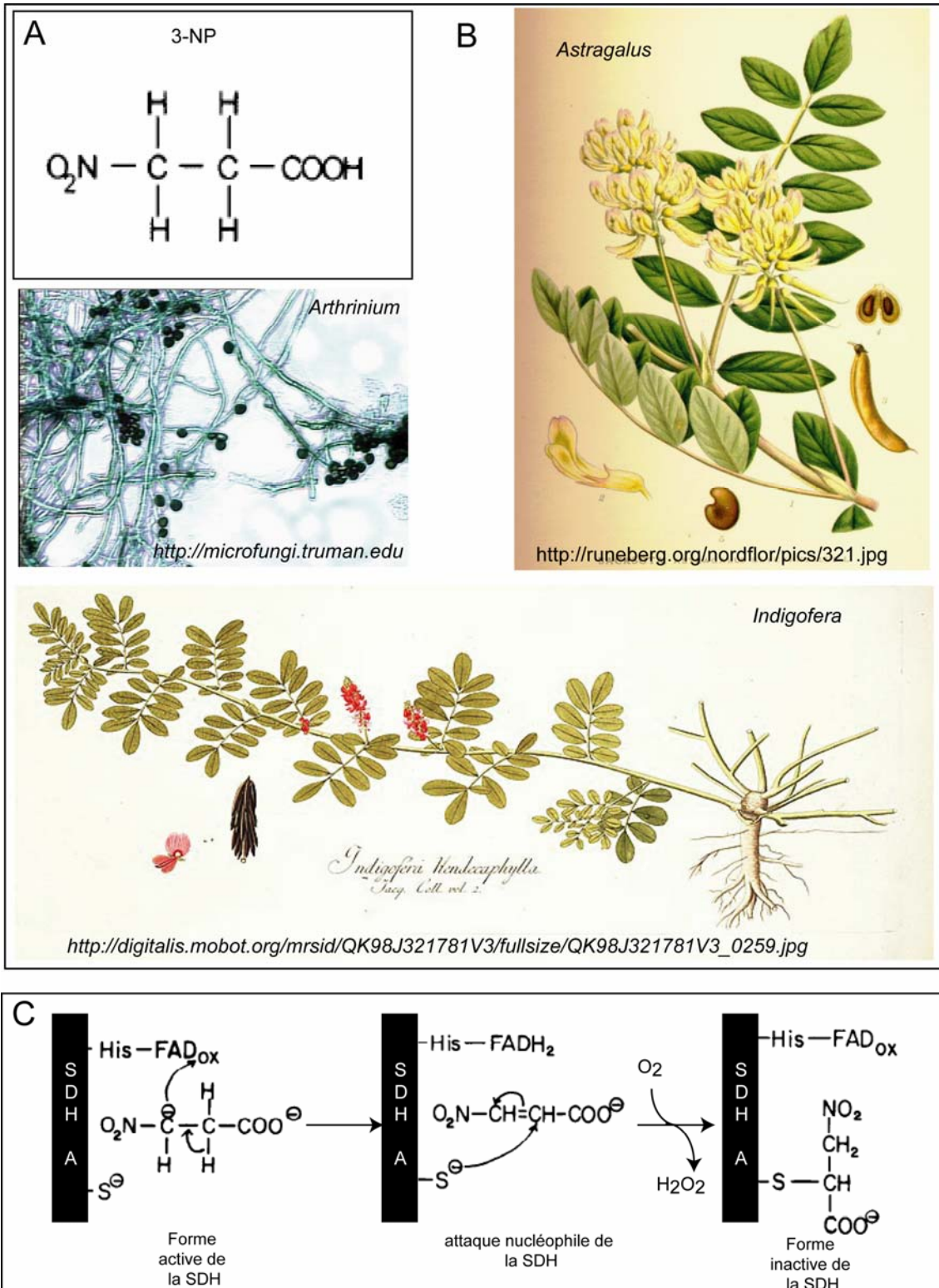


Figure 55 : 3-NP, structure, provenance et mécanisme d'inhibition de la SDH

A : Structure chimique du 3-NP, proche du succinate (figure 83C). B : Astragalus, indigofera et arthrinium, les sources de biosynthèse du 3-NP. C : Mécanisme supposé d'inhibition de la SDH. Le 3-NP sous forme dianionique attaque le FAD oxydé ce qui permet la formation du nitroacrylate réagissant avec un groupement thiol de la SDHA en présence d'oxygène moléculaire avec pour conséquence l'inactivation de l'enzyme par la formation d'un adduit covalent sur le thiol parallèle à la déshydrogénation du FAD.

al. 1991). L'analogie structurale du 3-NP avec le succinate (Figure 55A et 55C) et les études de pharmacologie de la mitochondrie ont permis de définir que le 3-NP était un inhibiteur suicide de la succinate déshydrogénase (Alston et al. 1977). Le mécanisme d'inhibition irréversible de la SDH par le 3-NP est la fixation covalente au niveau de la SDHA (Alston et al. 1977), sur une fonction thiol proche du site de liaison du FAD (Figure 55C) (Coles et al. 1979). En plus de l'inhibition de la SDH, le 3-NP est capable d'inhiber la fumarase (Porter and Bright 1980) et l'isocitrate lyase, enzyme de dégradation du glyoxylate catalysant la condensation du succinate et du glyoxylate en isocitrate (Schloss and Cleland 1982). L'inhibition de la SDH par le 3-NP est généralisée à tous les tissus mais le striatum est l'unique région cérébrale dégénérant suite à une intoxication par le 3-NP (Gould and Gustine 1982; Hamilton and Gould 1987). Par la suite, cette neurotoxine a été utilisée pour mimer différentes maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington (Brouillet et al. 1999; Brouillet et al. 2005), les dyskinésies tardives (Palfi et al. 2000) et les atrophies multisystémiques (Fernagut et al. 2005). Différentes voies d'administration du 3-NP (intra-striatale, intrapéritonéale répétée, injection et infusion sous-cutanée), chez différentes espèces incluant la souris, le rat et les primates non humains ont permis de reproduire la neuropathologie de la maladie de Huntington (annexes 1 et 2) (Brouillet et al. 1999; Brouillet et al. 2005).

3.7.2. Mécanismes de neurodégénérescence induits par le 3-NP

Les mécanismes de neurodégénérescence induits par la réduction de l'activité du complexe II impliqueraient différents acteurs : le déficit de fonctionnement du cycle de Krebs, l'inhibition de la navette malate/aspartate, la baisse du taux d'ATP, l'induction du PTP, la production de radicaux libres, l'activation des caspases, calpaïnes, metalloprotéase 9 et MAP-kinases ainsi que l'activation microgliale et la sécrétion de facteurs d'inflammation.

Du fait du positionnement de la SDH au carrefour de deux voies métaboliques, les deux premiers effets d'une réduction de l'activité du complexe II sont la baisse de l'oxydation du succinate en fumarate et l'absence de transfert des électrons du FADH₂ sur l'ubiquinone.

3.7.2.1. Réduction de l'oxydation du succinate par le 3-NP

La réduction de l'oxydation du succinate suite à l'inhibition de la SDH par le 3-NP *in vivo*, s'accompagne d'une accumulation du succinate formé à partir du glucose et observée en ¹³C-RMN dans le striatum de souris et de rat (Hassel and Sonnewald 1995; Brownell et al. 2004). L'accumulation du succinate par l'inhibition de la SDH serait restreinte aux MSN (Hassel and Sonnewald 1995). La baisse d'oxydation du succinate entraîne une inhibition de la vitesse du cycle de Krebs, observée en ¹³C-RMN dans le striatum des rats et des souris intoxiqués par le 3-NP (Hassel and Sonnewald 1995; Henry et al. 2002). Cette inhibition du cycle de Krebs s'accompagne d'une réduction de la formation du malate observée en ¹³C-RMN dans le striatum des souris intoxiquées par le 3-NP (Hassel and Sonnewald 1995). Donc par conséquent, il y a moins d'oxaloacétate qui conduit à une inhibition de la navette malate/aspartate avec pour conséquence une réduction de l'aspartate et du glutamate, observée en ¹³C-RMN dans le striatum des souris intoxiqués par le 3-NP (Hassel and Sonnewald 1995). Cette inhibition de la navette malate/aspartate serait spécifiquement neuronale car l'astrocyte est capable de former l'oxaloacétate manquant à partir du pyruvate grâce à une enzyme spécifiquement astrocytaire, la pyruvate carboxylase (Yu et al. 1983). La

réduction de la vitesse du cycle de Krebs a pour conséquence l'augmentation de l'acétylCoA, qui inhibe en retour la pyruvate déshydrogénase, avec accumulation du pyruvate qui est métabolisé en lactates par la lactate déshydrogénase et le NADH (Koolman and Röhm 1994). En effet, on observe une augmentation des lactates en ¹H-RMN dans le striatum des souris et des rats intoxiqués par le 3-NP (Hassel and Sonnewald 1995; Jenkins et al. 1996; Brownell et al. 2004) ainsi que chez les primates intoxiqués par le 3-NP (Dautry et al. 1999). Il est intéressant de remarquer que cette élévation de lactates est aussi observée par ¹H-RMN dans le striatum de patients présymptomatiques pour la maladie de Huntington (Jenkins et al. 1998), et dans le cortex occipital de patients symptomatiques en corrélation avec la durée de la maladie (Jenkins et al. 1993).

3.7.2.2. Réduction de l'ATP par le 3-NP

L'inhibition de la chaîne respiratoire conduirait à une réduction du taux d'ATP intracellulaire. En effet, en présence d'une inhibition importante de la SDH par le 3-NP à forte dose (supérieure à 1mM), le taux d'ATP est réduit dans les synaptosomes de rats (Erecinska and Nelson 1994). Il est aussi réduit dans de nombreux types neuronaux isolés à partir de l'hippocampe (Pang and Geddes 1997) (Nasr et al. 2003), de mésencéphale (Zeevalk et al. 1995), du cortex (Riepe et al. 1994) et du striatum (Ludolph et al. 1992) mais ne semble pas modifié dans les astrocytes en culture (Bakken et al. 1997). La réduction du taux d'ATP a été observée dans le striatum de rat après injection intrastriatale de malonate, de façon transitoire et prolongée, après administration de 3-NP (Beal et al. 1993a). Enfin chez le patient, une anomalie de production d'ATP musculaire est observable par ³¹P RMN, au repos par la réduction du rapport phosphocréatine/ Pi (Lodi et al. 2000) et lors de test d'effort musculaire (Saft et al. 2005). De plus, une réduction du taux d'ATP est observée dans les cellules neuronales immortalisées à partir des souris KI exprimant l'huntingtine mutée (Milakovic and Johnson 2005).

3.7.2.3. Réduction du potentiel de membrane mitochondrial par le 3-NP

Le traitement par le 3-NP peut produire une réduction du potentiel de membrane mitochondrial ainsi que l'élévation du calcium mitochondrial. En effet, tous deux ont été observés dans une culture primaire de neurones d'hippocampe (Nasr et al. 2003). De même la production de radicaux libres, l'ouverture du PTP et la libération du calcium mitochondrial sont observées dans une culture corticale en présence de 3-NP (Rosenstock et al. 2004). En accord avec l'intervention du PTP dans la toxicité induite par le 3-NP, les inhibiteurs du PTP comme la cyclosporine sont capables de réduire la lésion striatale chez le rat intoxiqué par le 3-NP (Leventhal et al. 2000).

3.7.2.4. Augmentation du calcium intracellulaire par le 3-NP

Le 3-NP seul n'augmente pas le calcium intracellulaire mais en présence de glutamate, il y a une augmentation du calcium intracellulaire dans les MSN en culture (Greene et al. 1998) comme dans des tranches corticostriatales (Calabresi et al. 2001). L'hypothèse la plus couramment émise pour expliquer l'élévation de calcium intracellulaire est l'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte. Elle repose sur l'hypothèse que l'inhibition du complexe II

mitochondrial réduirait le taux d'ATP, entraînant un dysfonctionnement de la Na^+/K^+ ATPase avec pour conséquence une dépolarisation de la membrane plasmique permettant la levée d'inhibition des récepteurs NMDA par le Mg^{2+} et l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA serait stimulée par le glutamate d'origine corticale (Albin and Greenamyre 1992; Beal 1992b, 1992c; Greene and Greenamyre 1996). En accord avec cette hypothèse, l'inhibition de la SDH supérieure à 80 % est associée à une réduction du potentiel de membrane des neurones épineux GABAergiques de taille moyenne, observée sur des tranches striatales de rat en présence de 3-NP à une concentration supérieure ou égale à 1 mM (Saulle et al. 2004). Pour une inhibition de 75% de la SDH sur ces mêmes tranches striatales avec 300 μM de 3-NP, aucune dépolarisation n'est observée (Saulle et al. 2004). Ceci suggère qu'il faut un certain niveau d'inhibition du complexe II pour réduire le taux d'ATP et par conséquent le potentiel de membrane cellulaire par défaut d'activité de la Na^+/K^+ ATPase. Par ailleurs, l'administration du MK-801, antagoniste des récepteurs NMDA, permet la réduction des lésions induites par l'injection striatale du malonate chez le rat (Beal et al. 1993a) ou l'administration systémique de 3-NP chez la souris (Kim et al. 2000). De plus, la suppression chirurgicale des afférences corticales responsables de la libération du glutamate, réduit la toxicité du 3-NP chez le rat (Beal et al. 1993b).

3.7.2.5. Production de radicaux libres, activation de protéases et de kinases et facteurs d'inflammation par le 3-NP

Les phases terminales de la neurodégénérescence impliqueraient la production de radicaux libres, l'activation de caspases, l'activation de calpaïnes, l'activation de métalloprotéases et l'activation de MAP kinases.

La production de radicaux libres induite par l'inhibition de la SDH a été observée dans le striatum de rats intoxiqués par le 3-NP, par la mesure d'une augmentation du taux d'hydroxyls et l'observation de la production de produits de dégradation du stress oxydatif, la 8-hydroxy-déoxyguanosine provenant de l'oxydation de l'ADN et les 3-nitrotyrosine provenant de l'oxydation des protéines (Schulz et al. 1996). De même, chez les souris invalidées pour la glutathion peroxydase, déficitaires pour la détoxification des radicaux libres, le malonate comme le 3-NP augmentent les lésions striatales (Klivenyi et al. 2000). Enfin l'inhibition de la SDH augmente le succinate, précurseur de radicaux libres par les complexes I et III (Adam-Vizi 2005).

L'activation des calpaïnes suite à l'élévation calcique a été mise en évidence aussi bien dans les neurones striataux (Galas et al. 2004) que dans les cellules d'hippocampe (Nasr et al. 2003). Les mécanismes apoptotiques et non apoptotiques intervenant *in vivo* seront exposés dans la partie résultats et discussion de la thèse (chapitre 5 et 6).

L'activation de la métalloprotéase 9 reliée au stress radicalaire a été observée *in vivo* et serait plus reliée à l'augmentation du passage du 3-NP dans le cerveau par perméabilisation de la BHE (Kim et al. 2003).

Enfin l'activation de d'une voie MAP-kinase, la voie c-Jun N-terminal kinase/c-Jun a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*, spécifiquement dans la partie dorsolatérale du striatum de rats intoxiqués par le 3-NP, l'unique région lésée par l'inhibition du complexe II (Garcia et al. 2002).

Enfin l'inhibition du complexe II par le 3-NP *in vivo* fait intervenir l'activation des cellules microgliales, responsables de la sécrétion de radicaux libres et de facteurs

d'inflammation comme la PGE₂ potentiellement impliqués dans la neurodégénérescence ([Ryu et al. 2003](#); [Bantubungi et al. 2005](#)).

4. Excitotoxicité

Dans ce chapitre, seront présentés successivement l'historique de la découverte l'excitotoxicité, les excitotoxines, les récepteurs glutamatergiques et les transporteurs des acides aminés excitateurs et la signalisation intracellulaire mise en jeu dans le phénomène d'excitotoxicité. Seront détaillées, en parallèle, les dysfonctions pouvant exister au niveau des excitotoxines, des récepteurs, des transporteurs et de la signalisation cellulaire en faveur de l'intervention de l'excitotoxicité dans les maladies neurodégénératives et plus particulièrement dans la maladie de Huntington.

4.1. Définition de l'excitotoxicité et rappel historique

L'excitotoxicité se définit comme le phénomène de mort cellulaire (toxicité) induite par des acides aminés excitateurs (AAE) (excitotoxines). Le potentiel excitateur des acides aminés endogènes, le glutamate et l'aspartate présents dans différentes régions cérébrales, a été découvert dans les années 60 (Curtis and Watkins 1960). Il est caractérisé par une conductance sodique et implique une dépolarisation neuronale (Curtis et al. 1959). Le fait que les AAE soient présents en forte quantité dans le cerveau et qu'ils fassent partie du métabolisme intermédiaire rendait peu probable leur rôle en tant que neurotransmetteur et leur rôle physiologique a été l'objet de nombreux débats dans les années 70. Aujourd'hui, le glutamate est considéré comme le neurotransmetteur excitateur principal dans le cerveau des vertébrés supérieurs.

En parallèle de l'étude du rôle physiologique de ces acides aminés, il a été observé dès les années 50, que le glutamate pouvait exercer une toxicité sur le système nerveux central dans certaines conditions. En recherchant un effet protecteur du glutamate sur la neurodégénérescence rétinienne héréditaire, du glutamate de sodium a été administré chez la souris nouveau-née par voie systémique (Lucas and Newhouse 1957). Les résultats de cette étude ont montré, au contraire, que cette injection provoquait une dégénérescence des cellules de la rétine (Lucas and Newhouse 1957). Par la suite, l'étude plus approfondie de la toxicité du glutamate et de l'aspartate par ingestion chez la souris et le primate non humain, a permis de démontrer sa toxicité sur de nombreuses structures du système nerveux central, dont l'hypothalamus et les organes circumventriculaires, régions proches de la BHE (Figure 56) (Olney and Sharpe 1969; Olney and Ho 1970; Olney 1971; Olney et al. 1972; Olney et al. 1977). Le lien entre l'effet cytotoxique du glutamate et son rôle physiologique de neurotransmetteur neuro-excitateur a été fait en 1971 et a donné naissance au concept d'excitotoxicité, néologisme incluant l'effet excitateur et toxique du glutamate (Olney et al. 1971).

La découverte d'analogues structuraux du glutamate, comme le kaïnate, a permis de confirmer la neurotoxicité induite par l'excitation excessive neuronale dans différentes régions cérébrales, comme l'hippocampe, le striatum et la substance noire, le nerf optique (Schwarcz and Coyle 1977b, 1977a; Coyle et al. 1978; Nadler et al. 1978). Il est maintenant reconnu que les agonistes endogènes et exogènes des récepteurs des AAE peuvent induire une mort cellulaire des neurones du système nerveux central.

Ensuite, les découvertes liées à l'excitotoxicité ont progressé grâce au développement d'antagonistes des récepteurs des AAE (Watkins et al. 1990) et à la découverte des différents sous-types des récepteurs des AAE. Elles ont permis la recherche des mécanismes de

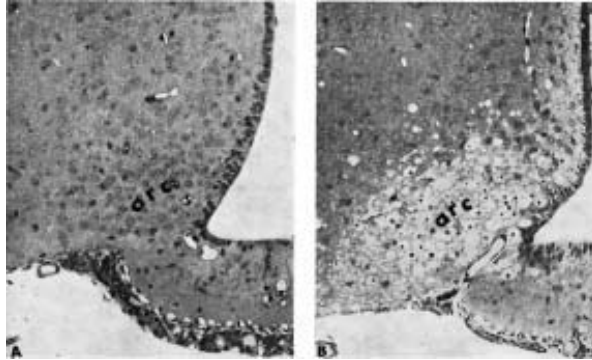


Figure 56 : Toxicité du glutamate de sodium au niveau de la rétine de souris

A : Section de cerveau au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus, chez une souris de 10 jours (x 150). B : Section de cerveau au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus, chez une souris de 10 jours après un traitement par voie orale avec le glutamate de sodium à 1g/kg (x 150) avec de nombreuses cellules nécrotiques. ([Olney and Ho, 1970](#))

l'excitotoxicité et la découverte de l'activation excessive des récepteurs ionotropiques comme étant à l'origine de la mort des neurones corticaux induite par le glutamate (Choi et al. 1988; Koh et al. 1990). Par la suite le rôle du calcium dans la mort des neurones corticaux et cérébelleux a été mis en évidence (Choi 1985; Garthwaite and Garthwaite 1986). Enfin, les voies de mort cellulaire ont été intensivement étudiées et semblent mettre en jeu, selon les conditions, la nécrose ou l'apoptose (Ankarcrona et al. 1995).

Enfin du fait de la très large distribution des AAE dans le cerveau, l'hypothèse de l'intervention des AAE dans les mécanismes de mort neuronale observés dans différentes affections neurodégénératives et l'ischémie cérébrale a été posée.

4.2. Trois voies d'induction de l'excitotoxicité

Trois types d'anomalies de la transmission glutamatergiques peuvent aboutir à une excitotoxicité. Le premier type d'anomalie est la libération excessive du glutamate ou d'une excitotoxine équivalente ce qui induit une hyperactivation des récepteurs glutamatergiques aboutissant à la mort neuronale (Figure 57A) (Choi 1988). Cette première voie de l'excitotoxicité classique est mise en jeu dans les modèles cellulaires et *in vivo*, par l'ajout ou l'administration d'excitotoxines comme le glutamate, le NMDA, le quinolinate, le kaïnate et l'iboténate. Elle interviendrait dans les atteintes neurologiques aiguës comme l'ischémie cérébrale (Rothman 1984), l'hypoglycémie (Simon et al. 1986) et certaines formes d'épilepsies (Olney et al. 1986).

Le second type d'anomalie de la transmission glutamatergique est l'augmentation du glutamate synaptique par la diminution de la capture du glutamate au niveau des transporteurs ou suite à l'inversion des transporteurs du glutamate, libérant le glutamate. Cette seconde possibilité est induite par des inhibiteurs des transporteurs glutamatergiques, comme la pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) ou le threo-benzyloxy-aspartate (TBOA) et induit une hyperactivation des récepteurs glutamatergiques aboutissant à la mort neuronale (Figure 57B) (Kanai and Hediger 2003). Elle serait mise en jeu dans la SLA (Heath and Shaw 2002) (Rothstein et al. 1992; Appel 1993; Leigh and Meldrum 1996).

Le troisième type d'anomalie de la transmission glutamatergique est l'excitotoxicité indirecte impliquant une activation des récepteurs glutamatergiques par des mécanismes intracellulaires, reliés à une dysfonction du métabolisme énergétique cellulaire, comme l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 57C) (Albin and Greenamyre 1992; Beal 1992c; Greene and Greenamyre 1996). Ce troisième type d'anomalie est induit par l'ajout *in vitro* ou l'administration *in vivo* de toxines métaboliques comme le 3-NP, le malonate, le MPTP, la roténone (Browne and Beal 2002). Elle serait mise en jeu dans les pathologies neurodégénératives chroniques comme maladie de Huntington (McGeer and McGeer 1976; Olney and de Gubareff 1978), la maladie d'Alzheimer (Greenamyre and Young 1989) et la maladie de Parkinson (Turski et al. 1991).

La mort neuronale consécutive au phénomène d'excitotoxicité serait associée à un stress oxydatif, à des perturbations ioniques et à des activations enzymatiques (Choi 1988; Beal 1992c; Coyle and Puttfarcken 1993; Lipton and Rosenberg 1994; Sattler and Tymianski 2000; Hardingham and Bading 2003) (Figure 57).

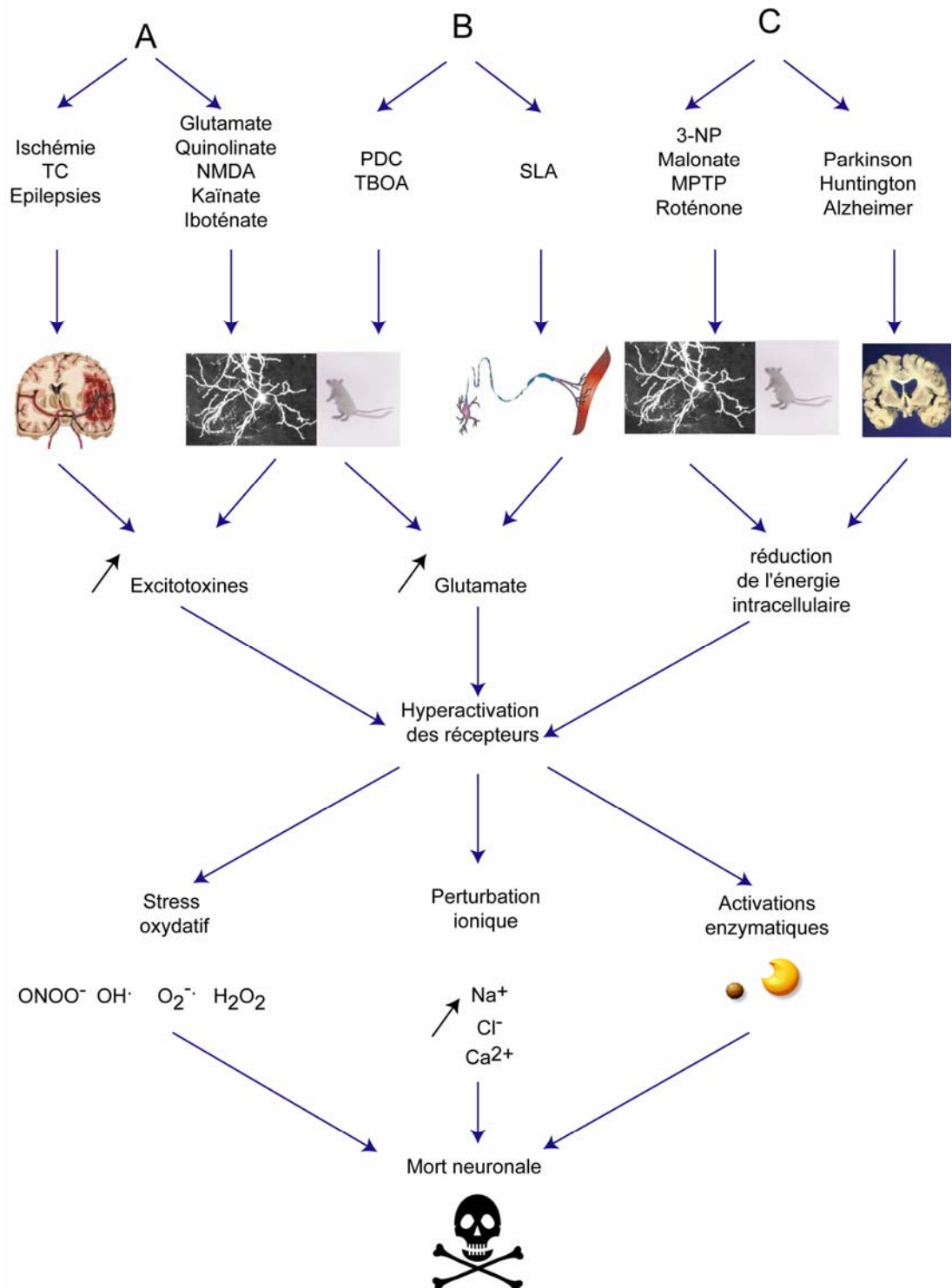


Figure 57 : Schéma des 3 types d'excitotoxicité impliqués dans les maladies neurodégénératives et les modèles in vitro et in vivo d'excitotoxicité

A : excitotoxicité classique mettant en jeu des excitotoxines exogènes ou endogènes intervenant dans l'ischémie, le traumatisme cérébral (TC) et certaines formes d'épilepsie lors de dégénérescence aiguë. B : excitotoxicité par dysfonction des transporteurs mettant en jeu des inhibiteurs des transporteurs comme la pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) ou le threo-benzyloxy-aspartate (TBOA) ou intervenant dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA). C : excitotoxicité indirecte mise en jeu lors de l'inhibition du métabolisme par l'acide 3-nitropropionique (3-NP) ou le 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) et intervenant possiblement dans la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington. Ces trois types d'excitotoxicité s'accompagne d'une hyperactivation des récepteurs suivie de différents types de signalisation intracellulaire comprenant un stress oxydatif, une perturbation ionique et des activations enzymatiques, aboutissant à la mort neuronale.

4.3. Le glutamate

Les excitotoxines sont de deux types : les excitotoxines endogènes et les excitotoxines exogènes, produits issus de la synthèse organique ou d'origine naturelle (Figure 58) (Dawson et al. 1995; Leigh and Meldrum 1996; Doble 1999). Les excitotoxines endogènes ou AAE représentent un groupe d'analogues structuraux du glutamate comprenant le glutamate, l'aspartate, le N-acétylaspartyl-glutamate ainsi que les dérivés de l'acide cystéique, l'acide L-homocystéique, l'acide L-cystéinesulfonique et l'acide L-cystéinesulfonique et le quinolinatate (Figure 59). Le glutamate et l'aspartate sont les deux excitotoxines présentes en forte quantité dans le cerveau, les autres sont entre 100 et 1000 fois moins concentrées.

La concentration intracellulaire du glutamate atteint 10mM contre 1µM dans l'espace extracellulaire dans le cerveau et la quantité totale de glutamate libre dans le cerveau humain est d'environ 2,3 g sur les 10 g que contient le corps humain (IGIS 2005). Les autres organes riches en glutamate sont les muscles avec 6g et dans une moindre mesure le foie, les reins et le sang (IGIS 2005). Le glutamate est, en premier lieu, un constituant des protéines et un intermédiaire du métabolisme en étroite relation avec le cycle de Krebs. Le glutamate a un rôle de majeur de neurotransmetteur exciteur dans le cerveau et il intervient probablement dans les processus neurodégénératifs.

4.3.1. Le glutamate, métabolite intermédiaire

Le glutamate est, avant tout, un métabolite intermédiaire au carrefour de différentes voies métaboliques (Figure 60). Le glutamate peut être formé par plusieurs voies :

- A partir de la L-glutamine par la glutaminase (EC 2.5.1.3) ;
- A partir de la L-glutamine par la L-glutamine synthétase (EC 6.3.1.2) ;
- A partir de l'α-cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.3), l'aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1), et l'alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2).
- A partir de l'histidine

Il est le précurseur de différents métabolites :

- La L-glutamine, très importante pour la régulation du glutamate synaptique et la formation des purines, du NAD et des pyrimidines, grâce à la L-glutamine synthétase (EC 6.3.1.2) avec consommation d'un ATP ;
- L'α-cétoglutarate ou 2-oxoglutarate, produit intermédiaire du cycle de Krebs, avec un NADPH grâce à la glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.3);
- L'α-cétoglutarate ou 2-oxoglutarate avec un L-aspartate grâce à l'aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1), faisant partie de la navette malate aspartate ;
- L'α-cétoglutarate ou 2-oxoglutarate avec une L-alanine grâce à l'alanine aminotransférase (EC 2.6.1.2) ;
- Le L-Glutamyl-t-ARN utile à la traduction des protéines par la glutamate ARNt synthétase en consommant un ATP (EC 6.1.1.17) ;
- La pyrroline-5-carboxylate, précurseur de l'ornithine et de la proline ainsi que du 4-aminobutanoate, grâce à l'aldéhyde déshydrogénase 4 ou Δ1-pyrroline-5 carboxylate déshydrogénase (EC 1.5.1.12) ;
- Le 4-aminobutanoate, précurseur du succinate semialdéhyde qui permet la formation du succinate, intermédiaire du cycle de Krebs, par la glutamate

EXCITOTOXINES ENDOGENES

Glutamate
Aspartate
Acide quinolinique
N-acétylaspartylglutamate
Acide L-cystéique
Acide L-homocystéique
Acide L-cystéinesulfonique
Acide L-cystéinesulfonique

EXCITOTOXINES EXOGENES

Acromélate A et B (champignon, *Clitocybe acromelelga*)
Acide domoïque (algue, *Chondria armata*) (phytoplancton, *Nitzchia pungens*)
Acide iboténique (champignon, *Amanita muscaria*)
Acide kaïnique (algue rouge)
Acide quisqualique (graine, *Quisqualis Indica*)
B-Méthyl-amino-L-alanine (fleur, *Cycas circinalis*)
B-oxalyl-amino-L-alanine (pois carré, *Lathyrus sativus*)
Willardine (pois commun, *Pisum sativum*)
N-méthyl-D-aspartate (synthèse)
AMPA (synthèse)

Figure 58 : Excitotoxines endogènes et exogènes

Liste des excitotoxines endogènes et exogènes avec leur origine naturelle (Leigh, 1996)

décarboxylase 1 ou GAD 67 (EC 4.1.1.15) et par l'arginine décarboxylase (EC 14.1.1.19).

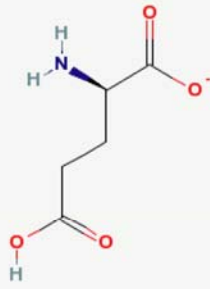
- La L-gammaglutamyl-cystéine, précurseur du glutathion, par la glutamate cystéine ligase en présence de L-cystéine et d'ATP (EC 6.3.2.2).

4.3.2. Le Glutamate, neurotransmetteur

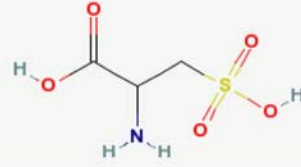
Le rôle électrophysiologique du glutamate en tant que neurotransmetteur a été postulé dès 1954, d'après l'observation que son injection dans le cerveau ou dans la carotide provoquait des convulsions (Hayashi 1954). Cependant des convulsions peuvent survenir lors de l'administration d'inhibiteurs métaboliques, et cela ne constituait pas une preuve en soi. La fonction excitatrice du glutamate a été découverte par l'effet dépolarisant qu'il avait sur les neurones spinaux de chat *in vivo*, grâce à la technique nouvellement découverte de l'iontophorèse (Curtis and Watkins 1960). Les études suivantes menées sur la moelle épinière de chat *in vivo*, ont permis de montrer l'effet de dépolarisation initiale du glutamate sur les neurones, menant à des décharges répétitives suivie d'une grande dépolarisation et d'une suppression complète de l'activité cellulaire (Curtis and Watkins 1960). Plus tard, le glutamate appliqué à une concentration entre 10^{-4} et 10^{-2} M sur la moelle épinière isolée de crapaud, a permis de reproduire le même phénomène avec dans un premier temps un effet excitateur suivi d'une dépression (Curtis et al. 1961). Pour vérifier la spécificité de l'action du glutamate sur certains types cellulaires, son action a été testée sur les cellules de Renshaw, connues pour être activées par l'acétylcholine. Ces cellules se sont aussi avérées répondre au glutamate et il a été postulé que le glutamate était capable de stimuler non spécifiquement plusieurs types cellulaires indépendamment de récepteurs. En parallèle, l'effet du glutamate pouvait être reproduit par les deux isoformes D et L, par l'aspartate et d'autres acides aminés proches, dans une gamme de concentrations proches en faveur d'un effet non spécifique (Watkins and Jane 2006). Un autre élément en défaveur de son rôle comme neurotransmetteur est le fait que les transmetteurs connus dans les années 50 étaient en faible concentration dans le cerveau alors que le glutamate est une des plus abondantes des petites molécules du cerveau. Ensuite des analogues structuraux ont été testés et certains se sont montrés plus efficaces à induire une excitation neuronale, comme le NMDA. Cette plus grande efficacité a amené le groupe de Johnston à formuler l'hypothèse qu'il existait des transporteurs chargés de la recapture du glutamate qui présentaient peu d'affinité pour les analogues structuraux comme le NMDA. Ceci a permis de démontrer qu'il existait pour le glutamate, un mécanisme de recapture synaptique spécifique, identifié pour d'autres substances comme le GABA et la glycine, agissant comme neurotransmetteurs (Curtis and Johnston 1974). La fonction synaptique du glutamate a été définitivement établie lors de la découverte de sa libération synaptique dépendant du calcium après stimulation électrique ou induction d'une dépolarisation par le K^+ . Il a ensuite été montré que les astrocytes capturaient le glutamate, le transformant en glutamine capable d'atteindre les terminaisons synaptiques riches en glutaminase, permettant sa reconversion en glutamate (Watkins 1972). Ensuite, la découverte des récepteurs du glutamate et le développement d'antagonistes spécifiques a permis de valider le rôle de neurotransmetteur du glutamate (Biscoe et al. 1977; Olverman et al. 1984).

Donc le glutamate satisfait les quatre conditions nécessaires à sa classification comme neurotransmetteur :

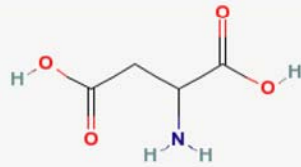
- Une localisation présynaptique ;



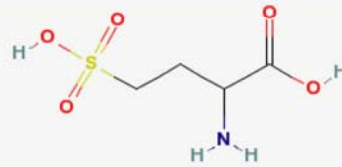
Glutamate



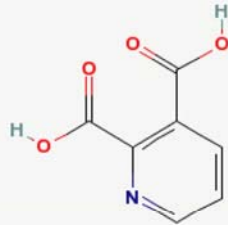
Acide cystéique



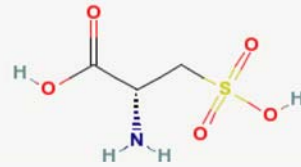
Acide aspartique



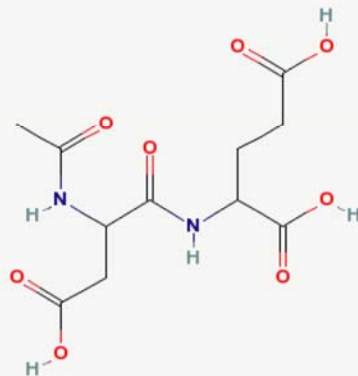
Acide homocystéique



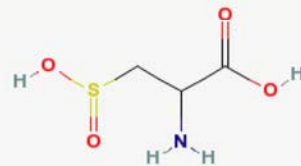
Acide quinolinique



Acide L-cystéinesulfonique



N-acétylaspartylglutamate



Acide L-cystéinesulfonique

Figure 59 : Acides aminés excitateurs endogènes

Excitotoxines endogènes et leur structure issues de pubchem

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pcsubstance>

-
- Une libération synaptique induite par une stimulation physiologique permettant en concentration suffisante pour stimuler une réponse postsynaptique ;
 - Une action identique au transmetteur endogène répondant aux antagonistes ;
 - L'existence d'un système rapide d'arrêt de la transmission.

4.3.3. Fonctions physiologiques du glutamate

Le glutamate intervient dans différentes fonctions cérébrales et périphériques :

- Les processus d'apprentissage et de mémoire avec mise en jeu de la LTP (long term potentiation) au niveau de l'hippocampe ;
- La transmission de l'influx synaptique de nombreux systèmes sensoriels comme le système visuel, le système olfactif et le système auditif ;
- Le contrôle de fonctions neuroendocriniennes et cardiovasculaires ;
- La motricité.

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus abondant du système nerveux central des mammifères, dans lequel il est présent dans environ 70% des synapses excitatrices (Watkins and Evans 1981). Les principales voies de sortie et d'entrée des influx nerveux du cerveau utilisent l'acide glutamique comme neurotransmetteur, comme le font des circuits locaux présents dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet. Les principales voies glutamatergiques sont (Figure 61) (Doble 1999) :

- La projection de la rétine au corps genouillé réticulé dans le nerf optique ;
- Le nerf olfactif ;
- Les fibres de projection sensorielles de diamètre moyen de la moelle épinière et du noyau trijumeau ainsi que de la fibre spinocerebelleuse ;
- La voie cortico-striatale, cortico-spinale, cortico-thalamique, thalamo-corticale et olivo-cerebelleuse intervenant dans la motricité.

Les circuits locaux glutamatergiques sont présents (Doble 1999) :

- Dans le cortex ;
- Dans le cervelet au niveau des cellules granulaires, des fibres parallèles, des fibres grimpantes et des fibres moussues ;
- Dans l'hippocampe au niveau des fibres moussues, des cellules CA3 et CA1 pyramidales ;
- Dans la moelle épinière au niveau du nerf sensoriel afférent de la corne dorsale, du neurone proprioceptif afférent de la corne ventrale impliqué dans les réflexes monosynaptiques, du neurone exciteur spinal impliqué dans les réflexes polysynaptiques et des motoneurones corticospinaux.

4.3.4. Le Glutamate et maladie neurodégénératives

Une des hypothèses pouvant expliquer l'existence d'un phénomène excitotoxique dans le processus neurodégénératif est la libération accrue de glutamate synaptique ou une diminution de sa recapture synaptique. En effet, une augmentation de la libération de glutamate mesuré au niveau de la substance grise est observée chez les patients ayant subi un traumatisme cérébral (Bullock et al. 1998). Cependant, dans les maladies neurodégénératives chroniques, il est beaucoup moins probable que la libération du glutamate soit augmentée. Il

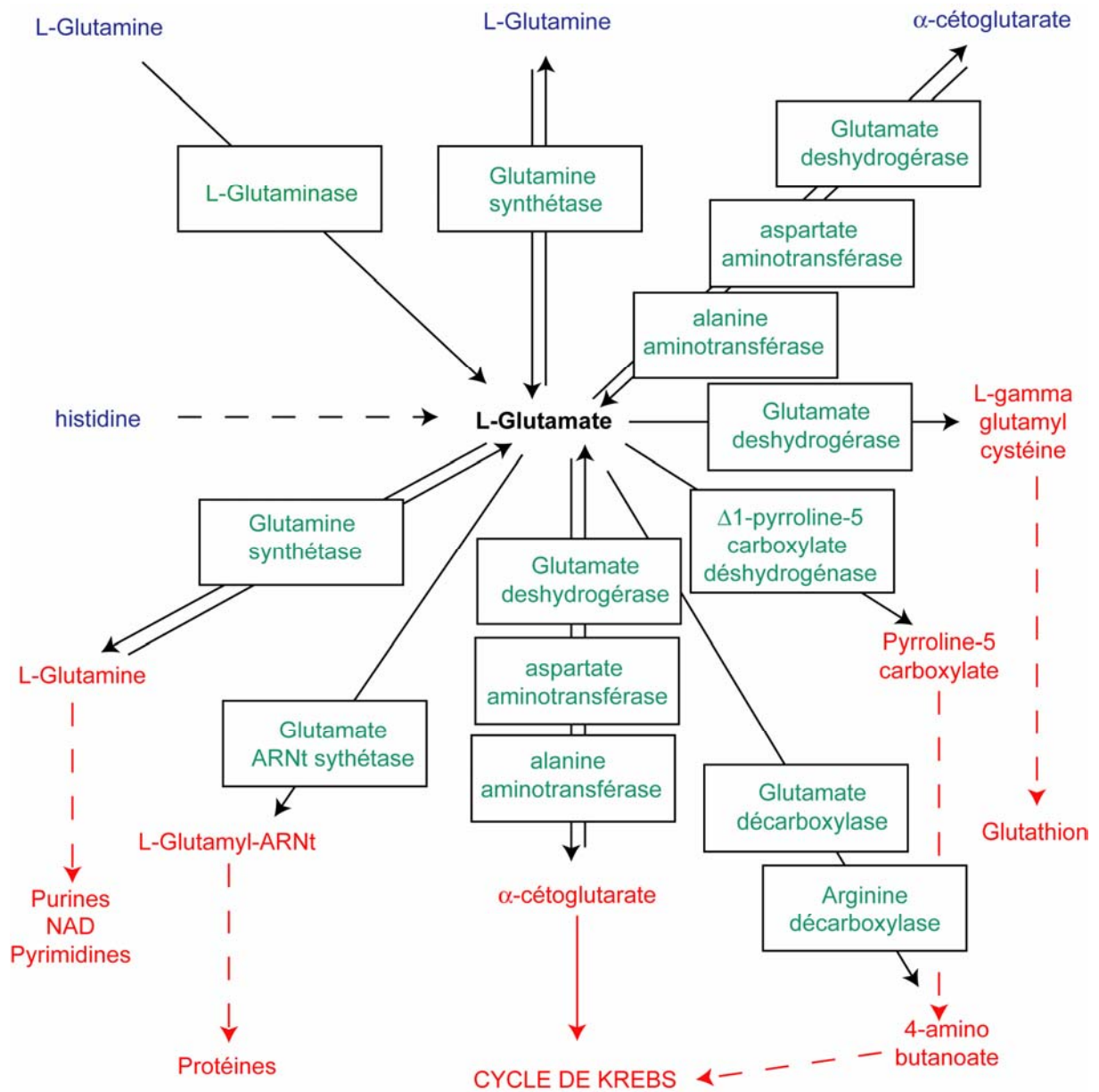


Figure 60 : Le glutamate au carrefour du métabolisme

Schéma du métabolisme avec le glutamate au cœur des fonctions métaboliques. En bleu les substrats du glutamate, en vert les enzymes, en rouge les produits du glutamate.

est cependant difficile d'évaluer le taux d'acides aminés excitateurs chez les patients mais, dans la maladie de Huntington, il ne semble pas y avoir d'augmentation de la concentration de glutamate (Nicoli et al. 1993). Par contre, le glutamate à concentration physiologique pourrait intervenir dans l'excitotoxicité indirecte induite par un déficit énergétique mitochondrial. En effet, dans différents modèles animaux de maladies neurodégénératives chroniques, la suppression chirurgicale des afférences glutamatergiques permet de protéger le striatum d'une lésion induite par le 3-NP (Beal et al. 1993b) et le malonate (Beal et al. 1993a; Greene et al. 1993). De même, la décortication cérébrale bloque la toxicité induite par l'injection de l'acide aminooxyacétique (AOAA), inhibiteur de la navette malate/aspartate (Urbanska et al. 1991). Enfin, elle est aussi capable de protéger la substance noire de la neurodégénérescence induite par le MPTP (Srivastava et al. 1993).

4.4. Autres excitotoxines endogènes

4.4.1. L'aspartate

L'aspartate est présent en forte concentration dans le cerveau et de façon ubiquitaire (Watkins and Evans 1981). Il a été détecté par immuno histochimie dans le cerveau de rat au niveau des neurones, des plexus choroïdes et des cellules épithéliales (Aoki et al. 1987). Il n'y a pas toujours superposition entre le marquage neuronal de l'aspartate et celui du glutamate, même s'ils sont sensés agir sur les mêmes récepteurs. Ainsi, dans l'hippocampe de primates, les interneurons contiennent de l'aspartate alors que les cellules granulaires et pyramidales contiennent du glutamate (Ottersen and Storm-Mathisen 1985). L'aspartate est comme le glutamate un intermédiaire métabolique et un acide aminé excitateur, mais sa fonction de neurotransmetteur est hypothétique.

Le L-aspartate est produit à partir de l'histidine et du N-acétylaspartate, par l'aminooxylase 2 en présence d'acétate (EC 3.5.1.15). Il est produit et dégradé par des voies métaboliques communes :

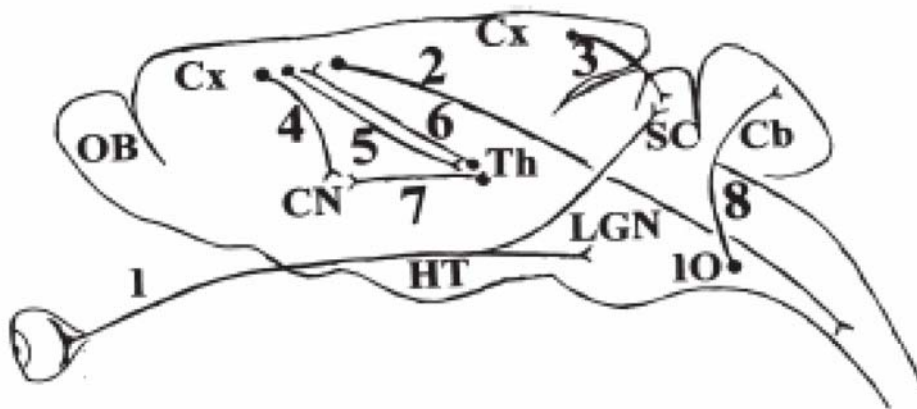
- par l'asparagine synthétase (EC 6.3.5.4), ayant pour substrat le L-aspartate et la L-asparagine ;
- par l'argininosuccinate synthétase en présence d'ATP (EC 6.3.4.5), ayant pour substrat le L-aspartate et le L-argininosuccinate ;
- par l'adéninosuccinate synthétase en présence d'ATP (EC 6.3.4.4) ayant pour substrat le L-aspartate et l'adénylosuccinate ;
- par l'aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1), composant de la navette aspartate/glutamate, ayant pour substrat le L-aspartate et l'oxaloacétate,

Il est à l'origine de la formation de différents produits métaboliques comme :

- Le L-aspartyl-ARNt, utile à la traduction des protéines, par la L'Aspartyl ARNt synthétase (EC 6.1.1.22) en présence d'ATP ;
- Le N-carbamoyl-L-aspartate, utilisé pour la synthèse des pyrimidines, par l'aspartate transcarbamoylase (EC 2.1.3.2) ;
- La biosynthèse de la lysine et de la β -alanine.

L'aspartate est un neurotransmetteur hypothétique car le seul point en faveur de ce rôle est qu'il agit sur les récepteurs glutamatergiques et permet d'induire une dépolarisation neuronale lorsqu'il est appliqué sur les cellules de Renshaw (Duggan 1974). En défaveur avec son rôle de neurotransmetteur, l'aspartate est très rarement concentré dans des vésicules synaptiques et rarement libéré par les terminaisons nerveuses de façon dépendante du calcium

A



B

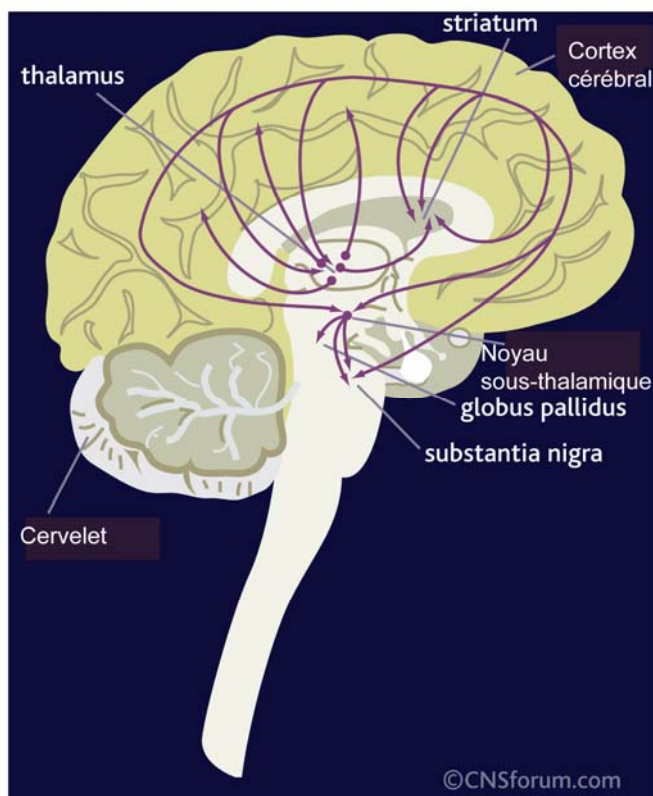


Figure 61 : Les différentes voies glutamatergiques dans le cerveau

A : voies glutamatergiques chez le rat. B : voies glutamatergiques chez l'homme, incluant le Nerf optique (1), motoneurones supérieures cortico-spinaux (2), voie cortico-tectale (3), voie cortico-striatale (4), voie cortico-thalamique (5), voie thalamo-corticale (6), voie thalamo-striatale (7), voie olivocérébelleuse (8). Cb : cervelet, CN : noyau caudé, HT : hypothalamus, IO : olive inférieure, LGN : corps genouillé latéral, OB : bulbes olfactifs, SC ; colliculus supérieur, Th : thalamus. Schéma tiré de (Doble 1999)

(Doble 1999). Cependant, il est probable qu'il puisse jouer le rôle de neurotransmetteur dans certaines régions cérébrales, comme le cervelet. En effet, c'est la région dans laquelle l'induction d'une dépolarisation membranaire par le K^+ , peut s'accompagner d'une libération d'aspartate dépendante du calcium (Vollenweider et al. 1990). En parallèle, la lésion des fibres grimpantes de la voie olivocérébelleuse s'accompagne par une réduction du niveau d'aspartate dans le cervelet (Nadi et al. 1977). L'autre région cérébrale pouvant faire intervenir l'aspartate comme neurotransmetteur, en raison de sa forte concentration observée chez le chat, est le nerf auditif (Godfrey et al. 1977).

4.4.2. Le N-acétylaspartylglutamate

Le N-acétylaspartylglutamate (NAAG) est un dipeptide (Figure 59) exprimé presque exclusivement dans le système nerveux (Miyake et al. 1981; Blakely and Coyle 1988), en quantité nettement supérieure à la plupart des neuropeptides connus comme neurotransmetteur (Guarda et al. 1988). Il est ainsi présent en concentration millimolaire dans la moelle épinière des mammifères (Gehl et al. 2004) et colocalisé au niveau de neurones glutamatergiques, dopaminergiques, sérotoninergiques, GABAergiques et cholinergiques du système nerveux central (Neale et al. 2000). Il est particulièrement abondant dans d'importantes voies de projections, comme les axones spinaux ascendants et descendants, les motoneurones spinaux, les cellules ganglionnaires rétinienne, les neurones géniculocorticaux, la voie nigrostriée, certains neurones afférents cérébelleux et les grands neurones spinaux sensoriels (Neale et al. 2000). Il est présent au niveau neuronal mais aussi au niveau des oligodendrocytes, des astrocytes en concentration variable (du μM à $200\mu M$) pour les astrocytes du cervelet ou corticaux, et de la microglie (à l'état de traces sauf après activation par le LPS) (Cassidy and Neale 1993; Passani et al. 1998; Wroblewska et al. 1998).

Le NAAG est synthétisé par une enzyme plutôt qu'issu de modifications post-traductionnelles comme les autres neuropeptides. L'enzyme de biosynthèse n'a pas été isolée et les substrats possibles sont nombreux. Il a successivement été montré que le glutamate, l'aspartate, la glutamine, le glucose puis dernièrement le NAA sont des précurseurs du NAAG (Cangro et al. 1987; Tyson and Sutherland 1998; Gehl et al. 2004). Cette biosynthèse est limitée par la disponibilité en NAA, capturé de façon préférentielle par les astrocytes cérébelleux et stimulée par la dépolarisation membranaire avec le K^+ (Gehl et al. 2004). Le NAAG est dégradé en glutamate par des ecto-peptidases de la famille des glutamates carboxypeptidases, exprimées au niveau des cellules neuronales et gliales (Robinson et al. 1987; Cassidy and Neale 1993; Bzdega et al. 1997; Bzdega et al. 2004).

Le NAAG a toutes les caractéristiques pour être un neurotransmetteur exciteur. En effet, il semble synthétisé par une machinerie enzymatique spécifique (Cangro et al. 1987; Tyson and Sutherland 1998; Gehl et al. 2004). Il est présent au niveau des vésicules synaptiques des neurones (Williamson and Neale 1988) et libéré par celle-ci de façon dépendante du calcium après une dépolarisation neuronale (Tsai et al. 1988; Zollinger et al. 1988). Il a une affinité pour les récepteurs glutamatergiques (Zaczek et al. 1983), notamment pour les récepteurs NMDA (Westbrook et al. 1986) et les récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe II, et plus particulièrement les mGluR3 (Wroblewska et al. 1997). L'activation des récepteurs NMDA a pour conséquence l'excitation des neurones spinaux (Westbrook et al. 1986) et l'injection du NAAG dans l'hippocampe et s'accompagne de convulsions, témoin d'un effet exciteur (Zaczek et al. 1983). Enfin, un système d'inactivation synaptique par les peptidases permet la régulation de l'action du NAAG (Robinson et al. 1987; Cassidy and Neale 1993; Bzdega et al. 1997; Bzdega et al. 2004).

Cependant cette inactivation du NAAG forme du glutamate, ce qui laisse présager une action indirecte du NAAG via le glutamate sur les glutamatergiques. Deux éléments appuient cette hypothèse. Le premier élément est la faible affinité du NAAG pour les récepteurs NMDA, donc il faudrait une forte quantité de NAAG synaptique pour qu'il soit toxique même si l'excitation des neurones spinaux a été observée en culture (Westbrook et al. 1986). Le second élément en accord avec l'excitotoxicité du NAAG via le glutamate, est l'effet neuroprotecteur des inhibiteurs des carboxypeptidases dégradant le NAAG en glutamate dans différents modèles de maladies neurodégénératives comme la SLA, l'ischémie cérébrale, le traumatisme cérébral ainsi que dans un modèle de douleur neuropathique et de schizophrénie (Neale et al. 2005).

4.4.3. Les dérivés sulfurés

Quatre acides aminés sulfurés, analogues de l'aspartate pour l'acide L-cystéique (CA) et l'acide cystéinesulfonique (CSA), ou analogues du glutamate pour l'acide homocystéique (HCA) et l'acide cystéinesulfonique (HCSA), ont un potentiel de neurotransmetteur exciteur (Figure 59) (Curtis and Watkins 1963). Ces acides aminés sulfurés sont présents en très faible concentration dans le cerveau de rat et de souris, de l'ordre de la pmole/mg (Thompson and Kilpatrick 1996). Chez l'homme, une immunoréactivité de l'HCA a été détectée au niveau d'astrocytes présents dans les glioblastomes (Ortega et al. 1994) et au niveau des terminaisons des photorécepteurs et des cellules gliales de Müller dans la rétine (Davanger et al. 1994).

La biosynthèse de ces acides aminés n'est pas totalement élucidée mais le HCSA puis le CSA dériveraient du catabolisme de la méthionine et le CSA et le CA dérivent du catabolisme de la cystéine (Thompson and Kilpatrick 1996). La seule enzyme identifiée est la cystéine dioxygénase (EC 1.13.11.20) catalysant la dégradation de la cystéine en CSA (Griffith 1983).

Ils sont libérés suivant un processus dépendant du calcium et après dépolarisation par le K^+ , à partir de tranches de différentes régions cérébrales, comme le cortex, l'hippocampe, le cervelet et la moelle épinière de rat (Do et al. 1986a). Au niveau de l'hippocampe, la libération de L-CSA et de L-HCA est observée après une stimulation électrique proche de celle induisant la LTP (Klančnik et al. 1992). Les acides aminés excitateurs sulfurés sont des agonistes faibles des récepteurs AMPA et peu affins pour les récepteurs du kaïnate (Murphy and Williams 1987), avec une propriété d'agoniste mixte modéré des récepteurs NMDA (Pullan et al. 1987). Le L-HCA a notamment une activité agoniste des récepteurs NMDA, démontrée par des études électrophysiologiques, au niveau du noyau caudé et du putamen de rat et de chat (Do et al. 1986b; Lehmann et al. 1988; Herrling et al. 1989). Ils sont excitotoxiques notamment après injection chez la souris nouveau-née (Olney et al. 1971; Olney et al. 1987). Ils sont transportés par les mêmes transporteurs membranaires que le glutamate avec une affinité variable selon l'acide aminé sulfuré et le type de transporteur (Grieve et al. 1991).

L'implication des acides aminés sulfurés excitateurs dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives serait possible dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, car il a été mis en évidence une réduction des concentrations plasmatiques des sulfates par rapport à la cystéine pouvant refléter une augmentation de production cérébrale des aminés sulfurés excitateurs (Heafield et al. 1990).

4.4.4. Le quinolinate

Le quinolinate est l'excitotoxine endogène de référence utilisée par voie intrastriatiale pour induire une lésion striatale chez les rats et les primates (annexe 1 et 2), se rapprochant de la neurodégénérescence observée dans la maladie de Huntington. Par ailleurs, sa concentration est anormalement augmentée dans différentes pathologies neurodégénératives, notamment dans la maladie de Huntington (Guidetti et al. 2004).

Le quinolinate est un acide aminé formé dans de nombreux tissus, dont le foie et le cerveau, comme un intermédiaire métabolique de la dégradation du tryptophane via les kynurénines (Stone 1993, 2001). C'est un acide aminé exciteur endogène au rôle physiologique méconnu. Chez l'homme, la concentration cérébrale est de l'ordre de 2 nmol/g de tissus, soit environ 2 µM avec un rapport de concentration entre de 2 à 4 fois plus élevée dans le néocortex (2 nmol/g) que dans le striatum (Wolfensberger et al. 1983). Cependant, les concentrations de quinolinate tissulaires sont nettement inférieures à celles nécessaires pour activer les récepteurs NMDA, estimées supérieure à 100 µM (Tsuzuki et al. 1989).

4.4.4.1. Le métabolisme du tryptophane et la biosynthèse du quinolinate

La conversion du tryptophane en nicotinamide et en nucléotides conjugués, par la voie des kynurénines, a été découverte en 1947 (Beadle et al. 1947). Par la suite, le quinolinate a été isolé en tant qu'intermédiaire de la voie des kynurénines (Gholson et al. 1964). Cette voie du métabolisme a tout d'abord été étudiée dans le cadre du déficit en pyridoxine, coenzyme de différentes enzymes de synthèse des kynurénines, responsable de défaut de NAD. Le métabolisme du tryptophane a ensuite été étudié dans le cadre de la formation du neurotransmetteur, le 5-Hydroxytryptophane, représentant moins de 5% du catabolisme du tryptophane (Peters 1991), très inférieur aux 95 % restant orientés vers les kynurénines (Wolf 1974).

Le L-tryptophane est dégradé en NAD en 8 étapes par les enzymes suivantes (Figure 62) (Karp et al. 2006) :

- La Tryptophane 2,3-dioxygénase (EC 1.13.11.11) qui transforme le L-tryptophane en L-formylkynurénine en présence d'O₂ ;
- La kynurénine formylase ou arylformamidase (EC 3.5.1.9) qui transforme, en présence d'H₂O, la L-formylkynurénine en kynurénine et formate ;
- La kynurénine 3-monooxygénase (EC 1.14.13.9) qui transforme, en présence de NADPH et d'O₂, la kynurénine en 3-hydroxykynurénine avec du NADPH et H₂O ;
- La kynuréninase (EC 3.7.1.3) qui transforme, en présence d'H₂O, la 3-hydroxykynurénine en 3-hydroxyanthranilate et L-alanine ;
- La 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase (EC 1.13.11.6) qui forme en deux étapes le 2-amino-3-carboxymuconate semialdéhyde par oxydation avec O₂, puis le quinolinate par déshydratation spontanée ;
- La quinolinate phosphoribosyltransférase (EC 2.4.2.19) qui décarboxyle le quinolinate, en présence de 5-phosphoribosyl-1-phosphate, en nicotinate nucléotide ;
- La nicotinamide/acide nicotinique mononucléotide adényltransférase (EC 2.7.7.18) qui forme en présence d'ATP le déamidoNAD ;

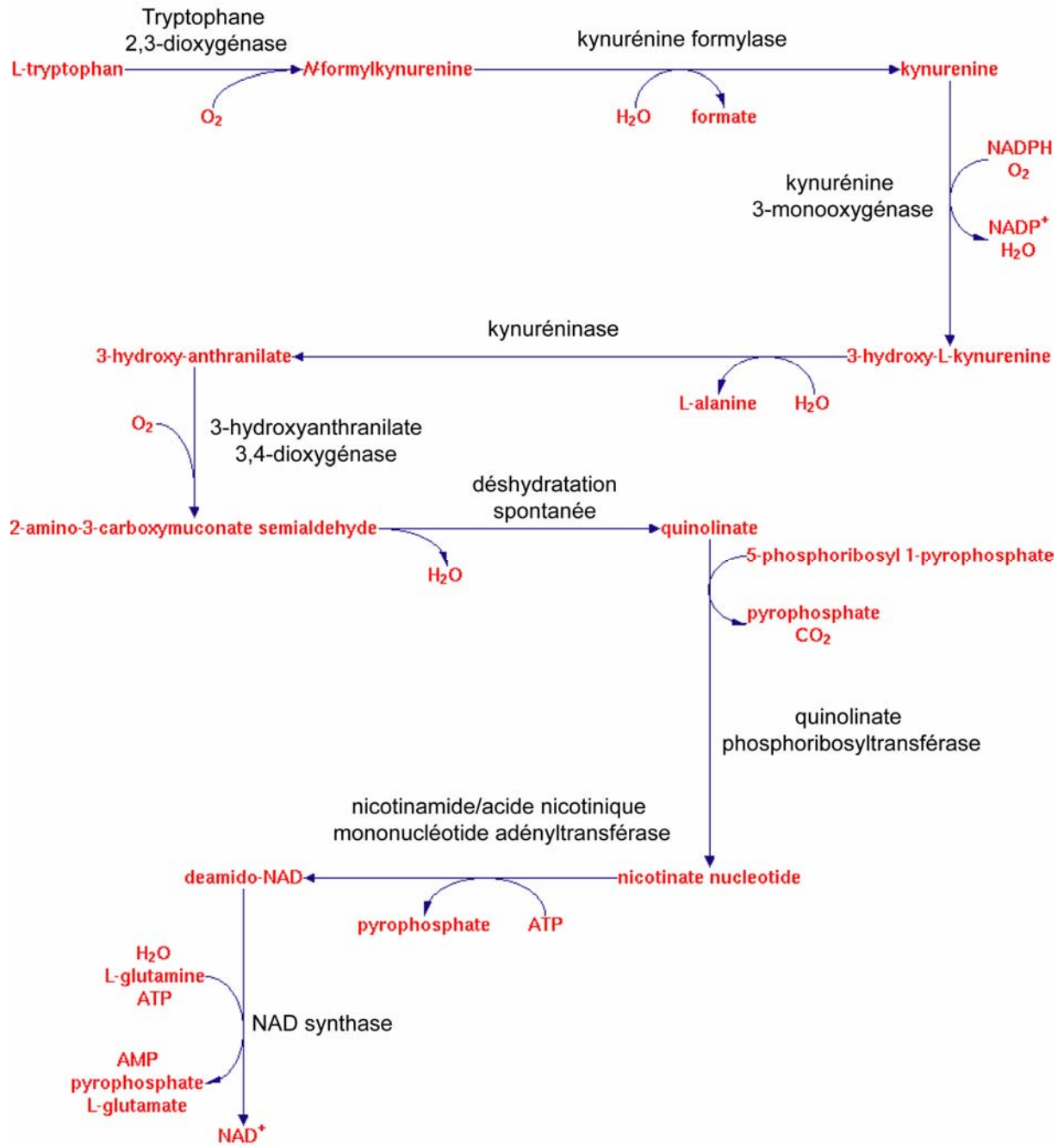


Figure 62 : Voie majoritaire du catabolisme du tryptophane

Schéma des réactions enzymatiques de la voie des kynurénines formant le quinolinate et le NAD à partir du L-tryptophane.

-
- La NAD synthase dépendant de la glutamine (EC 6.3.5.1) qui forme le NAD⁺ et du glutamate en présence de L-glutamine, d'ATP et d'H₂O.

La kynurénine est le produit de départ de réactions importantes pour la formation de trois produits ayant un rôle sur le fonctionnement des récepteurs aux acides aminés excitateurs : le quinolinate, l'acide kynurénique et la 3-hydroxykynurénine.

La quantité de quinolinate dans le cerveau de rat est préférentiellement augmentée par rapport à celle des autres métabolites comme le tryptophane, le 5-hydroxytryptophane et 5-hydroxyindoleacétique, lors de l'administration systémique de tryptophane (Heyes and Markey 1988). Il est intéressant de noter que l'injection intrapéritonéale unique de tryptophane de 250 mg/kg permet l'atteinte d'une concentration de quinolinate dans le striatum de 1,4 μM (During et al. 1989), concentration suffisante pour induire une neurotoxicité sur les tranches corticostriales (Whetsell and Schwarcz 1989). Paradoxalement, un régime diététique ne contenant pas de tryptophane maintenu pendant 15 jours double le niveau de quinolinate dans le cortex des rats en parallèle d'une réduction des niveaux de 5-hydroxytryptophane et de 5-hydroxyindoleacétique, suggérant l'existence d'une autre voie de synthèse du quinolinate (Moroni et al. 1989). Ceci est en accord avec l'observation de signes cliniques concordant avec une hyperactivation des récepteurs NMDA, comme les hallucinations, la confusion et la démence, observés dans la pellagre, affection consécutive à un régime sans tryptophane (Pitche 2005).

L'origine de l'accumulation du quinolinate dans le cerveau de patients atteints de maladies neurodégénératives est difficile à définir, mais plusieurs éléments peuvent l'expliquer. Le premier élément est la vitesse maximale de réaction de l'enzyme de biosynthèse du quinolinate, la 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase, 30 fois plus élevée que celle de l'enzyme de dégradation, la quinolinate phosphoribosyltransférase, alors que leur affinité pour le substrat est identique (Okuno and Schwarcz 1985; Foster et al. 1986). Le deuxième point est la différence d'expression des deux enzymes souvent en faveur de l'enzyme de biosynthèse, notamment le striatum de rat (Stone 1993). L'autre origine possible de l'accumulation du quinolinate dans le cerveau est l'apport du quinolinate ou de précurseur par les vaisseaux sanguins, produit à partir de tissus périphériques, comme le foie. En effet, le LPS (lipopolysaccharide) est capable d'augmenter la concentration cérébrale du quinolinate après administration périphérique et non par voie icv. Le précurseur responsable de l'accumulation du quinolinate cérébral serait la kynurénine, formée en périphérie car l'inhibition des enzymes de biosynthèse du quinolinate à partir de la kynurénine, la kynuréninase et kynurénine hydrolase, par le nicotylalanine prévient l'augmentation de quinolinate (Moroni et al. 1991).

4.4.4.2. Le quinolinate, un acide aminé excitateur

La découverte du rôle excitateur du quinolinate est relative au fait que le quinolinate et l'acide kynurénique ont respectivement un effet agoniste (Stone and Perkins 1981) et antagoniste au niveau des récepteurs des acides aminés excitateurs (Perkins and Stone 1982), présents sur les neurones du système nerveux central (Perkins and Stone 1983a, 1983b). En parallèle, l'injection du quinolinate dans le cerveau des rongeurs provoque des convulsions (Lapin 1978b, 1978a), phénomène observé avec le glutamate (Hayashi 1954). Il est peu probable qu'il joue le rôle de neurotransmetteur, car aucun système de transport ou de recapture actif n'a été mis en évidence, ni sur les tranches striatales, ni sur les tranches hippocampales et ni sur les synaptosomes (Foster et al. 1984; Kitt and Spector 1987).

4.4.4.3. Le quinolinate et la physiopathologie des maladies neurodégénératives

Le quinolinate pourrait être impliqué dans la neurodégénérescence de différentes pathologies comme le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), les hépathoencéphalies et la maladie de Huntington. En effet, la concentration du quinolinate est augmentée dans le LCR des patients présentant une atrophie cérébrale et une démence consécutives à l'infection par le virus du VIH (Heyes et al. 1989), dans le LCR et le cortex de patients décédés d'un coma suite à une lésion hépatique (Moroni et al. 1989) ainsi que dans le striatum et le cortex frontal de patients au stades 0 et 1 de la maladie de Huntington (Guidetti et al. 2004). Dans le cas de la maladie de Huntington, c'est la biosynthèse qui semble augmentée car une augmentation de l'activité de l'enzyme de biosynthèse du quinolinate a été observée dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Huntington (Schwarcz et al. 1988b) alors que le taux de quinolinate dans le LCR n'est pas différent de celui de présent chez les sujets sains (Schwarcz et al. 1988a).

4.4.4.4. Le quinolinate, excitotoxine utilisée pour modéliser la maladie de huntington

Le quinolinate est l'excitotoxine de référence pour modéliser la maladie de Huntington, par injection intrastriatiale chez les rongeurs (annexe 1) (Beal et al. 1986) et chez les primates (annexe 2) (Ferrante et al. 1993). En effet, au contraire de l'iboténate et du kaïnate lésant toutes les sous-populations neuronales du striatum, elle induit la neurodégénérescence préférentielle des MSN striataux avec pour conséquence la réduction du GABA et de la substance P, tout en préservant les interneurons contenant la somatostatine et le neuropeptide Y (Schwarcz et al. 1984; Beal et al. 1986). C'est l'excitotoxine utilisée dans l'étude de l'effet de la dysfonction mitochondriale sur l'excitotoxicité striatale dans le chapitre 5.

4.5. Excitotoxines exogènes

Les acides aminés excitateurs exogènes sont nombreux et peuvent être de deux origines : naturelle ou synthétique (Figure 58 et 63). Les premiers ont été mis en évidence à la suite d'observation de phénomène de toxicité, souvent après ingestion d'aliments toxiques comme des champignons ou des plantes ou des aliments contaminés; alors que les seconds ont été synthétisés dans le but d'identifier les sous-types de récepteurs glutamatergiques.

4.5.1. Produits d'origine naturelle

Les excitotoxines naturelles les acromélates, l'acide domoïque, l'acide iboténique, l'acide kaïnique, l'acide quisqualique, le β -méthylamino-L-alanine (BMAA), la β -oxalylamino-L-alanine (BOAA) et la wilaridiine (Figure 63).

4.5.1.1. Acromélate A et B

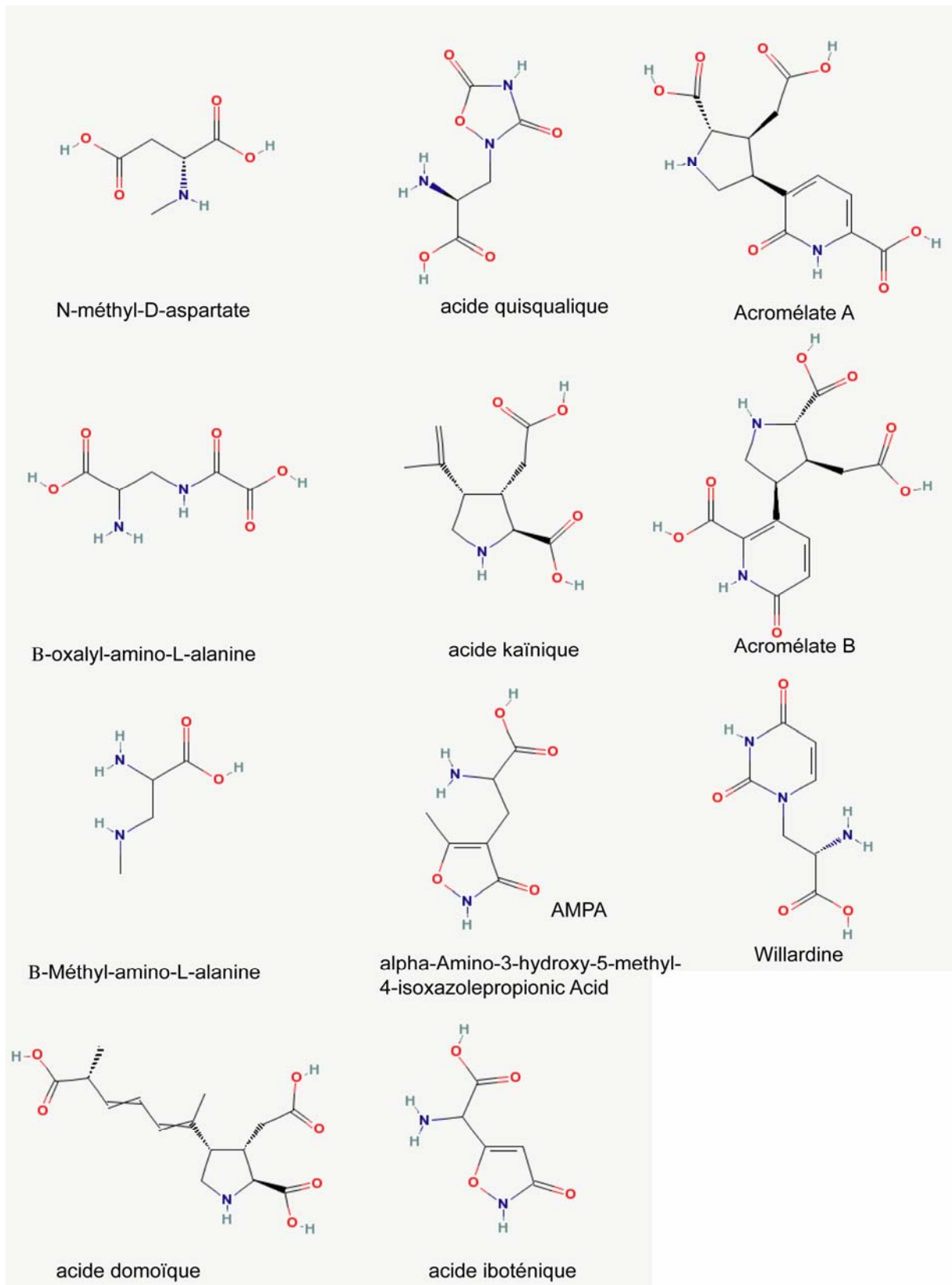


Figure 63 : Acides aminés excitateurs exogènes

Excitotoxines exogènes et leur structure issues de pubchem

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pcsubstance>

Les acromélates A et B, dérivés de la pyridine présents dans le champignon non comestible, le *Clitocybe acromelelga* (Shinozaki et al. 1986), champignon poussant dans les forêts de bambous japonaises, sont responsables d'une pathologie spinale avec paresthésie des extrémités et d'allodynie (douleur tactile extrême) par ingestion accidentelle (Saviuc et al. 2001). Les acromélates A et B sont des agonistes des récepteurs ionotropiques non-NMDA du de l'AMPA et du kaïnate (Kwak et al. 1992), capables d'induire une dépolatation neuromusculaire (Shinozaki et al. 1986) et des lésions spécifiques des interneurons spinaux induisant une paraplégie spastique chez le rat, après administration systémique (Shinozaki et al. 1989). Ils induisent aussi une élévation de la concentration de calcium intracellulaire après une application sur une culture de neurones spinaux (Ogata et al. 1994).

4.5.1.2. Acide domoïque

L'acide domoïque est responsable de lésion du système limbique et d'amnésie antérograde consécutives à la consommation de moules contaminée par du phytoplancton, la *Nitzschia pungens* (Perl et al. 1990). L'acide domoïque est un agent pharmacologique inhibiteur des transporteurs astrocytaires du glutamate permettant sa libération (Berman and Murray 1997; Ross et al. 2000) et un agoniste des récepteurs ionotropiques non NMDA, de forte affinité pour les récepteurs du kaïnate et de moyenne affinité pour les récepteurs AMPA (Debonnel et al. 1990). Il est capable d'induire une dépolarisation neuronale de neurones spinaux de grenouille et de rat (Biscoe et al. 1975), une entrée de calcium dans les neurones (Nijjar and Nijjar 2000) et une neurodégénérescence de l'hippocampe (Stewart et al. 1990; Scallet et al. 1993).

4.5.1.3. Acide iboténique

L'acide iboténique est responsable d'hallucinations visuelles, de délires et d'ataxie (Benjamin 1992) consécutives à la consommation d'un champignon vénéneux, l'amanite tue-mouches *Amanita muscaria* (Eugster et al. 1965). L'acide iboténique est un agoniste non sélectif des récepteurs NMDA et des récepteurs ionotropiques non NMDA, de type AMPA (Krogsgaard-Larsen and Hansen 1992). Il est capable d'induire une dépolarisation neuronale, mise en évidence sur le neurone unique de l'escargot (Walker et al. 1971), puis sur les cellules de Renshaw (MacDonald and Nistri 1978) et une neurodégénérescence du noyau caudé et du putamen mimant la maladie de Huntington chez le primate (Hantraye et al. 1990).

4.5.1.4. Acide kaïnique

L'acide kaïnique est un dérivé de la pyrrolidine présent dans les algues rouges identifié comme l'agoniste spécifique des récepteurs ionotropiques du kaïnate (Coyle 1987). C'est un produit capable d'induire une neurodégénérescence du striatum chez le rat (Coyle and Schwarcz 1976; McGeer and McGeer 1976) et chez le primate (Kanazawa 1992) mimant la maladie de Huntington (Beal et al. 1986) ainsi qu'une neurodégénérescence de l'amygdale mimant l'épilepsie (Menini et al. 1980).

4.5.1.5. Acide quisqualique

L'acide quisqualique est une excitotoxine présente dans les graines de *Quisqualis indica* (Takemoto et al. 1975). L'acide quisqualique est un agoniste des récepteurs non NMDA de type AMPA (Murphy et al. 1987a) et des récepteurs métabotropiques du glutamate couplés une protéine Gq augmentant le calcium après activation de la phospholipase C (Guiramand et al. 1991). Il est capable d'induire une dépolarisation neuromusculaire (Shinozaki and Shibuya 1974) et neuronale des neurones spinaux de grenouille et de rat (Biscoe et al. 1975). Il induit une neurodégénérescence striatale chez le rat après une injection striatale, mimant la maladie de Huntington (Ruzicka and Jhamandas 1990).

4.5.1.6. BMAA

Le BMAA, présent dans les fleurs de *Cycas circinalis* (Nunn et al. 1987) et responsable par intoxication chronique, d'un syndrome de parkinsonisme et sclérose latérale amyotrophique dans une population du Pacifique, les Chamorros de Guam (Spencer et al. 1991). Le BMAA est un agoniste des récepteurs NMDA (Zeevalk and Nicklas 1989) et un agoniste potentiel des récepteurs métabotropiques (Copani et al. 1990). Il est capable d'induire une excitotoxicité sur les neurones de la rétine du poulet (Zeevalk and Nicklas 1989) et d'induire une neurodégénérescence des neurones spinaux mimant la sclérose latérale amyotrophique (Sillevis Smitt and de Jong 1989).

4.5.1.7. BOAA

La BOAA, présente dans le pois carré et responsable du lathyrisme caractérisé par une paraparésie spastique non progressive et irréversible (Spencer and Schaumburg 1983). Le BOAA est un agoniste des récepteurs ionotropiques non NMDA, de type AMPA (Krogsgaard-Larsen and Hansen 1992) et est capable d'induire une excitotoxicité sur les neurones de la rétine du poulet (Zeevalk and Nicklas 1989) et d'induire une neurodégénérescence de la voie corticospinale mimant les maladies motoneuronales centrales (Ludolph and Spencer 1996).

4.5.1.8. Willardiine

La willardiine, dérivé de la pyrimidine présente dans le pois commun (Ashworth et al. 1972) est un agoniste des récepteurs glutamatergiques non NMDA de la famille du kaïnate et de l'AMPA (Wong et al. 1994) capable d'induire la neurodégénérescence de neurones d'hippocampe en culture (Zorumski et al. 1991).

4.5.2. Produits de synthèse

Les excitotoxines de synthèse sont le NMDA et l'AMPA, produits d'importance capitale car ils ont permis d'identifier deux classes de récepteurs du glutamate, les récepteurs ionotropiques du NMDA et les récepteurs ionotropiques non NMDA de l'AMPA.

4.5.2.1. NMDA

Le NMDA est un analogue structural de l'aspartate (Figure 63), découvert en 1961 par la mise en évidence de l'activité excitatrice sur les neurones du système nerveux central des mammifères (Curtis and Watkins 1961). Il a une activité d'agoniste spécifique des récepteurs NMDA, sans affinité pour les transporteurs du glutamate et est capable d'induire une lésion striatale chez le rat par injection intrastriatale, mimant la maladie de Huntington (Ruzicka and Jhamandas 1990).

4.5.2.2. AMPA

L'AMPA est un produit analogue à l'acide iboténique faisant partie des acides aminés hétérocycliques (Figure 63), identifié comme un nouveau ligand glutamatergique en 1980 (Hansen and Krogsgaard-Larsen 1980; Krogsgaard-Larsen et al. 1980).

4.6. Récepteurs du glutamates

Les excitotoxines sont des molécules analogues au glutamate et à l'aspartate, agissant sur les récepteurs glutamatergiques postsynaptiques pour induire une transmission synaptique ou présynaptiques pour réguler la libération du glutamate (Monaghan et al. 1989; Hollmann and Heinemann 1994; Kew and Kemp 2005). En complément, certaines excitotoxines peuvent activer ou inhiber les transporteurs des acides aminés excitateurs, chargés de la recapture du glutamate synaptique (Bridges and Esslinger 2005).

Seront rappelées dans ce chapitre les différents types de récepteurs, leur structure et leur localisation ainsi que leurs fonctions puis leur intervention dans les mécanismes de neurodégénérescence.

Les récepteurs glutamatergiques sont classés en deux familles : les récepteurs ionotropiques (iGluR) et les récepteurs métabotropiques (Figure 64) (Kew and Kemp 2005).

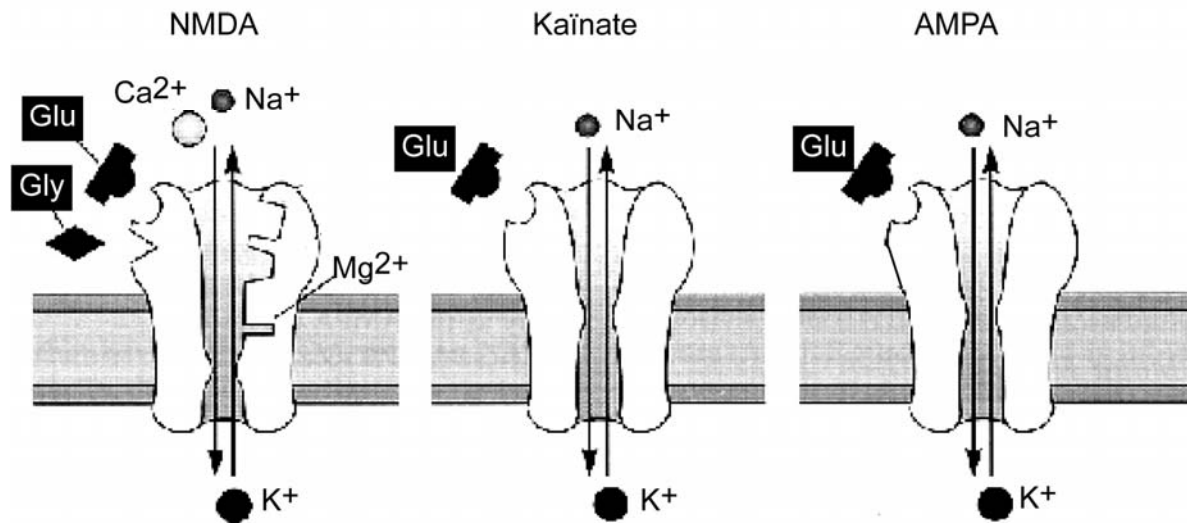
4.6.1. Récepteurs ionotropiques : types, structures, fonctions et localisations

Les récepteurs ionotropiques sont divisés en trois sous-types (Figure 64 et tableau 2) (Kew and Kemp 2005):

- Les récepteurs du NMDA perméables au Ca^{2+} , Na^+ et K^+ et comprenant 7 types de sous-unités (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A et NR3B) ;
- Les récepteurs de l'AMPA, anciennement du quisqualate, perméables au Na^+ et K^+ et dans une moindre mesure au Ca^{2+} , comprenant 4 types de sous-unités (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4) ;
- Les récepteurs du kaïnate, perméables au Na^+ et K^+ et dans une moindre mesure au Ca^{2+} et comprenant 5 types de sous-unités (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2).

Les différents sous-types d'iGluR possèdent 20 à 30 % d'homologie structurale, classés selon l'agoniste préférenciel (le NMDA, le kaïnate et l'AMPA) et sont organisés en hétérotétramères (Dingledine et al. 1999; Mayer and Armstrong 2004). Ce sont des récepteurs transmembranaires avec des domaines extracellulaires, intramembranaires et intracellulaires (Figure 65A). Ils sont localisés au niveau de la membrane plasmique et possèdent une partie

Récepteurs ionotropiques



Récepteurs métabotropiques

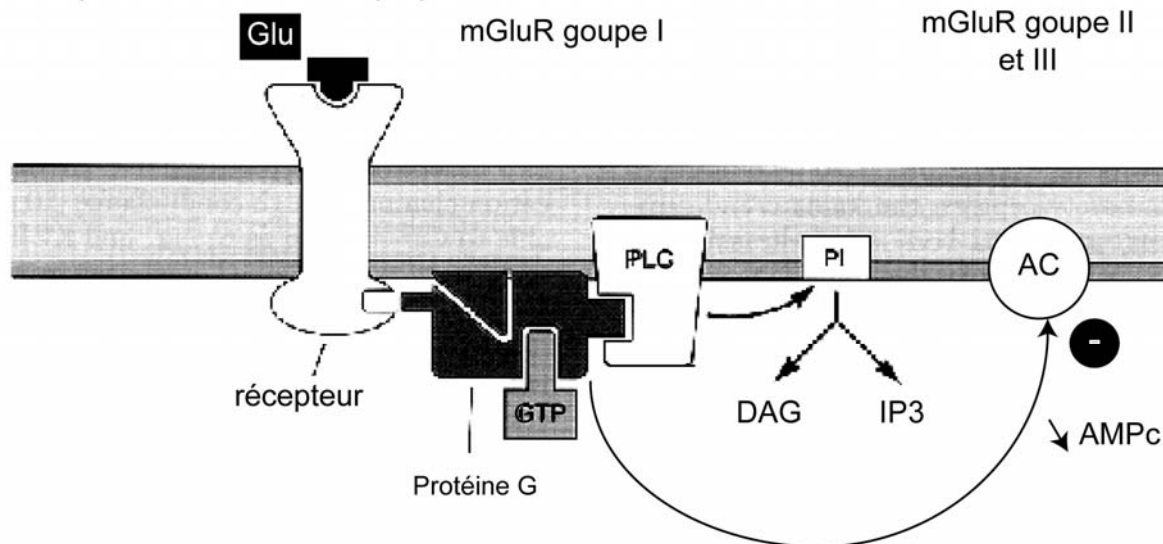


Figure 64 : Les 5 types de récepteurs glutamatergiques

Les cinq types de récepteurs glutamatergiques sont composés de trois types de récepteurs ionotropiques (NMDA, kainate et AMPA) et de deux types de récepteurs métabotropiques, ceux couplés à la protéine G activant la phospholipase C (PLC) dégradant l'inositol-4-phosphate (PI) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP3) et ceux couplés à la protéine G inhibant l'adénylate cyclase (AC), réduisent la formation d'AMP cyclique (AMPc). Glu : glutamate, Gly : glycine.

N-terminale localisée au niveau extracellulaire avec une homologie structurale au niveau du site bilobé de fixation de l'agoniste (site S1), avec les mGluR. Ils possèdent 3 domaines transmembranaires dont le premier est impliqué dans la formation du canal ionique. Ils comportent une boucle intracellulaire entre les deux premiers domaines transmembranaires passant partiellement dans la membrane, une boucle extracellulaire entre les domaines transmembranaires 2 et 3 avec un site de fixation de l'agoniste (site S2). La partie carboxyterminale est située dans le cytosol.

4.6.1.1. Récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont constitués d'au moins une sous-unité NR1, associée à un ou plusieurs types de sous unités NR2 seulement ou à NR2 et NR3 (Figure 65C). Les différences d'assemblage influencent les fonctions des récepteurs NMDA et celles-ci sont associées à des localisations tissulaires et à un âge de développement particulier.

Les sept types de sous-unités sont codées par des gènes différents (tableau 3) (Hollmann and Heinemann 1994) et il existe 9 variants d'épissage pour NR1 (McBain and Mayer 1994) et 2 pour NR2C.

Les sous-unités NR2A, B, C et D ont entre 38 et 53% d'identité de structure entre elles et 27% d'homologie avec NR1 (Monyer et al. 1992). Les récepteurs NMDA seraient exprimés exclusivement à la surface des neurones, avec une localisation postsynaptique majoritaire, avec un enrichissement au niveau du néocortex, des noyaux des ganglions de la base et de l'hippocampe (Nusser 2000). Ils peuvent aussi être extrasynaptiques (Hardingham et al. 2002). Au niveau glial, ils sont exprimés par les oligodendrocytes immatures et présents sur des cellules spécialisées comme les cellules de Müller en culture, et la glie de Bergmann (Gallo and Ghiani 2000). NR1 est exprimée ubiquitairement au niveau des neurones dans tout le cerveau et plus fortement au niveau du cervelet, du cortex cérébral et de l'hippocampe du rat (Moriyoshi et al. 1991). NR2B a une expression spécifiquement associée à NR1A au niveau des neurones striaux épineux GABAergiques de taille moyenne chez le rat (Landwehrmeyer et al. 1995; Kuppenbender et al. 2000). NR2A et NR2B sont associés avec différentes isoformes de NR1 avec une expression prédominante dans le cerveau antérieur humain (Monyer et al. 1992). NR2C est la sous-unité prédominante dans le cervelet, au niveau des neurones granulaires, aussi présente dans l'hippocampe, l'amygdale, le noyau caudé, le noyau subthalamique et le thalamus (Monyer et al. 1992). NR2D est exprimée surtout pendant le développement du diencephale (Hess et al. 1998). NR3A est exprimée préférentiellement pendant le développement du cortex cérébral (Andersson et al. 2001).

Le récepteur NMDA le plus courant semble être le récepteur NR1₂-NR2A-NR2B représenté sur la Figure 65C. Ce récepteur possède différents sites de liaison de différentes molécules aux propriétés (Cull-Candy et al. 2001) :

- d'agoniste pour le glutamate et le NMDA, se fixant sur les sous-unité NR2 ;
- de co-agoniste pour la D-glycine et la D-sérine, se fixant sur les sous-unité NR1 ;
- de bloqueur du canal pour le Mg²⁺ et le MK-801, se fixant dans le canal ;
- d'antagonistes compétitifs pour le D-AP5 ((R)-2-amino-5-phosphonopentanoate), se fixant sur les sous-unité NR2A et NR2B ;
- d'antagonistes non compétitifs pour l'ifenprodil, se fixant sur NR2B et le Zn²⁺, se fixant sur NR2A ;

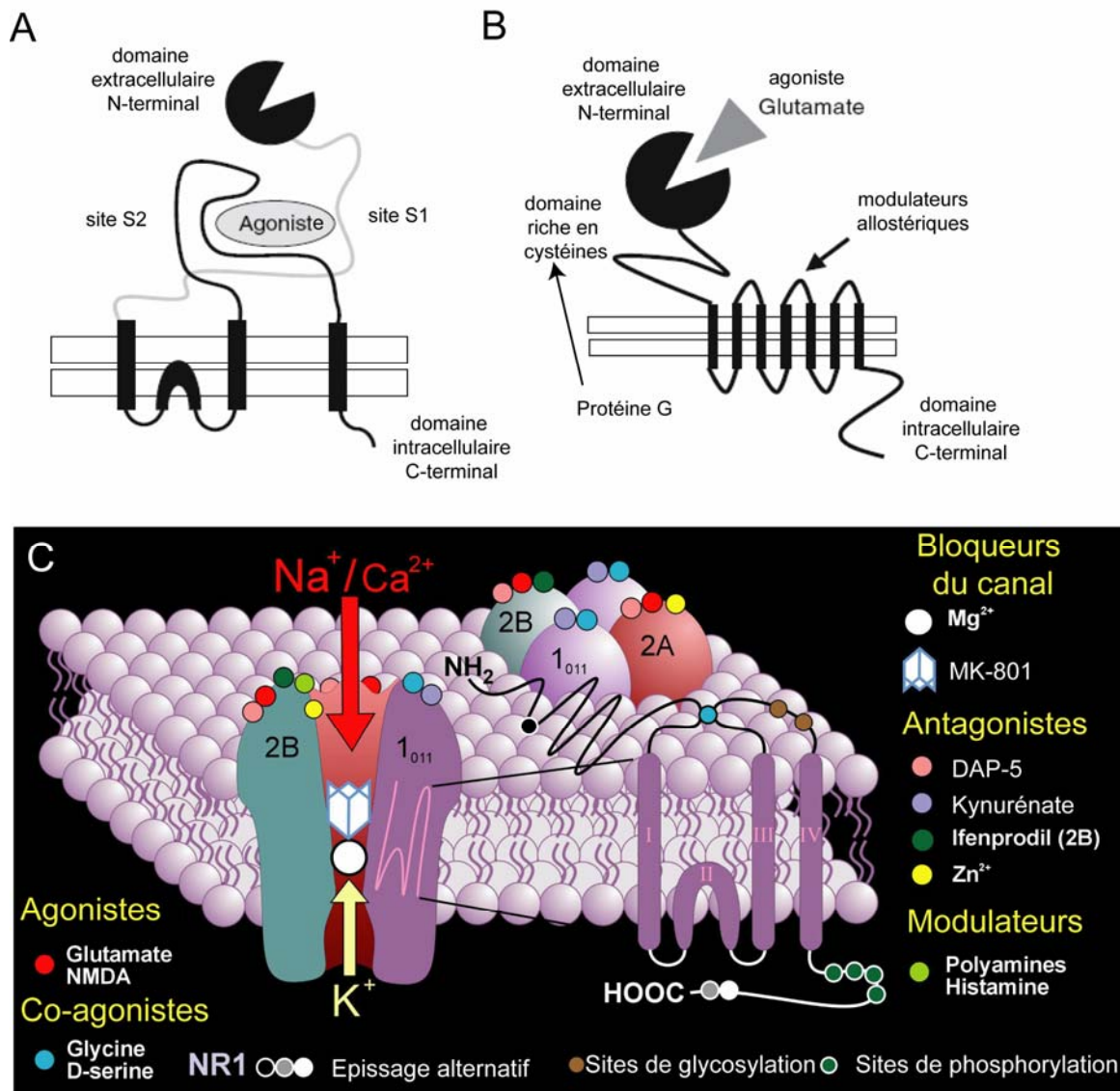


Figure 65 : Structure schématique des récepteurs ionotropiques, métabotropiques et du récepteur NMDA

A : structure d'un récepteur ionotropique. B : structure d'un récepteur métabotropique. Schéma issu de (Kew and Kemp 2005). C : structure d'un récepteur NMDA avec les sites de fixation des différentes molécules et les sites de maturation. Schéma issu de <http://www.chrisparsons.de/Chris/nmda.htm>.

Récepteurs ionotropiques	NMDA	AMPA	Kaïniques
Nombre de sous-unités différentes	7	4	5
Sous-unités	NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A et NR3B	GluR1, GluR2, GluR3, GluR4	GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2
Perméabilité	Ca ²⁺ , Na ⁺ et K ⁺	Na ⁺ et K ⁺ et dans une moindre mesure au Ca ²⁺	
Structure	hétérotétramère	hétérotétramère	homo et hétérotétramères
Localisation	Neuronale, synaptique (Nusser 2000) et extrasynaptique (Hardingham et al. 2002) et glie de Bergmann, cellules de Müller de la rétine (Gallo and Ghiani 2000)	neuronale synaptique préférentielle, reticulum endoplasmique et appareil de Golgi (Nusser 2000), extrasynaptique au niveau du cervelet et de l'hippocampe (Nusser 2000), microglie, les progéniteurs oligodendrocytaires et la glie de Bergmann (Gallo and Ghiani 2000)	pré et post synaptique de la membrane neuronale, peuvent être exprimés par les cellules microgliales et les progéniteurs oligodendrocytaires (Gallo and Ghiani 2000)
Expression préférentielle dans le cerveau	Néocortex, ganglions de la base et hippocampe (Nusser 2000)	Cervelet et hippocampe (Nusser 2000)	cervelet et le noyau suprachiasmatique, cellules des ganglions des cornes dorsales de la moelle épinière, lobe temporal et au niveau des interneurons de l'hippocampe (Gregor et al. 1993)

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types de récepteurs ionotropiques

- d'antagoniste du site glycine pour le kynurénate, se fixant sur NR1 ;
- de modulateur pour les polyamines et l'histidine, se fixant sur NR2B.

L'association des sous-unités 2A ou 2B dans des récepteurs NMDA dihéromériques (NR1/NR2)₂ leur confère les propriétés d'une grande conductivité et d'un blocage très sensible au Mg²⁺ alors que la présence de NR2C ou NR2D s'accompagne d'une faible conductivité et d'une faible sensibilité au Mg²⁺. Cette inhibition peut en outre influencer l'influx calcique généré par l'activation des récepteurs NMDA (Cull-Candy et al. 2001). La probabilité d'ouverture du canal des récepteurs NR1/NR2A est quatre fois supérieure à celle de NR1/NR2B, dans un système de surexpression cellulaire (Chen et al. 1999a). NR1 est régulée par phosphorylation par la protéine kinase C (Tingley et al. 1993) et déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A (Zhang et al. 2005) et par N-glycosylation (Chazot et al. 1995) (Figure 65C).

NR3B est exprimée surtout au niveau des motoneurons (Andersson et al. 2001). Les récepteurs NR3A et NR3B semblent atypiques car ils ne semblent pas associés à NR2, ne sont pas sensibles aux agonistes glutamatergiques et n'induisent pas un influx calcique sur un système de surexpression cellulaire. Ils seraient plutôt des récepteurs excitateurs à la glycine (Chatterton et al. 2002).

4.6.1.2. Récepteurs AMPA

Les quatre sous-unités de la famille des récepteurs AMPA sont codées par des gènes différents et possèdent tous un site d'épissage dans le site S2 de fixation du ligand régulant leur conformation en flip/flop et un site d'édition d'une arginine en glycine dans la boucle extracellulaire pour GluR2, 3 et 4, responsable d'une imperméabilité au calcium (tableau 4) (Sommer et al. 1990; Dingledine et al. 1999). Les récepteurs AMPA ont une localisation membranaire neuronale synaptique préférentielle mais sont aussi localisés au niveau de compartiments intracellulaires comme le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Nusser 2000). Ils ont une localisation extrasynaptique au niveau du cervelet et de l'hippocampe (Nusser 2000). En complément, ils peuvent être exprimés au niveau des cellules microgliales, les progéniteurs oligodendrocytaires et la glie de Bergmann (Gallo and Ghiani 2000). GluR1 et GluR2 sont exprimés ubiquitairement dans tout le cerveau (Potier et al. 1992; Sun et al. 1994). GluR3 est exprimée ubiquitairement dans le cerveau sauf au niveau de la substance noire et du lobe occipital (Gecz et al. 1999). GluR4 est fortement exprimée pendant le développement au niveau du cervelet et du cerveau antérieur (McNamara et al. 1992).

4.6.1.3. Récepteurs Kainiques

Les récepteurs du kaïnate sont composés de sous-unités issues de deux familles : GluR5, 6 et 7 et KA 1 et 2, codés par des chromosomes différents et formant des homo et hétérotétramères (tableau 5). Les récepteurs GluR 5, 6 et 7 peuvent être homotétramériques et possèdent un site d'édition leur conférant une imperméabilité au Ca²⁺ (Sommer et al. 1990; Dingledine et al. 1999). KA 1 et 2 sont toujours associés à une sous-unité de type GluR, car sinon, elles ne seraient pas exprimées à la surface membranaire même si elles sont capables de lier le kaïnate (Gallyas et al. 2003). GluR5 et GluR6 sont associés à la régulation de la libération présynaptique de neurotransmetteur au niveau des cornes dorsales de la moelle

Récepteurs NMDA	Synonyme	PM (kDa)	Chromosome	Variants d'épissage	Régulation
NR1	Zéta 1	105	9 (Karp et al. 1993)	9 (McBain and Mayer 1994)	Phosphorylation par la PKC (Tingley et al. 1993) et déphosphorylation par protein phosphatase 2A (Zhang et al. 2005) et N-glycosylation (Chazot et al. 1995)
NR2A	Epsilon1	165,3	16 (Takano et al. 1993)		
NR2B	Epsilon2	166,4	12 (Adams et al. 1995)		
NR2C	Epsilon 3	134,2	17(Takano et al. 1993)	2	
NR2D	Epsilon 4	143,6	19 (Hess et al. 1998)		
NR3A		125,6	9 (Andersson et al. 2001)		
NR3B		113	19 (Andersson et al. 2001)		

Tableau 3 : Caractéristiques des différents types de récepteurs NMDA

Récepteurs AMPA	PM (kDa)	Chromosome	Variants d'épissage	Régulation
GluR1	101,5	5 (Potier et al. 1992)	un site d'épissage dans le site S2 de fixation du ligand régulant leur conformation en flip/flop (Sommer et al. 1990; Dingledine et al. 1999)	site d'édition d'une arginine en glycine dans la boucle extracellulaire permet l'imperméabilité au calcium (Sommer et al. 1990; Dingledine et al. 1999)
GluR2	98.8	4 (Sun et al. 1994)		
GluR3	101	X (Gecz et al. 1999)		
GluR4	100,8	11(McNamara et al. 1992)		

Tableau 4 : Caractéristiques des différents types de récepteurs AMPA

épinière (Kerchner et al. 2002) et la libération de glutamate par les astrocytes dans l'hippocampe (Liu et al. 2004a).

4.6.2. Récepteurs métabotropiques : types, structures, fonctions et localisations

Les récepteurs métabotropiques sont divisés en deux familles selon le couplage aux protéines G mais en trois groupes selon le pourcentage d'homologie génétique (Figure 64 et Tableau 6) (Kew and Kemp 2005) :

- Les récepteurs métabotropiques du groupe I, couplés à la protéine G_q/G₁₁ activant la phospholipase C et comprenant 2 types de sous-unités (mGluR1 et mGluR5) ;
- Les récepteurs métabotropiques du groupe II, couplés à la protéine G_q/G₁₁ activant la phospholipase C et comprenant 2 types de sous-unités (mGluR2 et mGluR3) ;
- Les récepteurs métabotropiques du groupe III, couplés à la protéine G₀/G_i inhibant l'adénylate cyclase et comprenant 4 types de sous-unités (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8).

Les mGluR, actuellement au nombre de 8, sont classés selon leur homologie structurale, le second messager et la pharmacologie. Ce sont des récepteurs appartenant à la classe très répandue des récepteurs couplés aux protéines G, situés au niveau de la membrane plasmique et organisés en homodimères (Kew and Kemp 2005). Ce sont des récepteurs transmembranaires avec des domaines extracellulaires, intramembranaires et intracellulaires (Figure 65B). Ils possèdent une partie N-terminale localisée au niveau extracellulaire avec un site bilobé de fixation de l'agoniste (site S1) mis en évidence par mutagenèse dirigée et cristallographie (Kunishima et al. 2000; Malherbe et al. 2001). Cette partie N-terminale est suivie d'une région riche en cystéine impliquée dans l'activation de la protéine G (Bhave et al. 2003; Pin et al. 2003). Il possède 7 domaines transmembranaires en hélice α , avec 3 boucles extracellulaires dont la troisième interagit avec des modulateurs allostériques et 3 boucles intracellulaires. La partie cytosolique carboxyterminale a un rôle de régulation de l'activité du récepteur est impliquée dans l'interaction avec les protéines structurales de la famille Homer par un motif PPXXF et PICK1 permettant l'échaffaudage de la synaptique et des protéines fonctionnelles comme la calmoduline (Dev et al. 2001; Pin et al. 2003). Les récepteurs métabotropiques ont une localisation neuronale pré et postsynaptique et gliale (Kew and Kemp 2005).

Les récepteurs métabotropiques du groupe I sont localisés au niveau des postsynaptique des domaines somatodendritiques des neurones (Kew and Kemp 2005). Les isoformes mGluR1 et mGluR5 sont exprimées dans le striatum au niveau postsynaptique des synapses glutamatergiques et dopaminergiques des neurones de projection et pérисynaptique des interneurons. Ils sont présents dans le striatum au niveau postsynaptique des neurones GABAergiques, dans le globus pallidus au niveau des synapses GABAergiques et pérисynaptique des synapses glutamatergiques du noyau sous-thalamique (Smith et al. 2000b). Ils peuvent être activés par les agonistes extracellulaires et par les protéines Homer intracellulaires (Ango et al. 2001).

Les récepteurs métabotropiques des groupes II et III sont préférentiellement localisés au niveau des présynaptique des terminaisons axonales des neurones, où ils modulent la libération de neurotransmetteurs (Kew and Kemp 2005). mGluR2 est a une expression

Récepteurs kainiques	PM (kDa)	Chromosome	Régulation
GluR5	104	21 (Gregor et al. 1993)	Edition permettant une imperméabilité au calcium (Sommer et al. 1990; Dingledine et al. 1999)
GluR6	102,5	6 (Gregor et al. 1993)	
GluR7	104	1 (Nutt et al. 1994)	
KA1	107,2	11 (Kamboj et al. 1994)	
KA2	109	19 (Kamboj et al. 1992)	

Tableau 5 : Caractéristiques des différents types de récepteurs kainiques

Récepteurs métabotropiques	Groupe I	Groupe II	Groupe III
Nombre de sous-unités différentes	2	2	4
Sous-unités	mGluR1, mGluR5	mGluR2 et mGluR3	mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8
Type de couplage	protéine Gq/G11 activant la phospholipase C 150 mM		protéine G ₀ /G _i inhibant l'adénylate cyclase
Structure	Récepteurs à 7 domaines transmembranaires homodimériques (Kew and Kemp 2005)		
Localisation	neuronale pré et postsynaptique et gliale (Kew and Kemp 2005)	neuronale pré et postsynaptique et gliale (Kew and Kemp 2005)	présynaptique des terminaisons axonales des neurones, où ils modulent la libération de neurotransmetteurs (Kew and Kemp 2005)
Récepteurs métabotropiques	Pois moléculaire (kDa)	chromosome	isoformes d'épissage
mGluR1	132,4	6 (Stephan et al. 1996)	2
mGluR5	132,5	11 (Minakami et al. 1994)	2
mGluR2	95,6	3 (Flor et al. 1995)	
mGluR3	98,9	7 (Scherer et al. 1996)	
mGluR 4	101,8	6 (Makoff et al. 1996c)	
mGluR 6	95,4	5 (Hashimoto et al. 1997)	
mGluR 7	102,2	3 (Makoff et al. 1996a)	5
mGluR 8	101,7	7 (Scherer et al. 1996)	3

Tableau 6 : Caractéristiques des différents types de récepteurs métabotropiques

ubiquitaire dans le cerveau adulte et fœtal, notamment au niveau présynaptique des fibres moussues de l'hippocampe dans CA3 (Yokoi et al. 1996) alors que mGluR3 est exprimée préférentiellement dans les neurones du cortex cérébral, du noyau caudé et du putamen, du thalamus et du cervelet (Makoff et al. 1996c). mGluR4 est exprimée préférentiellement sur les neurones granulaires du cervelet (Makoff et al. 1996b) et sur les fibres parallèles, au niveau présynaptique des cellules Purkinje (Pekhletski et al. 1996). mGluR6 est exprimée spécifiquement sur les cellules bipolaires ON de la rétine (Hashimoto et al. 1997). mGluR7 est exprimée ubiquitairement dans le cerveau avec une localisation préférentielle au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe et du cervelet (Makoff et al. 1996a). mGluR8 est exprimée préférentiellement dans le cervelet (Scherer et al. 1996).

4.6.3. Fonctions des récepteurs glutamatergiques

Les principales fonctions des récepteurs glutamatergiques ont été identifiées par la mutation des gènes codant les différents récepteurs dans le but de les inactiver dans les souris KO. Les récepteurs sont impliqués dans la survie, l'apprentissage et la mémorisation, la motricité, la vision et la réponse au stress.

Plusieurs types de récepteurs sont impliqués dans la survie et le neurodéveloppement du cerveau. En effet, l'inactivation du gène de NR1 (Forrest et al. 1994) ou de NR2B (Kutsuwada et al. 1996) ou la troncation de la partie C-terminale de NR2C (Sprenkel et al. 1998), entraîne la mort des souris nouveau-nées. De même, l'inactivation du gène de GluR2 augmente la mortalité des souris nouveau-nées (Jia et al. 1996). De plus, les récepteurs NR1, NR2B et NR2C sont indispensables à la formation des barrels, structures corticales impliquées dans le fonctionnement somatosensoriel, comme la détection du toucher au niveau des moustaches de rongeurs (Li et al. 1994a).

Les récepteurs NMDA, AMPA et métabotropiques sont impliqués dans les processus de mémorisation. En effet, l'inactivation de NR1 dans la région CA1 de l'hippocampe s'accompagne d'un déficit de mémoire spatiale avec absence de LTP et LTD (Tsien et al. 1996), celle de NR2A s'accompagne d'un défaut de LTP et d'un déficit d'apprentissage (Sakimura et al. 1995). De même les souris invalidées pour le gène NR2B ont un déficit de LTD dans CA1 et de LTP dans CA3 (Kutsuwada et al. 1996), alors que les souris surexprimant NR2B sont capables d'une meilleure mémoire visuelle et spatiale (Tang et al. 1999). De même, l'apprentissage est anormal dans les souris KO pour le gène de GluR1 (Reisel et al. 2002) et la mémoire spatiale est altérée dans les souris KO pour GluR2 (Jia et al. 1996), dans les souris invalidées pour mGluR5 (Lu et al. 1997) et les souris invalidées pour mGluR4 (Pekhletski et al. 1996; Gerlai et al. 1998a). Les récepteurs mGluR2 interviennent dans les processus de mémorisation dont la mémoire olfactive, avec une absence de LTD dans CA3 observée chez la souris invalidé pour mGluR2 (Kaba et al. 1994; Yokoi et al. 1996). mGluR7 est impliquée dans la mémoire d'une aversion pour le goût, altérée dans la souris KO pour mGluR7, conséquence d'une anomalie de fonctionnement de l'amygdale (Masugi et al. 1999).

Les récepteurs NR1 sont impliqués dans le comportement moteur et social, car leur inactivation s'accompagne de mouvements stéréotypés, d'une augmentation de la motricité et d'une baisse de la sociabilité des souris (Mohn et al. 1999).

D'autres récepteurs sont impliqués dans la régulation de la motricité, réduite chez la souris KO pour NR2D (Ikeda et al. 1995), les souris KO pour mGluR4 (Pekhletski et al. 1996; Gerlai et al. 1998a) et les souris KO pour GluR2 caractérisées par un déficit de coordination locomotrice, un défaut d'exploration et une attitude passive (Jia et al. 1996; Gerlai et al. 1998b). De plus, l'inactivation de mGluR1 s'accompagne de déficit de LTD au

niveau de la voie corticostriatale, ainsi que d'un déficit de l'activité motrice et des réflexes oculaires (Aiba et al. 1994; Conquet et al. 1994). Par ailleurs, l'inactivation de mGluR5 est reliée à une absence de stimulation locomotrice sous cocaïne (Chiamulera et al. 2001).

Les récepteurs mGluR6 sont spécifiquement impliqués dans le processus de la vision (Masu et al. 1995).

Les récepteurs NR2D et mGluR7 semblent avoir un rôle dans l'anxiété et le stress, car l'inactivation du gène codant NR2D, réduit la réponse au stress et l'anxiété (Miyamoto et al. 2002b) et l'inactivation de mGluR7 augmente la probabilité d'épilepsie par le stress et les convulsivants (Sansig et al. 2001).

4.7. Dysfonctions des récepteurs glutamatergiques et neurodégénérescence

Différents éléments sont en faveur d'une dysfonction des récepteurs glutamatergiques dans les maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques. Parmi ceux-ci, on retrouve des mutations des récepteurs, la formation d'autoanticorps contre des récepteurs glutamatergiques et la diminution d'expression ou une modification du fonctionnement de certains récepteurs. Par ailleurs, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs est neuroprotectrice dans certain nombre de modèles de maladies neurodégénératives.

4.7.1. Mutation des gènes des récepteurs et neurodégénérescence

L'observation de la disparition des récepteurs NMDA parallèle à la neurodégénérescence striatale chez les patients atteints de la maladie de Huntington a stimulé la recherche sur les récepteurs NMDA et le clonage des gènes codant les récepteurs (Young et al. 1988a). Cependant, à la surprise générale, aucune mutation de ces gènes n'a été associée à la maladie de Huntington. Par contre, une pathologie avec des symptômes étrangement proches de la maladie de Huntington, comprenant une dystonie précoce primaire avec des mouvements anormaux du cou, des membres et du tronc est la résultante de la mutation du gène codant la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA est associée à (Collins et al. 1993).

Cependant, un polymorphisme TAA dans la région 3' non transcrite du gène codant l'isoforme du récepteur au kaïnate GluR6 est à l'origine d'un plus grande précocité dans l'apparition des symptômes de la maladie de Huntington (Rubinsztein et al. 1997; MacDonald et al. 1999). En effet, la présence de l'allèle 155 dans la région TAA du récepteur GluR6, rare dans la population normale (2,7%) avance d'environ 5 ans le début des symptômes (MacDonald et al. 1999).

Par ailleurs, la mutation du site d'édition de GluR2 entraîne chez la souris, des crises d'épilepsie (Feldmeyer et al. 1999).

4.7.2. Anticorps dirigés contre les récepteurs et neurodégénérescence

Des anticorps dirigés contre les parties extracellulaires de NR2A et NR2B ont été isolés dans l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus de patients atteints de lupus érythémateux systémique (DeGiorgio et al. 2001) s'accompagnant de symptômes

neuropsychiatriques avec des anomalies du comportement, de l'émotion et de la cognition. Des anticorps dirigés contre mGluR1A ont été observés dans un syndrome d'ataxie cérébelleuse paranéoplasique avec des anomalies de mouvement du tronc et de la démarche (Coesmans et al. 2003).

4.7.3. Diminution de l'expression ou dysfonctionnement des récepteurs et neurodégénérescence

Une réduction de l'expression de mGluR2 dans les lymphocytes reliée à une diminution de la transcription a été observée chez les patients atteints de SLA (Poulopoulou et al. 2005).

Dans la maladie d'Alzheimer, des études de liaison de glutamate marqué sur les récepteurs glutamatergiques, ont montré une réduction de la fixation du ligand, notamment au niveau des récepteurs AMPA, dans le cortex de cerveau de patients décédés de démence (Greenamyre et al. 1985).

Dans la maladie de Huntington, une réduction de la fixation du glutamate a été observée au niveau du noyau caudé et du putamen de cerveau de patients décédés de la maladie de Huntington (Greenamyre et al. 1985). Celle-ci est consécutive à la disparition des récepteurs NMDA observée dans le striatum des patients (Young et al. 1988a). De plus, différentes observations réalisées dans les modèles transgéniques montrent des anomalies de l'expression de différents types de récepteurs et de protéines associées ou des modifications structurales des récepteurs. En effet, une réduction de la liaison de ligands marqués a été détectée dans le striatum des souris R6/2 de 12 semaines, au niveau des récepteurs AMPA, kaïniques et métabotropiques du groupe II mais pas au niveau des récepteurs NMDA (Cha et al. 1998; Cha et al. 1999), consécutive à une réduction de l'expression de mGluR2/3 sans modification de mGluR1, de mGluR5 ni de NR1 (Cha et al. 1998; Cha et al. 1999). Ces modifications d'expression semblent être dans certains cas reliées à une réduction de la transcription de mGluR1 observée dans le striatum et dans le cortex et de mGluR2 et mGluR3 observée uniquement dans le cortex (Cha et al. 1998; Cha et al. 1999). Par ailleurs, une réduction de la transcription des sous-unités NR2A et NR2B a été observée dans le cerveau des souris R6/2, mais elle semble à l'origine de dysfonctionnement circonscrit à la région CA1 de l'hippocampe (Luthi-Carter et al. 2003). Des modifications de transcription de protéines associées à l'ancrage et la fonction des récepteurs NMDA, comme PSD-95 et l' α -actinine2, ont aussi été observées dans le striatum des souris R6/2 (Luthi-Carter et al. 2003) et les souris N-171Q82 (Jarabek et al. 2004). En parallèle, une augmentation de phosphorylation de NR2B a été observée *in vitro* dans une lignée cellulaire exprimant l'huntingtine mutée (Song et al. 2003) et une diminution de phosphorylation de NR1 a été observée chez les souris N-171Q82 (Jarabek et al. 2004). En parallèle, les souris R6/2 et les souris KI CAG94 ainsi que les YAC 72 ont montré une plus grande sensibilité à l'activation induite par le NMDA (Levine et al. 1999; Laforet et al. 2001; Zeron et al. 2002). Cette augmentation de toxicité cellulaire consécutive à l'activation des récepteurs NMDA semble mettre en jeu, au moins *in vitro*, préférentiellement les récepteurs NR1/NR2B (Chen et al. 1999b; Zeron et al. 2004).

4.8. Neuroprotection de maladies neurodégénératives par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs

En accord avec le rôle des récepteurs NMDA dans la neurodégénérescence des atteintes neurologiques aiguës et des maladies neurodégénératives chroniques, plusieurs antagonistes de récepteurs glutamatergiques se sont montrés neuroprotecteur dans des modèles *in vivo* de maladies neurodégénératives. Par exemple, l'antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, le MK-801, s'est montré neuroprotecteur dans des modèles *in vivo* de l'ischémie cérébrale chez la gerbille (Gill et al. 1987), du traumatisme cérébral chez le rat (Shapira et al. 1990), de l'épilepsie chez le cochon d'Inde (Sparenborg et al. 1992), de la maladie de Huntington chez le rat (Beal et al. 1988), de maladie de Parkinson chez le rat (Srivastava et al. 1993). De plus, des antagonistes d'autres types de récepteurs glutamatergiques peuvent être neuroprotecteurs *in vivo*. Par exemple, un antagoniste des récepteurs kaïnique, le 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline s'est montré neuroprotecteur chez la souris dans un modèle d'épilepsie induite par l'injection de kaïnate dans l'hippocampe (Chapman et al. 1991) et dans un modèle d'ischémie cérébrale focale chez le rat (Buchan et al. 1991). De même, le MPEP, antagoniste des récepteurs mGluR5 postsynaptique prolonge la survie des souris R6/2 (Schiefer et al. 2004).

Par ailleurs, certains produits pourraient être efficaces chez l'homme comme la mémantine, antagoniste NMDA capable de retarder l'évolution des symptômes chez le patient atteints de la maladie de Huntington (Beister et al. 2004).

4.9. Transporteurs des acides aminés excitateurs

Pour réguler l'action du glutamate au niveau synaptique, les transporteurs des acides aminés excitateurs (EAAT) capturent le glutamate synaptique. Ils sont la cible de certaines excitotoxines endogènes, comme le L-glutamate et le L-aspartate, mais aussi le D-Aspartate (Bridges and Esslinger 2005). Seront exposés successivement les différents types de transporteurs synaptiques, leur structure et leur localisation puis leurs fonctions et leur intervention dans les mécanismes de neurodégénérescence.

4.9.1. Transporteurs du glutamate : types, structure et localisation

Cinq types de transporteurs des acides aminés excitateurs ont été identifiés au niveau de la membrane plasmique des neurones et/ou des astrocytes (Figure 66 et tableau 7) (Conti and Weinberg 1999; Bridges and Esslinger 2005). Ils auraient une structure de dix domaines transmembranaires dont six en hélices α avec les parties C et N-terminales orientées du côté cytosolique (Wahle and Stoffel 1996). En parallèle trois types de transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT) sont présents au niveau des vésicules synaptiques neuronales et sont chargés de transporter le glutamate issu du recyclage via les transporteurs synaptiques (Figure 66) (Moriyama and Yamamoto 2004).

EAAT1 est exprimée sur les astrocytes avec une prédominance pour la région du cervelet, les cellules de Müller de la rétine. EAAT2 existe sous deux formes d'épissage alternatif dans le cerveau : EAAT2A ou GLT1A, localisée sur les astrocytes pérисynaptiques avec une expression ubiquitaire et EAAT2b ou GLT1B tronquée au niveau C-terminale, exprimée au niveau neuronal (Schmitt et al. 2002). EAAT3 est exprimée sur la membrane plasmique des neurones et les cellules épithéliales (Smith et al. 1994). Elle est exprimée dans variété de tissus dont le foie, les muscles et le cerveau, où elle est particulièrement dense au niveau de la substance noire, du noyau rouge, de l'hippocampe et du cortex (Shashidharan et al. 1994). Plus récemment, elle a été isolé au niveau d'astrocytes en culture (Miralles et al.

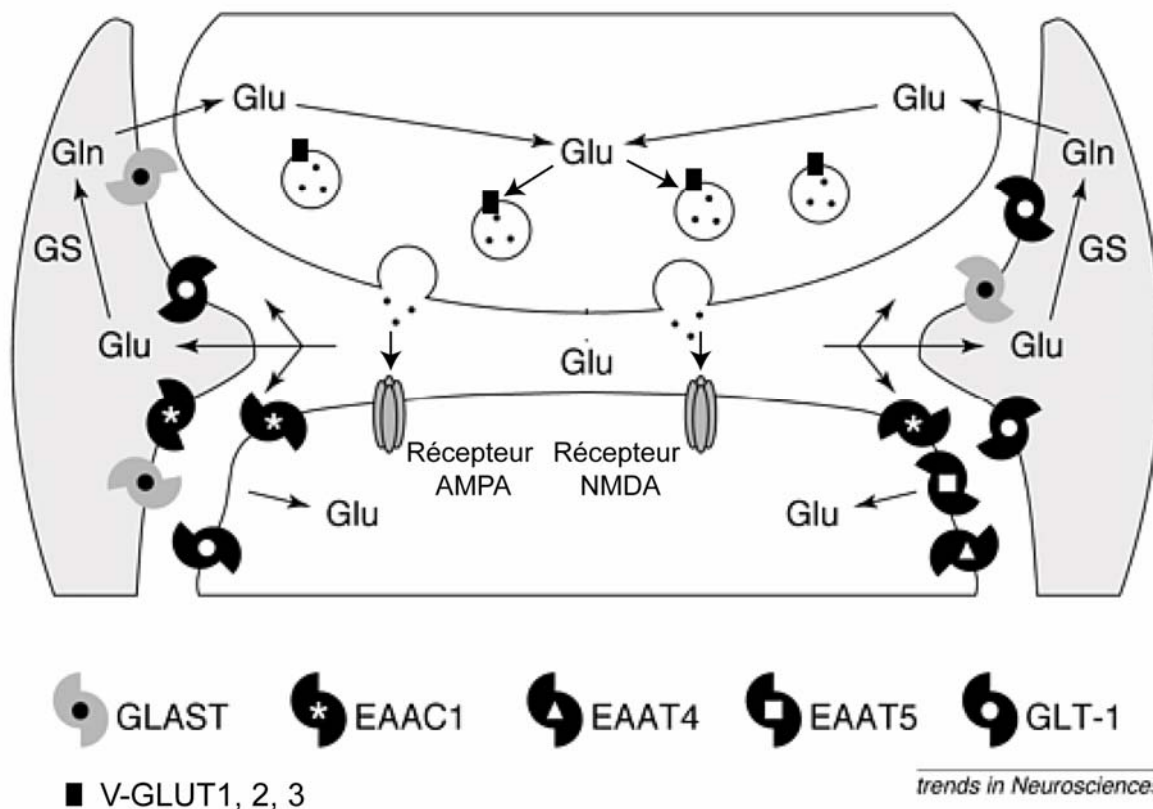


Figure 66 : Localisation cellulaire et subcellulaire des transporteurs du glutamate

Schéma illustrant la gestion du glutamate au niveau synaptique par les transporteurs membranaires des acides aminés excitateurs GLAST, EAAC1, EAAT4, EAAT5 et GLT-1 et au niveau du recyclage vésiculaire synaptique par les transporteurs vésiculaires V-GLUT. GLAST est localisé au niveau astrocytaire, EAAC1 au niveau neuronal et secondairement astrocytaire, EAAT4 et EAAT5 sont localisés au niveau neuronal et GLT-1 est localisé au niveau glial et secondairement neuronal. Schéma adapté de (Conti and Weinberg, 1999).

Transporteurs du glutamate	synonyme	Pois moléculaire (kDa)	chromosome	Régulation
EAAT1	GLAST	59,6	5 (Shashidharan and Plaitakis 1993)	Glycosylation (Escartin 2006 in press)
EAAT2	GLT1	62,1	11 (Takai et al. 1996)	
EAAT3	EAAC1	57,1	9 (Smith et al. 1994)	
EAAT4		61,6	19 (Fairman et al. 1995)	
EAAT5		60,7	1 (Arriza et al. 1997)	
VGLUT1			19 (Ni et al. 1996)	
VGLUT2			11 (Aihara et al. 2000)	
VGLUT3		65	12 (Takamori et al. 2002)	

Tableau 7 : Caractéristiques des transporteurs du glutamate

2001). EAAT4 est exprimée sur les neurones comme les cellules de Purkinje du cervelet, (Takahashi et al. 1998), dans le cerveau antérieur et dans la moelle épinière et sur les astrocytes (Hu et al. 2003). EAAT5 est exprimée sur les neurones au niveau de la rétine (Arriza et al. 1997).

VGLUT1 est particulièrement exprimé dans les neurones de l'amygdale et de l'hippocampe, modérément exprimée dans le corps calleux et peu présente au niveau du thalamus, de la substance noire et du noyau sous-thalamique (Ni et al. 1996). VGLUT2 est et exprimé sur les vésicules synaptiques des neurones, au niveau du thalamus, de la substance noire et du noyau sous-thalamique et plus faiblement exprimée dans le cervelet et l'hippocampe (Aihara et al. 2000). VGLUT3 est préférentiellement exprimée au niveau de l'amygdale et de la moelle épinière, plus faiblement au niveau du cervelet et du thalamus (Takamori et al. 2002).

4.9.2. Fonctions des transporteurs du glutamate

Au niveau des synapses glutamatergiques, les transporteurs membranaires du glutamate des terminaisons nerveuses et des astrocytes se chargent d'achever la transmission synaptique par la capture rapide de l'acide glutamique synaptique (Nicholls and Attwell 1990). Les EAAT permettent l'entrée du glutamate dans la cellule en cotransport avec 3 ions Na^+ et un H^+ puis exportent au retour un K^+ à partir du cytosol (Zerangue et al. 1995). Ces flux cationiques sont accompagnés, surtout au niveau des isoformes EAAT4 et EAAT5, de flux de Cl^- dépendant du sodium et du glutamate, mais non couplés stoechiométriquement au transport du glutamate (Fairman and Amara 1999). Ils ont une affinité élevée pour le L-glutamate et le L-aspartate, évaluée *in vitro* par des expériences de liaison de ligands radioactifs, entre 1 et 100 μM (Danbolt 2001). La capture du glutamate par les astrocytes est couplé à une activation du métabolisme énergétique car de l'ATP est nécessaire d'une part pour faire sortir le Na^+ contre l'entrée de K^+ par la Na^+/K^+ -ATPase membranaire, et d'autre part pour produire la glutamine à partir du glutamate par la glutamine synthase en glutamine (Figure 67) (Tildon et al. 1985; Bonvento et al. 2002). L'apport des deux ATP nécessaires à l'ATPase et à la glutamine synthase astrocytaires provient de la capture d'une molécule de glucose capté dans la circulation sanguine par l'astrocyte (Magistretti et al. 1999; Attwell and Laughlin 2001). Le glucose est par un transporteur du glucose astrocytaire, GLUT1 et est transformé en lactate permettant l'apport d'énergie au niveau du neurone après transfert via les transporteurs des acides monocarboxyliques, les MCT (Bonvento et al. 2002). Au niveau neuronal, le lactate est nécessaire pour l'apport d'ATP nécessaire au recyclage synaptique du glutamate (Bonvento et al. 2002).

Les transporteurs vésiculaires du glutamate sont chargés du transport actif du glutamate issu du recyclage via les transporteurs synaptiques neuronaux et issu de la dégradation de la glutamine astrocytaire, via la glutaminase (Fremeau et al. 2004a). Ils permettent le transport actif du glutamate grâce à l'existence d'un gradient de protons maintenu par une ATPase, en cotransport avec le Na^+ et le Pi , et possiblement le Cl^- (Fremeau et al. 2004a).

EAAT1, exprimé au niveau des cellules de Müller, est indispensable dans le processus de transmission synaptique entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires mise en jeu dans la transmission visuelle (Harada et al. 1998). Il est aussi associé à la coordination motrice, due à son expression sur la glie de Bergmann du cervelet (Watase et al. 1998).

EAAT2, exprimé ubiquitairement, est impliqué dans la régulation du glutamate synaptique et est indispensable à la survie. En effet, les souris invalidée pour le gène codant GLT1 ont un taux de glutamate augmenté dans le cerveau, s'accompagnant de crises

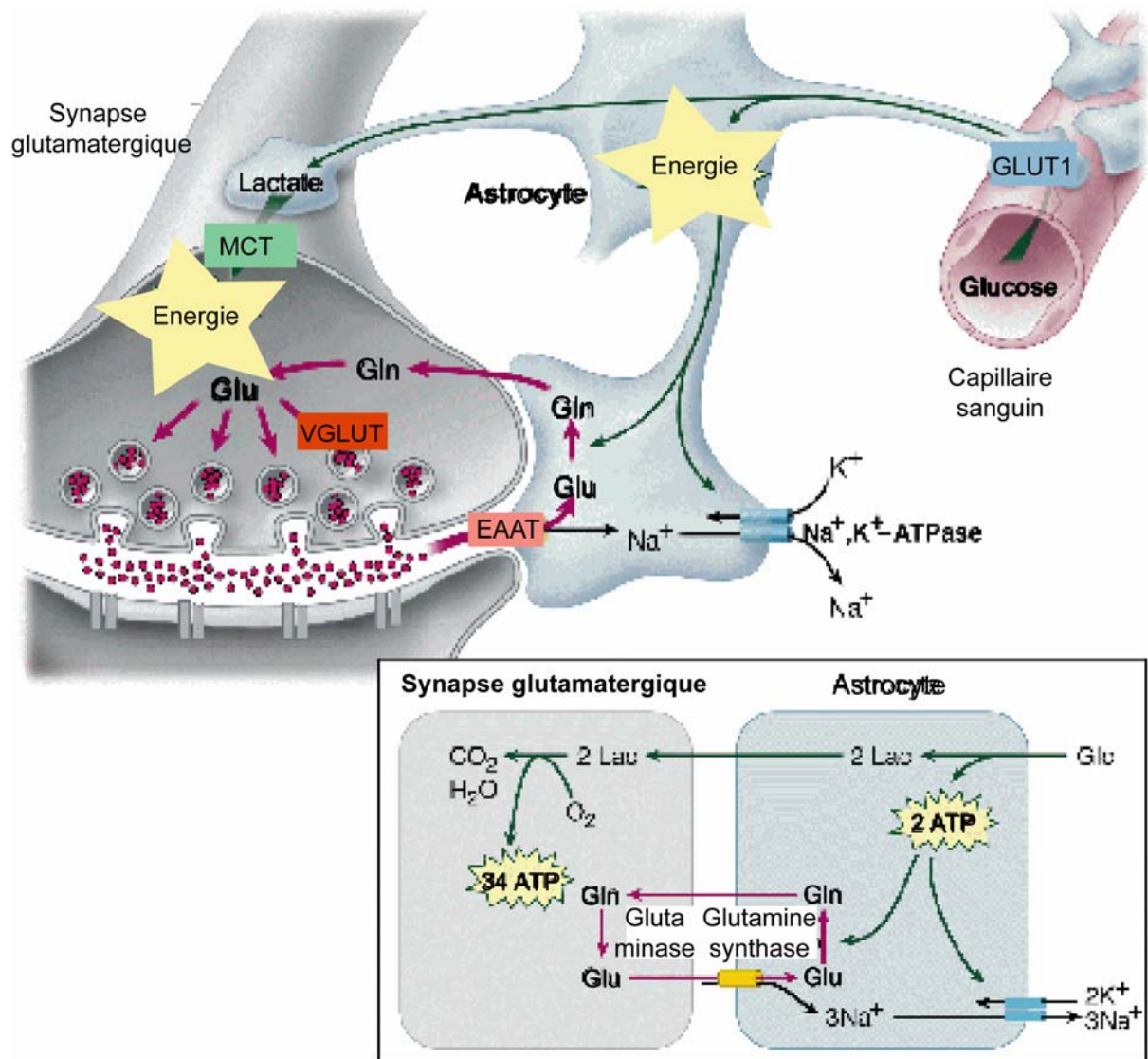


Figure 67 : Capture du glutamate et couplage métabolique

Schéma de la capture du glutamate par l'astrocyte au niveau d'une synapse glutamatergique via un transporteur des acides aminés excitateurs (EAAT), en parallèle de Na^+ ressortant contre du K^+ grâce à une Na^+/K^+ ATPase membranaire. Le glutamate astrocytaire est métabolisé en glutamine grâce à la glutamine synthase et à l'ATP. Donc la capture du glutamate astrocytaire est directement couplée à la capture d'une molécule de glucose via le transporteur du glucose astrocytaire, GLUT1, pour former 2 lactates et les 2 ATP nécessaire au fonctionnement de la glutamine synthase et de l'ATPase. Le lactate est ensuite véhiculé via le transporteur des acides monocarboxyliques (MCT) dans le neurone pour sa métabolisation en ATP permettant la capture du glutamate au niveau des vésicules synaptiques par VGLUT. Schéma modifié à partir de (Magistretti, 1999).

d'épilepsies mortelles et d'une augmentation de la susceptibilité à développer des lésions corticales (Tanaka et al. 1997).

VGLUT1 a une fonction dans la survie postnatale car l'inactivation du gène entraîne une léthalité chez la souris. En parallèle, il a une fonction dans la transmission visuelle et la coordination motrice, toutes deux perturbées chez la souris KO conditionnelle (Fremeau et al. 2004b; Wojcik et al. 2004)

4.9.3. Intervention des transporteurs dans le mécanisme de neurodégénérescence

Deux éléments sont en faveur de l'intervention des EAAT dans la neurodégénérescence : les mutations des gènes codant les transporteurs peuvent être associées à des maladies neurodégénératives et certaines maladies neurodégénératives sont associées à une diminution d'expression des transporteurs et/ou à la modification du taux de transport des excitotoxines.

Plusieurs pathologies neurodégénératives sont associées à des mutations des EAAT. Ainsi, une délétion du bras court du chromosome 5 codant EAAT1 ou GLAST est associée à un syndrome de microcéphalie et de retard mental (Keppen et al. 1992). D'autre part, une mutation du gène de EAAT1 est associée à l'ataxie épisodique de type 6 caractérisée par une hémiparésie, des migraines et des crises d'épilepsie (Jen et al. 2005). La mutation du gène EAAT2 résultant en un changement de l'alanine 79 en glycine est associée à une forme de paraplégie spastique héréditaire (Meyer et al. 1998). De même, chez certains patients atteints de SLA sporadique, une mutation de l'asparagine 206 en sérine entraînerait un défaut de glycosylation du transporteur (Aoki et al. 1998), détecté par la présence d'une forme courte d'EAAT2 de 60 et 65 kDa contre 70kDa, s'accompagnant d'une réversion de son activité (Trotti et al. 2001). La mutation de EAAT3 est associée à une forme précoce de trouble obsessionnel compulsif (Veenstra-VanderWeele et al. 2001).

Le déficit de transport des acides aminés excitateurs, consécutif à la diminution de l'expression ou à une inhibition, paraît de plus en plus souvent impliqué dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives. En effet, une diminution de l'expression de EAAT2 a été observée dans le cortex frontal des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Cette baisse d'expression n'est pas consécutive à la diminution de la transcription de EAAT2 mais est plutôt consécutive à une expression anormale de l'APP (Li et al. 1997b). De même, dans l'ischémie cérébrale, l'élévation du glutamate semble être en partie la conséquence de l'activité réversée du transporteur EAAT2, permettant la libération du glutamate astrocytaire au lieu de sa capture. En effet, l'utilisation du DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, inhibiteur non spécifique des EAAT1-3 induit une réduction de la concentration d'aspartate et de glutamate libéré, dans un modèle d'ischémie cérébrale globale chez le rat (Phillis et al. 2000). Cette réversion de l'activité du transporteur serait la conséquence du dysfonctionnement des gradients de sodium et de potassium consécutive au défaut énergétique observable en cas d'hypoglycémie, de traumatisme cérébral et d'ischémie cérébrale (Santos et al. 1996). Par ailleurs, un déficit d'expression d'EAAT2 de 71 à 90% a été observé dans le cortex moteur et la moelle épinière de patients atteints de SLA (Rothstein et al. 1995). Un déficit d'expression d'EAAT2 de 30 à 95 % a été observé chez 60 à 70% des cas de SLA sporadique, probablement consécutive à la présence d'ARNm anormaux (Lin et al. 1998). Ce déficit est en parallèle associé à une réduction du transport du glutamate dans les synaptosomes isolés à partir de la moelle épinière, du cortex moteur et somatosensoriel des

patients atteints de SLA (Rothstein et al. 1992). En complément, la surexpression de EAAT2 par croisement avec une souris transgénique (Guo et al. 2003) ou par administration d'un analogue de β -lactame (Rothstein et al. 2005), permet l'augmentation de la survie et le retardement de la mort des motoneurons chez la souris G93A, modèle de SLA.

Par ailleurs, la réduction de l'expression d'EAAT3 au niveau du lobe temporal a été observée chez des patients épileptiques (Mathern et al. 1999).

Dans la maladie de Huntington, les transporteurs du glutamate pourraient aussi être impliqués dans la neurodégénérescence. En effet, une réduction du transport du glutamate parallèle à la diminution de la transcription de GLT1 au niveau du cortex et du striatum de souris R6 (Lievens et al. 2001). De plus, l'administration striatale continue d'un inhibiteur des transporteurs du glutamate, le L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) mime la neurodégénérescence striatale observée dans la maladie de Huntington (Lievens et al. 1997; Lievens et al. 2000a). En parallèle, le quinolinate à forte dose inhibe la capture du glutamate par les transporteurs astrocytaires, inhibe la capture du glutamate par les transporteurs vésiculaires synaptiques (Tavares et al. 2000) et stimule la libération du glutamate par les synaptosomes (Tavares et al. 2002; Tavares et al. 2005).

4.10. Mécanismes et signalisation intracellulaire mise en jeu dans l'excitotoxicité

Les mécanismes mis en jeu dans l'excitotoxicité font intervenir des perturbations ioniques, en particulier une augmentation intracellulaire du calcium, une activation d'enzymes, un stress oxydatif et probablement des modifications de transcription, aboutissant à la mort cellulaire neuronale (Choi 1988; Beal 1992c; Coyle and Puttfarcken 1993; Lipton and Rosenberg 1994; Sattler and Tymianski 2000; Hardingham and Bading 2003).

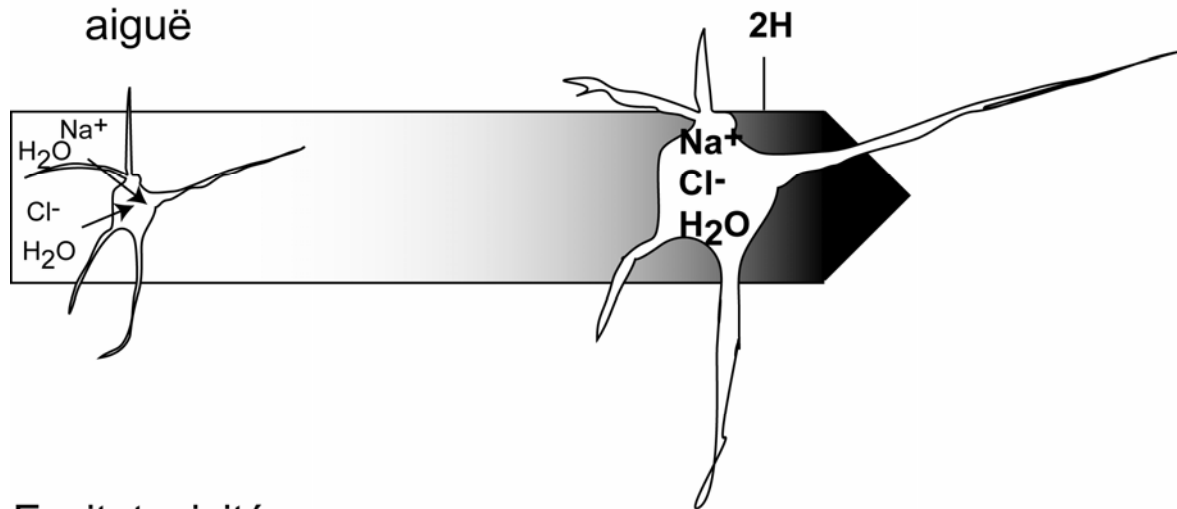
4.10.1. Perturbations des flux ioniques

L'étape clé de l'excitotoxicité est l'activation des récepteurs glutamatergiques, mais cette seule activation n'est pas suffisante à induire la neurodégénérescence. En effet quatre éléments le confirment :

- Il y a une faible corrélation entre la sensibilité neuronale au stress excitotoxique et la densité des récepteurs (McDonald and Johnston 1990; Kato et al. 1991) ;
- En présence d'un même nombre de récepteurs, le striatum est plus sensible au glutamate après décortication (McLennan 1980) ;
- En dépit de la présence de récepteurs au niveau axonal et des terminaisons nerveuses, ces structures sont généralement préservées par rapport au corps cellulaire (Olney 1971; Coyle et al. 1978);
- La déafférentation de région cérébrale riche en innervation glutamatergique peut atténuer la neurotoxicité des agonistes des récepteurs du kaïnate et du NMDA (Young et al. 1988b; Debonnel et al. 1989; Coyle and Puttfarcken 1993), possiblement par les changements d'expression des transporteurs astrocytaires glutamatergiques (Lievens et al. 2000b);

La dégénérescence neuronale évolue pendant plusieurs heures après une brève activation des récepteurs (Coyle et al. 1978). Ces observations ont provoqué l'étude des mécanismes mis en jeu après l'activation des récepteurs. Les études réalisées sur les cultures

Excitotoxicité aiguë



Excitotoxicité retardée

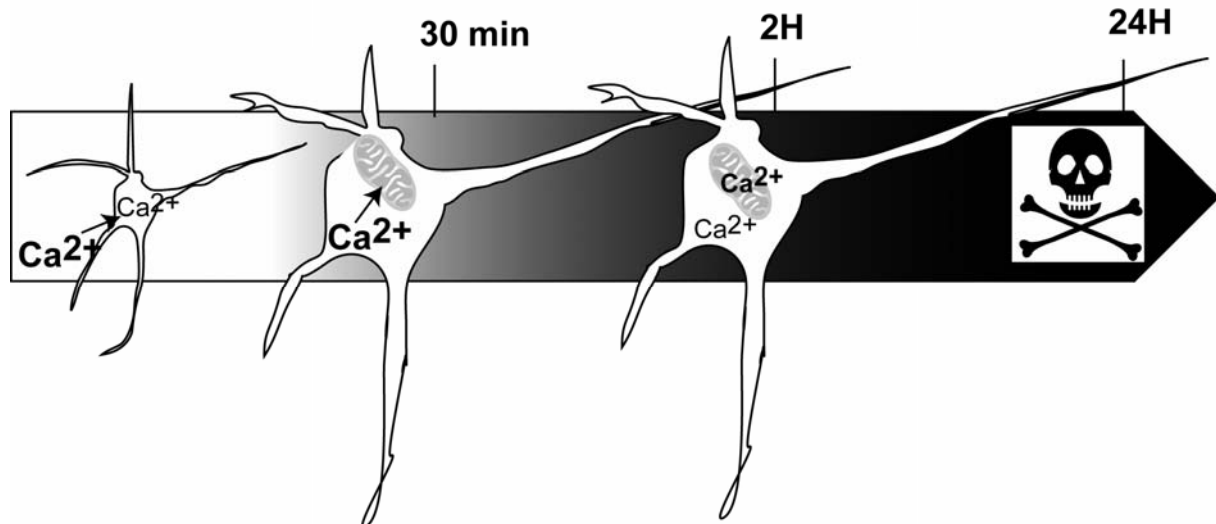


Figure 68 : Les deux formes d'excitotoxicité

Ce schéma représente les deux formes d'excitotoxicité : l'excitotoxicité aiguë et l'excitotoxicité retardée. L'excitotoxicité aiguë dépend de l'entrée du sodium, du chlore et de l'eau aboutissant au gonflement cellulaire, réversible jusqu'à 2H après l'action de l'excitotoxine. L'excitotoxicité retardée dépend de l'entrée de calcium immédiate après l'action de l'excitotoxine sur les récepteurs, augmentant le calcium intracellulaire pendant une heure environ avant de retourner au niveau basal, suivie d'une mort vers 24H. Cette phase est réversible pendant les 30 premières minutes d'application du glutamate.

primaires neuronales ont révélé deux formes de neurodégénérescence induite par la stimulation des récepteurs du glutamate, aiguë et retardée, distinctes par leur durée d'évolution et le type d'ions mis en jeu (Figure 68) (Choi 1987). La forme aiguë de neurotoxicité induite par un agoniste glutamatergique est caractérisée par un gonflement neuronal aboutissant à une lyse osmotique neuronale. Elle peut être prévenue par le retrait du Na⁺ ou du Cl⁻ du milieu de culture, les deux ions responsables de l'entrée massive d'eau par les canaux ioniques ouverts suite à l'activation glutamatergique (Figure 68) (Rothman 1985; Choi 1987). Elle a été observée principalement dans des cultures corticales (Choi 1987) et striatales (Colwell and Levine 1996) et paraît moins importante dans les cultures hippocampales (Colwell and Levine 1996).

Au contraire, la forme retardée de neurotoxicité induite par l'exposition des neurones à une forte concentration d'un agoniste glutamatergique de type NMDA ou kaïnate sur une courte durée ou une faible concentration sur une longue durée, s'accompagne d'un influx calcique et d'une mort retardée (Figure 68) (Choi 1985, 1987; Rothman et al. 1987; Kato et al. 1991). Cette toxicité retardée induite soit par le récepteur du kaïnate soit par le récepteur du NMDA ne dépend pas du gonflement neuronal initial car il peut exister pendant une période de deux heures en présence de glutamate et être réversible lors du retrait du glutamate, sans induire de mort retardée, en présence du neuroprotecteur MK-801 (Choi et al. 1988; Michaels and Rothman 1990). La toxicité retardée est consécutive à une phase d'initiation constituée de l'influx du calcium du milieu extracellulaire dans la cellule et est réversible jusqu'à 30 minutes par retrait du calcium du milieu de culture après l'exposition d'une culture corticale à une excitotoxine comme le NMDA (Figure 68) (Hartley and Choi 1989). Cette augmentation de calcium intracellulaire intervient dans la minute suivant l'exposition d'une culture neuronale, comme une culture d'hippocampe, à une excitotoxine comme le glutamate et peut être maintenue sur une période d'une heure (Dubinsky 1993). Elle diminue ensuite progressivement pour atteindre le niveau de base maintenu à partir de 2 heures jusqu'à 13 heures après la stimulation, la mort étant observée à 24 heures (Figure 68) (Dubinsky 1993).

4.10.2. Augmentation du calcium intracellulaire et origines

L'augmentation du calcium intracellulaire relié à une cytotoxicité après un influx de calcium extracellulaire a été mise en évidence sur différents types de neurones (Sattler and Tymianski 2000) :

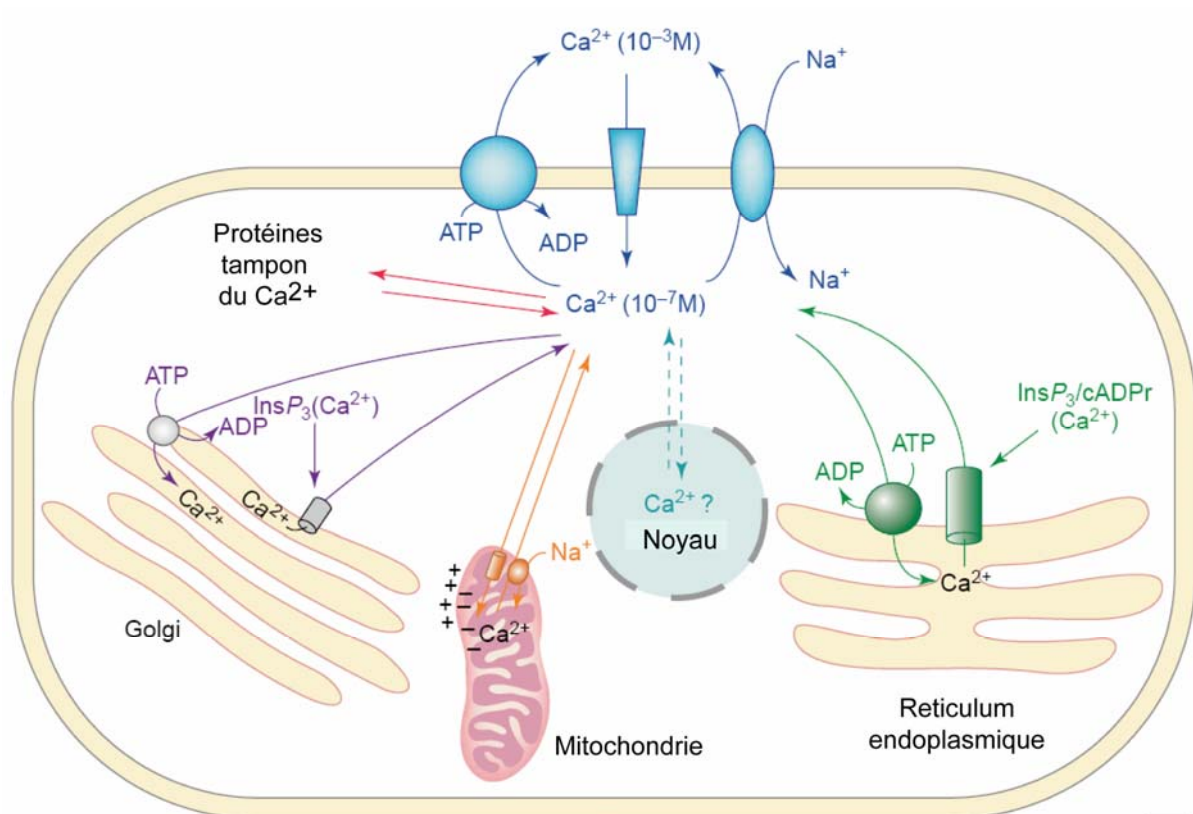
- sur des axones amputés (Schlaepfer and Bunge 1973),
- sur des cultures corticales (Choi 1985),
- sur les cultures d'hippocampe (Michaels and Rothman 1990),
- sur les cultures spinales (MacDermott et al. 1986),
- sur les cultures de cellules granulaires du cervelet (Milani et al. 1991),
- sur les cultures striatales (Murphy et al. 1987b; Freese et al. 1990),
- sur les tranches de cortex pyriforme (Hori et al. 1985),
- sur les tranches de cervelet (Garthwaite et al. 1986),
- sur les tranches striatales (Calabresi et al. 1990)
- sur les tranches hippocampales (Seubert et al. 1988).

Selon le type neuronal étudié, cette neurotoxicité retardée dépendante du calcium peut être consécutive à l'entrée de calcium via les récepteurs du NMDA, via les récepteurs non-NMDA ou via les canaux calciques (Sattler and Tymianski 2000).

L'activation des récepteurs NMDA a été mise en évidence dans les neurones corticaux (Choi et al. 1988; Hartley et al. 1993), les neurones spinaux (MacDermott et al. 1986), les neurones d'hippocampe (Michaels and Rothman 1990), les neurones striataux après au moins deux semaines de culture (Koroshetz et al. 1990; Freese et al. 1992), sur les tranches hippocampales (Seubert et al. 1988) et striatales (Calabresi et al. 1990). L'activation des récepteurs non-NMDA a été mise en évidence dans les neurones corticaux (Koh et al. 1990), les neurones spinaux (MacDermott et al. 1986), les neurones hippocampaux (Jahr and Stevens 1987), les neurones striataux (Chen et al. 1995) et les tranches striatales (Calabresi et al. 1990). Les canaux calciques voltage-dépendant peuvent être activés secondairement à l'activation de récepteurs NMDA dans les tranches corticostriatales (Akopian and Walsh 2002).

In vivo, l'intervention du calcium dans le mécanisme de l'excitotoxicité est partiellement ou indirectement mise en évidence. En effet, la réduction du calcium extracellulaire a été observée dans la solution de perfusion de microdialyse en présence de kaïnate perfusé dans le striatum (Butcher et al. 1987). De même, la perfusion de NMDA par microdialyse dans l'hippocampe de lapin s'accompagne d'une réduction de la concentration de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans le dialysat, reflet d'un influx calcique. Dans un modèle d'ischémie cérébrale ou de maladie de Parkinson induite par l'injection de 6-hydroxydopamine chez le rat, l'autoradiographie du $^{45}\text{Ca}^{2+}$, injecté par voie intraveineuse avant la lésion est superposable à la région lésée (Dienel 1984; Gramsbergen et al. 1988). En parallèle, l'injection de kaïnate chez le chat s'accompagne d'une imagerie par PET au $^{55}\text{Co}^{2+}$ marquant le Ca^{2+} superposable à la zone lésée (Gramsbergen et al. 1988). Par la suite, ce même groupe a mis en évidence une accumulation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans le striatum et la substance noire de rat, dépendant du temps et de la dose de quinolinate injecté dans le striatum (Gramsbergen and van der Sluijs-Gelling 1993). L'accumulation striatale de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se fait dans les 48 heures suivant l'injection, en corrélation avec le développement de la lésion détectée par la disparition de la glutamate décarboxylase, avec une présence restreinte au site d'injection après 6H qui s'étend à la presque totalité du striatum par la suite, détectable 6 semaines plus tard (Gramsbergen and van der Sluijs-Gelling 1993). La substance noire ipsilatérale accumule le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ avec un maximum atteint 7 jours plus tard, reflétant soit le temps nécessaire à la mort retardée induite par l'excitotoxine endogène soit la neurodégénérescence des terminaisons nerveuses striatonigrales (Gramsbergen and van der Sluijs-Gelling 1993). En parallèle, des dépôts de calcium intra et extracellulaires ont été observés dans la région du cerveau lésée par l'injection d'AMPA, comme l'hippocampe et le cortex préfrontal, plus de 30 jours après la lésion (Rodriguez et al. 2000). Ceci a aussi été observé dans le cortex et l'hippocampe de cerveaux de patients atteints de pathologies neurodégénératives chronique et aiguës susceptibles d'être associées à l'excitotoxicité, comme la maladie d'Alzheimer, la démence vasculaire et l'ischémie cérébrale (Ramonet et al. 2002). Par ailleurs, l'utilisation de différents chélateurs du calcium comme le BAPTA (Abdel-Hamid and Tymianski 1997) et le PAN-811 (Jiang et al. 2006) ont un effet neuroprotecteur dans des modèles d'ischémie *in vitro* ou *in vivo*. De même, la surexpression de la calbindine permet de protéger une culture primaire striatale de la mort cellulaire induite par le NMDA (Koroshetz et al. 1990). Les autres éléments en faveur d'une augmentation de la concentration du calcium *in vivo*, est la détection de protéases activées par le calcium ou plus exactement de leurs substrats sous la forme protéolysée dans les modèles d'excitotoxicité ou dans certaines pathologies neurodégénératives.

La présence du calcium en excès dans la cellule n'est cependant pas toujours reliée ou indispensable à une cytotoxicité. Paradoxalement, dans les cellules rétinienne et les cellules ganglionnaires ciliées, la surcharge calcique intracellulaire ne s'accompagne pas de



T/BS

Figure 69 : Compartiments intracellulaire impliqués dans la gestion du calcium

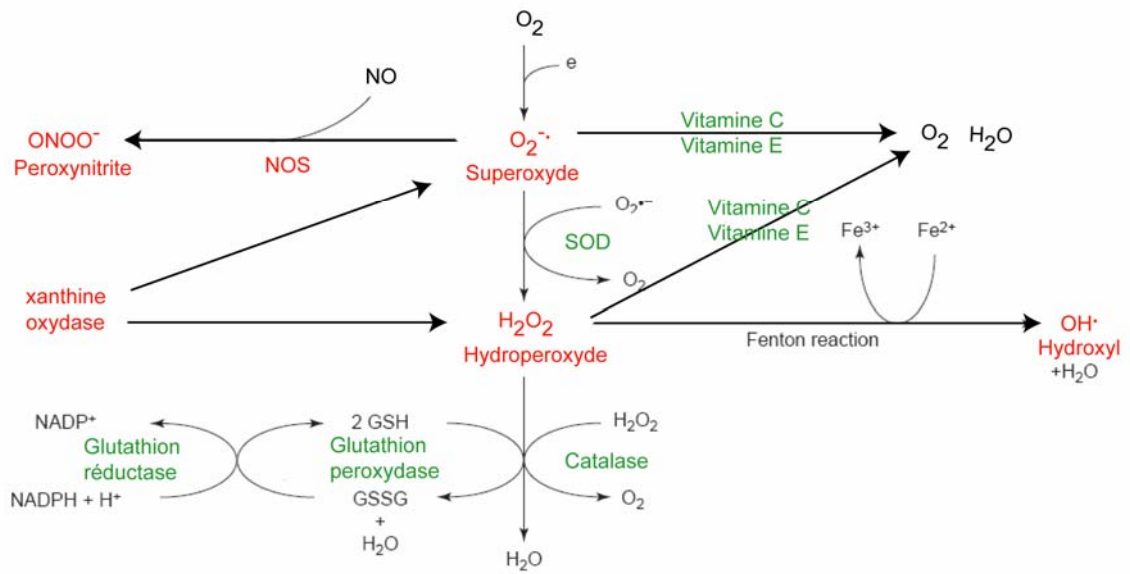
Figure représentant les différents compartiments de gestion du calcium issue de (Carafoli 2004).

La concentration extracellulaire de calcium libre est d'environ 1mM alors que la concentration intracellulaire de calcium libre est maintenue à 100nM par les protéines tampon du calcium et les différents compartiments intracellulaires comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et éventuellement le noyau. Le calcium entre dans la cellule par les canaux calciques membranaires et ressort par l'ATPase membranaire (PMCA) ou l'échangeur $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ membranaire (NCX). Dans la cellule, il rentre dans la mitochondrie par un uniporteur et ressort contre l'entrée du sodium alors que le calcium rentre dans le réticulum par une Ca^{2+} -ATPase (pompe SERCA) et ressort par les canaux activés par l'inositol-3-phosphate ($\text{InsP}_3/\text{cADPr}$) ou les canaux ryanodine activés par l'ADP-ribose cyclique (cADPr) ou par l'acide nicotinique ADP.

neurodégénérescence (Price et al. 1985; Collins et al. 1991). En parallèle, la cytotoxicité peut être observée même en absence de calcium extracellulaire lors de l'ajout de kaïnate sur les neurones granulaires du cervelet (Kato et al. 1991). De même, une neuroprotection des culture d'hippocampe vis-à-vis de la cytotoxicité du kaïnate par le MK-801 peut s'observer en présence d'une élévation de la concentration de calcium intracellulaire (Michaels and Rothman 1990). Ceci s'explique par le fait que plusieurs paramètres interviennent pour que la surcharge calcique intracellulaire soit toxique. Premièrement, elle dépendrait plutôt de l'influx net de calcium plutôt que de la concentration intracellulaire atteinte (Kurth et al. 1989). Secondairement, ce serait la gestion du calcium intracellulaire par les organelles de stockage et les protéines « tampon » du calcium, qui interviendrait surtout dans la toxicité (Figure 69) (Carafoli 2004). Ainsi la capture du calcium par la mitochondrie suivie du relargage lent dans le cytosol constituerait le point central de la toxicité du calcium. Celui-ci a été mis en évidence par l'inhibition de la toxicité du glutamate sur une culture primaire de neurones du cerveau antérieur de rat par l'inhibition de la capture du calcium par la mitochondrie (Stout et al. 1998). Finalement, l'élévation calcique résultant ou non d'une libération mitochondriale, permet la formation de radicaux libres (Coyle and Puttfarcken 1993), l'activation de différentes enzymes (Lipton and Rosenberg 1994) pour aboutir à la mort neuronale.

4.10.3. Radicaux libres

La formation des radicaux libres dans le cerveau se fait au niveau de la phosphorylation oxydative mitochondriale par la réaction des électrons avec l'oxygène moléculaire formant l'anion superoxyde radicalaire $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 (Figure 70). D'autres enzymes exprimées dans le cerveau produisent l' H_2O_2 comme produit secondaire réactionnel, c'est le cas de la monoamine oxydase, de la tyrosine hydroxylase et de la L-amino-oxydase. D'autre part, les catécholamines et l'acide ascorbique peuvent s'auto-oxyder en H_2O_2 (Graham 1978). D'autre part, la phospholipase A_2 activée par le calcium est capable de libérer de l'acide arachidonique, métabolisé en eicosanoïdes par les lipoxygénases et les cyclooxygénases formant en parallèle des $O_2^{\cdot-}$ (Chan and Fishman 1980). La xanthine oxydase possède une activité enzymatique orientée vers la formation d'acide urique, de l'hydroperoxyde H_2O_2 et de superoxyde radicalaire $O_2^{\cdot-}$, lors de la présence de concentration élevée de Ca^{2+} et de déficit énergétique (McCord 1985). La formation de NO, second messenger important intracellulaire, se fait au niveau de la synthèse de l'oxyde nitrique (NOS), enzyme activée par le calcium et associée au niveau neuronal aux récepteurs NMDA (Dawson et al. 1993). Le NO réagit ensuite avec l'anion superoxyde radicalaire $O_2^{\cdot-}$, formant le peroxy-nitrite $ONOO^-$ qui se décompose en radical hydroxyl OH^{\cdot} (Figure 70) (Beckman et al. 1990), l'espèce radicalaire la plus réactive participant à la dégradation des membranes par la peroxydation lipidique. Le radical hydroxyl OH^{\cdot} n'est formé par aucune réaction enzymatique mais il se forme spontanément en présence de Fe^{2+} , par la réaction de Fenton à partir de l'hydroperoxyde H_2O_2 . Tous ces radicaux libres attaquent les lipides en lipides oxydés, diènes, lipides hydroperoxydés et isoprostanes ; les protéines en kynurénines, bityrosine, en hydroxydes de valine et de leucine, en L-dihydroxyphénylalanine, en orthotyrosine, en 2-oxohistidine et en glutamate semialdéhydique et acide adipique semialdéhydique ; et les acides nucléiques, en 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, participant ainsi à la lyse cellulaire (Halliwell and Whiteman 2004). Contre ces radicaux libres, les défenses cellulaires comprennent deux vitamines, la vitamine C, antioxydant hydrophile et la vitamine E antioxydant hydrophobe, ainsi que le glutathion réagissant avec les OH^{\cdot} et prévenant la peroxydation lipidique. En parallèle, trois enzymes dégradent le superoxyde radicalaire $O_2^{\cdot-}$ et



TRENDS in Cell Biology

Figure 70 : Radicaux libres, formation et détoxification

Schéma représentant les différentes voies de formation des radicaux libres en rouge et en vert les voies de détoxification. NOS : synthase d'oxyde nitrique, SOD : superoxyde dismutase.

l'hydroperoxyde H_2O_2 : la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Figure 70) (Temple et al. 2005).

L'intervention des radicaux libres dans les mécanismes d'excitotoxicité est supportée par quatre types d'observations : l'augmentation du taux de radicaux libres, l'augmentation de l'activité des enzymes formant les radicaux libres ou la réduction de l'activité des enzymes de détoxification, ou l'augmentation de témoins de stress oxydatif.

L'augmentation du taux de NO a été observé dans des situations excitotoxiques *in vitro*, après l'activation des récepteurs NMDA (Lipton et al. 1993) et *in vivo* dans le dialysat de microdialyse après l'infusion d'excitotoxines dans le striatum (Kendrick et al. 1996). La production de superoxydes par l'activation de récepteurs NMDA sur les cultures de cellules granulaires du cervelet via l'activation de la phospholipase A2 (Lafon-Cazal et al. 1993).

L'activation de la NOS via l'activation des récepteurs NMDA a été observée dans différents systèmes cellulaires dont les neurones striataux (Marin et al. 1992), les neurones corticaux et hippocampaux (Dawson et al. 1991). De plus, l'activation de la xanthine oxydase, de la phospholipase A2 et de la NOS a été observée au niveau de tranches corticales après l'incubation du glutamate (Sanganahalli et al. 2005). L'activation de la phospholipase A2 induite par la stimulation des récepteurs NMDA mène à la formation d'acide arachidonique et de radicaux libres (Dumuis et al. 1988; Lazarewicz et al. 1988), qui eux-même inactiveraient les transporteurs du glutamate et augmentent la libération du glutamate, entraînant ainsi un cercle vicieux (Pellegrini-Giampietro et al. 1988; Trotti et al. 1996).

D'autre part, l'utilisation de différents types de stratégies visant à diminuer le stress oxydatif, comme la surexpression de la catalase ou de la SOD, l'utilisation de piègeurs de radicaux libres, l'inhibition de la NOS ou l'invalidation de la NOS inductibles sont neuroprotecteurs dans des systèmes excitotoxiques *in vitro* et dans l'ischémie *in vivo* (McCord 1985).

Par exemple la surexpression de la catalase ou de la SOD ou de l'alpha-phényl-N-tert-butyl-nitron, piègeur de radicaux libres, protège une culture primaire corticale de l'excitotoxicité induite par le kaïnate (Cheng and Sun 1994).

Par exemple, l'inhibition de la NOS est neuroprotectrice sur une culture primaire neuronale en présence de NMDA (Dawson et al. 1993). De même, l'invalidation de la NOS protège de l'excitotoxicité induite par l'injection de NMDA dans le striatum (Ayata et al. 1997) et de l'ischémie cérébrale chez le rat (Buisson et al. 1993) (Chabrier et al. 1999).

Dans les maladies neurodégénératives chroniques, le stress oxydatif peut provenir de la cascade excitotoxique comme de la dysfonction mitochondriale, donc il est difficile de définir l'origine du stress oxydatif mais il intervient dans les principales maladies neurodégénératives chroniques. En effet, dans la maladie de Parkinson, une diminution du glutathion (Perry et al. 1982), une augmentation de Fe^{3+} et de ferritine dans la substance noire des patients (Jellinger et al. 1990) ainsi qu'un effet neuroprotecteur de l'inhibiteur de la MAO B, la sélégyline (LeWitt 1993) sont en faveur d'un stress oxydatif. De même, dans la maladie d'Alzheimer, une augmentation de la peroxydation lipidique est observée par l'intermédiaire de l'augmentation des conjugués du thiobarbiturate au niveau du cortex des patients (Subbarao et al. 1990). Dans la SLA, une trentaine de mutations du gène de la SOD1 sont associées à une forme autosomale dominante de la maladie (de Belleruche et al. 1995).

Dans la maladie de Huntington, la réduction de l'activité des enzymes à centre fer-soufre comme l'aconitase pourraient être consécutives à un stress oxydatif utilisant le fer via la réaction de Fenton (Tabrizi et al. 1999). D'autres part, différentes anomalies ont été observées dans les érythrocytes des patients atteints de la maladie de Huntington, comme des défauts de l'activité d'enzymes de détoxification, la glutathion réductase et la glutathion

peroxydase 4 et la présence de diènes conjugués et d'une diminution du glutathion (Kumar and Kurup 2002). Enfin, dans un modèle de maladie de huntington, la cystamine est neuroprotectrice entre autre en augmentant le taux de glutathion réduit (Lesort et al. 2003).

4.10.4. Activation enzymatiques

L'élévation de calcium intracellulaire s'accompagne d'une activation de diverses enzymes (Figure 71), dont la xanthine oxidase, de la phospholipase A2 et de la NOS intervenant dans le stress oxydatif (chapitre précédent). Les autres enzymes activées sont des kinases comme la PKC et la CAM-KII, des phosphatases comme la calcineurine, des protéases comme les calpaïnes et des endonucléases (Lipton and Rosenberg 1994).

4.10.4.1. Kinases et phosphatases

La phosphorylation par les kinases et la déphosphorylation par les phosphatases de substrats cellulaires comme les récepteurs NMDA et leurs molécules de signalisation cellulaire a une implication importante sur l'excitotoxicité.

En effet, l'activation de récepteurs NMDA surexprimés sur des cellules HEK augmente l'activité de la PKC et induit une mort cellulaire qui peut être diminuée par l'ajout d'inhibiteur ou la réduction de l'expression de la PKC permettant la réduction de la phosphorylation de NR2A sur la partie C-terminale (Wagey et al. 2001).

En parallèle, l'inactivation de la jnk 3 (Jun N-terminal Kinase 3) est neuroprotectrice vis-à-vis de l'excitotoxicité induite par le kaïnate dans l'hippocampe (Yang et al. 1997) et la jnk est activée dans des tranches striatales en présence de glutamate (Vanhoutte et al. 1999).

D'autre part, l'inactivation d'Akt est associée à l'excitotoxicité *in vitro* et la surexpression d'Akt est protectrice de l'excitotoxicité induite par le NMDA (Luo et al. 2003).

L'activation de la phosphatase calcineurine, enzyme préférentiellement exprimée dans les MSN (Goto et al. 1987), a été observée après la stimulation des récepteurs NMDA avec pour conséquence la déphosphorylation de MAP-2 (Halpain and Greengard 1990), de DARPP32 dans des tranches striatales (Halpain et al. 1990), et plus récemment celle de DAPK (Death-associated protéin kinase) dans un modèle d'ischémie focale chez le rat (Shamloo et al. 2005). L'inhibition de la calcineurine dans le modèle d'ischémie *in vitro* réduit l'activation de la DAPK et l'inhibition de la DAPK *in vitro* et *in vivo* a un effet neuroprotecteur (Shamloo et al. 2005).

Au contraire, l'activation des récepteurs NMDA sur une culture hippocampale induit une diminution de l'activité de la CAM-KII (Churn et al. 1995) mais celle-ci serait plutôt un phénomène neuroprotecteur que neurotoxique (Hajimohammadreza et al. 1995), permettant la réduction de la phosphorylation de NR2B (Meng et al. 2003). En parallèle, l'activation de la voie des protéines kinases activées par le mitogène (MAPK) par le GDNF s'avère neuroprotectrice sur des cultures neurogliales corticales exposées au NMDA, par diminution de l'influx calcique via les récepteurs NMDA (Nicole et al. 2001a). En parallèle, l'activation de la voie MAPK et phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) et l'augmentation de la synthèse de protéine comme bcl-2 par le BDNF est neuroprotectrice vis-à-vis d'une culture hippocampale en présence de glutamate (Almeida et al. 2005).

Les phosphatases et les kinases interviendraient dans la physiopathologie de différentes pathologies neurodégénératives, potentiellement associées à un mécanisme excitotoxique. Elles ont été mises en évidence dans :

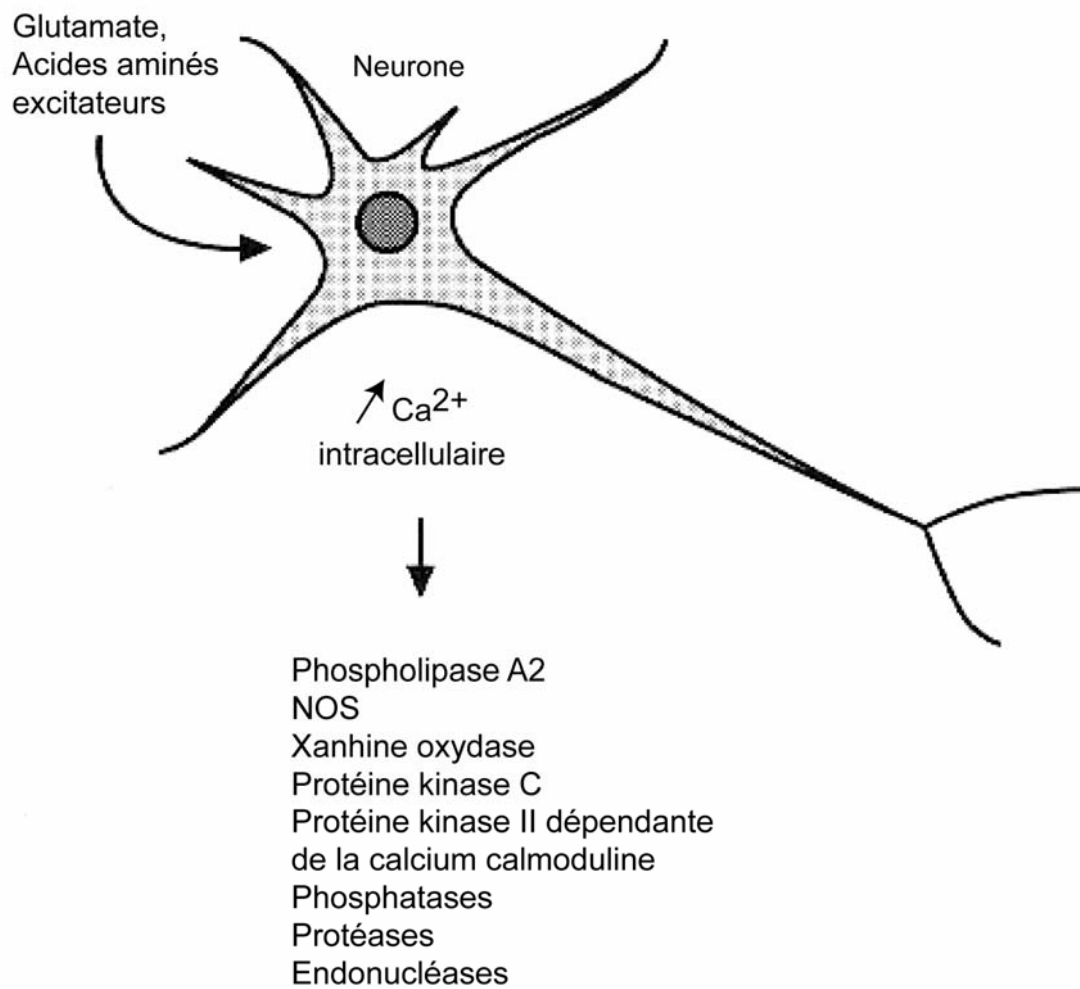


Figure 71 : Enzymes intervenant lors de l'excitotoxicité
 NOS : synthase de l'oxyde nitrique. Schéma issu de (Lipton and Rosenberg 1994)

-
- La maladie d'Alzheimer avec la présence d'une forme tronquée et activée par la calpaïne de la calcineurine (Liu et al. 2005) en parallèle d'une diminution de l'expression de trois isoformes de la PKC dans le cerveau des patients (Masliah et al. 1990) et de l'augmentation de l'activité de la CAMKII parallèle à la perte des neurones CA1 dans l'hippocampe (Wang et al. 2005);
 - La SLA avec une réduction de la phosphorylation des récepteurs NMDA, probablement suite à une activité augmentée de la calcineurine au niveau de section de la moëlle épinière de patients décédés (Wagey et al. 1997);
 - La maladie de Huntington avec une diminution de l'expression de la calcineurine (Goto et al. 1986; Goto et al. 1989) et de l'isoforme β II de la PKC (Hashimoto et al. 1992) dans le striatum de patients.

4.10.4.2. Calpaines

L'intervention des calpaines dans les mécanismes d'excitotoxicité est supportée par différents éléments :

- L'observation d'une dégradation de la spectrine après la stimulation des récepteurs NMDA dans différents systèmes dont les tranches d'hippocampe (Seubert et al. 1988), non observée en présence d'une inhibition de la transcription de la calpaïne I par un antisens (Bednarski et al. 1995) ;
- La protection de l'excitotoxicité induite par l'ajout de kaïnate sur les neurones corticaux par un inhibiteur de calpaïne (Cheng and Sun 1994) ;
- La protection de l'excitotoxicité induite par l'ajout de kaïnate et de NMDA sur les neurones cerebelleux et hippocampaux par un inhibiteur de calpaïne (Brorson et al. 1995).
- L'augmentation de l'activité caséinolytique des calpaines en parallèle de l'observation de l'accumulation de fragments protéolytique de la calpastatine, de MAP-2 et de l'alphaII-spectrine ainsi que de l'activation de la caspase 3 par les calpaines, dans les zones ischémisées du cerveau de rat (Blomgren et al. 1997; Blomgren et al. 2001) ;

Les calpaines interviendraient dans la physiopathologie de nombreuses pathologies (Zatz and Starling 2005), dont différentes pathologies neurodégénératives aiguës et chroniques potentiellement associées à un mécanisme excitotoxique. Elles ont été mises en évidence dans :

- L'augmentation de la probabilité de développer une ischémie cérébrale est associée à un polymorphisme génétique portant sur le gène de la calpaïne 10 (Malecki et al. 2003);
- La maladie de Parkinson avec l'observation d'une augmentation de l'expression de la m-calpaïne dans le mésencéphale des patients (Mouatt-Prigent et al. 1996);
- La maladie d'Alzheimer par l'observation de l'augmentation de la quantité de m-calpaïne cytosolique et la diminution de la calpastatine dans le néocortex des patients (Nixon et al. 1994) ;
- La maladie de Huntington avec une augmentation de l'expression de la petite sous-unité régulatrice et de la μ -calpaïne dans le noyau caudé des patients (Gafni and Ellerby 2002).

4.10.4.3. *Endonucleases*

Les endonucléases sont des acteurs terminaux de la mort cellulaire par apoptose (Nagata et al. 2003) et par nécrose (Higuchi 2003), assurant la fonction de coupure de l'ADN au niveau internucléosomal. Elles sont activées dans le striatum de rat après injection de kaïnate (Lok and Martin 2002) et la réduction de l'expression de l'endonucléase G chez la souris protège partiellement de lésion de l'hippocampe induite par le kaïnate (Wu et al. 2004). Un marquage TUNEL positif, représentant le résultat de la fragmentation de l'ADN par les endonucléases, a été observé dans différentes pathologies neurodégénératives :

- La zone ischémisée du cerveau de patients décédés d'ischémie cérébrale (Guglielmo et al. 1998) ;
- La zone lésée du cerveau de patients décédés de traumatisme cérébral (Smith et al. 2000a) ;
- L'hippocampe de patients décédés de la maladie d'Alzheimer (Smale et al. 1995) ;
- Le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington (Dragunow et al. 1995; Portera-Cailliau et al. 1995; Thomas et al. 1995; Butterworth et al. 1998).

5. Objectifs

Les objectifs de cette thèse comportaient l'étude de deux problématiques. La première problématique était l'étude des voies de mort cellulaires mises en jeu *in vivo* dans un modèle de la maladie de Huntington induit par une forte inhibition du complexe II mitochondrial. La seconde problématique consistait à comprendre par quel mécanisme l'inhibition partielle du complexe II mitochondrial pouvait produire une potentialisation majeure de la neurodégénérescence induite la stimulation excessive des récepteurs NMDA. L'objectif global de ces deux études était de mieux définir quelles pouvaient être les conséquences du déficit chronique du complexe II rapporté dans la maladie de Huntington.

5.1. Etude des voies de mort cellulaire

De nombreux laboratoires ont étudié la physiopathologie de la maladie de Huntington par différentes approches et différents modèles de la pathologie. La mise en évidence des voies de neurodégénérescence *in vivo* s'est révélée problématique du fait de l'absence de mort cellulaire dans la majorité des modèles transgéniques. L'administration d'inhibiteurs de la SDH, comme le malonate et le 3-NP chez les rongeurs, induit une neurodégénérescence striatale se rapprochant de celle observée dans la maladie de Huntington (Brouillet et al. 1999; Brouillet et al. 2005). Le but de cette première étude était de déterminer si la neurodégénérescence striatale induite par l'inhibition de la SDH produisait l'activation préférentielle des caspases et/ou des calpaïnes dans un modèle reproduisant la dysfonction de la SDH observée dans la maladie de Huntington (Brennan et al. 1985; Gu et al. 1996; Browne et al. 1997; Tabrizi et al. 1999). Pour répondre à cette question, nous avons utilisé deux modes d'administration du 3-NP chez le rat produisant soit une inhibition transitoire de la SDH dans le modèle de neurodégénérescence striatale aiguë, soit une inhibition stable de la SDH dans le modèle de neurodégénérescence striatale chronique. Le modèle aigu est obtenu par une double injection IP de 3-NP alors que le modèle chronique, mis au point précédemment dans le laboratoire (Dautry et al. 2000; Ouary et al. 2000), est obtenu par une administration sous cutanée continue au moyen de pompe osmotiques.

5.2. Etude du mécanisme de potentialisation de la neurodégénérescence induit par l'inhibition de la SDH dans un modèle d'excitotoxicité

Des évidences de l'existence de dysfonctions mitochondriales et d'anomalies de la transmission glutamatergique ont été observées dans diverses atteintes neurologiques aiguës et dans de nombreuses pathologies neurodégénératives chroniques (Greene and Greenamyre 1996; Beal 2000; Mattson 2003; Beal 2005). De plus, il est connu depuis plusieurs années que la neurotoxicité d'inhibiteurs mitochondriaux requiert l'intervention des récepteurs NMDA. En effet, les antagonistes des récepteurs NMDA et la suppression chirurgicale des afférences glutamatergiques peuvent bloquer la neurodégénérescence induite par l'injection d'inhibiteurs de la navette malate/aspartate (Beal et al. 1991), du complexe I (Srivastava et al. 1993) et de la SDH (Beal et al. 1993a; Beal et al. 1993b; Greene et al. 1993). Ces observations ont mené à l'élaboration de l'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte pour expliquer le mécanisme de neurodégénérescence induit par les inhibiteurs mitochondriaux (Albin and Greenamyre 1992;

Beal 1992b; Greene and Greenamyre 1996). L'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte suggère que l'inhibition de complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale induit une réduction du taux d'ATP intracellulaire qui n'est plus suffisant pour maintenir le potentiel de la membrane plasmique par la Na⁺/K⁺-ATPase, permettant la levée de l'inhibition des récepteurs NMDA par le Mg²⁺ pour aboutir à une entrée de Ca²⁺ anormale et à la neurodégénérescence dépendant du glutamate. Le but de la seconde étude présentée était d'étudier *in vivo* l'existence de l'excitotoxicité indirecte et d'en définir ses mécanismes. Dans ce but, nous avons administré le 3-NP par voie générale à une dose infratoxique pour induire une dysfonction de la SDH dans le striatum et nous avons injecté directement le quinolinate dans le striatum pour induire une lésion excitotoxique par l'activation des récepteurs NMDA.

6. Résultats

6.1. Article 1

Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease.

Bizat N., Hermel J. M., Boyer F., **Jacquard C.**, Creminon C., Ouary S., Escartin C., Hantraye P., Kajewski S. and Brouillet E. (2003)

J Neurosci **23**, 5020-5030. Erratum in: *J Neurosci*. 2003 Oct 5029;5023(5030):9960.

6.1.1. Présentation de l'étude, hypothèses et objectifs

Cette étude a été initiée pour définir si la neurodégénérescence striatale dans la maladie de Huntington fait intervenir l'activation des caspases et/ou l'activation des calpaïnes, dans deux modèles phénotypiques de la maladie obtenus par l'inhibition de la SDH par le 3-NP.

Différents éléments étaient en faveur de l'activation des caspases et de l'apoptose dans la maladie de Huntington avant le commencement de cette étude ([Hickey and Chesselet 2003](#)). En effet, l'activation des caspases 3, 8 et 9 et l'augmentation de l'expression de la caspase 1 ont été mises en évidence dans différents systèmes d'expression de l'huntingtine mutée *in vitro* ([Liu 1998](#); [Saudou et al. 1998](#); [Kim et al. 1999](#); [Miyashita et al. 1999](#); [Wang et al. 1999](#); [Hackam et al. 2000](#); [Li et al. 2000b](#); [Jana et al. 2001](#); [Gervais et al. 2002](#)). Par ailleurs, la fragmentation de l'ADN mise en évidence par le marquage TUNEL a été observée dans le striatum des modèles 3-NP ([Dautry et al. 2000](#); [Ouary et al. 2000](#); [Kim and Chan 2001](#); [Vis et al. 2001](#)), des modèles excitotoxiques ([Portera-Cailliau et al. 1995](#); [Bordelon et al. 1999](#)) et chez les patients atteints de la maladie de Huntington ([Dragunow et al. 1995](#); [Portera-Cailliau et al. 1995](#); [Thomas et al. 1995](#); [Butterworth et al. 1998](#)). De plus, l'activation de la caspase 9 a été observée dans un modèle 3-NP ([Vis et al. 2001](#)) et l'activation de la caspase 1 ([Ona et al. 1999](#)) et de la caspase 8 ([Sanchez et al. 1999](#)) pouvait être observée indirectement dans le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington.

D'autres éléments étaient en faveur de l'activation des calpaïnes et de la nécrose comme mécanisme de neurodégénérescence dans la maladie de Huntington. En effet, *in vitro* le modèle d'excitotoxicité induite par l'activation des récepteurs NMDA de tranches d'hippocampe met en jeu une augmentation du calcium intracellulaire suivie d'une dégradation de la spectrine, substrat des calpaïnes, protéases activées par le calcium ([Seubert et al. 1988](#)), non observée en présence d'une inhibition de la transcription de la calpaïne I par un antisens ([Bednarski et al. 1995](#)). L'ajout d'inhibiteurs de calpaïne *in vitro* permet la protection de l'excitotoxicité induite par le kaïnate et le NMDA sur différents types de neurones, comme les neurones de cervelet, d'hippocampe ([Bronson et al. 1995](#)) et corticaux ([Cheng and Sun 1994](#)). Par ailleurs, l'existence d'une inflammation, signe de nécrose, a été mise en évidence dans le striatum des patients atteint de la maladie de Huntington ([Hedreen and Folstein 1995](#)). Celle-ci met en jeu une astroglie et une microglie réactives avec une activation du complément d'origine microgliale dans le noyau caudé des patients de stade III et IV ([Singhrao et al. 1999](#)). En parallèle de la thèse, deux témoins de l'activation des calpaïnes ont été observés dans le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington ([Gafni and Ellerby 2002](#)). Il s'agit de la présence en grande quantité de la forme protéolysée de la petite sous-unité de

la calpaïne et de l'augmentation de l'expression de l'expression de la μ -calpaïne et de la m-calpaïne dans le noyau caudé (Gafni and Ellerby 2002).

Afin d'élucider *in vivo*, les voies de mort cellulaire mises en jeu dans les deux modèles de la maladie de Huntington, nous avons caractérisé la lésion par marquage au masson-trichome. Nous avons déterminé la cinétique de la mort cellulaire par la mesure du taux d'oligonucléosomes dans le striatum au cours des 48 heures qui ont suivies l'injection du 3-NP dans le modèle aigu. En parallèle, nous avons réalisé la même étude cinétique au cours des 5 jours d'infusion continue du 3-NP dans le modèle chronique. Nous avons ensuite étudié la cinétique d'activation de la caspase 3, de la caspase 8 et de la caspase 9 et des calpaïnes par mesure *ex vivo* de la protéolyse de substrats en spectrofluorescence, au niveau du striatum lésé et au niveau du cortex préservé par le 3-NP, dans les deux modèles. Puis nous avons étudié la protéolyse de substrats des caspases et des calpaïnes dans le striatum et le cortex par western blot et la présence des formes actives des caspases dans le striatum par immunohistochimie et de la μ -calpaïne dans le striatum par western blot. Finalement, nous avons étudié l'effet de l'inhibition des calpaïnes, par l'administration icv du Z-Leu-Leu-Norleucinal (CI-1), sur la neurodégénérescence induite par l'infusion continue de 3-NP dans le modèle chronique.

Calpain Is a Major Cell Death Effector in Selective Striatal Degeneration Induced *In Vivo* by 3-Nitropropionate: Implications for Huntington's Disease

Nicolas Bizat,¹ Jean-Michel Hermel,¹ Frédéric Boyer,¹ Carine Jacquard,¹ Christophe Créminon,² Stéphane Ouary,¹ Carole Escartin,¹ Philippe Hantraye,^{1,3} Stan Krajewski,⁴ and Emmanuel Brouillet¹

¹Unité de Recherche Associée Commissariat à l'Energie Atomique (CEA)-Centre National de la Recherche Scientifique 2210, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Département de Recherche Médicale (DRM), Direction des Sciences du Vivant (DSV), CEA, 91401 Orsay, France, ²CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, DRM, DSV, Centre d'Etudes Nucléaires Saclay, 91191 Gif sur Yvette, France, ³CEA, Isotopic Imaging, Biochemical and Pharmacology Unit, Service Hospitalier Frédéric Joliot, DRM, DSV, CEA, 91401 Orsay, France, and ⁴Program on Cell Death and Apoptosis, The Burnham Institute, La Jolla, California 92037

Striatal cell death in Huntington's Disease (HD) may involve mitochondrial defects, NMDA-mediated excitotoxicity, and activation of death effector proteases such as caspases and calpain. However, the precise contribution of mitochondrial defects in the activation of these proteases in HD is unknown. Here, we addressed this question by studying the mechanism of striatal cell death in rat models of HD using the mitochondrial complex II inhibitor 3-nitropropionic acid (3-NP). The neurotoxin was either given by intraperitoneal injections (acute model) or over 5 d by constant systemic infusion using osmotic pumps (chronic model) to produce either transient or sustained mitochondrial deficits. Caspase-9 activation preceded neurodegeneration in both cases. However, caspase-8 and caspase-3 were activated in the acute model, but not in the chronic model, showing that 3-NP does not require activation of these caspases to produce striatal degeneration. In contrast, activation of calpain was specifically detected in the striatum in both models and this was associated with a calpain-dependent cleavage of huntingtin. Finally, in the chronic model, which mimics a steady blockade of complex II activity reminiscent of HD, selective calpain inhibition prevented the abnormal calpain-dependent processing of huntingtin, reduced the size of the striatal lesions, and almost completely abolished the 3-NP-induced DNA fragmentation in striatal cells. The present results demonstrate that calpain is a predominant effector of striatal cell death associated with mitochondrial defects *in vivo*. This suggests that calpain may play an important role in HD pathogenesis and could be a potential therapeutic target to slow disease progression.

Key words: neurodegenerative disease; excitotoxicity; mitochondrial complex II inhibitor; calpain; caspase; calpain inhibitor; neuroprotection

Introduction

Huntington's disease (HD) is a genetic disorder associated with severe motor and cognitive deficits and preferential degeneration of medium spiny GABAergic neurons located in the striatum (Harper, 1991). Whereas the genetic defect responsible for HD is identified as an expansion of polyglutamine sequences within the huntingtin (Htt) protein (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), most of the pathological mechanisms linking the mutant protein to the selective neurodegeneration observed in the patient's brain remain highly speculative.

Mechanisms of cell death specifically implicated in HD pathogenesis include oxidative stress, mitochondrial defects, excitotoxicity, and activation of death effector proteases. The mitochondrial defects most consistently found in HD involve the succinate

dehydrogenase-complex II and Ca²⁺ homeostasis (Gu et al., 1996; Browne et al., 1997; Tabrizi et al., 1999; Panov et al., 2002). Compelling evidence also supports the view that excitotoxic cell death plays a major role in HD (DiFiglia, 1990). This is further supported by more recent observations of transgenic mice overexpressing full-length mutated Htt in which striatal neurons display increased NMDA-evoked currents and are more vulnerable to the toxic effects of the NMDA-receptor agonist quinolinate (Cepeda et al., 2001; Laforet et al., 2001; Zeron et al., 2002). Finally, a central role in the toxicity of the mutant form of Htt of the proteases of the caspase family (Saudou et al., 1998; Sanchez et al., 1999; Wellington et al., 2002) and more recently of the Ca²⁺-activated neutral protease calpain (Kim et al., 2001; Gafni and Ellerby, 2002) has also been suggested. Despite this accumulating data, the precise contribution of these cell death mechanisms in HD pathogenesis is still unknown. A sequential process of cell death has been hypothesized for HD in which mitochondrial defects lead indirectly to excitotoxicity, activation of cell death effector proteases, and eventually cell demise (Albin and Greenamyre, 1992; Beal, 1992). An alternative mechanism proposes that all these steps are part of a self-amplifying vicious circle in which they are either initiated by, or themselves contribute to,

Received Nov. 5, 2002; revised Feb. 27, 2003; accepted March 26, 2003.

This work was supported by Commissariat à l'Energie Atomique and Centre National de la Recherche Scientifique and National Institutes of Health Grant NS36821 (S.K.). We thank Drs. Kenneth L. Moya and Hiram Hedayat for comments and critical reading of this manuscript.

Correspondence should be addressed to Dr. Emmanuel Brouillet, Unité de Recherche Associée Commissariat à l'Energie Atomique (CEA)-Centre National de la Recherche Scientifique 2210, Service Hospitalier Frédéric Joliot, DRM, DSV, CEA, 4 place du Général Leclerc, 91401 Orsay CEDEX, France. E-mail: brouillet@shfj.cea.fr.

Copyright © 2003 Society for Neuroscience 0270-6474/03/235020-11\$15.00/0

an impairment of mitochondrial function leading to energy failure and ultimately cell death (for review, see Petersen et al., 1999). In support of the sequential process, experimental mitochondrial blockade using the selective complex II inhibitors malonate or 3-nitropropionic acid (3-NP) has shown that mitochondrial perturbation by itself can trigger NMDA receptor activation leading to selective degeneration of the striatal medium spiny GABAergic neurons (Brouillet et al., 1999). Whether the mitochondrial defects in HD mimicked by malonate and 3-NP are also directly responsible for the preferential activation of caspases and/or calpains *in vivo* is unknown.

To address this question, we used 3-NP-mediated succinate dehydrogenase (SDH) inhibition in rats as a mean to produce either transient (acute model) or sustained (chronic model) mitochondrial deficits and characterized the pattern of caspase and calpain activation, in relation to these different patterns of mitochondrial perturbation. We found evidence for a regionally restricted calpain activation in both models *in vivo*. We then examined whether inhibiting calpain *in vivo* could also specifically protect the striatum in the chronic model of mitochondrial blockade.

Materials and Methods

Animals. We used 12-week-old male Lewis rats (Iffa Credo, L'Arbresle, France) weighing 340–370 gm. All experimental procedures were performed in strict accordance with the recommendations of the European Community (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care and use of laboratory animals.

All chemicals and reagents were purchased from Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France) unless specified otherwise.

3-NP treatment and experimental design. Two different 3-NP-rat models were studied.

In the chronic model, a solution of 3-NP was delivered by chronic infusion ($54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) using osmotic minipumps (flow rate $10 \mu\text{l/hr}$, model 2ML1; Alzet, Palo Alto, CA) placed subcutaneously in the back of the animals under ketamine–xylazine anesthesia (Dautry et al., 2000; Garcia et al., 2002; Mittoux et al., 2002; Blum et al., 2002). Control rats were sham-operated. In a first experiment, animals (5–6 per time point) were killed every 6 hr from day 2 to day 5 for biochemical analysis (DNA fragmentation, caspase-3-related proteolytic activity, fodrin cleavage) and immunohistochemistry (caspase-3, -8, -9). In this experiment including 65 3-NP-treated rats, survival was 100%. In a second experiment in which animals were analyzed for activation of caspase-3, -8 and -9 and calpains by Western blot and proteolytic activity assays, groups of rats ($n = 5–8$) were killed by decapitation at daily intervals (days 1, 2, 3, 4, and 5) after osmotic pump implantation (day 0). In this experiment including 35 3-NP-treated rats, one animal of the day 5 group ($n = 7$) died prematurely and could not be analyzed. All animals chronically treated with 3-NP were included in biochemical analysis.

In the acute model, animals received two intraperitoneal injections of 3-NP (25 mg/ml, pH 7.4, 50 mg/kg) at 90 min intervals. Control animals received intraperitoneal injections of saline. Animals were killed at 3, 6, 12, 24, and 48 hr after the first intraperitoneal injection of the neurotoxin. Rats showed variable responses to this acute 3-NP regimen. In the experiments presented, survival rate over the 48 hr after injection was 87% (time point, n survivor/ n per group: 6 hr, 7/7; 12 hr, 7/7; 24 hr, 8/10; 48 hr, 11/14). All rats of the 6 hr group were used for analysis. For later time points, only rats with obvious uncoordination and/or dystonia among survivors were taken for analysis (time point, n symptomatic/ n survivors: 12 hr, 7/7; 24 hr, 5/8; 48 hr, 10/11).

Calpain inhibitor I neuroprotection experiments in the chronic model. The calpain inhibitor I (CI-1; z-Leu-Leu-Norleucinal; Biomol, Plymouth Meeting, PA) solubilized in phosphate buffer saline containing 40% dimethylsulfoxide was delivered ($2.5 \mu\text{g/hr}$, $1 \mu\text{l/hr}$) by intracerebroventricular infusion using an osmotic minipump (model 2001; Alzet) connected to a stereotaxically implanted cannula [anteroposterior (AP) -1.6 mm , lateral 2.0 mm from bregma, ventral 3.5 mm from dura, using the

“brain infusion kit”; Alzet]. The minipump delivering 3-NP and that delivering CI-1 were implanted simultaneously. Histological and biochemical evaluation was performed on day 5 of the neurotoxic treatment.

Brain processing, sample dissection, and homogenization. Brains were rapidly removed from the skull and cut vertically along the rostrocaudal axis into two hemispheres. The left hemisphere was fixed in Bouin's solution for 3 d and paraffin-embedded for immunohistochemical evaluation. For CI-1 studies, the left hemisphere was frozen in isopentane (-30°C) and stored at -80°C for histological evaluation. Striatum and cortex samples were dissected and processed for biochemical analyses from the right hemisphere. Tissue dissection was carried out on an ice-cooled platform. The lateral striatum and the surrounding cerebral cortex were dissected out from coronal slices (2-mm-thick) (Dautry et al., 2000). Tissue samples (10–20 mg) were homogenized using a 1 ml glass Teflon potter (900 rpm, 20 strokes) in $300 \mu\text{l}$ of ice-cooled buffer containing 25 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 0.1% Triton X-100, 5 mM MgCl_2 , 1.3 mM EDTA, 1 mM EGTA, and proteases inhibitor cocktail (Roche, Meylan, France) (Namura et al., 1998). Homogenates were centrifuged at $15,000 \times g$ for 30 min. The supernatant (soluble fraction) and the pellet (membrane fraction) were stored at -80°C until analysis.

Western blot analysis. Protein concentrations were determined using the BCA method (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. Proteins in striatal and cortical fractions were separated by SDS-PAGE as previously described (Hermel et al., 1999). After blot transfer, nitrocellulose membranes were incubated overnight at 4°C with one of the antibodies raised against fodrin (1:2000, antibody against non-erythroid α -spectrin; Chemicon, Temecula, CA), huntingtin [1:1000; 4C8 clone, antibody (Ab) 2166; Euromedex, Souffelweyersheim, France], caspase-9 (1:1000; Bur 81 and Bur 73, Krajewski et al., 1999), caspase-8 (1:1000; Bur 1890, Stoka et al., 2001), caspase-3 (1:1000; Ab 1797; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) and μ -calpain (1:1000; domain III, clone 9A4H8D3, Biomol). The blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (1:1000, Sigma), and peroxidase activity was detected using ECL reagent (Pierce).

Immunohistochemistry and histological studies. Caspase-9, -8, and -3 immunohistochemistry and Masson-trichrome staining was performed on paraffin sections as previously described (Krajewski et al., 1999; Stoka et al., 2001). The antibodies used for immunohistochemistry of caspases were similar to those used for Western blot. For neuroprotection studies, lesion severity was evaluated on frozen coronal sections ($40\text{-}\mu\text{m}$ -thick). Cells with DNA fragmentation were detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling (TUNEL) method using the “*In situ* cell death detection-fluorescein kit” (Roche) (Dautry et al., 2000; Ouary et al., 2000). For each animal, cells were counted over the entire surface of the striatum in one section at the same rostrocaudal level (AP 0.5 mm) with a $20\times$ objective (≈ 350 fields of view per section) using an automated motorized stage and acquisition system (Fluovision; IMSTAR, Paris, France). SDH and cytochrome oxidase (COX) histochemistry was performed and quantitatively analyzed as previously described (Greene and Greenamyre, 1995; Brouillet et al., 1998).

Oligonucleosome detection. Oligonucleosome contents in soluble fractions ($20 \mu\text{l}$) were determined using the “ELISA cell death detection kit” (Roche) according to the manufacturer instructions. The results were normalized by the protein concentrations in each sample and expressed as mean OD values \pm SEM.

Proteolytic activity assay using fluorogenic substrate for caspases and calpain. The fluorescent assay of the protease activity is based on the cleavage of 7-amino-4-methyl-coumarin (AMC) or 7-amino-4-trifluoro-methyl-coumarin (AFC) dyes from the C terminus of the peptide substrates. The calpain activity was determined using *N*-succinyl-Leu-Tyr-(*N*-succinyl-LY)-AMC, a substrate preferentially cleaved by μ /m-calpain (McDonald et al., 2001). Calpain activity (Ca^{2+} -dependent cleavage of *N*-succinyl-LY-AMC) present in brain sample supernatants ($\sim 10 \mu\text{l}$ containing $\sim 30 \mu\text{g}$ of protein) was determined as the difference between the calcium-dependent and the non-calcium-dependent fluorescence. The calcium-dependent fluorescence released was measured after 30 min incubation at 37°C in buffer A containing 63 mM imidazol-HCl, pH 7.3, 10 mM

β -mercaptoethanol, and 5 mM CaCl_2 and is attributable to the cleavage of 150 μM *N*-succinyl-LY-AMC. The non-calcium-dependent fluorescence was measured under the same conditions using buffer A without calcium and containing 1 mM EDTA and 10 mM EGTA. To measure the inhibiting effects on calpain activity of striatal samples from animals treated *in vivo* with CI-1 or its vehicle, 10 μl of supernatant was incubated in 90 μl of calpain assay buffer containing purified μ -calpain (0.2 U; Calbiochem). Caspase-3, -8, and -9 activities were tested on peptidic substrates (Biomol), using respectively *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (DEVD-AFC), *N*-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (IETD-AFC), and *N*-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AFC (LEHD-AFC). Soluble fractions (30 μg of protein) were incubated at 37°C for 45 min in a caspase buffer B (in mM: 20 HEPES, pH 7.4, 50 NaCl, 0.2 EDTA, and 4 DTT) with 40 μM of the appropriate substrate. The nonspecific activity was considered as the activity remaining in the presence of the fluorogenic substrate and 10 μM of the appropriate caspase inhibitor i.e., the C-terminal aldehyde form (CHO) of the substrate (DEVD-CHO, IETD-CHO, and LEHD-CHO for caspase-3, -8, and -9, respectively). Fluorescence (excitation/emission: 400/505 nm for AFC and 380/460 nm for AMC) was measured in 96 well plates using a "Fusion" fluorimeter (Packard Bioscience, Rungis, France). Enzyme activity was calculated using standard curves of AFC or AMC and expressed as mean activity (picomoles of AFC-AMC released per minute per milligram of protein) \pm SEM.

Calpain-induced cleavage of fodrin and huntingtin *in vitro*. The *in vitro* proteolysis of endogenous fodrin and huntingtin was studied after incubation (1 hr at 37°C) of control samples (20 μg of protein) with purified μ -calpain (0.2 U; Calbiochem) or recombinant caspase-3 (50 ng; Biomol) in 100 μl of the assay buffer A or B, respectively. Digestion products were analyzed by SDS-PAGE (8–20% gradient gel) followed by Western blot analysis.

Statistical analysis. Results were expressed as means \pm SEM. Statistical analysis included Student's *t* test or one-way ANOVA followed by a *post hoc* Scheffé *F* test.

Results

Time course of striatal degeneration and primary mitochondrial impairment in acute and chronic 3-NP models

In the acute model, all 3-NP-treated rats showed symptoms of drowsiness, slowness of movement, and general uncoordination at 6 hr. Histological evaluation indicated that 43% (3/7) of these animals had striatal lesions. Uncoordination and bradykinesia were more pronounced at 12 hr. At this time point, 71% (5/7) of the animals showed tissue abnormalities, including shrinkage of medium neurons and edema in the striatum (data not shown). After 24–48 hr, symptomatic rats had developed severe and permanent dystonia of hindlimbs or recumbency. In these rats, the entire lateral striatum was lesioned with many cells displaying fragmented nuclei or condensed chromatin (Fig. 1*B,E*). Consistent with this, biochemical analysis showed evidence of nuclear damage in these animals with a significant 20-fold increase in free oligonucleosome levels (an index of DNA fragmentation) compared with control levels (Fig. 2). Thus in the acute model, the onset of striatal lesion was about 6 hr after 3-NP injection and the bulk of degeneration occurred within 24 hr of the 3-NP administration.

In the chronic model, motor symptoms were prominent on day 4 in all treated rats and worsened on day 5 as previously described (Ouary et al., 2000; Garcia et al., 2002; Mittoux et al., 2002). Histological evaluation of the 3-NP-treated animals ($n = 6$ per time point) at day 3, day 3 plus 6 hr, day 3 plus 12 hr, and day 3 plus 18 hr did not show any striatal abnormalities. At day 4, 37.5% (6/16) of the animals showed small lesions in the dorsolateral aspect of the striatum. This was associated with a sevenfold increase in free oligonucleosome levels compared with controls (Fig. 2). At day 4 plus 6 hr, day 4 plus 12 hr, day 4 plus 18 hr, and day 5, all rats ($n = 6$ per group) showed striatal lesions. At day 5,

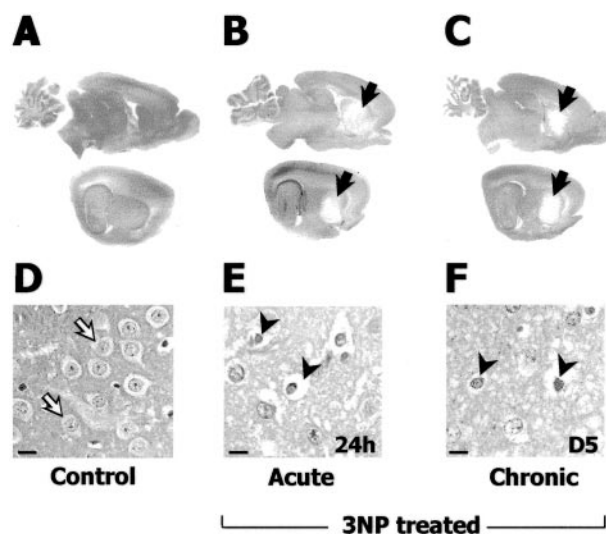


Figure 1. 3-NP-induced preferential degeneration and cell death in the striatum. Sagittal brain sections (Masson-trichrome staining) in control (*A, D*), acute (*B, E*), and chronic (*C, F*) 3-NP models. *A–C*, Sections of the entire brain at low magnification at two different lateral levels showing the striatal lesion as a pale staining (*B, C*, arrows). *D–F*, High magnification of the striatum. Representative normal nuclear staining and the perikarya (devoid of staining, open arrow) of striatal cells (mainly projection neurons) in a control animal is shown in *D*. Abnormal chromatin condensation and cytoplasm reduction (arrowhead) in neurons is observed in the dorsolateral striatum at 24 hr after acute 3-NP injections (*E*) and on day 5 in the chronic model (*F*). Scale bars, 10 μm .

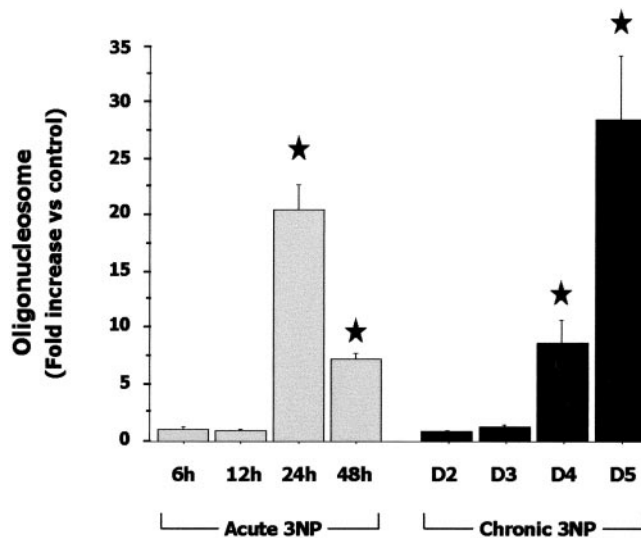


Figure 2. Evolution of nuclear DNA fragmentation in the striatum in the acute (open bars) and chronic (black bars) 3-NP models. What is shown is relative changes of free oligonucleosomes (i.e., an index of DNA fragmentation due to ongoing cell death) measured in the soluble fraction of striatal homogenates. Each bar corresponds to the mean value \pm SEM determined in 6–10 animals. $\star p < 0.0001$ compared with control, ANOVA, and *post hoc* Scheffé *F* test.

the entire lateral part of the striatum was lesioned (Fig. 1*C,F*), and free oligonucleosome levels were increased 28-fold (Fig. 2). This shows that the onset of lesion was a few hours before day 4, and aggravation of striatal cell death occurred within the next 24–30 hr. Thus, progression of obvious striatal cell death was relatively similar in both models.

The primary effect of 3-NP is the irreversible inhibition of the catalytic site of SDH, the main component of mitochondrial complex II (Brouillet et al., 1999). One important characteristic

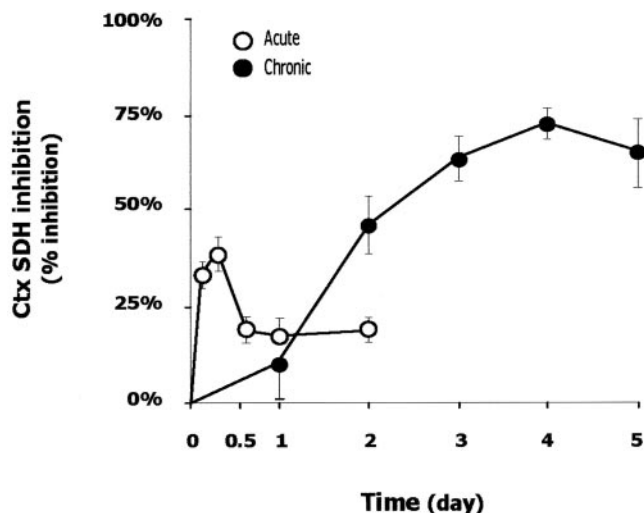


Figure 3. 3-NP-induced inhibition of cortical SDH activity in the acute and chronic models. In the chronic model, SDH inhibition reaches ~65% on day 3 and remains constant thereafter. Note that in the acute model, SDH inhibition peaks at 6 hr after injection of the neurotoxin and remains at low level thereafter. Each point corresponds to the mean value ± SEM in six or seven animals. SDH inhibition was significant ($p < 0.01$ compared with control, ANOVA, and *post hoc* Scheffé *F* test) at all time points considered.

of the 3-NP lesion model of HD is that although 3-NP inhibits striatal and extrastriatal (i.e., cerebral cortex) SDH activity to similar extent, the toxin produces a striatal degeneration with sparing of the cerebral cortex. Thus, region-selective neurodegeneration is not associated with a given levels of SDH inhibition in the brain (Brouillet et al., 1998; Garcia et al., 2002). Therefore, the loss of SDH activity in the cortex reflects solely 3-NP-induced inhibition of SDH, whereas in the striatum it reflects 3-NP blockade plus the loss of SDH containing neurons (Brouillet et al., 1998; Garcia et al., 2002). To estimate the levels of SDH inhibition in the striatum caused solely by 3-NP-induced blockade of the enzyme, we measured SDH activity in the cortex.

In the acute model, cortical SDH activity was inhibited by 40% after 3–6 hr (Fig. 3). This SDH inhibition decreased at 12 hr so that SDH activity was at 80% of control and remained at this level up to 48 hr after 3-NP injection. These data show that in an acute experimental paradigm, 3-NP produces a “transient” peak effect on oxidative energy metabolism (Fig. 3).

In marked contrast, in the chronic model, SDH activity was progressively inhibited, decreasing by 60–70% on days 3–5 (Fig. 3). These data indicate that very different patterns of SDH inhibition can be achieved depending on the systemic administration of the mitochondrial toxin and that only the chronic model is associated with a sustained 60–70% inhibition of complex II reminiscent of that seen in HD.

Differential patterns of caspase activation are found in acute and chronic models of mitochondrial blockade

After acute administration of 3-NP, in the striatum, caspase-9-related LEHDase activity (Fig. 4A) showed a significant increase at 12 hr compared with controls, and Western blot analysis showed accumulation of the processed p34 subunit of caspase-9 (Fig. 4B). Consistent with this finding, immunohistochemistry of active caspase-9 showed labeled cells in the striatum (Fig. 4C). Caspase-8-related IETDase activity (Fig. 5A) was also significantly increased at 12 hr, and an increase in the processing of caspase-8 was observed by Western blot (Fig. 5B) and immuno-

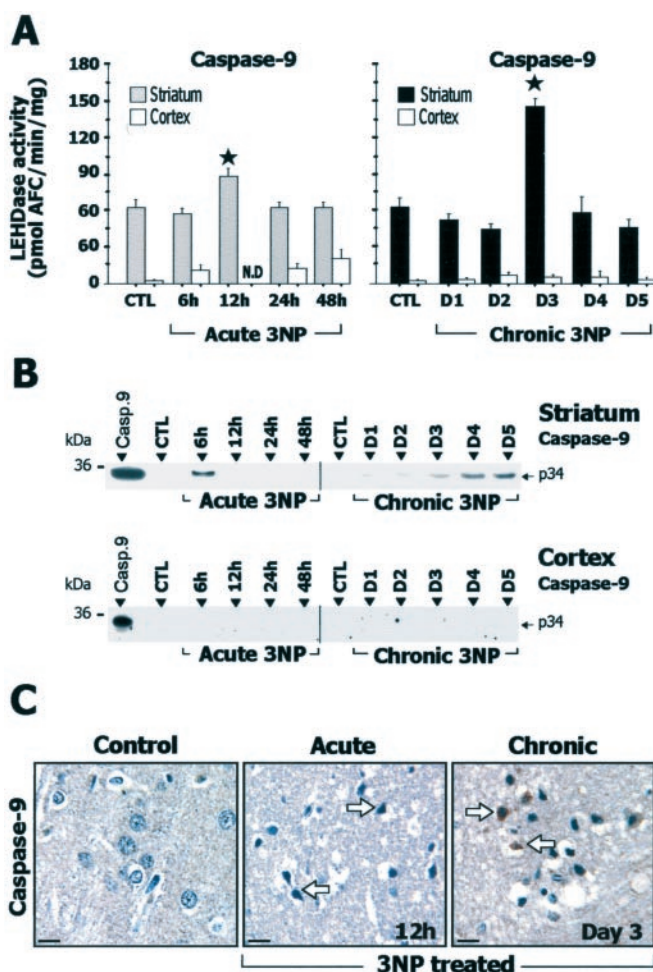


Figure 4. Study of caspase-9 in rats after acute or chronic 3-NP treatment. *A*, Caspase-9-related LEHDase proteolytic activity in cerebral cortex and striatum. *B*, Analysis of striatal and cortical samples by SDS-PAGE followed by Western blot for the active form of caspase-9. Recombinant caspase-9 (Casp.9) was loaded in the left lane as a positive control. Note that accumulation of the p34 subunit of the active form of caspase-9 is detected in the striatum in the acute and chronic 3-NP models. *C*, Immunohistochemistry of active caspase-9 showing low levels of immunoreactivity in the striatum of control rats, whereas a marked increased labeling (arrows) is detected in the acute model at 12 hr and in the chronic model at day 3. Data are means ± SEM determined in 5–10 animals. N.D., Not detectable. ★ $p < 0.001$ compared with control, ANOVA, and *post hoc* Scheffé *F* test.

histochemistry (Fig. 5C). In the same animals, significant increase in striatal caspase-3-related DEVDase proteolytic activity was detected at 24 hr (Fig. 6A). The presence of processed caspase-3 in the striatum was also demonstrated by Western blot analysis for the active form p17/19 (Fig. 6B). Accumulation of the processed form of caspase-3 in degenerating striatal cells was detected by immunohistochemistry at 12 and 24 hr (Fig. 6C). In summary, the acute model was associated with increased processing of both initiator and effector caspases.

During chronic 3-NP administration, a transient increase in caspase-9-related LEHDase proteolytic activity was detected within the striatum at day 3 (Fig. 4A). Western blot and immunohistochemical analysis of the active form of caspase-9 also showed an accumulation of the processed form of caspase-9 (Fig. 4B,C). Caspase-8-related IETDase activity was not increased in the chronic model (Fig. 5A). Consistent with this, Western blot analysis and immunohistochemistry showed no detectable accumulation of the active caspase-8 subunit p20 (Fig. 5B,D). Simi-

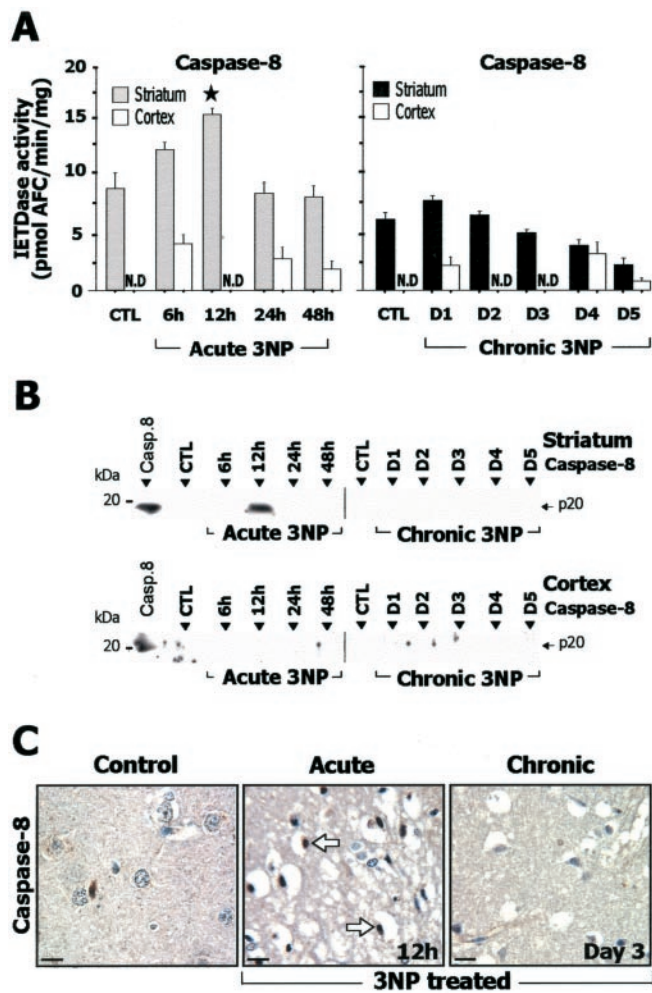


Figure 5. Study of caspase-8 in rats after acute or chronic 3-NP treatment. *A*, Caspase-8-related IETDase proteolytic activity in striatal and cortical homogenates. *B*, Analysis of brain samples by SDS-PAGE followed by Western blot for the active form of caspase-8. Recombinant caspase-8 (Casp.8) was loaded in the left lane as a positive control. Note that accumulation of the p20 subunit of the active form of caspase-8 is detected only in the striatum in the acute 3-NP model at 12 hr. Ten micrograms of proteins were loaded per lane. *C*, Immunohistochemical analysis of caspases-8 showing low levels of immunoreactivity in the striatum in control and chronic model, whereas increased striatal labeling is observed in the acute model (arrows). Data are means \pm SEM determined in 5–10 animals. N.D., Not detectable. $\star p < 0.02$ compared with control, ANOVA, and *post hoc* Scheffé *F* test.

larly, there was no significant increase in caspase-3-related DEVDase activity in the same animals (Fig. 6*A*) or evidence of increased caspase-3 processing as seen by Western blot analysis using an antibody selective for the p17/19 subunits of active caspase-3 (Fig. 6*C*). This absence of increase in DEVDase activity was observed in three independent experiments. To detect a possible transient activation of caspase-3 in the chronic model, a group of rats was analyzed every 6 hr from day 2 to day 5. Again, we found no change in DEVDase activity compared with control in this group. Immunohistochemical evaluation of active caspase-3 in these animals showed only a few scattered immunoreactive neurons in the striatum at day 4 (Fig. 6*C*).

Interestingly, in the cerebral cortex, which is not sensitive to 3-NP toxicity but in which SDH is similarly inhibited as in the striatum, the same acute and chronic 3-NP rats showed no significant change in DEVDase, LEHDase, and IETDase activity (Fig. 4–6*A*). Consistently, Western blot analysis showed no

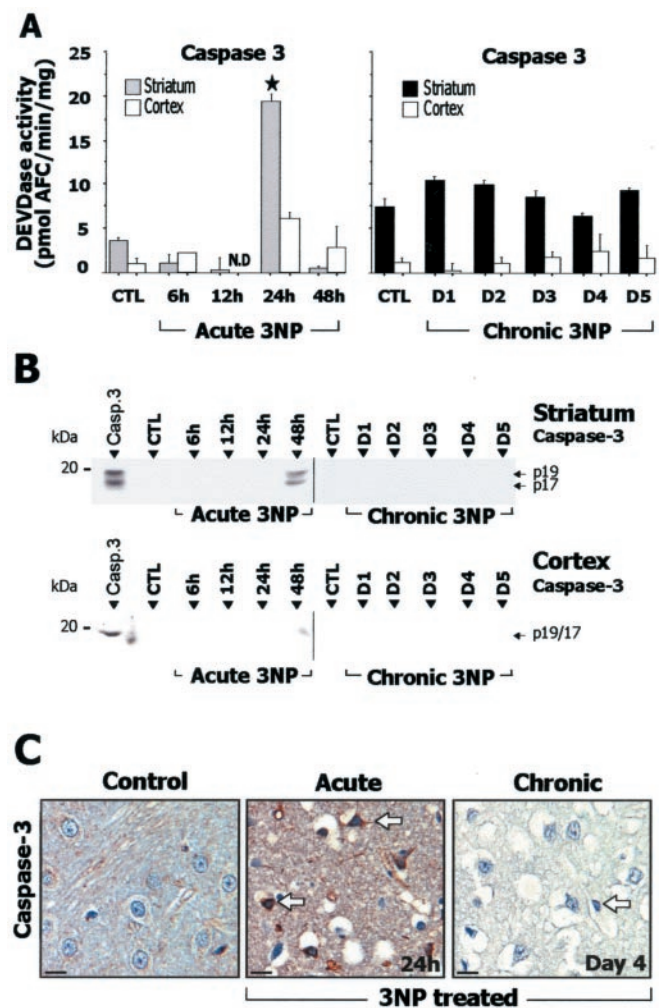


Figure 6. Study of caspase-3 in rats after acute or chronic 3-NP treatment. *A*, Caspase-3-related DEVDase proteolytic activity in striatal and cortical homogenates. *B*, Analysis by SDS-PAGE followed by Western blot for the active form of caspase-3. Recombinant caspase-3 (Casp.3) was loaded in the left lane as a positive control. Note that accumulation of the p20 subunit of the active form of caspase-3 (seen as a 17/19 kDa doublet) is detected only in the acute 3-NP model at 48 hr. Ten micrograms of protein were loaded per lane. *C*, Immunohistochemical analysis of activated caspases-3 showing low levels of immunoreactivity in the striatum in control and chronic model, whereas marked increased striatal labeling is detected in the acute model (arrows). N.D., Not detectable. Data are means \pm SEM determined in 5–10 animals. $\star p < 0.0001$ compared with control, ANOVA, and *post hoc* Scheffé *F* test.

bands corresponding to active caspase-9, -8, and -3 in the cerebral cortex of 3-NP-treated rats (Fig. 4–6*B*).

3-NP-induced mitochondrial complex II defect is associated with calpain activation

To further characterize the mechanism of cell death involved in striatal degeneration associated with complex II defect *in vivo*, we studied the pattern of cleavage of fodrin (non-erythroid α -spectrin) in the two models of mitochondrial defects. Fodrin is a known substrate of caspase-3 as well as of the calcium-activated neutral proteases, μ - and m-calpain (Wang, 2000). Importantly, caspase-3-mediated cleavage of fodrin leads to 150 and 120 kDa breakdown products, whereas calpain-mediated cleavage results in a doublet near 145/150 kDa (Wang, 2000). In the acute model, a specific calpain-dependent cleavage of fodrin leading to accumulation of the 145/150 kDa products was detected at 12 hr in the striatum (Fig. 7*A*). The intensity of the 145/150 kDa doublet

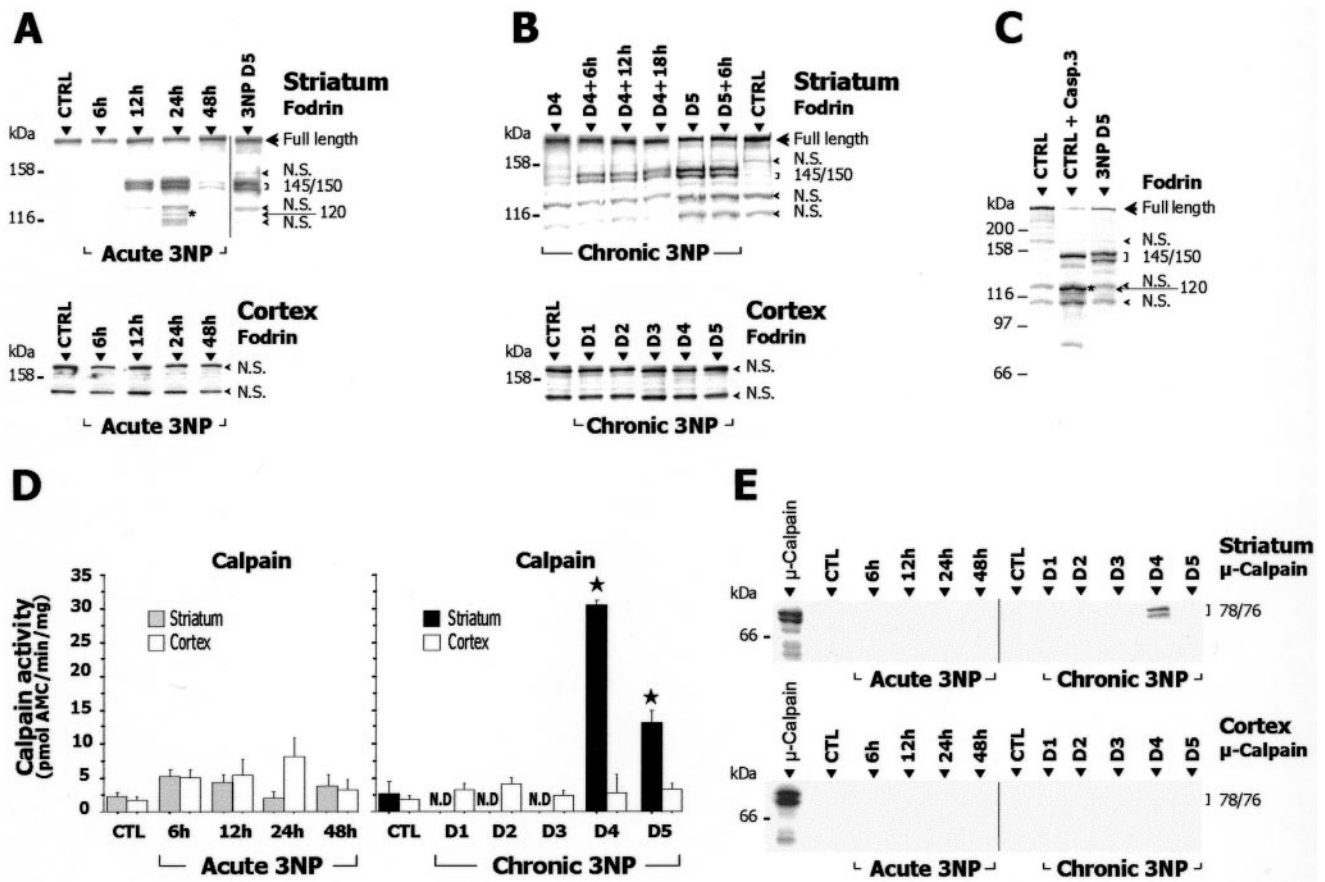


Figure 7. Calpain activation in acute and chronic 3-NP models. *A–C*, Homogenates prepared from striatum and cerebral cortex of 3-NP-treated and control (CTRL) rats were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blot for fodrin (known substrate of calpain and caspase-3) and assayed for calpain-dependent proteolytic activity using the fluorogenic substrate *N*-succinyl-LY-AMC (*D*). *E*, Western blot analysis of μ -calpain cleavage in cytosol fractions from striatum and cerebral cortex of 3-NP-treated animals. The typical calpain-dependent cleavage of fodrin appearing as a 145/150 kDa doublet is found in the striatum of both acute (*A*) and chronic (*B*) 3-NP models (each lane contains pooled samples from 5–8 animals). Note in *A* the presence between two nonspecific (N.S.) bands of a 120 kDa band (asterisk), possibly because of a caspase-3-mediated fodrin breakdown product. In *B*, chronic 3-NP animals were analyzed every 6 hr showing that the intensity of this doublet increases on day 4 and is maximal at day 5. Western blots for fodrin in cerebral cortex were slightly overexposed. *C* shows that the pattern found in the striatum of 3-NP-treated animals (day 5) is clearly different from the caspase-3-mediated cleavage of fodrin observed after *in vitro* digestion of control samples with recombinant caspase-3 (CTRL + R. Casp-3). Note the prominent increase in the proteolytic activity of calpain and the presence of cleaved/active form of μ -calpain in the striatum of chronic 3-NP rats, whereas no changes were found within the cerebral cortex of the same animals. Data are means \pm SEM determined in 5–10 animals. N.D., Not detectable. $\star p < 0.0005$ compared with control, ANOVA, and *post hoc* Scheffé *F* test.

further increased at 24 hr, then disappeared at 48 hr. There was also a low concentration of the 120 kDa breakdown product, possibly because of caspase-3-mediated cleavage (Fig. 7*A*).

Chronic 3-NP intoxication resulted in a specific calpain-dependent cleavage of fodrin in the striatum and not in the cerebral cortex (Fig. 7*B,C*). This was evident as a progressive and selective accumulation of the 145/150 kDa fodrin breakdown products on day 4. Accumulation was maximal at day 5 (Fig. 7*A,B*). No caspase-3-mediated 120 kDa breakdown product was observed at this time point (Fig. 7*C*).

To assess the proteolytic activity of calpain in striatum and cerebral cortex more directly, we measured the Ca^{2+} -dependent cleavage of *N*-succinyl-LY-AMC, a fluorogenic substrate cleaved by calpain, in both models. In the acute model, contrary to Western blot results above, we did not detect any increase in calpain activity at 6, 12, 24, and 48 hr (Fig. 7*D*). This apparent discrepancy might be explained by a short-lived activation of this enzyme between 6 and 12 hr, leading to the accumulation of calpain-mediated breakdown products of fodrin detected in the striatum at 12 and 24 hr. In the chronic model, calpain activity was prominently increased i.e., 7- to 10-fold, at days 4 and 5 (Fig. 7*D*) in the striatum, consistent with the accumulation of the fodrin 145/150 kDa doublet.

We analyzed the expression and potential cleavage of μ -calpain by Western blot. In the chronic model, we found an intense 76/78 kDa doublet corresponding to the cleaved/active form of μ -calpain at day 4 (Fig. 7*E*). Using the same Western blot conditions, this cleaved form of μ -calpain was not found in the striatum in the acute model (Fig. 7*E*), consistent with a probable short-lived activation of the protease in this model.

Taken together, these results indicate pathological activation of calpains (including μ -calpain) in the acute and chronic 3-NP models. Interestingly, this activation was specific to the striatum: no increased calpain proteolytic activity (Fig. 7*D*), no cleavage of μ -calpain (Fig. 7*E*), and no modification of fodrin cleavage (Fig. 7*A,B*) were detected in the cerebral cortex.

Because the chronic model was capable of reproducing several important features reported in HD patients such as progressive and sustained mitochondrial defects, detectable calpain activation and no major increase in caspase-3 activity, we used this model to further examine the effects produced by calpain inhibition *in vivo* and its relevance to HD pathogenesis.

CI-1 infusion inhibits calpain *in vivo*

If calpain activity is central to striatal degeneration produced by sustained mitochondrial defects, inhibiting calpain could have

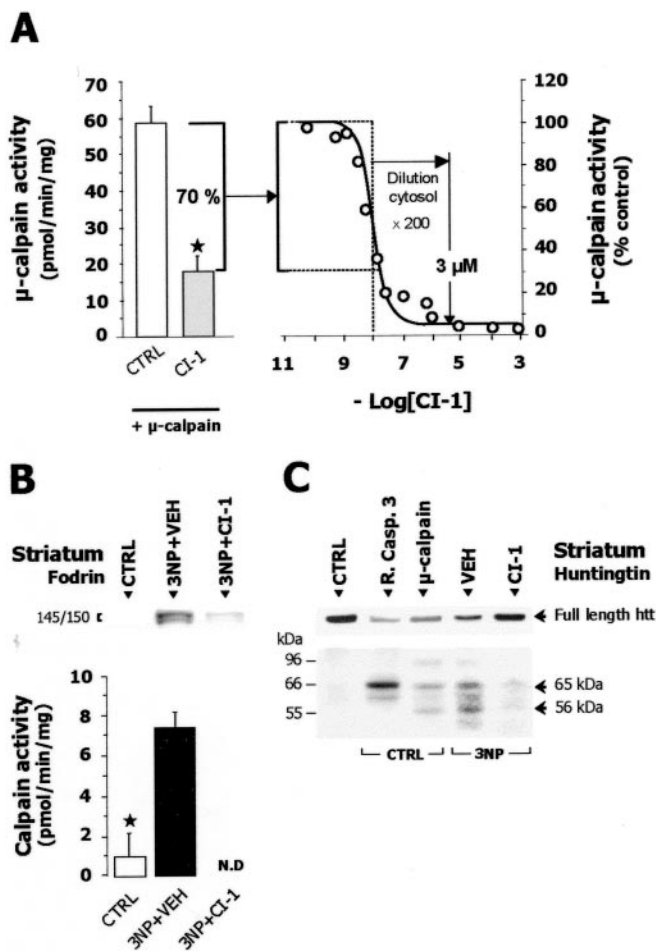


Figure 8. Calpain inhibitor I (CI-1) inhibits calpain *in vitro* and *in vivo*. *A*, *Ex vivo* estimation of the inhibiting effects of intracerebroventricular infusion of CI-1 (2.5 $\mu\text{g/hr}$ for 5 d) on calpain. Left panel, Striatal cytosol fractions from control (open bar) or 3-NP-treated rats infused with CI-1 (gray bar) were incubated with purified μ -calpain before measuring the enzyme activity *in vitro*. Right panel, Inhibition curve of purified μ -calpain by CI-1 *in vitro* ($\text{IC}_{50} = 9.28 \text{ nM}$). *B*, Top panel, SDS PAGE followed by Western blot for fodrin in striatal membrane fraction prepared from chronic 3-NP-treated and CTRL rats. Note that CI-1 compared with its vehicle (VEH) markedly inhibits *in vivo* the 3-NP-induced accumulation of the calpain-mediated 145/150 kDa breakdown products of fodrin. Bottom panel, Reduction of the activity of endogenous calpain by infusion of CI-1 in 3-NP-treated rats. *C*, SDS-PAGE followed by Western blot for huntingtin (Htt) of striatal samples from control (CTRL) or rats treated with 3-NP for 5 d (3-NP). Samples of CTRL rats were loaded after incubation with or without μ -calpain or with or without caspase-3 (R. Casp-3). 3-NP-treated rats received calpain inhibitor I (CI-1) or its vehicle only (VEH). The 3-NP treatment induces a reduction of full-length Htt concentrations and the appearance of Htt breakdown products (56 and 65 kDa, arrows) which are similar to those observed after *in vitro* cleavage of control striatum samples by μ -calpain. Note that *in vivo* treatment with CI-1 prevents the effects of 3-NP toxicity. N.D., Not detectable. $\star p < 0.002$, Student's *t* test.

neuroprotective effects. To test this hypothesis, we first examined whether intracerebroventricular infusion of the selective calpain inhibitor CI-1 would inhibit calpain *in vivo*. We first measured the inhibition of purified μ -calpain induced by striatal soluble fractions taken from rats infused by CI-1 (2.5 $\mu\text{g/hr}$ for 5 d) or vehicle. Control samples produced no significant inhibition of purified μ -calpain. In contrast, fractions from CI-1-treated animals significantly inhibited the activity of the purified enzyme by 70% (Fig. 8A).

By measuring the *in vitro* IC_{50} value of CI-1 for μ -calpain (9.28 nM) and taking into account the various dilution factors (~ 200 -fold) resulting from striatum dissection, homogenization and the *in vitro* μ -calpain assay, we estimated striatal concentra-

tions of CI-1 inhibiting calpain *in vivo* at $\sim 3 \mu\text{M}$ (Fig. 8A). We then examined whether this dose of CI-1 could effectively prevent the activation of calpain *in vivo* and the accumulation of calpain-dependent 145/150 kDa fodrin breakdown products. On day 5 of chronic 3-NP treatment, animals receiving CI-1 displayed a significant reduction in endogenous calpain activity and in calpain-dependent fodrin breakdown products compared with control rats receiving the vehicle alone (Fig. 8B).

Calpain inhibition prevents 3-NP-induced cleavage of huntingtin

Since Htt is cleaved by caspases and calpains into fragments of different molecular weights (Kim et al., 2001), we used Western blot analysis to determine whether calpain activation modified the pattern of Htt processing observed *in vivo* during chronic 3-NP administration. Using an antibody directed against the N-terminal part of the Htt protein, a major band of high molecular weight ($>300 \text{ kDa}$) corresponding to full-length Htt was detected in control striatal samples (Fig. 8C), whereas the intensity of this band was decreased at day 5 in the 3-NP-treated animals. Additionally, striatal samples from 3-NP-treated rats presented two main immunoreactive bands of 65 kDa and 56 kDa, corresponding to breakdown products of Htt. Similar bands were found when control striatal samples were digested with μ -calpain *in vitro* (Fig. 8C). Infusing calpain inhibitor CI-1 in the 3-NP-treated rats reduced both the decrease in full-length Htt and the accumulation of these two Htt breakdown products, indicating that abnormal cleavage of Htt was reduced by intracerebroventricular infusion of CI-1 *in vivo*.

Calpain inhibition prevents 3-NP-induced striatal cell death

Because CI-1 could block calpain activation and reduce abnormal processing of the wild-type Htt in the chronic model, we next examined whether CI-1 infusion could prevent 3-NP-induced striatal neurodegeneration. We evaluated the effects of CI-1 at day 5 of the chronic 3-NP treatment, at a time of severe striatal degeneration (Dautry et al., 2000; Ouary et al., 2000; Garcia et al., 2002; Mittoux et al., 2002). CI-1 markedly reduced the size of striatal lesions and resulted in cytochrome oxidase levels (a marker of neuronal integrity) near control values (Fig. 9A–C). The CI-1 effects were not caused by a direct interaction of CI-1 with 3-NP, because the SDH inhibition was similar in vehicle- or CI-1-treated rats (data not shown). In addition, we analyzed the effect of CI-1 on DNA fragmentation, a late stage marker of 3-NP-induced neurodegeneration. We showed that CI-1 prevented DNA fragmentation in striatal cells as detected by the levels of free oligonucleosomes and the number of TUNEL-positive cells in the striatum (Fig. 9D–F).

Discussion

We used two different animal models of mitochondrial blockade associated either with transient or sustained complex II inhibition, and we found that whereas activation of calpain was observed in both conditions, this was not the case for another death effector protease, caspase-3. In addition, calpain activity was specifically increased in the striatum, a region known to be specifically sensitive to both 3-NP-induced degeneration and HD pathology but not in the cerebral cortex. Finally, calpain inhibition spared striatal cells from neurodegeneration. Together, these data indicate that calpain activation is essential in 3-NP-induced striatal cell death. Because a sustained and partial mitochondrial complex II defect has been reported so far in HD (Brouillet et al.,

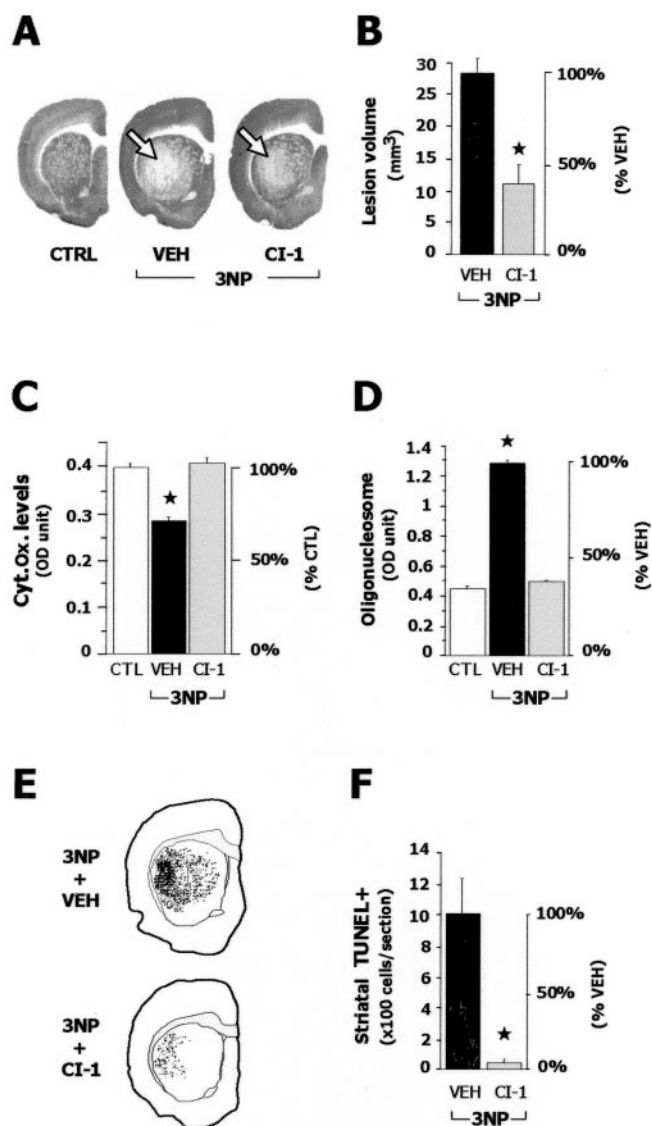


Figure 9. Calpain inhibition protects the striatum against chronic 3-NP toxicity. Control rats (CTRL) and rats treated for 5 d with 3-NP received continuous infusion of CI-1 or its vehicle (VEH). *A*, Representative coronal brain sections stained for cytochrome oxidase histochemistry: 3-NP-treated rats that received vehicle showed severe striatal neurodegeneration (open arrow), which is reduced by CI-1 treatment. *B*, Quantification of the 3-NP-induced striatal lesion volume. *C*, Quantification of cytochrome oxidase activity. *D*, ELISA quantification of oligonucleosomes (DNA fragmentation) in the cytosol prepared from the striatum of CTRL and 3-NP-treated rats with or without CI-1 treatment. *E*, Localization of striatal neurons with DNA fragmentation (TUNEL-positive cells) on coronal sections from 3-NP-treated rats. Section from the CI-1-treated animal with the highest TUNEL-positive cell density is shown. *F*, Quantification of striatal TUNEL-positive neurons in 3-NP-treated animals. Data are means \pm SEM measured in six or seven animals. $\star p < 0.005$, two groups comparison using unpaired Student's *t* test (*B*, *F*) or $p < 0.002$ compared with CTRL using ANOVA and *post hoc* Scheffe *F* test (*C*, *D*).

1999), these data also strongly support a direct implication of calpain in HD pathogenesis.

Using a number of biochemical and immunocytochemical evidence, we have shown that caspase-9, -8, and -3 are all activated in the model of transient mitochondrial inhibition. In this situation, the activation of caspase-3 may result from the cleavage of its zymogen form by upstream caspase-9 and/or caspase-8, and this is consistent with our observations that upstream caspase-8 and -9 activation precedes caspase-3 activation in the striatum after acute 3-NP treatment. Although activation of caspase path-

ways is well known to occur in cell culture models of energy compromise (Du et al., 1997; Leist et al., 1998; Hartmann et al., 2000; Ohgoh et al., 2000; Newcomb-Fernandez et al., 2001), our data suggest that acute 3-NP toxicity *in vivo* may involve molecular actors of apoptosis as well. In agreement with our present findings, activation of caspase-3 has been observed *in vivo* under experimental conditions associated with transient mitochondrial perturbation such as focal ischemia (Namura et al., 1998; Benchoua et al., 2001), intrastriatal injection of the 3-NP analog malonate (Schulz et al., 1998), or subacute repeated injections of 3-NP (Duan et al., 2000; Kim et al., 2000).

In clear contrast with the findings in the acute model, we found no activation of caspase-8 during chronic 3-NP treatment. Despite an activation of caspase-9, no caspase-3 activation was detected. The reasons for this are unclear. One hypothesis is that the spreading out of apoptotic events in the chronic model evolving over 5 d would not have allowed us to detect caspase-8 and -3 activation. Although we cannot completely rule out this possibility, the spreading out of apoptotic events would similarly impede detecting caspase-9 activation in the chronically treated rats. A more likely explanation is that specific molecular events may preclude caspase-3 activation and/or the accumulation of active forms of caspase-3 in the chronic model. One possibility is that caspase-9 activation leads to caspase-3 processing but that the rate of degradation of the active forms of caspase-3 is accelerated in this model, preventing the accumulation of functional forms of the death effector protease. In favor of this hypothesis, preliminary data obtained *in vitro* and *in vivo* using the chronic 3-NP model show that processed caspase-3 can be degraded by calpain (N. Bizat, J.-M. Hermel, P. Hantraye, S. Krajewski, and E. Brouillet, unpublished observations). Additional studies will be needed to understand the absence of processed forms of caspase-3 in the chronic 3-NP model.

Regardless of the precise mechanisms of caspase-3 regulation, our data demonstrate that one mitochondrial toxin may activate different cell death mechanisms, depending on the pattern of acute and chronic mitochondrial perturbation. Our data also suggest that increased caspase-3 processing may not be strictly required for 3-NP to produce striatal degeneration. This absence of "pathological" caspase-3 processing in the chronic model is reminiscent of the absence of abnormal caspase-3 processing observed in HD patients and in transgenic mice models overexpressing the full-length Htt protein. In line with this, whereas neurotoxicity of quinolinate in wild-type rodents *in vivo* seems to require caspase-3 processing (Qin et al., 2000), quinolinate toxicity in transgenic YAC72 mice overexpressing a full-length mutated Htt is not associated with an increased caspase-3-mediated cleavage of Htt (Zeron et al., 2002). However, the toxicity of the mutated Htt requires the presence of caspases (Saudou et al., 1998; Sanchez et al., 1999), probably for cleavage of full-length Htt into shorter and more toxic fragments (Wellington et al., 2002). In a number of physiological forms of cell death, increased processing of effector caspases, especially caspase-3 is observed (Nicholson and Thornberry, 1997). For Htt toxicity in HD, the role of caspase pathways may not necessarily be associated with increased caspase processing. The results from the chronic 3-NP model suggest that the striatal cell death resulting from mitochondrial defects in HD patients may not require abnormal caspase activation and that other death effector proteases are implicated in the disease process.

A novel finding of the present work is that the cysteine protease calpain is the essential cell death effector in 3-NP-induced HD-like pathogenesis. In the mammalian brain, calpains (μ -

calpain and m-calpain) are present as heterodimers (catalytic 80 kDa subunit and regulatory 30 kDa subunit) in the cytosol and are activated by increases in Ca^{2+} concentrations (Chan and Mattson, 1999; Wang, 2000). In the present study, calpain activity was increased by 3-NP in conditions of both transient and sustained inhibition of the respiratory chain. Results from Western blot analysis suggest that in the chronic 3-NP model this activation involves μ -calpain. It has been shown that once activated by micromolar concentrations of Ca^{2+} , μ -calpain can itself activate m-calpain through a “heterolytic” processing (Tompa et al., 1996). Thus, it is likely that m-calpain is also activated by 3-NP, although additional studies are required to precisely examine this point. Additionally, we demonstrated a calpain-dependent decrease in full-length Htt, coincident with the appearance of Htt breakdown products in the striatum of 3-NP-treated rats. Finally, the present data show that calpain activation *in vivo* likely plays a central role in 3-NP toxicity because pharmacological inhibition of the protease produces significant neuroprotective effects against neurotoxin effects.

The mechanisms underlying the “pathological” activation of calpain in 3-NP-treated animals remain speculative but probably involve alterations in Ca^{2+} homeostasis. Although we show that 3-NP produces a partial blockade of SDH/complex II in our models, further studies will be necessary to characterize *in vivo* the early consequences of this blockade on mitochondrial membrane potential, radical oxygen species production, Ca^{2+} uptake capacity, oxidative phosphorylation, and general cellular energy charge. However, it is likely that ATP concentrations are not profoundly modified in the 3-NP models at time points preceding overt tissue damage because (1) we observed caspase-9 activation, which is an ATP-dependent process, and (2) we previously showed increased phosphorylation of the c-jun N-terminal kinase in the chronic model (Garcia et al., 2002). One interesting hypothesis is that the 3-NP-induced partial blockade of SDH may reduce the capacity of mitochondria to regulate cytosolic Ca^{2+} concentrations. Interestingly, Ca^{2+} entering through NMDA receptors is tightly regulated by mitochondrial reuptake system in neurons (Peng and Greenamyre, 1998). Thus, it is possible that once SDH is partially inhibited by 3-NP, the pool of cytosolic Ca^{2+} associated with physiological NMDA receptor activation may be inefficiently regulated by mitochondria leading to a rise in cytosolic Ca^{2+} concentrations. As shown previously in brain slices and neurons in culture, at concentrations that do not increase cytosolic Ca^{2+} *per se*, 3-NP markedly potentiates the rise in Ca^{2+} produced by NMDA receptor stimulation in striatal medium-size spiny neurons (Greene et al., 1998; Calabresi et al., 2001). Several studies in cell culture or in rats also support an important role of NMDA receptors in 3-NP toxicity (Beal et al., 1993; Simpson and Isacson, 1993; Wüllner et al., 1994; Zeevalk et al., 1995). However, it cannot be ruled out that 3-NP produces at least in part, Ca^{2+} changes independently of NMDA receptors. Other pools of Ca^{2+} may be also affected such as the pool of the endoplasmic reticulum. An excess of intracellular Ca^{2+} could activate calpain, leading to cleavage of specific substrates important for cell survival, and eventually cell death.

The presence of activated calpain in the striatum of rats with chronic mitochondrial deficits is highly reminiscent of the modifications observed recently in HD patients (Gafni and Ellerby, 2002). HD patients have an increase in the activated calpain, as revealed by the presence of cleaved 30 kDa regulatory subunit on Western blot and upregulation of μ - and m-calpain in the caudate nucleus as seen by immunohistochemistry. In addition, the

calpain-dependent cleavage of Htt is increased in the caudate of HD patients (Kim et al., 2001; Gafni and Ellerby, 2002). Our results showing that 3-NP can indirectly activate calpain *in vivo* are, to our knowledge, the first demonstration that calpain abnormalities in HD could directly result from the chronic mitochondrial defects that have been consistently observed in HD patients (Jenkins et al., 1993, 1998; Gu et al., 1996; Browne et al., 1997; Sawa et al., 1999; Tabrizi et al., 1999; Panov et al., 2002). The present results also demonstrate that calpain activation is region-selective, which could explain the preferential vulnerability of the striatum for 3-NP-induced chronic mitochondrial inhibition. Whereas systemic 3-NP administration produces an ubiquitous inhibition of SDH activity in the brain (Brouillet et al., 1998; Garcia et al., 2002), calpain activation was only observed in the striatum and not in other brain regions, less vulnerable to the neurotoxin such as the cerebral cortex. One possibility for explaining a region-specific activation of calpain is that for a similar level of 3-NP-induced SDH inhibition, changes in intracellular Ca^{2+} concentrations are higher within striatal projection neurons compared with less vulnerable cells, such as cortical neurons. Alternatively, 3-NP may increase Ca^{2+} in many brain regions, whereas calpain in striatal neurons may be particularly susceptible to activation by Ca^{2+} . Possible contributing factors to such a susceptibility might include regional differences in substrates and inhibitors and/or regulation of expression of the protease. Whether such a striatal-selective activation of calpain also occurs in HD awaits further study.

The results of the chronic 3-NP model also suggest the existence of a vicious circle in which mitochondrial defects in HD could amplify the toxic effects of mutated Htt. Mitochondrial defects resulting from Htt mutation may lead to anomalies in Ca^{2+} homeostasis (possibly at the level of pools of Ca^{2+} associated with NMDA receptors) and “uncontrolled” calpain activation. This would in turn increase cleavage of full length Htt. Given that wild-type Htt is neuroprotective against mutated Htt (Cattaneo et al., 2001), this would render striatal cells more vulnerable to mutated Htt. In addition, the increased calpain-mediated cleavage of mutated Htt may generate shorter N terminus fragments containing the toxic polyglutamine stretch. Because it has been shown that for a given polyglutamine length (higher than 37), the shorter the fragment, the higher the toxicity (Hackam et al., 1998), the activation of calpain would amplify the toxic effects of mutated Htt. Finally, in addition to the amplification of Htt toxicity, high levels of activated calpain may directly lead to cell death through proteolysis of other calpain-sensitive neuronal proteins.

It is possible that the mitochondrial perturbation-induced calpain activation may be also involved in other neurodegenerative disorders such as Alzheimer’s disease (Chan and Mattson, 1999; Lee et al., 2000), which has been associated with secondary mitochondrial defects (Beal, 2000). In this context, it has been hypothesized that calpain blockade in neurodegenerative diseases may be of therapeutic interest (Di Rosa et al., 2002). Supporting this view, we demonstrate that calpain blockade produces a significant neuroprotection including drastic reduction of DNA fragmentation in the chronic 3-NP model of HD.

In conclusion, the present study points to calpain as one of the major actors of cell death process in HD and strongly supports the hypothesis that inhibiting calpain activity is a potential therapeutic strategy for the treatment of HD and possibly other neurodegenerative disorders.

References

- Albin RL, Greenamyre JT (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 42:733–738.
- Beal MF (1992) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illness? *Ann Neurol* 31:119–130.
- Beal MF (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 7:298–304.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins B, Ferrante R, Kowall N, Miller J, Storey E, Srivastava R, Rosen B, Hyman BT (1993) Neurochemical and histologic characterization of the striatal lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13:4181–4192.
- Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onteniente B (2001) Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* 21:7127–7134.
- Blum D, Gall D, Galas MC, d'Alcantara P, Bantubungi K, Schiffmann SN (2002) The adenosine A1 receptor agonist ADAC exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid of neurotoxicity. *J Neurosci* 22:9122–9133.
- Brouillet E, Guyot M-C, Mittoux V, Altairac S, Condé F, Palfi S, Hantraye P (1998) Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in Rat. *J Neurochem* 70:794–805.
- Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P (1999) Replicating Huntington's disease in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59:427–458.
- Browne SE, Bowling AC, Mac Garvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MK, Bird ED, Beal MF (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41:646–653.
- Calabresi P, Gubellini P, Picconi B, Centonze D, Pisani A, Bonsi P, Greengard P, Hipskind RA, Borrelli E, Bernardi G (2001) Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J Neurosci* 21:5110–5120.
- Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* 24:182–188.
- Cepeda C, Ariano MA, Calvert CR, Flores-Hernandez J, Chandler SH, Leavitt BR, Hayden MR, Levine MS (2001) NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J Neurosci Res* 66:525–539.
- Chan SL, Mattson MP (1999) Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* 58:167–190.
- Dautry C, Vauffrey F, Brouillet E, Bizat N, Condé F, Bloch G, Hantraye P (2000) Early N-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal dysfunction in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:789–799.
- DiFiglia M (1990) Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13:286–289.
- Di Rosa G, Odrijin T, Nixon RA, Arancio O (2002) Calpain inhibitors: a treatment for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 19:135–141.
- Du Y, Dodel RC, Bales KR, Jemmerson R, Hamilton-Byrd E, Paul SM (1997) Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 69:1382–1388.
- Duan W, Zhiong G, Mattson M (2000) Participation of Par-4 in the degeneration of striatal neurons induced by metabolic compromise with 3-nitropropionic acid. *Exp Neurol* 165:1–11.
- Gafni J, Ellerby LM (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci* 22:4842–4849.
- Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E, Caboche J (2002) Activation of the c-Jun-N-terminal kinase/c-Jun module occurs in striatal neurons in response to 3-nitropropionic acid: a comparative *in vivo* and *in vitro* analysis. *J Neurosci* 22:2174–2184.
- Greene JG, Greenamyre JT (1995) Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* 64:430–436.
- Greene JG, Sheu S-S, Gross RA, Greenamyre JT (1998) 3-nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience* 84:503–510.
- Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agud F, Cooper JM, Shapira AH (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39:385–389.
- Hackam AS, Singaraja R, Wellington CL, Metzler M, McCutcheon K, Zhang T, Kalchman M, Hayden MR (1998) The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol* 141:1097–1105.
- Harper PS (1991) Huntington's disease (Harper PS, ed). London: Saunders.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Turmel H, Srinivasan A, Ruberg M, Evan GI, Agid Y, Hirsch EC (2000) Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2875–2880.
- Hermel J-M, Dirx R, Solimena M (1999) Post-translational modifications of ICA512 a receptor tyrosine phosphatase-like protein of secretory granules. *Eur J Neurosci* 11:2609–2620.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72:971–983.
- Jenkins BG, Koroshetz WJ, Beal MF, Rosen R (1993) Evidence for an energy metabolic defect in Huntington's Disease using localized proton spectroscopy. *Neurology* 43:2689–2693.
- Jenkins BG, Rosas HD, Chen YCI, Makabe T, Myers R, MacDonald M, Rosen BR, Beal MF, Koroshetz WJ (1998) 1H NMR spectroscopy studies of Huntington's Disease correlation with CAG repeat numbers. *Neurology* 50:1357–1365.
- Kim GW, Copin JC, Kawase M, Chen SF, Sato S, Gobbel GT, Chan PH (2000) Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:119–129.
- Kim YJ, Yi Y, Sapp E, Wang Y, Cuiffo B, Kegel KB, Qin ZH, Aronin N, DiFiglia M (2001) Caspase-3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains associate with membranes and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12784–12789.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5752–5757.
- Laforet GA, Sapp E, Chase K, McIntyre C, Boyce FM, Campbell M, Cadigan BA, Warzecki L, Tagle DA, Reddy PH, Cepeda C, Calvert CR, Jokel ES, Klapstein GJ, Ariano MA, Levine MS, DiFiglia M, Aronin N (2001) Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* 21:9112–9123.
- Lee M-S, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360–364.
- Leist M, Volbracht C, Fava E, Nicotera P (1998) 1-Methyl-4-phenylpyridinium induces autocrine excitotoxicity protease activation and neuronal apoptosis. *Mol Pharmacol* 54:789–801.
- McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, Cuzzocrea S, Adbelrahman M, Harwood S, Plevin R, Chatterje PK, Yaqoob MM, Thiernemann C (2001) Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEB* 15:171–186.
- Mittoux V, Ouary S, Monville C, Lisovoski F, Poyot T, Conde F, Escartier C, Robichon R, Brouillet E, Peschanski M, Hantraye P (2002) Corticostriatal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J Neurosci* 22:4478–4486.
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18:3659–3668.
- Newcomb-Fernandez JK, Zhao X, Pike BR, Wang KK, Kampfl A, Beer R, DeFord SM, Hayes RL (2001) Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose deprivation in primary septohippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1281–1294.
- Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299–306.
- Oghog M, Shimizu H, Ogura H, Nishizawa Y (2000) Astroglial trophic support and neuronal cell death: Influence of cellular energy level on type of cell death influenced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem* 75:925–933.

- Ouary S, Bizat N, Altérac S, Ménétrat H, Mittoux V, Condé F, Hantraye P, Brouillet E (2000) Major strain differences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionate in rats: implications for neuroprotection studies. *Neurosci* 97:521–530.
- Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5:731–736.
- Peng TI, Greenamyre JT (1998) Privileged access to mitochondria of calcium influx through *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 53:974–980.
- Petersen A, Mani K, Brundin P (1999) Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease. *Exp Neurol* 157:1–18.
- Qin Z, Wang Y, Chasesa TN (2000) A caspase-3-like protease is involved in NF-kappaB activation induced by stimulation of *N*-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 80:111–122.
- Sanchez I, Xu CJ, Joo P, Kakizaka A, Blenis J, Yuan J (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22:623–633.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg M (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55–66.
- Sawa A, Wiegand GW, Cooper J, Margolis R, Sharp AH, Lawler JF, Greenamyre JT, Snyder SH, Ross C (1999) Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat Med* 5:1194–1198.
- Schulz JB, Weller M, Matthews RT, Heneka MT, Groscurth P, Martinou JC, Lommatzsch J, Coelin RV, Wulner U, Loschmann PA, Beal MF, Dichgans J, Klockgether T (1998) Extended therapeutic window for caspase inhibition and synergy with MK-801 in the treatment of cerebral histotoxic hypoxia. *Cell Death Differ* 5:847–857.
- Simpson JR, Isacson O (1993) Mitochondrial impairment reduces the threshold for in vivo NMDA-mediated neuronal death in the striatum. *Exp Neurol* 121:57–64.
- Stoka V, Turk B, Schendel S, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby L, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Broemme D, Krajewski S, Reed JC, Yin X-M, Turk V, Salvesen G (2001) Lysosomal protease pathways to apoptosis: cleavage of BID, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276:3149–3157.
- Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman J-W, Cooper JM, Shapira AHV (1999) Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 45:25–32.
- Tomba P, Baki A, Schad E, Friedrich P (1996) The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain. *J Biol Chem* 271:33161–33164.
- Wang K (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23:20–26.
- Wellington CL, Ellerby LM, Gutekunst CA, Rogers D, Warby S, Graham RK, Loubser O, van Raamsdonk J, Singaraja R, Yang YZ, Gafni J, Bredesen D, Hersch SM, Leavitt BR, Roy S, Nicholson DW, Hayden MR (2002) Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* 22:7862–7872.
- Wüllner U, Young A, Penney J, Beal MF (1994) 3-nitropropionic acid toxicity in the striatum. *J Neurochem* 63:1772–1781.
- Zeevalk GD, Derr-Yellin E, Nicklas WJ (1995) Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1124–1130.
- Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA (2002) Increased sensitivity to *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33:849–860.

Correction

In the article “Calpain Is a Major Cell Death Effector in Selective Striatal Degeneration Induced *In Vivo* by 3-Nitropropionate: Implications for Huntington’s Disease,” by Nicolas Bizat, Jean-Michel Hermel, Frédéric Boyer, Carine Jacquard, Christophe Créminon, Stéphane Ouary, Carole Escartin, Philippe Hantraye, Stan Krajewski, and Emmanuel Brouillet, which appeared on pages 5020–5030 of the June 15, 2003 issue, errors were uncovered in calculation spreadsheets used for determining absolute

values of the proteolytic activities of caspase-3, caspase-8, caspase-9, and calpain using fluorimetric assays. Correcting the errors does not change the significance or interpretation of the study. However, the magnitude of changes induced by 3-NP is less than that initially reported. Corrected absolute values found in the striatum of control rats and at time points at which 3-NP treatment produced significant changes in the striatum are shown in the table below.

Table. Corrected protease activity (in $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; mean \pm SD) in the striatum of control and 3-NP-treated rats

Protease	Acute 3-NP model		Chronic 3-NP model	
	Control	3-NP	Control	3-NP
Caspase-9	9.51 \pm 0.80	No increase at 6, 12, 24, and 48 hr ^a	11.19 \pm 1.53	19.54 \pm 0.57 day 3; $p < 0.0001$
Caspase-8	9.96 \pm 1.25	13.07 \pm 0.62 12 hr; $p < 0.02$	11.56 \pm 0.63	No increase from day 1 to day 5
Caspase-3	11.42 \pm 0.48	24.93 \pm 1.37 24 hr; $p < 0.0001$	10.31 \pm 1.57	No increase from day 1 to day 5
Calpain	22.87 \pm 4.04	No increase at 6, 12, 24, and 48 hr	18.47 \pm 2.22	41.14 \pm 4.82 day 5; $p < 0.0003$

Activities were determined as described in Materials and Methods. Comparisons between groups were done by ANOVA and *post hoc* Scheffe *F* test. In these studies, absolute values of protease activity found in control cerebral cortex are close to those found in the control striatum. No increase induced by 3-NP was detected in the cerebral cortex.

^a Note that after correction of calculation errors, caspase-9 activity is not found to be increased in the striatum in the acute 3-NP model at 12 hr. This is consistent with Western blotting and immunohistochemistry indicating that processing of caspase-9 in this model occurs early after acute injection of 3-NP (see original Fig. 4).

6.1.2. Résultats

Dans les deux modèles, la neurodégénérescence striatale est associée à des voies différentes de mort cellulaire, consécutives à un mode différent d'inhibition de la SDH.

Le modèle aigu de lésion striatale est caractérisé par une inhibition transitoire de la SDH, rapide et pratiquement maximale dès le début qui redescend par la suite. Le pourcentage d'animaux lésés est variable dans les 12 premières heures mais devient maximal à 24 heures avec une léthalité partielle entre 24 et 48 heures. La lésion striatale est totale et s'étend jusqu'au thalamus. La mort cellulaire atteint un pic à 24 heures et est précédée de l'activation de la caspase 9, de la caspase 8, suivie de la caspase 3. L'activation de la calpaïne est également observée très tôt (à 6 heures) dans ce modèle.

Le modèle chronique de lésion striatale est caractérisé par une inhibition progressive de la SDH se stabilisant dès le 3^{ème} jour, se maintenant jusqu'au sacrifice le 5^{ème} jour et s'accompagnant d'une évolution des symptômes moteurs parallèle au développement de la lésion. Le pourcentage d'animaux lésés est nul jusqu'au 3^{ème} jour puis augmente progressivement au cours du 4^{ème} jour pour atteindre 100% le 5^{ème} jour. La lésion striatale est préférentiellement latérale et la cinétique de mort cellulaire montre un pic le 5^{ème} jour. La mort cellulaire se fait en absence de l'activation de la caspase 8 et de la caspase 3, et est postérieure à l'activation de la caspase 9. L'activation des calpaïnes est observée le 4^{ème} jour, juste avant le pic de mort cellulaire. L'intervention des calpaïnes dans la neurodégénérescence striatale induite par l'inhibition chronique de la SDH par le 3-NP a été confirmée par l'effet neuroprotecteur de l'inhibiteur de calpaïnes, le CI-1.

6.1.3. Discussion

Le modèle aigu met en jeu une neurodégénérescence associée à la voie des caspases et à la voie des calpaïnes, caractérisée par une mortalité élevée et un décours variable ne permettant pas facilement le test de neuroprotecteurs. L'activation de la caspase 3 dans ce modèle est compatible avec l'observation de l'activation de la caspase 3 dans des modèles *in vivo* d'atteintes neurologiques aiguës comme l'ischémie cérébrale (Namura et al. 1998; Benchoua et al. 2001), le trauma cérébral (Yakovlev et al. 1997). Par ailleurs, l'activation de la caspase 3 est aussi observée dans des modèles de la maladie de Huntington dont la neurodégénérescence striatale est induite par l'administration intrastriatale du malonate (Schulz et al. 1998) ou celle du 3-NP, injecté en sous-cutané de façon répétée (Duan et al. 2000; Kim et al. 2000). L'activation de caspase 8 dans le modèle aigu de la maladie de Huntington est compatible avec l'observation de l'activation de la caspase 8 dans un modèle d'ischémie cérébrale (Benchoua et al. 2001) et chez les patients atteints de la maladie de Huntington (Sanchez et al. 1999).

Dans le modèle chronique, les calpaïnes sont impliquées dans la neurodégénérescence striatale car leur blocage diminue la neurodégénérescence. L'activation des calpaïnes n'est pas sans rappeler celle observée dans le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington. Dans la maladie de Huntington, l'expression de certaines isoformes des calpaïnes comme la μ -calpaïne, la m-calpaïne et la calpaïne 5 est augmentée (Gafni and Ellerby 2002; Gafni et al. 2004) et la petite sous unité de la calpaïne est protéolysée (Gafni and Ellerby 2002). Par ailleurs, les calpaïnes semblent impliquées dans un autre modèle de maladie neurodégénérative mimée par l'inhibition chronique d'un complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, l'inhibition des calpaïnes a un effet neuroprotecteur sur la neurodégénérescence nigrale induite par l'injection chronique de MPTP chez la souris (Crocker et al. 2003). Dans ce modèle, les caspases semblent peu actives. En effet, seule la caspase 9 est transitoirement activée, ce qui est compatible avec la sortie du cytochrome c observée dans une étude ultérieure (Bizat et al. 2003b). Le rôle de cette activation reste à démontrer. L'activation de la caspase 9 a aussi été observée dans un modèle 3-NP chronique

dans lequel l'effet neuroprotecteur d'un inhibiteur de caspases à large spectre, le QVD-OPH, permet de réduire son activation (Yang et al. 2004). De plus, l'activation de la caspase 9 dans le modèle aigu et le modèle chronique est compatible avec l'observation de la forme active de la caspase 9 dans le striatum des patients à un stade terminal de la maladie de Huntington (Kiechle et al. 2002).

L'absence d'activation de la caspase 3 dans le modèle chronique a pu être expliquée par un travail ultérieur. Nous avons démontré que la calpaïne pouvait protéolyser la forme active de la sous-unité p20 de la caspase 3, bloquant ainsi l'activité protéolytique de la caspase 3 détectable en spectrofluorimétrie (Bizat et al. 2003b). En parallèle, l'inhibition des calpaïnes par le CI-1 dans le modèle 3-NP chronique induit l'augmentation de la quantité de fragments de caspase 3 active, confirmant le rôle des calpaïnes dans la protéolyse de la forme active de la caspase 3 (Bizat et al. 2003b).

L'absence d'activation de la caspase 8 dans le modèle chronique n'a pas été confirmée par l'étude de Yang et collaborateurs utilisant aussi une inhibition chronique de la SDH chez le rat pour induire une neurodégénérescence striatale (Yang et al. 2004). Il est probable que les moyens techniques mis en œuvre dans notre étude aient été insuffisants pour mettre en évidence la caspase 8 car l'activation détectée en fluorimétrie peut être transitoire. En effet, dans l'étude de Yang, l'activation de la caspase 8 n'est détectée qu'à un temps précoce. En parallèle, deux autres outils ont été utilisés pour mettre en évidence l'activation de la caspase 8 dans cette étude. Un anticorps dirigé contre la forme active de la caspase 8 a permis de mettre en évidence une activation de la protéase entre j1 à j5. De plus, un autre anticorps spécifique de la protéolyse de Bid par la caspase 8 a permis de montrer l'activation de la caspase 8 de j3 à j5 (Yang et al. 2004).

Les autres points en rapport l'article suivant seront discutés dans la discussion générale.

6.1.4. Conclusion

En conclusion, cette étude a permis la mise en évidence d'activation de protéases différentes selon le type d'inhibition de la SDH induit par le 3-NP *in vivo*. Dans le modèle chronique, la voie calpaïne est directement impliquée dans la neurodégénérescence striatale induite par l'inhibition du complexe II.

6.2. Article 2:

Brain mitochondrial defects amplify intracellular $[Ca^{2+}]$ rise and neurodegeneration but not Ca^{2+} entry during NMDA receptor activation

Jacquard C., Trioulier Y., Cosker F., Escartin C., Bizat N., Hantraye P., Cancela J. M., Bonvento G. and Brouillet E. (2006)

Faseb J 20, 1021-1023.

6.2.1. Présentation de l'étude, hypothèses et objectifs

Cette étude a été initiée pour étudier *in vivo* l'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte et tenter d'en préciser les mécanismes dans le cas d'une neurodégénérescence striatale.

Dans les atteintes neurologiques aiguës comme l'ischémie, l'atteinte énergétique est combinée à une augmentation de la libération du glutamate (Bullock et al. 1998) créant un phénomène d'excitotoxicité à l'origine de la neurodégénérescence. Dans les maladies neurodégénératives chroniques, des dysfonctions au niveau de l'activité des complexes mitochondriaux ont été mises en évidence, en particulier la réduction de l'activité de la SDH dans la maladie de Huntington (Brennan et al. 1985; Gu et al. 1996; Browne et al. 1997; Tabrizi et al. 1999). Cependant, il n'y a pas d'augmentation de la libération du glutamate ni dans le striatum (Ellison et al. 1987), ni dans le LCR (Nicoli et al. 1993) chez les patients atteints de la maladie de Huntington. D'autres éléments sont néanmoins en faveur de l'implication d'un phénomène d'excitotoxicité dans cette maladie. En effet, la neurodégénérescence striatale touche spécifiquement les MSN, neurones connectés aux afférences corticostriatales de type glutamatergique et porteurs de récepteurs NMDA. L'administration d'agonistes des récepteurs NMDA, comme le quinolinate et le NMDA dans le striatum permet d'induire une neurodégénérescence proche de celle observée dans la maladie de Huntington (Beal et al. 1986). Il a donc été proposé que le phénomène de l'excitotoxicité dans les maladies neurodégénératives chroniques comme la maladie de Huntington serait indirect et ferait intervenir l'hypersensibilité des récepteurs NMDA au glutamate présent en concentration normale. L'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte indique que l'inhibition de complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale induirait une réduction du taux d'ATP intracellulaire qui ne serait plus suffisant pour maintenir le potentiel de la membrane plasmique par la Na^+/K^+ -ATPase, permettant la levée de l'inhibition des récepteurs NMDA par le Mg^{2+} (Albin and Greenamyre 1992; Beal 1992b; Greene and Greenamyre 1996). Ceci produirait l'entrée de Ca^{2+} et le déclenchement de la cascade excitotoxique.

L'excitotoxicité indirecte a été mise en évidence *in vitro*, par l'observation de la potentialisation de la toxicité induite par une excitotoxine dans des modèles de cultures de neurones de cervelet (Novelli et al. 1988) ou de rétine (Zeevalk and Nicklas 1990) lors de l'induction d'une hypoxie, d'une hypoglycémie. Lors de l'inhibition brutale de la SDH par le 3-NP à forte concentration, la mort neuronale induite par le NMDA est augmentée *in vitro* dans une culture primaire de neurones de cervelet (Weller and Paul 1993), de neurones striataux (Greene et al. 1998) et de tranches corticostriatales (Calabresi et al. 2001). Cependant, le mécanisme de mort cellulaire mis en jeu par une inhibition chronique de la

SDH à une dose infratoxique en présence d'une excitotoxine à une concentration subtoxique n'a jamais été évalué sur une culture striatale. Ce type d'inhibition de la SDH se rapproche plus de la réduction partielle de l'activité de la SDH observée dans le striatum des patients.

L'excitotoxicité indirecte a également été mise en évidence *in vivo*, par l'observation de la potentialisation de la toxicité induite par NMDA ou le glutamate dans des conditions d'inhibition aiguë de la SDH par le malonate (Greene and Greenamyre 1995a) ou le 3-NP (Simpson and Isacson 1993). Son existence est aussi corroborée par la neuroprotection obtenue par l'administration d'antagonistes des récepteurs NMDA ou la suppression chirurgicale des afférences corticales glutamatergiques, dans une situation de neurodégénérescence striatale induite par les inhibiteurs du complexe II comme le malonate et le 3-NP (Beal et al. 1993a; Beal et al. 1993b; Greene et al. 1993). Cependant le mécanisme de potentialisation dépendant des récepteurs NMDA n'a pas été défini et la potentialisation n'a pas été mise en évidence dans une situation d'inhibition chronique et stable du complexe II, vraisemblablement plus proche du phénomène observé dans la maladie de Huntington

Dans le but de confirmer l'existence de l'excitotoxicité indirecte dans un système *in vivo* se rapprochant de la maladie de Huntington, nous avons administré le 3-NP par voie systémique à une dose infratoxique pour induire une dysfonction de la SDH dans le striatum et nous avons injecté le quinolinate directement dans le striatum pour induire une lésion excitotoxique par l'activation des récepteurs NMDA.

Dans un premier temps, nous avons déterminé les doses de 3-NP et celle de quinolinate à utiliser pour déterminer les conditions permettant d'observer une potentialisation entre l'atteinte énergétique et l'excitotoxicité. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les lésions cellulaires, nous avons quantifié la mort cellulaire et nous avons étudié les mécanismes cellulaires de cette potentialisation. En particulier, nous avons déterminé si la potentialisation était proportionnelle au niveau d'inhibition de la SDH ou si elle suivait une loi du « tout ou rien ». Nous avons ensuite évalué les mécanismes de la potentialisation en étudiant notamment l'implication du calcium en analysant l'activation des calpaïnes. Nous avons recherché l'origine de l'augmentation du calcium intracellulaire *in vivo* par un index métabolique indirect de l'activation des récepteurs NMDA, puis *in vitro* dans une culture primaire de cellules striatales par mesure de l'entrée du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et par imagerie calcique en microscopie par fluorescence.

Brain mitochondrial defects amplify intracellular $[Ca^{2+}]$ rise and neurodegeneration but not Ca^{2+} entry during NMDA receptor activation

Carine Jacquard,* Yael Trioulier,* François Cosker,[†] Carole Escartin,*
Nicolas Bizat,* Philippe Hantraye,* José Manuel Cancela,[†] Gilles Bonvento,*
and Emmanuel Brouillet*¹

*Unité de Recherche Associée CEA-CNRS 2210, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Département de Recherches Médicales, Direction des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Énergie Atomique, Orsay, France; and [†]Laboratoire de Neurobiologie cellulaire et moléculaire, CNRS, UPR 9040, Gif-sur-Yvette, France

ABSTRACT According to the “indirect” excitotoxicity hypothesis, mitochondrial defects increase Ca^{2+} entry into neurons by rendering NMDA-R hypersensitive to glutamate. We tested this hypothesis by investigating in the rat striatum and cultured striatal cells how partial mitochondrial complex II inhibition produced by 3-nitropropionic acid (3NP) modifies the toxicity of the NMDA-R agonist quinolinate (QA). We showed that nontoxic 3NP treatment, leading to partial inhibition of complex II activity, greatly exacerbated striatal degeneration produced by slightly toxic QA treatment through an “all-or-nothing” process. The potentiation of QA-induced cell death by 3NP was associated with increased calpain activity and massive calpain-mediated cleavage of several postsynaptic proteins, suggesting major neuronal Ca^{2+} deregulation in the striatum. However, Ca^{2+} anomalies probably do not result from NMDA-R hypersensitivity. Indeed, brain imaging experiments using [¹⁸F]fluorodeoxyglucose indirectly showed that 3NP did not increase QA-induced ionic perturbations at the striatal glutamatergic synapses *in vivo*. Consistent with this, the exacerbation of QA toxicity by 3NP was not related to an increase in the QA-induced entry of ⁴⁵Ca²⁺ into striatal neurons. The present results demonstrate that the potentiation of NMDA-R-mediated excitotoxicity by mitochondrial defects involves primarily intracellular Ca^{2+} deregulation, in the absence of NMDA-R hypersensitivity.—Jacquard, C., Trioulier, Y., Cosker, F., Escartin, C., Bizat, N., Hantraye, P., Cancela*, J. M., Bonvento, G., Brouillet, E. Brain mitochondrial defects amplify intracellular $[Ca^{2+}]$ rise and neurodegeneration but not Ca^{2+} entry during NMDA receptor activation. *FASEB J.* 20, 000–000 (2006)

Key Words: 3-nitropropionic acid • calpain • striatum • Huntington's disease

THERE IS COMPELLING EVIDENCE that abnormal glutamate receptor activity (1) and defects in mitochondrial

function (2) are involved in acute neurological conditions, such as stroke, and in chronic neurodegenerative illnesses, such as Huntington's disease (HD). Mitochondrial defects and the overactivation of glutamate receptors, including the ionotropic NMDA subtype in particular, may act together to trigger neurodegeneration (3–5).

Excitotoxicity, mediated by the NMDA receptor (NMDA-R), rapidly damages mitochondria by leading to Ca^{2+} accumulation in the organelles (6,7), an increase in free radical production (8,9), the collapse of mitochondrial membrane potential, and a decrease in ATP production (10,11).

Acute impairment of oxidative energy metabolism can potentiate NMDA-R-mediated excitotoxicity (12–15). Potentiation is likely associated with major cytosolic Ca^{2+} deregulation. In support of this hypothesis, fluorescence imaging techniques showed that, in cultured neurons and brain slices, NMDA-R activation produces cytosolic Ca^{2+} rise that is exacerbated in neurons with respiratory chain defects (16,17).

Three important aspects of the mechanisms underlying the potentiation between NMDA-R activation and mitochondrial defects remain to be elucidated. First, evidence for an increase in cytosolic Ca^{2+} concentrations in the detrimental coupling of mitochondria and NMDAR has never been provided *in vivo*. Second, the mechanism leading to an increase in cytosolic Ca^{2+} rise in neurons with mitochondrial defects is unknown. However, the so-called “weak” or “indirect” excitotoxicity hypothesis is often suggested (3–5,18). According to this hypothesis, mitochondrial alterations may decrease ATP synthesis, impairing Na^+/K^+ -ATPase function, thereby decreasing plasma membrane potential and relieving the voltage-dependent Mg^{2+} blockade of NMDA-R, rendering the receptor hypersensitive to

¹Correspondence: URA CEA-CNRS 2210, Service Hospitalier Frédéric Joliot, DRM, DSV, CEA, 4 place du Général Leclerc, 91401 Orsay cedex, France. Email: brouillet@shfj.cea.fr

doi: 10.1096/fj.05-5085fje

glutamate (5). Hypersensitive NMDA-R could increase the entry of Ca^{2+} into neurons, leading to Ca^{2+} deregulation. However it is also possible that cytosolic Ca^{2+} deregulation results from an alteration of the intracellular sequestration and/or extrusion of Ca^{2+} . Third, the relationship linking the potentiation of NMDA-R-mediated excitotoxicity and partial chronic mitochondrial dysfunction has never been characterized. One possibility is that potentiation of excitotoxicity is proportionate to the magnitude of mitochondrial defects. Alternatively, mitochondrial anomalies may potentiate NMDA-R-mediated excitotoxicity through an “all-or-nothing” process.

The aim of the present study was to investigate the mechanisms underlying the potentiation of NMDA-R-mediated neurodegeneration by chronic mitochondrial dysfunction. We determined how the toxicity of the NMDA-R agonist quinolinate (QA) was amplified by chronic administration of 3-nitropropionic acid (3NP), a selective inhibitor of mitochondrial complex II. We investigated these mechanisms in the rat striatum *in vivo* and in cultured striatal neurons. QA and 3NP produce striatal lesions that are reminiscent of those seen in HD (19). QA injection reproduces the NMDA-R hypersensitization to glutamate observed in neurons overexpressing a mutated form of huntingtin (m-Htt), the protein implicated in HD (20–22). The systemic administration of 3NP replicates the mitochondrial alterations reported in HD patients and transgenic mouse models (23–26). We report that QA toxicity is exacerbated by 3NP only for a particular range of mitochondrial complex II inhibition, $>35\%$ and involves Ca^{2+} deregulation, leading to calpain activation, in the absence of NMDA-R hypersensitivity.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Twelve-week-old male Lewis rats (Charles River) weighing 320–350 g were used for these studies. All animals were

Figure 1. Experimental design of rat experiments investigating synergy between QA toxicity and 3NP-induced complex II defects. Toxicity of intrastriatal QA injection was assessed using various outcomes, in rats subjected to chronic treatment with the mitochondrial toxin 3NP and in sham-operated rats (see Materials and Methods). Osmotic pumps delivering 3NP were implanted 5 days (T0–5 days) before intrastriatal injection of QA or PBS (T0) as a control. Complex II/SDH activity (SDH act.) was determined at T0 and T0 + 24 h. FDG uptake was determined by injecting radiotracer 10 min after intrastriatal injection of QA and PBS and freezing brain 50 min later for autoradiography. The volume of striatal lesions was determined at T0 + 24 h by TTC staining. The “intensity” of degeneration was assessed using 2 indices of DNA fragmentation (ELISA and TUNEL methods). Calpain activity was also determined at T0 + 24 h. Long-term neuronal loss in striatal lesions was evaluated 15 days after intrastriatal injections. Number of striata (*n*) analyzed per group is indicated in brackets.

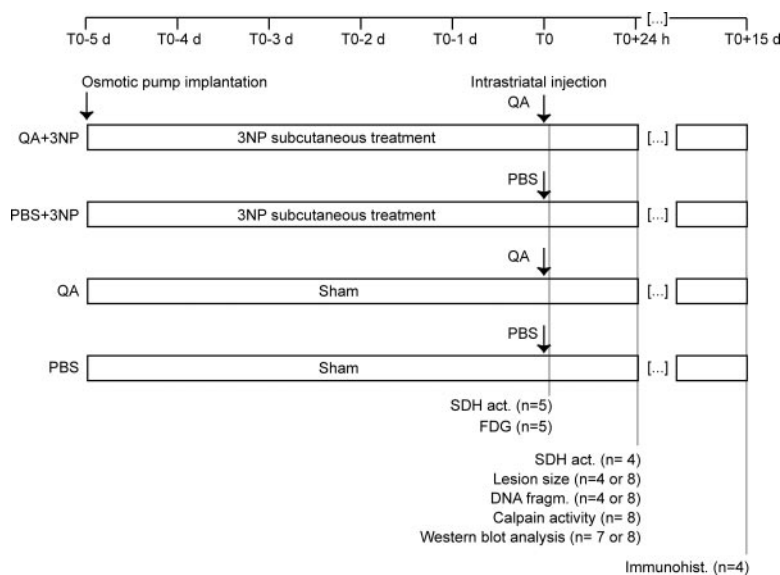
housed under standard conditions (12 h light cycle), with free access to food and water. For all surgical procedures, rats were anesthetized with a mixture of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (1.5 mg/kg). Protocols were performed in compliance with EEC directives (86/609/EEC) and the guidelines of the French National Committee (87/848) for Care and Use of Laboratory Animals.

Preparation of neurotoxins

3NP (Fluka, France) was dissolved in 5 ml deionized water, and the solution was brought to pH 7.4 with 10 N NaOH. The pH was stabilized with 2.5 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The final volume was adjusted to 50 ml. For preparation of the stock solution of QA (180 mM), 30 mg of the excitotoxin (Sigma) were dissolved in 0.9 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) with 0.9% NaCl (PBS) and 100 μl 1N NaOH. Solutions of lower QA concentrations were prepared by appropriate dilutions in PBS.

Experimental design of rat studies

We carried out time-course experiments to characterize the effect of QA in naive rats and rats chronically treated with 3NP (Fig. 1). Rats were subcutaneously implanted with osmotic minipumps delivering 3NP or were sham-operated (T0–5 days). Five days later (T0), we simultaneously administered QA to the right striatum and PBS to the left striatum by stereotactic injection. In [^{18}F]fluorodeoxyglucose (FDG) uptake studies, animals were killed 1 h after intrastriatal injection. In other experiments, rats were killed 24 h after intrastriatal injection (T0+1 day) for biochemical and histological analysis of “ongoing” cell degeneration. In this case, striatal degeneration was assessed using the vital dye triphenyltetrazolium chloride (TTC) for lesion volume determination, by biochemical and *in situ* detection of DNA fragmentation (“intensity” of degeneration), and using biochemical markers (fluorescence assay for calpain activity and calpain-dependent protein cleavage analysis by Western blotting). We evaluated the extent and intensity of the neurodegeneration induced by the different treatments in the long term in animals killed 2 wk (T0+15 days) after intrastriatal injection of QA or vehicle, by immunohistochemistry.



Chronic 3NP treatment

3NP was prepared as described previously and systemically administered via subcutaneous osmotic minipumps (10 μ l/h, 2ML1 model, Alzet, Palo Alto, CA) (27) delivering 10–45 mg/kg/day for 6 days, the dose depending on the group of animals considered. Sham-treated rats (no 3NP treatment) were similarly anesthetized and subjected to the same surgery for the implantation of empty osmotic pumps.

Intrastriatal administration of QA

On the fifth day after surgery for osmotic pump implantation, all animals (3NP-treated rats and sham-operated littermates) were anesthetized and placed in a stereotactic frame. Stereotactic intrastriatal injections of 1 μ l QA (4, 10, 15, 20, 40, 80, 120, or 180 nmol) or 1 μ l PBS were made simultaneously in the right and left striatum, respectively, using two blunt-tipped 25 gauge Hamilton syringes placed in parallel in a needle holder. Each injection was made over 1 min, and the needle was left in place 2 min before being slowly withdrawn. Stereotactic coordinates (+0.8 mm rostral from bregma; 3.5 mm lateral from midline, and 5 mm ventral from dura, with tooth bar set at –3.3 mm) were chosen according to the atlas of Paxinos and Watson (28).

FDG uptake experiments

Five days after the implantation of osmotic pumps, rats fasted for 24 h were anesthetized and the femoral vein was catheterized for intravenous administration of the radiotracer. The femoral artery was also catheterized for the removal of blood samples for PaO₂ and PaCO₂ determinations. The animals were then placed in the stereotactic frame. We injected QA (40 nmol) into the striatum as described above, followed by FDG (3NP-treated rats, $n=5$, 1.2 ± 0.4 mCi; sham-treated rats, $n=5$, 1.1 ± 0.2 mCi) 15 min later. Rats were maintained at 37°C, using a heating blanket. Glycemia was determined with a Onetouch glucose (Glc) meter (Lifescan Inc., Milpitas, CA). PaO₂ and PaCO₂ were determined with a blood gas analyzer (ABL5 Radiometer, Copenhagen, Denmark). Physiological parameters were monitored during this experiment and were found not to change significantly over a period beginning just before and continuing until 45 min after FDG injection. Similarly, no significant intergroup differences were noted. The parameters for rats ($n=5$) without 3NP treatment were (before/after FDG injection): glycemia $1.36 \pm 0.25/1.41 \pm 0.10$ g/l; PaO₂ $76 \pm 4/79 \pm 6$ mm Hg; PaCO₂ $44 \pm 5/44 \pm 6$ mm Hg. The parameters for 3NP-treated rats ($n=5$) were (before/after FDG injection): glycemia $1.36 \pm 0.12/1.48 \pm 0.12$ g/l; PaO₂ $74 \pm 13/89 \pm 9$ mm Hg; PaCO₂ $47 \pm 2/42 \pm 3$ mm Hg. Rats were killed 50 min after FDG administration. Brains were rapidly removed, frozen in isopentane at –40°C and cut into 20 μ m coronal sections with a cryostat. Sections were serially collected, at intervals of 100 μ m, on Superfrost plus slides (Fischer, Elancourt, France). Slides were then placed against BIOMAX MR films (Kodak) overnight at room temperature. Autoradiographs were digitized using a scanner (Amersham Pharmacia Biotech, New Castle, UK), and striatal optical densities (subtracted from background) were measured using an image analysis system (MCID, Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Canada). For all animals, we calculated the mean striatal optical density (OD) of 20 sections (4 mm rostrocaudal extension) centered on the site of injection of QA and PBS. In our experimental conditions, we checked that brain OD values increased linearly as a function of increasing section thickness (from 3 to 40 μ m) even in the cerebral cortex, which showed high rates of FDG

uptake. This made it possible to rule out saturation of the film by high levels of radioactivity in the 100% range. In addition, striatal OD increased linearly as a function of the radioactivity injected (mCi/kg). This made it possible to determine the increase in FDG uptake induced by QA injection semiquantitatively. The relative QA-induced increase in FDG uptake in the right striatum was determined by expressing FDG uptake in the right striatum as a percentage of that in the PBS-injected contralateral (left) striatum.

Anatomical and histological evaluation

For short-term evaluation of striatal lesions, the brain was dissected out, rapidly washed in cold PBS, placed in a brain matrix (Pelco Inc.), and 1 mm fresh slices were cut. Slices were stained with the vital red dye TTC and stored in 4% paraformaldehyde (PFA) (29). The volume of striatal lesions was assessed after image acquisition for all sections, using a high-resolution scanner (Amersham Pharmacia Biotech) and Total Lab image analysis software (3.1 version, Amersham). For each coronal brain section, the lesioned area was measured by manually delineating the external border of the lesion, seen as a pale staining on digitized images. From these areas, the volume of the striatal lesion was determined for all animals using the Cavalieri method (30).

For long-term immunohistochemical evaluation of striatal lesions, rats were anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with 4% PFA. The brain was removed, postfixed overnight, and cryoprotected in sucrose solutions (12, 16, and 18%) in PBS. Brain sections (40 μ m) were stained with gallocyanin or processed for immunohistochemistry using mouse monoclonal antineuronal nucleus antibody (Ab) (NeuN, MAB377, diluted 1:10000, Chemicon International Inc.) or a rabbit anti-DARPP32 (AB1656, 1:3000, Chemicon International Inc.). The primary Ab was detected with biotinylated-conjugated antimouse or anti-rabbit Ab (1:3000, Vector), followed by double amplification with avidin-biotin and tyramine-biotin. The final staining pattern was obtained by incubation for 2 min with VIP substrate (Vector). Before DARPP32 immunostaining, we performed NADPH-diaphorase histochemistry by incubating sections for 120 min at 37°C in a buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.4 g/l NADPH, 1 g/l nitroblue tetrazolium (Sigma), and 0.5% Triton-X100.

For *in situ* detection of DNA fragmentation, brains were processed as for immunohistochemistry and 10 μ m thick coronal sections were processed for the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated uridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) method, using the *in situ* cell death detection-fluorescein kit (Roche). For all animals, the apparent density of TUNEL-positive cells was estimated over the entire surface of the striatum in two to three sections close to rostrocaudal concentration, 0.8 mm anterior to the bregma. Sections were scanned with an $\times 20$ objective, using a Zeiss Axioplan2 imaging microscope motorized for X, Y, and Z displacements and an image acquisition and analysis system (Morphostar 5.12, IMSTAR, Paris, France) (27). Results are expressed as the number of TUNEL-positive cells per section.

Measurement of SDH activity

SDH activity was evaluated *in situ*, using a histochemical procedure (31) and a previously described quantification method (32) in frozen coronal brain sections. This procedure allows for quantitative determination of changes in the regional V_{\max} of SDH (32).

Brain processing for biochemical analysis

Brains were collected 24 h after QA injection, rapidly rinsed in cold PBS, and cut into 2 mm fresh slices using a steel brain matrix. The striatum was dissected out and homogenized, using a 1 ml glass Potter homogenizer (800 rpm, 20 strokes), in 300 μ l of buffer containing 25 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.3 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM benzamide, and 1 mM PMSF. An aliquot of the total homogenate was used for Western blotting (60 μ l). The remaining homogenate was centrifuged at 15,000 *g* for 30 min to obtain a supernatant enriched in cytosolic proteins for proteolytic activity assays and oligonucleosome detection. Aliquots of total homogenate and of the supernatant fraction were stored at -80°C until analysis. For all samples, protein concentrations were quantified with the microBCA kit (Pierce), according to the manufacturer's instructions.

Calpain activity measurement in brain extracts

Calpain activity was determined using the fluorogenic substrate *N*-succinyl-Leu-Tyr-AMC as described previously, but with minor modifications (27). The selectivity of the assay was increased (elimination of the Ca^{2+} -dependent release of AMC unrelated to calpain) by incubating half of the sample with Z-Leu-Leu-CHO (10 μM), a specific inhibitor of calpain. AMC release was quantified using a standard curve after 30 min of incubation at 37°C in a 96-well plate reader (Fusion plate reader, Perkin-Elmer), with excitation/emission wavelengths set at 380 nm/460 nm. Specific calpain activity was calculated as the difference between AMC released in presence of Ca^{2+} and that released in presence of Ca^{2+} and z-Leu-Leu-CHO. For each group of rats, specific activity was normalized according to protein content. Activity was expressed in picomoles of AMC released per minute per milligrams of protein.

Western blotting

Equal amounts of protein from striatal extract samples were pooled for each animal group (7 or 8 striata per group), and 30 μg of the pooled sample were loaded in triplicate on acrylamide gels and separated by SDS-PAGE (6, 8, or 10% acrylamide). The protein bands were blotted onto nitrocellulose or PVDF membranes, which were then incubated overnight at 4°C with an Ab against one of the following proteins: fodrin (1:1000, MAB 1622, non erythroid α -spectrin, Chemicon), huntingtin (1/1000, hu4C8, Euromedex), PSD-95 (1/250, P46520, Beckton Dickinson), NR-2B (1/500, NR-2B C-terminal, 1469, Santa Cruz), and actin (1/10000, A2066, Sigma). Membranes were incubated with horseradish-peroxidase-conjugated antimouse, anti-rabbit (1:2000, Amersham Biosciences), or anti-goat (1:2000, Vector Laboratories) Ab, and peroxidase activity was detected using enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Amersham Biosciences). The membranes were placed against X-ray films (Kodak), and the resulting autoradiographs were scanned, and OD values were measured with Total Lab software. For all experimental groups, the mean OD of all studied bands (full-length proteins and breakdown products) was measured from observations made in triplicate.

Oligonucleosome detection

The oligonucleosome content of the cytosolic supernatant fraction was determined spectrophotometrically, using the cell death detection ELISA plus kit (Roche Applied Science),

according to the manufacturer's instructions. The presence of oligonucleosomes was assessed by measuring OD, which was normalized according to the protein content of the sample.

Primary striatal culture

Primary striatal neurons were obtained from E14-E15 rat embryos. Timed-pregnant Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were killed with a lethal dose of pentobarbital, and embryos were quickly removed and dissected on cooled Hank's balanced sodium salts (without Ca^{2+} and Mg^{2+} , Sigma). Ganglionic eminences were isolated and incubated for 15 min at 37°C in 0.3 mg/ml DNase I (Sigma). Tissues were mechanically dissociated with a fire-polished Pasteur pipette, and debris was removed after decantation of the suspension. Cells were finally concentrated by centrifugation (20°C , 5 min, 1500 *g*) and resuspended in serum-free Neurobasal medium supplemented with 2% B27 supplement (Life Technologies), 1% antibiotic-antifungal mixture (Life Technologies), and 0.5 mM L-glutamine (Sigma). Cells were plated at a density of 400,000 cells/well in 24-well-Costar plates coated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 30–70 kDa poly-D-lysine (Sigma). The cultures were kept in a humid incubator (5% CO_2 , 37°C), and half the medium was changed once a week.

Calcium uptake measurement with $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Experiments were performed on cultures after 21 days *in vitro* (DIV). PBS or 3NP (75 μM) was added to the medium 5 h before $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake measurements. Ca^{2+} uptake assays were performed as described by Hartley et al. (33) but with minor modifications. Cells were rinsed with buffer A, which contained 25 mM HEPES (pH 7.4), 120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , and 15 mM Glc. Cells were incubated with 5 mM QA in buffer A supplemented with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (2×10^6 cpm/well, Amersham CES3) for 10 min at 24°C . For pharmacological blockade of QA-induced Ca^{2+} entry, 10 μM MK801 was added for 15 min before addition of QA and $^{45}\text{Ca}^{2+}$. We stopped $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by replacing buffer A with fresh, non radioactive buffer A containing 2 μM MK-801, for the rapid blocking of NMDA-R-mediated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx (34). Cells were rapidly rinsed four times in 900 μl of this buffer. The fourth wash lasted 6 min. Extracellular buffer was collected for evaluation of Ca^{2+} efflux. Then cells were extracted from culture wells using 300 μl SDS 0.2%. Protein concentrations were determined on 20 μl aliquots. The radioactivity present in 200 μl of cell extract (i.e., intracellular $^{45}\text{Ca}^{2+}$) and 200 μl of washing buffer (i.e., extracellular $^{45}\text{Ca}^{2+}$) was determined by three rounds of scintillation counting (Beckman counter LS5801) for 2 min and corrected for background. Intracellular accumulation of Ca^{2+} was expressed as counts per minute per milligram of protein. The experiment was repeated twice and similar results were obtained in each case.

SDH activity in neuronal cell culture

Cells in a six-well plate were incubated with 75 μM 3NP or PBS for 5 h, rinsed with trypsin, and centrifuged. We homogenized $\sim 1.5 \times 10^6$ cells in 200 μl of a buffer containing 20 mM Tris (pH 7.2), 250 mM sucrose, 2 mM EGTA, 40 mM KCl, and 1 mg/ml BSA and protease inhibitor cocktail (Roche). SDH activity was measured as described by Munujos et al. (35). Samples were incubated in triplicate with 50 mM succinate and in duplicate without succinate (for determination of nonspecific activity) in the presence of 2 mM iodo-

nitrotetrazolium chloride (INT) in 50 mM Tris buffer (pH 8.3) supplemented with 0.5 mM EDTA at 37°C for 90 min. The formation of red formazan was monitored spectrophotometrically at 485 nm. Specific activity was calculated by subtracting nonspecific formazan formation in absence of succinate from total activity measured in presence of succinate. Activity was normalized according to protein concentration.

Cell culture cytotoxicity

Cytotoxicity experiments were performed on sister cultures after 21 DIV. LDH release, an index of cell disruption, was measured in duplicate in each well. Four wells were used for each experimental condition. 3NP (75 μ M) or PBS was applied 5 h (T0–5 h) before QA treatment. QA (5 mM) or PBS in culture medium was then applied (T0). For the determination of LDH release, aliquots of culture medium were collected immediately after QA application (T0, 50 μ l), and every day thereafter (T0+24 h, T0+48 h, T0+72 h, 100 μ l). After centrifugation to remove floating cells, aliquots were incubated at 37°C with the LDH kit (Roche) for 60 min, according to the manufacturer's instructions. LDH release was calculated as the percentage of LDH activity in the medium normalized according to the total LDH activity (100%) in wells after the complete lysis of cells with 2% Triton X-100.

In situ detection of calpain activity on living cells

For *in situ* determination of calpain activity in cell cultures (19 DIV), the volume of extracellular medium was set to 500 μ l for each well the day preceding the experiment. The treatment with 3NP (75 μ M) started 5 h before QA treatment. The fluorogenic calpain substrate SLY-AMC (5 mM in DMSO) was added at a final concentration of 50 μ M final (0.1% DMSO final) in the culture medium. QA (5, 1, or 0.5 mM final) or vehicle (PBS) is added to the medium and fluorescence intensity in cells was determined at different time points (0, 15, and 20 h after QA addition) using a plate reader (fluorimeter Fusion, Packard) set in "bottom" mode to selectively detect fluorescence of AMC (Ex 380/Em 460 nm) at the levels of plated cells. Fluorescence at time "0" was considered to represent background fluorescence unrelated to substrate cleavage. We checked that the fluorescence signal detected at 20 h after QA (4 wells, mean \pm SE: 4661 \pm 940) was markedly inhibited by pretreating cells with 10 μ M calpain inhibitor I (Sigma) (4 wells, mean \pm SEM: 1440 \pm 490), demonstrating that at least 70% of the accumulation of AMC resulted from calpain activity.

ATP measurement

ATP concentrations was determined using the method of Lust et al. (36) in four sister culture wells for each condition. Cultured cells (19 DIV) were incubated in 75 μ M or 1 mM 3NP for 5 h. As positive control for massive ATP depletion, sodium azide (0.2%) plus 1 mM 3NP were added to massively block oxidative phosphorylation. Cultures were rinsed with PBS, and 200 μ l per well of the ATP releasing buffer (Sigma) were rapidly added at 37°C for 5 min. Detection of ATP concentrations in samples was performed right after lysis. Triplicates (50 μ l) of each sample are put in black plastic 96-well plates (Nunc). To start the reaction, 50 μ l of the reaction medium containing 100 mM glycine, 15 mM dithiothreitol, 4 mM EGTA, 1 mM EDTA, 20 mM MgSO₄, 0.08% BSA, and 30 μ M luciferin (Promega) with luciferase

(38,400 LU/mg, Sigma) were sequentially added to each sample using the automatic injector of a luminometer (MITHRAS LB940, Berthold technologies, Bad Wildbad, Germany). Reading was started 1 s after the injection and lasted 1 s. Light that was detected in each sample was transformed in ATP concentrations using a standard curve (from 10 pM to 1 mM). Results were expressed as (mean \pm SE) pmol of ATP/well.

Calcium imaging

For imaging studies cells were plated on glass coverslips coated with poly-D-lysine. Cells were incubated in culture medium with Fura-2-AM (5 μ M final) in a plexiglass chamber set at 37°C for 30 min. Fura-2-loaded cells were perfused (1 ml/min) with buffer A during 10 min to establish the baseline of fluorescence at rest. Then a 5 mM QA solution in buffer A was perfused. The measurements were performed at room temperature using an inverted epifluorescence microscope (Leica) with an \times 40 oil immersion lens and equipped with a cooled CCD camera (Hamamatsu ORCA ER). Fura-2 was sequentially excited at 340 nm and 380 nm, and emitted fluorescence was collected at 510 nm. All settings of the Lambda DG4, filters, and microscope and the complete data acquisition were controlled by SimplePCI6.0 software (Compix Inc., Imaging Systems). Ratio images 340/380 were recorded at 12 images/min right before and for 2 min after starting QA perfusion and at 0.5 image/min thereafter. To determine the effects of 3NP, we used the 340/380 ratio values as an index of the variation of cytosolic Ca²⁺ levels at rest and during QA stimulation. For each condition (control and 3NP), three coverslips were studied. A total of 50 and 35 neurons were analyzed in 3NP-treated and untreated cells respectively.

Analysis and statistics

Results are mean \pm SE. We used Mann-Whitney tests to compare QA-induced Glc uptake in rats in the presence and absence of 3NP. Other data were analyzed by unpaired Student's *t* tests in experiments, with groups being compared in pairs. If several groups were to be compared in the same experiment, statistical analysis included one-way ANOVA followed by Fisher's *post hoc* PLSD test. The number of 3NP-treated rats and sham-rats with lesions after QA injection (15 and 20 nmol) as compared by means of a χ^2 test.

RESULTS

Exacerbation of QA-induced striatal degeneration by chronic 3NP treatment

We investigated the potential synergistic effects of mitochondrial defects on QA toxicity *in vivo* by determining the dose of 3NP leading to respiratory chain inhibition without triggering overt striatal degeneration. We studied the effects of various doses of 3NP, using staining with the vital dye TTC to detect striatal lesions. Treatment with <40 mg/kg 3NP for 6 days did not, in any case, lead to striatal degeneration (Fig. 2A). Striatal lesions were seen in animals receiving higher doses (56 mg/kg/day; Fig. 2A). Complex II is homogeneously inhibited by 3NP throughout the brain (32,37), but in cases in which 3NP also causes degeneration,

complex II activity in the striatum is reduced by both the inhibitory effects of the neurotoxin and by cell death. In this dose-dependent experiment, we therefore measured complex II activity in the parietal cortex. The degree of SDH/complex II inhibition increased steeply as a function of 3NP dose (correlation coefficient, $r=0.982$, $P<0.01$; Fig. 2B), consistent with the irreversible mechanism of action of 3NP on the complex II catalytic site (32,38,39). Consistent with published results (27,32,40,41), striatal lesions occurred only when inhibition of complex II was $>50\%$ (i.e., $57\pm 4\%$ of inhibition for 54 mg/kg/day).

To study the effects of partial complex II inhibition on QA toxicity, we chose a dose of 35 mg/kg/day 3NP, which does not lead to overt striatal degeneration. Complex II inhibition on the sixth day of 3NP administration at this dose was similar in the striatum and cerebral cortex (44 ± 3 and $49\pm 2\%$ respectively, $n=7$

per group, n.s. by ANOVA and *post hoc* PLSD test, not shown).

We then compared the effect of QA injection in sham-operated and 3NP-treated rats (35 mg/kg/day). Stereotactic intrastriatal injections of QA and PBS were performed on the fifth day of 3NP treatment. PBS injection did not produce striatal degeneration in 3NP-treated animals (Fig. 2C-D). One day after PBS injection, TTC staining showed no striatal lesion. The biochemical quantification of soluble oligonucleosomes indicated no detectable nuclear DNA fragmentation. In line with this, *in situ* detection of nuclei with fragmented DNA using the TUNEL method showed that, in the vicinity of the needle track, only a few cells were damaged by the intrastriatal injection of PBS (not shown). Immunohistochemical evaluation of 3NP-treated rats 2 wk after the intrastriatal injection of PBS showed no detectable cell loss in the striatum (Fig. 2D).

We examined the presence of striatal lesions using TTC staining 24 h after QA injection (Fig. 3). The injection of doses of QA <15 nmol left the striatum undamaged in all animals (Fig. 3A). The injection of 15 and 20 nmol QA produced lesions in 10% (2/20) of the naive rats (Fig. 3A) and 60% (12/20) of the 3NP-treated rats ($df=1$, $\chi^2=10.98$, $P<0.001$). The injection of 40 nmol QA or more resulted in lesions in all animals (Fig. 3A). The volume of QA-induced striatal lesions was greater in 3NP-treated animals than in rats not treated with 3NP (Fig. 3B). For example, in rats injected with 40 nmol QA, the volume of striatal lesions in 3NP-treated rats was double that in rats not treated with 3NP (Fig. 3B), with the lesion extending throughout the striatum (Fig. 3H). At

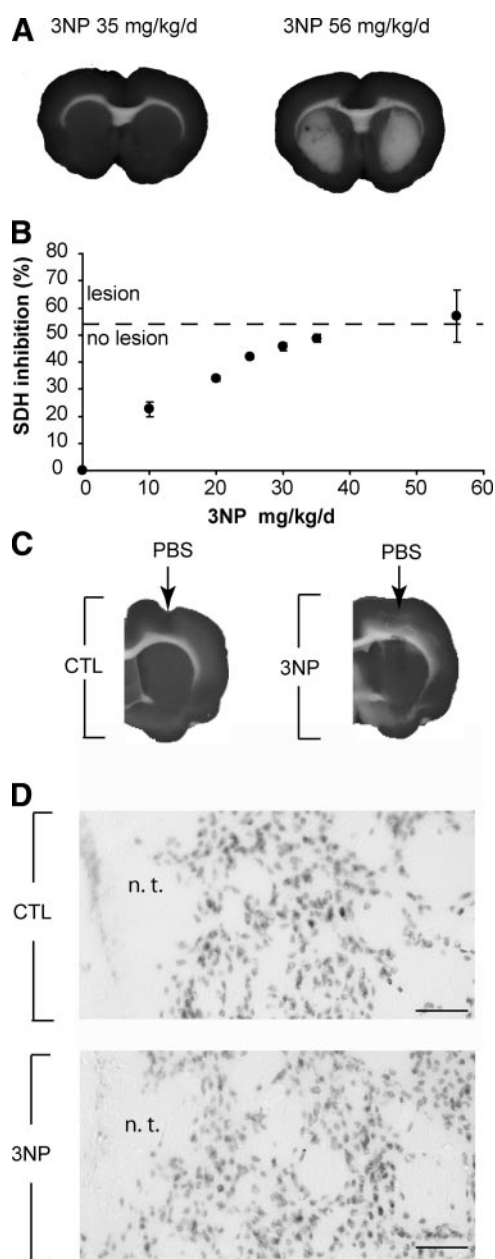


Figure 2. Determination of a subtoxic dose of 3NP partially inhibiting mitochondrial complex II but not causing striatal degeneration. *A*) Representative coronal brain slices after staining with the vital dye TTC showing (*right* image) severe striatal lesions produced by a toxic dose of 3NP (56 mg/kg/day) and (*left* image) an essentially normal striatum in a rat treated with a subtoxic dose (35 mg/kg/day). *B*) Curve showing inhibition of complex II/SDH activity as a function of the dose of 3NP administered. Complex II/SDH inhibition was measured in the cerebral cortex on the 5th day of chronic administration of various doses of 3NP. Dashed line indicates that all rats display striatal degeneration if inhibition exceeds 55%, whereas no rats display lesions if inhibition is $<50\%$. Data are mean \pm SE in 3–7 animals. SDH inhibition (i.e., reduction of activity) was statistically significant, in comparisons with the control, for all doses ($P<0.01$, ANOVA, and Fisher's *post hoc* test). *C*) TTC staining showing no striatal lesion 24 h after intrastriatal injection of PBS in control (*left* image) rats or rats chronically treated with 3NP (35 mg/kg/day) for 5 days (*right* image). Images are representative of the TTC staining observed in more than 30 rats. *D*) Immunohistochemistry of the neuronal marker NeuN 15 days after intrastriatal injection of PBS in control rats (*top*) and rats treated for 5 days with 35 mg/kg/day 3NP (*bottom*). Note that, even in the vicinity of needle track (n.t.), no delayed cell loss has occurred. Photomicrographs are representative of histological observations for 3 animals from each group. Scale bars, 100 μ m.

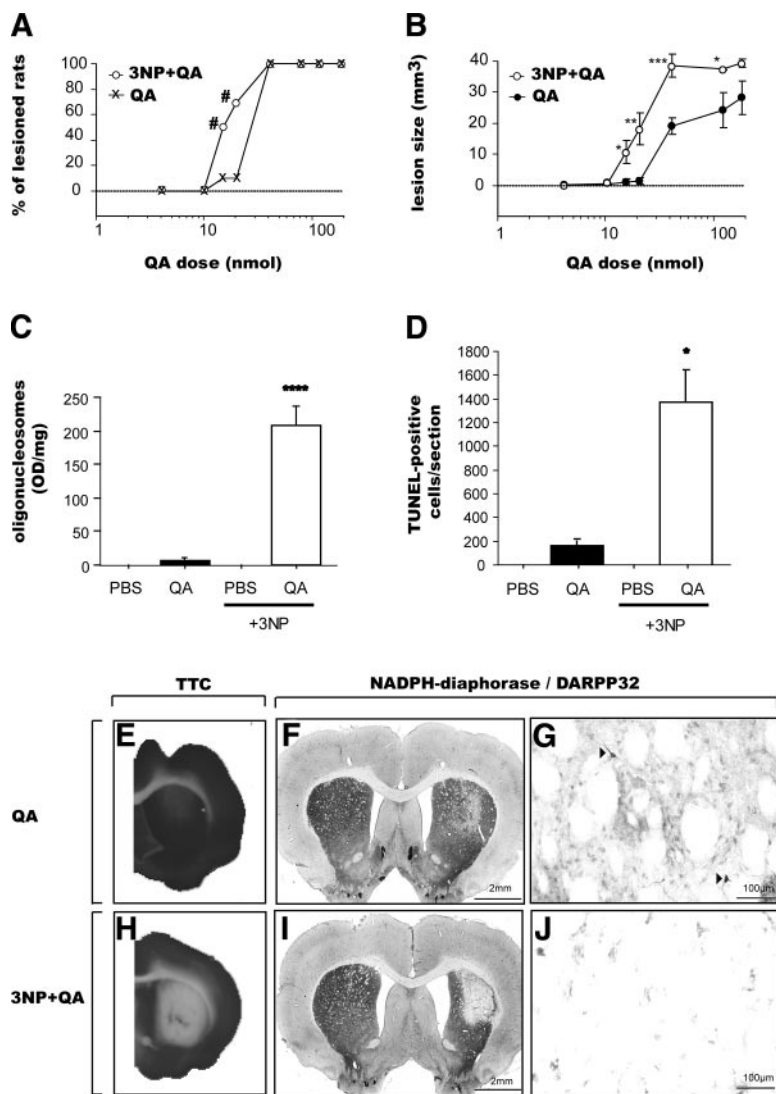


Figure 3. Inhibition of mitochondrial SDH by chronic 3NP treatment greatly potentiates NMDA-R-mediated excitotoxicity. Lesions were assessed after intrastriatal injection of various doses of QA in rats with or without chronic 3NP treatment (35mg/kg/day). Percentage of animals showing striatal lesions (A) and size of striatal lesion (B) detected using TTC staining 24 h after QA. Oligonucleosomal concentration (C) and number (D) of TUNEL-positive cells in the striatum 24 h after intrastriatal injection of QA (40 nmol) in rats with or without 3NP treatment. Only a few cells were observed in the PBS-injected striata. Representative striatal lesions induced by 40 nmol QA in 3NP-treated (H–J) and untreated (E–G) rats seen with TTC staining (E and H), or immunohistochemistry of DARPP-32 with with counterstaining for NADPH-diaphorase activity at low (F and I) and high (G and J) magnification. Only cellular debris and nonspecific staining are seen within the lesion at high magnification (bottom right image). Data are mean \pm SE for 5–10 animals in each group. # $P < 0.001$, $df = 1$, $\chi^2 = 10.98$, and * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared with QA, ANOVA, and Fisher’s *post hoc* PLSD test.

higher doses of QA (80–180 mmol), this difference between 3NP-treated rats and sham-rats was apparently reduced when using the volume of lesion as an index of degeneration, the entire striatum being almost entirely lesioned at high doses of QA (Fig. 3B). Interestingly, regardless of the size of the lesion, the “intensity” of QA-induced cell death was higher in 3NP-treated rats than in rats not treated with 3NP. QA-induced lesions appeared as a gray pallor in the striatum in rats without 3NP, whereas those in 3NP-treated rats were white and seemed to be more necrotic (Fig. 3E and H).

We determined the “intensity” of ongoing neurodegeneration rather than exclusively the spatial extent of the lesion 24 h after QA injection by studying the intensity of DNA fragmentation. QA (40 nmol) treatment increased free oligonucleosome levels 10 times more strongly in 3NP-treated rats than in rats without 3NP (Fig. 3C). *In situ* DNA fragmentation analysis by TUNEL confirmed that the number of dying cells 24 h after QA injection was about 10 times larger in 3NP-treated animals than in rats not treated with 3NP (Fig. 3D). Histological evaluation of rats 2 wk after stereotac-

tic injections (i.e., when the cell death process was complete) showed that 40 nmol of QA led to only partial cell loss in rats not treated with 3NP, with residual neurons detected in the lesioned area (Fig. 3F and G). In contrast, QA-induced lesions in 3NP-treated rats were associated with the complete loss of neuronal markers (Fig. 3I and J).

Thus, 3NP markedly increases the severity of QA-induced striatal lesions and renders low doses of QA (not in themselves overtly toxic) able to trigger excitotoxic striatal lesions.

Relationship between levels of SDH inhibition and potentiation of QA toxicity

We then investigated whether the cell death potentiation phenomenon observed was proportional to the mitochondrial defects induced by 3NP. We plotted a toxicity curve for 40 nmol QA, using oligonucleosome levels as a function of the complex II inhibition measured in rats following treatment with various doses of 3NP (Fig. 4). No potentiation was seen at levels of

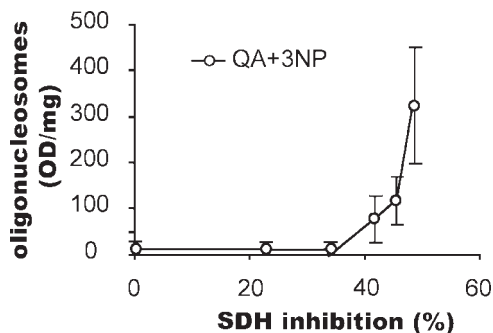
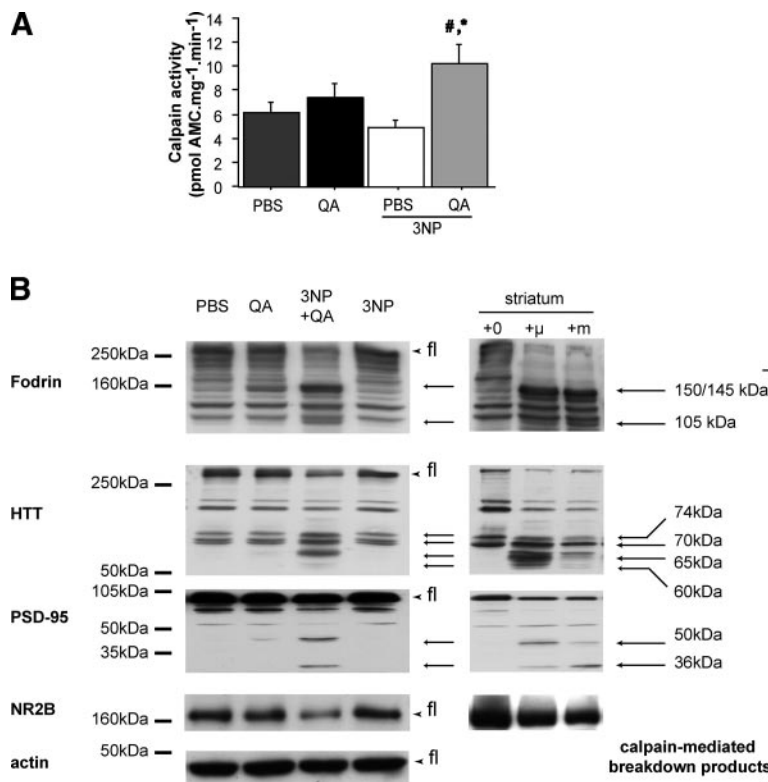


Figure 4. Exacerbation of QA-induced striatal neurodegeneration as a function of 3NP-induced SDH inhibition. Rats were treated with various doses of 3NP (0 to 45 mg/kg/day), and on the 5th day QA (40 nmol) was injected into the striatum. Cortical complex II/SDH inhibition (mean value for each dose) and concentration of striatal cell death were determined 24 h later by oligonucleosome detection. In these conditions, in which oligonucleosome assay was set up for detecting massive DNA fragmentation produced by 3NP plus QA, DNA fragmentation produced by QA in animals without 3NP could not be detected. Note QA-induced increase in oligonucleosome levels at levels of SDH inhibition not toxic in themselves (between 35 and 50%). Data are mean \pm SE for 3 animals, for each 3NP dose.

SDH/complex II inhibition <35%. At inhibition levels of 35–50%, the potentiation of QA-induced striatal degeneration increased sharply with inhibition. These results indicated that QA toxicity was increased only for a particular range of complex II defects, a situation not toxic in itself but probably associated with a decrease in the capability of neurons to cope with a deleterious event triggered by QA.

Figure 5. Chronic 3NP treatment increases QA-induced calpain activation and calpain substrate proteolysis *in vivo*. Calpain was studied in striatal homogenates 24 h after intrastriatal injection of either PBS or QA in rats with or without chronic 3NP treatment. *A*) Calpain-dependent proteolytic cleavage of SLY-AMC was measured in striatal homogenates by fluorimetry. Note that 3NP increases the QA-induced activation of calpain. Data are mean \pm SE for 7 or 8 animals. * $P < 0.003$ vs. PBS in 3NP-treated rats and # $P < 0.02$ vs. PBS alone, ANOVA, and Fisher's *post hoc* PLSD test. *B*) Calpain substrate proteolysis was assessed by Western blotting. Calpain-mediated breakdown products of fodrin, HTT, and PSD-95 were identified *in vitro* by incubating control rat striatal homogenates with μ -calpain (+ μ), m-calpain (+m), or no added proteases (0+) in the presence of Ca^{2+} (images on right). Bands corresponding to full-length protein are indicated by an arrowhead. Western blots are representative of 7–8 pooled striata from each experimental group. Western blots were performed in triplicate for semiquantitative analysis of the cleavage of full-length proteins and the appearance of breakdown products (see Table 1 for quantitative changes and statistical analysis).



Massive activation of calpain in the potentiation of QA toxicity by 3NP

It was shown *in vitro* that 3NP increases the cytosolic accumulation of Ca^{2+} provoked by NMDA-R stimulation (16,17). We wanted to test whether 3NP could produce similar effects in striatal cells *in vivo*. To this purpose, we studied the Ca^{2+} -activated protease calpain, which we used as an *in vivo* index of Ca^{2+} deregulation. We used fluorimetric assays to measure the proteolytic activity of the protease in striatal extracts. We also used Western blotting to study fodrin, as the rate of calpain-dependent cleavage of this protein increases during excitotoxic cell death (42). In addition, we analyzed synaptic proteins of the NMDA-R multiprotein complex: the NR2B subunit, PSD-95, and huntingtin, both of which interact with the receptor (21).

The injection of 40 nmol of QA into rats without 3NP led to a nonsignificant increase in the proteolytic activity of calpain, as seen in fluorimetric assays (Fig. 5A). However, significant accumulation of the products of fodrin digestion by calpain was observed, as a 145–150 kDa doublet on Western blots (Fig. 5B), indicating that significant calpain activation occurred following QA injection.

In rats treated with 3NP only, no significant change was observed in the levels of calpain-like proteolytic activity in fluorimetric assays (Fig. 5A). Consistently, fodrin and the other proteins studied were not cleaved (Fig. 5B).

In 3NP-treated rats receiving QA, fluorimetric assays showed a significant increase in the proteolytic activity

TABLE 1. Western blot analysis showing exacerbation of QA-induced proteolysis of calpain substrates

Protein	Mol. Weight (kDa)		Levels (% of control)			Exacerbation (P)
			3-NP	QA	3-NP+QA	
	Full Length	Fragment	Mean \pm SE	Mean \pm SE	Mean \pm SE	
Fodrin	280		89.1 \pm 3.8	86.9 \pm 1.1*	53.3 \pm 4.2***	0.0001
		150/145	100 \pm 8.7	168.3 \pm 1.7**	270 \pm 11.5***	<0.0001
htt	348	105	105.7 \pm 9.9	102.7 \pm 2.7	244.3 \pm 9.9*	0.0207
		74	94.8 \pm 3	98.3 \pm 3.6	67.8 \pm 2.9***	<0.0001
		70	122.6 \pm 11.3	101.6 \pm 7.4	187.1 \pm 4.3**	0.0003
		65	107 \pm 4.2	103.5 \pm 7.6	145.3 \pm 6.5*	0.0034
		60	109.1 \pm 7.9	118.2 \pm 4.5	472.7 \pm 22.7***	<0.0001
PSD-95	95	95	95 \pm 5	105 \pm 0	145 \pm 5***	0.0002
		50	93.7 \pm 3.4	98.2 \pm 1.8	83.4 \pm 2.1*	0.0023
		36	103.7 \pm 3.7	118.5 \pm 7.4	337 \pm 26.7***	<0.0001
NR2B	180		100 \pm 0	100 \pm 0	218.5 \pm 24.3***	0.0001
Actin	42		91.3 \pm 6.9	91.7 \pm 4.4	72.8 \pm 2.5*	0.0165
			94.2 \pm 4.2	100.3 \pm 5.9	93.9 \pm 1.7	0.3106

Full-length fodrin, htt, PSD-95, NR2B (NMDA-R subunit), and actin and their calpain breakdown products were investigated by Western blotting 24 h after intrastriatal injection of QA or PBS into rats with or without 3NP treatment. For each band (see Fig. 8), levels indicated in table are expressed as percentage of intensity measured in control samples. Actin was used to control for equal protein loading. The 60 kDa htt fragment is a doublet. QA-induced excitotoxicity in 3NP-treated rats leads to a significant increase in calpain-dependent cleavage of proteins of NMDA-R multiprotein complex. Data are mean OD values \pm SE measured in triplicate. Means were compared by ANOVA, and Fisher's *post hoc* PLSD test. *P* values indicated (right column) correspond to a comparison between QA and 3NP+QA. **P* < 0.05, ***P* < 0.001, ****P* < 0.0001, vs. control.

of calpain (Fig. 5A). Western blot analysis showed that levels of the full-length forms of fodrin, huntingtin, PSD-95, and NMDA-R NR2B subunit were significantly lower in 3NP-treated than in untreated rats. The potential breakdown products of these substrates accumulated in significantly larger amounts in 3NP-treated than in untreated rats, demonstrating significant potentiation (Fig. 5B, Table 1). Many of these breakdown products were probably generated by calpain digestion as they migrated at the same apparent molecular weight as bands appearing after the *in vitro* incubation of striatal homogenates from control rats with purified μ - and m -calpain (Fig. 5B).

Thus, 3NP treatment potentiated the calpain activation induced by QA, suggesting that the exacerbation of QA-induced neuronal cell death by mitochondrial impairment was associated with major Ca^{2+} deregulation.

Mitochondrial defects do not increase QA-induced neuronal activation *in vivo*

We then investigated whether the exacerbation of Ca^{2+} deregulation by a combination of QA and 3NP treatment was dependent on NMDA-R hypersensitivity. We reasoned that if mitochondrial defects increase the sensitivity of NMDA-R to agonists, then the striatal neuron activation/firing (and the corresponding energy demand) triggered after QA injection should be enhanced in 3NP-treated rats. We tested this hypothesis by determining whether 3NP treatment exacerbated the QA-induced increase in Glc uptake in the striatum, a direct index displaying 1:1 stoichiometry with glutamatergic activity *in vivo* (43–45). We injected the

positron emitter FDG 10 min after intrastriatal injection of QA to study the early pharmacological effects of QA. The basal uptake of FDG in the PBS-injected striatum was similar in 3NP-treated rats and in rats not treated with 3NP (mean OD/mCi/kg \pm SE; sham, 0.373 ± 0.024 ; 3NP rats, 0.308 ± 0.019 ; nonsignificant; Fig. 6A and B). The administration of 40 nmol of QA significantly increased FDG uptake (mean OD/mCi/kg \pm SE; sham-treated rats, 0.617 ± 0.049 ; 3NP rats, 0.564 ± 0.058 ; *P* < 0.001 over that observed in PBS-injected striatum, as shown by ANOVA and *post hoc* PLSD Fisher test). This increase was of similar extent in both groups (sham-treated, +65 \pm 5%; 3NP, +81 \pm 8%; nonsignificant by Mann-Whitney test; Fig. 6C).

These results indirectly suggest that 3NP did not markedly change the early effect of QA on NMDA-R *in vivo*.

Mitochondrial defects do not increase the amount of Ca^{2+} entering the cell in response to NMDA-R stimulation

We wanted to determine more directly how intracellular Ca^{2+} homeostasis alterations were related to 3NP-induced potentiation of NMDA-R-mediated excitotoxicity. Fluorescence imaging techniques can be used to assess variation of cytosolic Ca^{2+} concentration. To quantitatively determine the modifications of the net influx/accumulation of Ca^{2+} from the extracellular space to the intracellular space of neurons, measurement of radioactive $^{45}Ca^{2+}$ uptake is also particularly suitable (33). Since these assays can not be performed *in vivo*, we assessed the effect of 3NP on NMDA-R sensitivity to QA in cultured striatal cells.

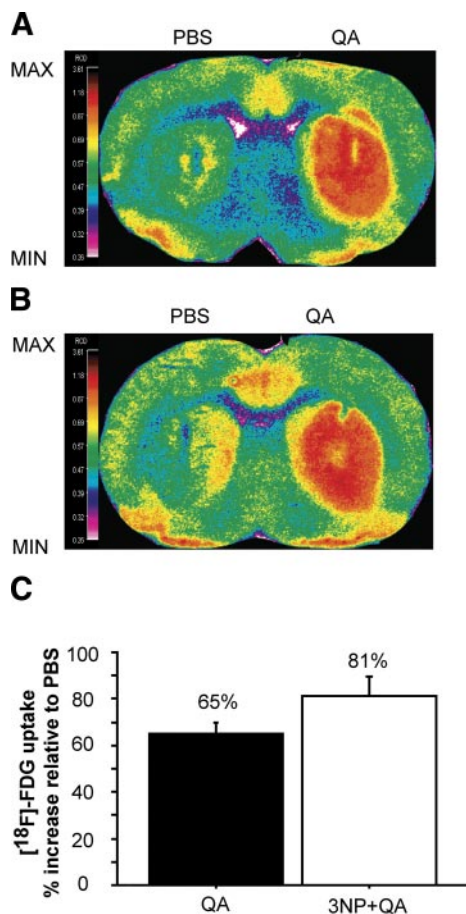


Figure 6. QA-induced increase in striatal FDG uptake is not modified by chronic 3NP treatment. Striatal FDG levels were assessed by autoradiography 50 min after intrastriatal injection of QA or PBS (*left*) injection, with (*B*) or without (*A*) 3NP treatment. *C*) Higher levels of striatal FDG uptake in the QA-injected striatum than in the PBS-injected striatum in rats chronically treated with or without 3NP. Data are mean \pm SE for 5 animals per group (n.s., Mann Whitney).

We first set up *in vitro* conditions reproducing our *in vivo* observations. We previously showed that striatal cells cultured in similar conditions and continuously treated with 100 μ M 3NP degenerate within 48–72 h (46). In the present study, we identified a 3NP concentration that substantially inhibited complex II without triggering overt degeneration. Measurements of LDH release, a sensitive index of degeneration, showed that 75 μ M 3NP did not increase cell death levels over those in control cultures (Fig. 7A). This concentration of 3NP produced substantial inhibition of (74%) complex II inhibition in cultured striatal cells (Fig. 7B). At this nontoxic dose of 3NP, ATP concentrations were not modified compared with control condition. Higher concentrations of 3NP (1 mM) or a combination of respiratory chain inhibitors (sodium azide+3NP) were necessary to produce significant loss of ATP (Fig. 7C). In striatal cells not treated with 3NP, 5 mM QA increased cell death levels slightly over those observed in the control (by a factor of 1.7; Fig. 7A). QA-induced neurodegeneration levels in cultures treated with 75 μ M 3NP were 2.3 times higher than those in cells

treated with QA alone and 3.2 times higher than those in control cells (Fig. 7A). At a concentration of 50 μ M, 3NP inhibited complex II activity by 54% and failed to potentiate QA toxicity (not shown), suggesting that potentiation occurred only over a particular range of inhibition. Thus, subtoxic 3NP treatment in cell culture can exacerbate QA-induced cell death, as seen in rat striatum *in vivo*. However, the amplitude of potentiation was lower *in vitro* compared with the *in vivo* situation.

We next investigated whether potentiation was associated with intracellular alterations of Ca^{2+} homeosta-

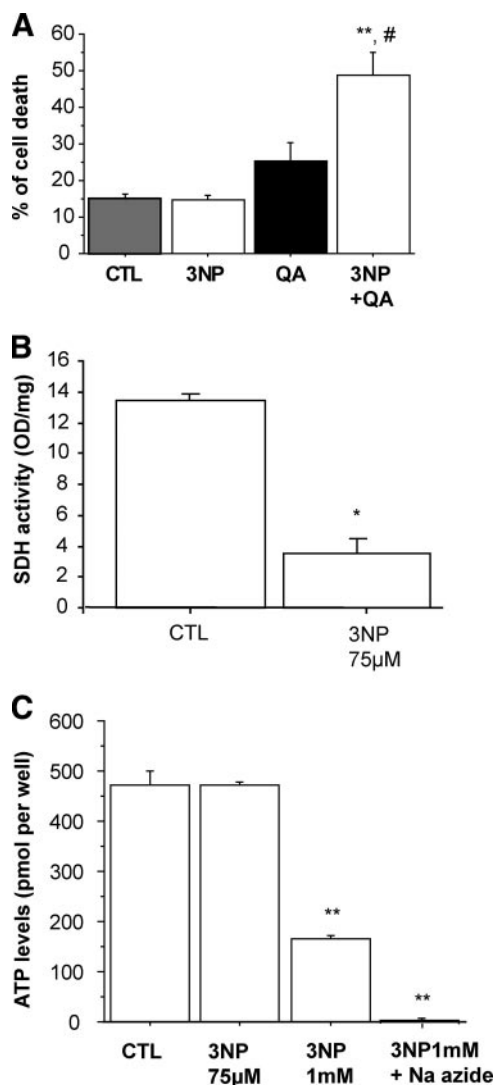


Figure 7. Exacerbation of QA-induced neurodegeneration by 3NP in cultured striatal neurons. 3NP (75 μ M) was applied 5 h before treatment with QA. *A*) Cell death was determined by LDH assays 72 h after the addition of 5 mM QA to culture medium. Note that 75 μ M 3NP significantly potentiates QA toxicity, whereas this concentration produces no toxicity in itself. *B*) Determination of SDH activity right before QA application. *C*), ATP concentrations in control cells, and cells treated with either 75 μ M 3NP, 1 mM 3NP, or 1 mM 3NP + 0.2% sodium azide. Note that 3NP can potentiate QA-induced degeneration without modifying ATP levels. * P < 0.001 compared with control. # P < 0.001 compared with QA alone. ** P < 0.0001 compared with control.

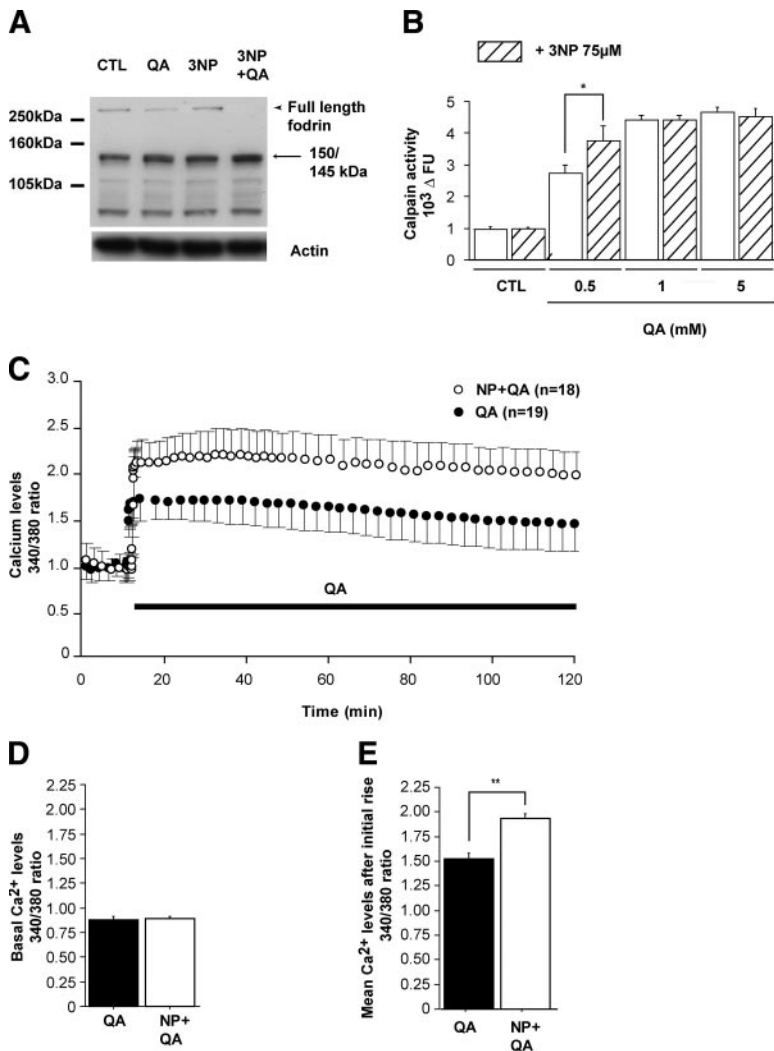


Figure 8. Exacerbation of QA-induced Ca²⁺ perturbation by 3NP in cultured striatal neurons. In all experiments, 3NP (75 μM) was applied 5 h before treatment with QA. *A*) Western blot of fodrin (6h of QA treatment) showing that QA-induced decrease in full-length protein and increase in 145/150 kDa doublet is slightly amplified by 3NP. *B*) *In situ* determination of calpain activity 15 h after QA treatment was started. Note that at this time point, potentiation by 3NP is detected only for the low dose of QA with a ceiling effect at higher doses. *C*) Effects of 3NP on time course of cytosolic Ca²⁺ concentration assessed by Fura-2 ratio imaging before and during QA perfusion (black horizontal bar). Two representative curves from 6 experiments are shown. Number of neurons studied in each condition is indicated between parentheses. Note that concentration of cytosolic Ca²⁺ is more elevated in 3NP-treated cultures during QA treatment compared with cells without 3NP. *D*) Basal Ca²⁺ concentrations as assessed by Fura-2 ratio imaging determined in neurons before application of QA in 3NP-treated cells and untreated cells. *E*) Mean Ca²⁺ levels as assessed by Fura-2 ratio imaging determined after the initial rise produced by QA until 120 min. Mean parameters determined in *D* and *E* are from 6 different coverslips (3NP, *n*=3; 50 neurons; Control *n*=3; 35 neurons). **P* < 0.05; ***P* < 0.0001

sis. We studied fodrin cleavage by Western blot analysis. Results showed a decrease in levels of full length fodrin and an apparition of a calpain-mediated 145/150 kDa doublet at 6 h after QA treatment (Fig. 8A). At later time points, a similar pattern was seen, suggesting that calpain activation was rapidly maximal during QA treatment. In 3NP-treated cells, QA treatment produced a total loss of full-length fodrin and the intensity of the 145/150 kDa doublet was slightly increased compared with QA treatment in absence of 3NP (Fig. 8A). We also measured as an index of calpain activity the *in situ* accumulation of AMC in living cells incubated with the calpain substrate SLY-AMC. In all conditions, a net accumulation of fluorescence was detected 15 h after addition of the substrate (earlier reading gave no reliable detection; Fig. 8B). In cells treated with 5 mM QA, fluorescence increased to 450% of control values. Interestingly, 3NP treatment produced no substantial increase as if a ceiling effect occurred at this QA concentration (Fig. 8B). A similar experiment was performed with lower concentrations of QA (0.5 and 1 mM). Results showed that with the lowest QA concentration (0.5 mM), AMC accumulation was still substan-

tial (~300% of control) and could be significantly potentiated by 3NP treatment (~400% of control).

We reasoned that potentiation of QA-induced alterations of intracellular Ca²⁺ by 3NP might be subtle *in vitro* and probably occur early after the beginning of QA treatment. We used microscopy Fura-2 ratio imaging to dynamically study variation of cytosolic Ca²⁺ concentrations before and during QA treatment. Using such ratio measurement, we showed that basal levels of cytosolic Ca²⁺ concentrations were similar in control and 3NP-treated cells (Fig. 8C and D). Perfusion of control striatal cultures with 5 mM QA produced a rapid rise in cytosolic Ca²⁺ that remained relatively stable thereafter. In cultures that were pretreated with 75 μM 3NP, the QA-induced rise in cytosolic Ca²⁺ was significantly higher than that seen in cells not treated with 3NP (Fig. 8C and E), suggesting that partial blockade of complex II reduced the ability of neurons to cope with cytosolic Ca²⁺ signals. Ca²⁺ “deregulation” (i.e., sudden and massive elevation of cytosolic Ca²⁺ concentrations) as seen by others in studies where glutamate rapidly induces excitotoxicity (see, for example, refs 47,48) did not occur within the 2 h of the

experiments, consistent with the observation that QA produced a relatively slow excitotoxic death in our cultures.

We finally investigated whether potentiation was associated with an increase in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entry. Control cells showed low basal levels of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation (Fig. 9A). Preincubation with the NMDA-channel inhibitor MK801 did not markedly affect basal Ca^{2+} entry. Incubation with QA produced marked elevation in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation, which was totally inhibited by MK801 (Fig. 9A). Nontoxic concentrations of 3NP (75 μM) did not significantly affect basal Ca^{2+} accumulation in cells. Incubation with 5 mM QA increased $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation by a factor of seven over that in basal conditions in control cells (Fig. 9B). In 3NP-treated cells, QA increased $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation by a factor of only three with respect to control conditions (Fig. 9B). Net $^{45}\text{Ca}^{2+}$ efflux evaluated at the end of the period of accumulation after stimulation by QA was lower in 3NP-treated cells than in untreated cells (mean \pm SE, 3NP+QA, $0.75 \pm 0.18 \cdot 10^3$ cpm/mg of protein; QA, $1.17 \pm 0.12 \cdot 10^3$ cpm/mg of protein; $P < 0.025$). Relative efflux (extruded/accumulated ratio) was not

statistically different in QA-treated cells with or without 3NP (mean \pm SE; 3NP+QA, $20.53 \pm 1.29\%$; QA, $16.51 \pm 0.58\%$). This indicated that the reduction in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation produced by 3NP plus QA as compared with QA alone was therefore not due to increased efflux, but reduced QA-induced entry of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ into neurons.

These results show that the exacerbation of QA toxicity induced by complex II inhibition was therefore not associated with NMDA-R hypersensitivity.

DISCUSSION

The present results identify three key aspects of the potentiation of NMDA-R-mediated excitotoxicity by chronic defects in the respiratory chain. First, potentiation occurs for a restricted range of complex II defects *in vivo* and *in vitro*. Second, potentiation leads to exacerbation of the activation of the protease calpain, indicating Ca^{2+} deregulation *in vivo*. Third, Ca^{2+} deregulation associated with potentiation is likely not linked to NMDA-R hypersensitivity.

NMDA-R excitotoxicity is exacerbated for a particular “window” of respiratory chain inhibition

This study demonstrates that NMDA-receptor-mediated excitotoxicity can be strongly increased *in vivo* by 3NP-induced partial blockade of the respiratory chain, which is not overtly toxic in itself. It also shows that 3NP significantly decreases, by a factor of up to two, the threshold dose of QA required to trigger striatal lesions. Thus, nontoxic NMDA-R activation combined with nontoxic mitochondrial complex II defects can synergistically trigger striatal degeneration. This result is consistent with the results of previous studies in cultured neurons, in which the toxicity of low doses of NMDA or glutamate was increased by prior treatment with 3NP (13,16,49). Only two pioneering studies have demonstrated that this synergy operates *in vivo* by providing evidence that the size of striatal lesions produced by NMDA is significantly increased by injecting the reversible complex II inhibitor malonate into the striatum (15) or acute intraperitoneal injection of 3NP (14). These studies did not investigate the relationship between the magnitude of potentiation and the concentration of complex II inhibition. The results presented here are novel in that they show that QA toxicity is exacerbated for a particular “window” of complex II inhibition. Indeed, no potentiation was detected for levels of inhibition $< 35\%$. Once this threshold had been exceeded, QA toxicity rapidly increased with the concentration of complex II inhibition through an almost “all-or-nothing” process. In this case, mitochondria may be in a particular state rendering striatal cells highly vulnerable to excitotoxic stress.

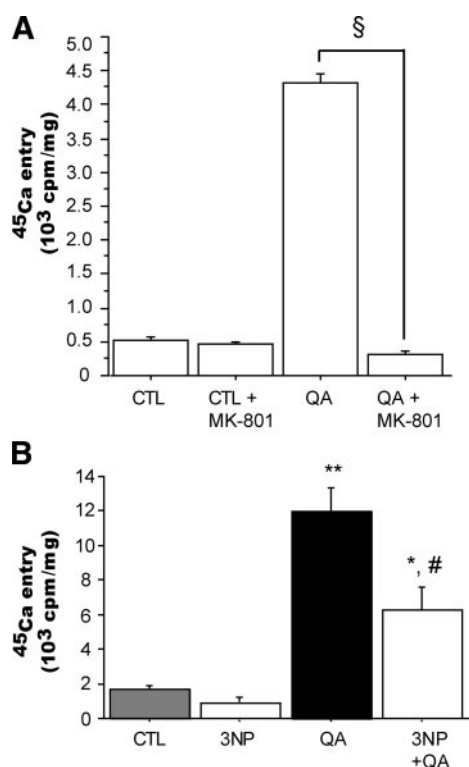


Figure 9. QA-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entry in primary striatal cells cultured with or without 3NP. Intracellular accumulation of radioactivity was measured after 10 min of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ incubation with QA (5 mM), PBS (CTL), or QA + MK801 (10 μM). *A*) Effect of MK801 pretreatment on QA-induced entry of $^{45}\text{Ca}^{2+}$. *B*) Effect of 3NP on basal and QA-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entry. 3NP (75 μM) was applied 5 h before QA treatment. Data are mean \pm SE determined for 4 culture wells per condition. Note that 3NP attenuates QA-induced increase in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entry. * $P < 0.001$, ** $P < 0.0001$ vs. control (CTL). § $P < 0.0001$ vs. QA+MK801. # $P < 0.001$ vs. QA, ANOVA, and Fisher’s *post hoc* PLSD test.

Possible mechanisms leading to calpain activation and Ca^{2+} deregulation during potentiation

We show here by fluorimetric proteolysis assays and Western blotting that QA activates calpain more strongly in 3NP-treated rats than in untreated rats. Doses of 3NP potentiating QA toxicity when applied alone did not activate calpain. We obtained similar results in cultured striatal cells, although the amplitude of the potentiation of QA-induced cell death and calpain activation by 3NP were found of limited amplitude compared with the *in vivo* situation. As the deleterious activation of calpains requires high concentrations of Ca^{2+} (42), our results suggest that the potentiation of QA toxicity by 3NP is associated with a major increase in cytosolic Ca^{2+} concentrations *in vivo*. This hypothesis is consistent with the present intracellular Ca^{2+} imaging study with Fura-2 and studies performed earlier by others (16,17) showing that the activation of NMDA-R leads to higher elevation in cytosolic concentrations of Ca^{2+} in 3NP-treated cultured neurons and brain slices as compared with untreated preparations.

There are three main mechanisms that could explain abnormal Ca^{2+} concentration increases within a neuron (50): 1) increases in Ca^{2+} entry, 2) decreases in Ca^{2+} extrusion, and 3) changes in the sequestration of Ca^{2+} to intracellular stores.

The potentiation of QA toxicity by 3NP may depend on an increase in Ca^{2+} entry into striatal neurons. Indeed, according to the hypothesis of "indirect excitotoxicity" in energy-deficient situations, ATP availability is reduced and the plasma membrane Na^+/K^+ -ATPase cannot maintain the resting membrane potential. Partial depolarization renders NMDA-R hypersensitive to agonists by relieving the voltage-dependent Mg^{2+} blockade of the cation channel. In the presence of even low (physiological) concentrations of glutamate, this would lead to an increase in Ca^{2+} influx and cell death. Supporting this hypothesis, the neurotoxic effects of many mitochondrial toxins are reduced by drugs blocking the NMDA-R, such as MK-801 (5,19). Electrophysiological studies on brain slices have also shown that strong complex II inhibition by 3NP (>75%) leads to a decrease in plasma membrane resting potential, resulting in the hypersensitivity of NMDA-R to agonists (17).

Our results showed that NMDA-R did not seem to become hypersensitive to QA in 3NP-treated rats. We directly showed that the QA-induced influx of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ into cultured striatal neurons was decreased rather than increased by 3NP, suggesting the absence of a hypersensitivity of NMDA-R. As a similar analysis of Ca^{2+} entry could not be performed *in vivo*, we used an indirect index of NMDA-R activation. One of the primary effects of NMDA-R activation in the striatum is ionic disturbance and an increase in firing/discharges (51). NMDA-R activation leads to an influx of Na^+ and Ca^{2+} , increasing the activity of the plasma membrane Na^+/K^+ -ATPase, which accounts for a large proportion

of the ATP used in neurons (44). Consistent with this, we found that Glc uptake increased markedly in the striatum after QA injection. We found that 3NP did not enhance the QA-induced increase in Glc consumption, indicating that the primary effect of NMDA-R activation by QA (ionic imbalance across the plasma membrane) remains essentially unchanged by 3NP-induced complex II inhibition *in vivo*. This is only indirect evidence that, *in vivo*, NMDA-R sensitivity is not modified by 3NP treatment. However, the *in vitro* experiments we carried out more directly demonstrate that the exacerbation of the QA-induced cytosolic Ca^{2+} perturbation by 3NP is not related to increased entry of Ca^{2+} into the cells. This is consistent with the observation in brain slices, showing that when 3NP-induced complex II inhibition is in the range of 50%, cell death can be triggered in absence of plasma membrane depolarization (52).

An alternative mechanism contributing to Ca^{2+} deregulation is based on a reduced extrusion of Ca^{2+} from the cell. The efficiency of the Ca^{2+} -ATPase of the plasma membrane may be reduced if ATP stores are decreased by 3NP. However, this is unlikely in the early phase of synergy. Indeed, we show in the present study that in conditions for which 3NP inhibits SDH and potentiates QA toxicity, ATP levels are essentially normal. In addition, we show using $^{45}\text{Ca}^{2+}$ that Ca^{2+} efflux is not modified by 3NP. This is consistent with previous studies that have strongly suggested that ATP levels are not markedly modified by 35 to 50% inhibition of complex II *in vivo* (see Discussion in ref 27). Another possible mechanism involving a decrease in Ca^{2+} extrusion in 3NP-treated rats is calpain-mediated cleavage of the type 3 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX3) present in the striatum (47). However, as our results show that subtoxic doses of 3NP in themselves do not enhance cytosolic Ca^{2+} concentrations, activate calpain, or increase Ca^{2+} accumulation into neurons, the role of NCX3 cleavage in Ca^{2+} deregulation during potentiation is likely secondary to altered capacity of neurons to sequester Ca^{2+} within intracellular stores.

Finally, complex II inhibition may modify the sequestration of Ca^{2+} entering through NMDA-R in intracellular pools. As the capacity of mitochondria to buffer Ca^{2+} *in vitro* is dependent on the energy substrates used to energize mitochondria (53) and is reduced by 3NP (54), it is likely that subtoxic 3NP treatment modifies the ability of mitochondria to properly sequester Ca^{2+} entering through NMDA-R, leading to an elevation of the cytosolic Ca^{2+} concentrations. Thus, even if less Ca^{2+} enters into 3NP-treated neurons, the cytosolic concentrations of the cation will sufficiently increase to initiate calpain activation and the cascade of deleterious events leading to cell death. The probable role of mitochondria in the deregulation of Ca^{2+} homeostasis during potentiation is further supported by the present findings. Indeed, we showed that synaptic proteins (including PSD-95, NR2B, fodrin, and huntingtin) are massively cleaved by calpain in 3NP-treated rats receiving QA. In striatal cells *in vivo*, these proteins are preferentially localized in dendrites. As dendrites are

remote from the reticulum and nucleus (2 important pools of Ca^{2+}) but contain many mitochondria, calpain-dependent cleavage of synaptic proteins indicates preferential Ca^{2+} deregulation in vicinity of mitochondria.

Thus, the main mechanism of “weak/indirect” excitotoxicity is associated with massive calpain activation, likely resulting from a decrease in the ability of neurons to cope with cytosolic increase in Ca^{2+} concentration rather than an exacerbated increase in Ca^{2+} entry.

Possible implications for neurodegenerative diseases

These *in vivo* results provide support for the view that mitochondrial defects and NMDA-R activation may have synergistic effects in acute and chronic neurodegenerative disorders, such as HD in particular. Indeed, mutated huntingtin increases the sensitivity of NMDA-R to glutamate (20–22,55,56) and partial mitochondrial defects have been reported in HD (23–25,57,58). Our data suggest that intracellular Ca^{2+} anomalies in HD (59), possibly leading to calpain activation in the striatum of patients (60), may result from a combination of moderate NMDA-R and mitochondrial defects. **[F]**

We thank Dr. Philippe Gervais for providing FDG. We would also like to thank Philippe Champeil (DBJC, CEA Saclay) for help with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake experiments and Dr. Raphael Boisgard (ERIT-M 0103, CEA Orsay) for help in setting up the ATP assay. This work was supported by the CEA and the CNRS. C. Jacquard holds a Ph.D. fellowship from the CEA. Y. Trioulier holds a postdoctoral fellowship from Hereditary Disease Foundation.

REFERENCES

- Mattson, M. P. (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* **3**, 65–94
- Beal, M. F. (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **23**, 298–304
- Albin, R. L., and Greenamyre, J. T. (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* **42**, 733–738
- Beal, M. F. (1992) Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2**, 657–662
- Greene, J. G., and Greenamyre, J. T. (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog. Neurobiol.* **48**, 613–634
- Peng, T. I., Jou, M. J., Sheu, S. S., and Greenamyre, J. T. (1998) Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons. *Exp. Neurol.* **149**, 1–12
- Ward, M. W., Kushnareva, Y., Greenwood, S., and Connolly, C. N. (2005) Cellular and subcellular calcium accumulation during glutamate-induced injury in cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* **92**, 1081–1090
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., and Bockaert, J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* **364**, 535–537
- Reynolds, I. J., and Hastings, T. G. (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* **15**, 3318–3327
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A., and Nicotera, P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961–973
- White, R. J., and Reynolds, I. J. (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J. Neurosci.* **16**, 5688–5697
- Novelli, A., Reilly, J. A., Lysko, P. G., and Henneberry, R. C. (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* **451**, 205–212
- Weller, M., and Paul, S. M. (1993) 3-Nitropropionic acid is an indirect excitotoxin to cultured cerebellar granule neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **248**, 223–228
- Simpson, J. R., and Isacson, O. (1993) Mitochondrial impairment reduces the threshold for *in vivo* NMDA-mediated neuronal death in the striatum. *Exp. Neurol.* **121**, 57–64
- Greene, J. G., and Greenamyre, J. T. (1995) Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J. Neurochem.* **64**, 430–436
- Greene, J. G., Sheu, S. S., Gross, R. A., and Greenamyre, J. T. (1998) 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience* **84**, 503–510
- Calabresi, P., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., Greengard, P., Hipskind, R. A., Borrelli, E., and Bernardi, G. (2001) Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J. Neurosci.* **21**, 5110–5120
- Beal, M. F. (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* **6**, 3338–3344
- Brouillet, E., Conde, F., Beal, M. F., and Hantraye, P. (1999) Replicating Huntington’s disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* **59**, 427–468
- Laforet, G. A., Sapp, E., Chase, K., McIntyre, C., Boyce, F. M., Campbell, M., Cadigan, B. A., Warzecki, L., Tagle, D. A., Reddy, P. H., Cepeda, C., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Klapstein, G. J., Ariano, M. A., Levine, M. S., DiFiglia, M., and Aronin, N. (2001) Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington’s disease. *J. Neurosci.* **21**, 9112–9123
- Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P. H., and Liu, Y. F. (2001) Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J. Biol. Chem.* **276**, 24713–24718
- Zeron, M. M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., Brundin, P., Hayden, M. R., and Raymond, L. A. (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington’s disease. *Neuron* **33**, 849–860
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., and Schapira, A. H. (1996) Mitochondrial defect in Huntington’s disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.* **39**, 385–389
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D., and Beal, M. F. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington’s disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* **41**, 646–653
- Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., and Greenamyre, J. T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington’s disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* **5**, 731–736
- Choo, Y. S., Johnson, G. V., MacDonald, M., Detloff, P. J., and Lesort, M. (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1407–1420
- Bizat, N., Hermel, J. M., 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**, 5020–5030
- Paxinos, G., and Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (2nd ed). Academic, New York
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., and Bartkowski, H. M. (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* **17**, 1304–1308

30. Coggeshall, R. E. (1992) A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci.* **15**, 9–13
31. Riddle, D., Richards, A., Zsuppan, F., and Purves, D. (1992) Growth of the rat somatic sensory cortex and its constituent parts during postnatal development. *J. Neurosci.* **12**, 3509–3524
32. Brouillet, E., Guyot, M. C., 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**, 794–805
33. Hartley, D. M., Kurth, M. C., Bjerkness, L., Weiss, J. H., and Choi, D. W. (1993) Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J. Neurosci.* **13**, 1993–2000
34. Eimerl, S., and Schramm, M. (1994) The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J. Neurochem.* **62**, 1223–1226
35. Munujos, P., Coll-Canti, J., Gonzalez-Sastre, F., and Gella, F. J. (1993) Assay of succinate dehydrogenase activity by a colorimetric-continuous method using iodinitrotetrazolium chloride as electron acceptor. *Anal. Biochem.* **212**, 506–509
36. Lust, W. D., Feussner, G. K., Barbehenn, E. K., and Passonneau, J. V. (1981) The enzymatic measurement of adenine nucleotides and P-creatine in picomole amounts. *Anal. Biochem.* **110**, 258–266
37. Dautry, C., Vaufrey, F., Brouillet, E., Bizat, N., Henry, P. G., Conde, F., Bloch, G., and Hantraye, P. (2000) Early N-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal dysfunction in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 789–799
38. Coles, C. J., Edmondson, D. E., and Singer, T. P. (1979) Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.* **254**, 5161–5167
39. Alston, T. A., Mela, L., and Bright, H. J. (1977) 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3767–3771
40. Alexi, T., Hughes, P. E., Knusel, B., and Tobin, A. J. (1998) Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague-Dawley rats but not in BALB/c ByJ mice. *Exp. Neurol.* **153**, 74–93
41. Blum, D., Galas, M. C., Pintor, A., Brouillet, E., Ledent, C., Muller, C. E., Bantubungi, K., Galluzzo, M., Gall, D., Cuvelier, L., Rolland, A. S., Popoli, P., and Schiffmann, S. N. (2003) A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists. *J. Neurosci.* **23**, 5361–5369
42. Wang, K. K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**, 20–26
43. Sibson, N. R., Dhankhar, A., Mason, G. F., Rothman, D. L., Behar, K. L., and Shulman, R. G. (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 316–321
44. Attwell, D., and Laughlin, S. B. (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 1133–1145
45. Bonvento, G., Sibson, N., and Pellerin, L. (2002) Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci.* **25**, 359–364
46. Galas, M. C., Bizat, N., Cuvelier, L., Bantubungi, K., Brouillet, E., Schiffmann, S. N., and Blum, D. (2004) Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol. Dis.* **15**, 152–159
47. Bano, D., Young, K. W., Guerin, C. J., Lefevre, R., Rothwell, N. J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., and Nicotera, P. (2005) Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity. *Cell* **120**, 275–285
48. Tymianski, M., Charlton, M. P., Carlen, P. L., and Tator, C. H. (1993) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* **13**, 2085–2104
49. Nasr, P., Gursahani, H. I., Pang, Z., Bondada, V., Lee, J., Hadley, R. W., and Geddes, J. W. (2003) Influence of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} , ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem. Int.* **43**, 89–99
50. Nicholls, D. G., and Ward, M. W. (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* **23**, 166–174
51. Bordelon, Y. M., Chesselet, M. F., Erecinska, M., and Silver, I. A. (1998) Effects of intrastriatal injection of quinolinic acid on electrical activity and extracellular ion concentrations in rat striatum in vivo. *Neuroscience* **83**, 459–469
52. Saulle, E., Gubellini, P., Picconi, B., Centonze, D., Tropepi, D., Pisani, A., Morari, M., Marti, M., Rossi, L., Papa, M., Bernardi, G., and Calabresi, P. (2004) Neuronal vulnerability following inhibition of mitochondrial complex II: a possible ionic mechanism for Huntington's disease. *Mol. Cell Neurosci.* **25**, 9–20
53. Brustovetsky, N., and Dubinsky, J. M. (2000) Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium. *J. Neurosci.* **20**, 103–113
54. Maciel, E. N., Kowaltowski, A. J., Schwalm, F. D., Rodrigues, J. M., Souza, D. O., Vercesi, A. E., Wajner, M., and Castilho, R. F. (2004) Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca^{2+} and respiratory chain complex II inhibition. *J. Neurochem.* **90**, 1025–1035
55. Cepeda, C., Ariano, M. A., Calvert, C. R., Flores-Hernandez, J., Chandler, S. H., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., and Levine, M. S. (2001) NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J. Neurosci. Res.* **66**, 525–539
56. Song, C., Zhang, Y., Parsons, C. G., and Liu, Y. F. (2003) Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 33364–33369
57. Tabrizi, S. J., Cleeter, M. W., Xuereb, J., Taanman, J. W., Cooper, J. M., and Schapira, A. H. (1999) Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann. Neurol.* **45**, 25–32
58. Bae, B. I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S. D., Moran, T. H., Montell, C., Ross, C. A., Snyder, S. H., and Sawa, A. (2005) p53 Mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* **47**, 29–41
59. Bezprozvanny, I., and Hayden, M. R. (2004) Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1310–1317
60. Gafni, J., and Ellerby, L. M. (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *J. Neurosci.* **22**, 4842–4849

Received for publication September 16, 2005.

Accepted for publication December 22, 2005.

6.2.2. Résultats

6.2.2.1. Confirmation de la potentialisation de l'excitotoxicité par l'inhibition du complexe II mitochondrial *in vivo*

Les résultats de cette étude confirment l'existence d'une potentialisation de la lésion induite par un agoniste des récepteurs NMDA, en terme de fréquence de lésion et de taille de lésion, lors d'une inhibition du complexe II respiratoire. Chez les animaux recevant du 3-NP seul, il n'y a pas de lésion en dessous d'une inhibition de 55% de la SDH. La dose de 40 nmole de quinolinate est toxique seule et le volume de lésion est multiplié par deux par l'inhibition de 50% de la SDH par le 3-NP.

6.2.2.2. Forte potentialisation de la mort cellulaire neuronale

L'étude de la lésion induite par le quinolinate à 40nmoles montre que la présence de 3-NP induit une augmentation de l'intensité de mort cellulaire de 9-10 fois, par rapport à la lésion induite par le quinolinate seul à la même dose. Cette potentialisation est très nettement visible lorsque l'inhibition de la SDH est comprise entre 35 et 50%. Cette mort cellulaire est de plus strictement restreinte aux neurones striataux et touche préférentiellement les MSN.

6.2.2.3. Le niveau d'inhibition du complexe II doit être supérieur à 35% et la potentialisation suit une loi de « tout ou rien »

Le niveau d'inhibition de la SDH nécessaire pour induire une potentialisation de l'excitotoxicité induire par le quinolinate subtoxique est d'environ 35% alors que l'inhibition de la SDH nécessaire pour induire une neurodégénérescence seule est de 55-60%. Nous n'avons pas pu démontrer que l'intensité de la lésion était corrélée au niveau d'inhibition de la SDH. Il semblerait plutôt qu'au-delà de 35 % d'inhibition de la SDH, la potentialisation se produise selon une loi du « tout ou rien ».

6.2.2.4. Le mécanisme de la potentialisation dépend d'une augmentation du calcium intracellulaire

Le mécanisme de la potentialisation de l'excitotoxicité par l'inhibition de la SDH est dépendant de l'augmentation du calcium intracellulaire. Cette augmentation de la concentration de calcium intracellulaire a été détectée indirectement par mesure spectrofluorimétrique de l'activité des calpaïnes *ex vivo* après injection de quinolinate dans le striatum des rats dont la SDH est partiellement inactivée par le 3-NP. Cette augmentation de l'activité des calpaïnes est plus flagrante si on observe par Western blot la protéolyse de fodrin, de l'huntingtine, de PSD-95 et de NR2B. De plus le profil de protéolyse de PSD-95

dans le striatum est proche de celui obtenu lors de la digestion d'un striatum contrôlé par la m-calpaïne et la μ -calpaïne. Ceci indiquerait que les deux isoformes seraient impliquées dans la potentialisation. La lésion excitotoxique induite par le quinolinate seul est associée à une tendance à l'augmentation de l'activité des calpaïnes. En effet, l'augmentation de l'activité des calpaïnes est significative si on regarde la protéolyse de fodrin en Western blot aussi bien par la disparition de la forme entière que par l'apparition du doublet de 150/145 kDa.

6.2.2.5. L'augmentation du calcium intracellulaire n'est pas consécutive à l'hyperactivation des récepteurs NMDA

L'augmentation du calcium intracellulaire dans la potentialisation peut provenir de trois phénomènes : l'augmentation de l'entrée du Ca^{2+} , la diminution de la sortie du Ca^{2+} ou la mauvaise gestion du calcium par les organites de stockage. L'activation des récepteurs NMDA est techniquement difficile à mettre en évidence *in vivo*.

En conséquence, nous avons utilisé la mesure de la capture du FDG en tant qu'index de l'activation des récepteurs NMDA. En effet, il a été démontré *in vivo* que l'activité glutamatergique est directement reliée à la capture du glucose majoritairement astrocytaire dans un rapport stoechiométrique 1/1 (Sibson et al. 1998; Attwell and Laughlin 2001; Bonvento et al. 2002). Nos résultats montrent que la capture du FDG par les striata injectés avec le PBS est la même avec ou sans inhibition de la SDH. L'administration du quinolinate à 40 nmoles augmente significativement la capture du FDG. Cette augmentation de capture du FDG n'est pas modifiée chez les animaux traités par le 3-NP. Ces résultats indiquent indirectement une absence d'hypersensibilité des récepteurs NMDA par l'inhibition de la SDH.

Pour renforcer l'étude de l'origine de l'élévation du calcium intracellulaire, nous avons étudié le mécanisme de la potentialisation sur un modèle de culture striatale, se rapprochant du modèle *in vivo*. On observe dans ce modèle une augmentation de l'activité de la calpaïne *in situ* en présence du quinolinate, significativement augmentée par le 3-NP à 75 μM . Dans ces conditions, l'inhibition de la SDH est d'environ 75%. Cette activité augmente avec la dose de quinolinate jusqu'à 1 mM où elle atteint un plateau impossible à dépasser même en présence de 3-NP. En parallèle la disparition de la forme entière de fodrin par l'ajout de quinolinate (5mM) est significativement augmentée par le 3-NP en western blot et le doublet 150/145 kDa est un peu augmenté. La toxicité du quinolinate (5mM) sur cette culture est multipliée par deux par le 3-NP (75 μM).

La mesure de la concentration de calcium intracellulaire neuronale par une sonde fluorescente, le Fura-2 indique que le niveau de base du calcium n'est pas modifié par le 3-NP. Le quinolinate augmente la concentration intracellulaire du calcium et l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium induite par le quinolinate est supérieure en présence de 3-NP. Enfin, nous avons déterminé que l'augmentation de calcium intracellulaire via les récepteurs NMDA n'est pas induite par une entrée accrue du calcium en présence de 3-NP. En effet, la quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entrée dans la cellule est moins importante en présence de 3-NP et de quinolinate qu'en présence de quinolinate seul. Ce serait donc la gestion du calcium intracellulaire qui est mise en cause dans la potentialisation et pas l'augmentation de l'influx calcique.

Dans l'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte, il est dit que la dysfonction mitochondriale est à l'origine de la diminution du taux d'ATP et que c'est cette diminution qui permet l'hypersensibilité des récepteurs NMDA au glutamate. Nous avons donc évalué le taux d'ATP dans les cultures en présence d'une inhibition de la SDH par 3-NP. Le taux d'ATP n'est pas modifié par le 3-NP donc l'hypersensibilité des récepteurs NDMA et la

diminution de l'efflux du calcium via les Ca^{2+} -ATPases ne doivent pas être impliquées dans l'augmentation du calcium intracellulaire. En effet l'hypersensibilité des récepteurs NMDA comme la diminution de l'efflux du calcium sont consécutives à la réduction du taux d'ATP.

6.2.3. Discussion

6.2.3.1. Confirmation de la potentialisation de l'excitotoxicité par l'inhibition de la SDH

Cette étude est en accord avec certains aspects des données obtenues par différentes équipes ayant étudié la potentialisation de la toxicité des excitotoxines (NMDA, AMPA) par des inhibiteurs du complexe II (Simpson and Isacson 1993; Greene and Greenamyre 1995a). Cependant, nous avons recherché dans notre étude à mieux caractériser la lésion tant au niveau histologique qu'au niveau biochimique. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation de la taille de la lésion mais aussi et surtout de la sévérité de la mort cellulaire, touchant préférentiellement les MSN. Un autre aspect novateur de l'étude résulte dans la mesure de l'atteinte mitochondriale requise pour que la potentialisation se produise. De plus, notre étude a identifié le calcium et la calpaïne comme étant les acteurs importants de la potentialisation. Enfin notre travail remet en cause le mécanisme de l'excitotoxicité indirecte (tel qu'il est couramment décrit) en démontrant que la dysfonction mitochondriale produite par le 3-NP n'augmente pas la sensibilité des récepteurs NMDA au quinolinate. Nos résultats suggèrent que la potentialisation résulte plutôt d'une anomalie de la gestion du calcium intracellulaire que d'une augmentation de l'entrée du calcium, contredisant ainsi les mécanismes décrits dans l'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte.

6.2.3.2. Caractérisation d'un mécanisme dépendant du calcium dans la potentialisation de l'excitotoxicité par l'inhibition de la SDH

Nos données montrent que le mécanisme de la potentialisation de l'excitotoxicité par l'inhibition de la SDH est dépendant de l'augmentation du calcium intracellulaire. Ceci est concordant avec les observations faites auparavant sur une culture striatale (Greene et al. 1998) et sur tranche corticostriatale (Calabresi et al. 2001). Notre étude a mis en évidence pour la première fois, l'activation des calpaïnes dans la potentialisation de l'excitotoxicité par l'inhibition de la SDH. Nous l'avons interprétée comme le reflet d'une élévation du calcium intracellulaire neuronal. En effet, cette activation est concomitante de la protéolyse de substrats exprimés exclusivement dans les neurones et notamment au niveau synaptique comme PSD-95, en fragments de poids identiques à ceux obtenus par la digestion d'homogénats de striatum par les enzymes purifiées. Il faut cependant noter que les calpaïnes peuvent aussi être activées par la réduction de l'expression des inhibiteurs endogènes comme la calpastatine (Squier et al. 1999) et Gas2 (Squier et al. 1999) ainsi que par les phospholipides, comme la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol (Pontremoli et al. 1985). La réduction de la concentration de la calpastatine est peu probable car des données du laboratoire indiquent que la transcription de la calpastatine dans le striatum n'est pas modifiée *in vivo* par l'inhibition de la SDH dans le modèle 3-NP chronique (données non publiées). Par ailleurs, les résultats des études de l'imagerie calcique par une sonde fluorescente sur les neurones en culture montrent une augmentation de la concentration cytosolique du Ca^{2+} .

Notre étude remet cependant en cause l'origine de l'augmentation du calcium intracellulaire. Elle confirme qu'il provient du milieu extracellulaire par l'intermédiaire des récepteurs NMDA, mais ne provient pas d'une augmentation de l'entrée du calcium induite par une hyperactivation des récepteurs NMDA ou d'autres récepteurs. En effet, l'ajout de 3-NP seul dans nos conditions n'augmente pas la concentration de calcium intracellulaire car le niveau de Fura-2 est similaire dans la condition PBS ou 3-NP avant l'ajout de quinolinate. Ceci est en accord avec le fait que le 3-NP seul n'induit pas d'augmentation de calcium intracellulaire dans les MSN en culture (Greene et al. 1998) comme dans les tranches corticales striatales (Calabresi et al. 2001). De plus, l'augmentation de l'influx calcique par les récepteurs NMDA tel qu'il est décrit dans l'hypothèse excitotoxique indirecte nécessiterait une diminution du taux de l'ATP et une dépolarisation de la membrane plasmique. Or le taux d'ATP n'est pas diminué par le 3-NP dans notre étude et la dépolarisation de la membrane plasmique est absente sur des tranches corticostriatales en présence de 3-NP à une concentration supérieure (300 μ M) à celle que nous avons utilisée (75 μ M) (Saulle et al. 2004).

Paradoxalement, dans notre étude, le quinolinate induit un influx calcique moindre en présence de 3-NP qu'en son absence. Ceci peut s'expliquer par le fait que le 3-NP puisse induire l'ouverture du PTP et l'accumulation rapide de calcium cytosolique dans les secondes suivant l'activation des récepteurs NMDA et permettant l'atteinte d'une concentration calcique cytosolique identique à celle du milieu extracellulaire freinant l'entrée de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les minutes suivantes. En effet, l'influx de calcium est le reflet de l'accumulation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pendant 10 minutes et nous observons une concentration intracellulaire calcique supérieure en présence de 3-NP par rapport à sans 3-NP, dès les premières minutes de l'activation des récepteurs NMDA. Par ailleurs la diminution de l'entrée du calcium via les récepteurs NMDA pourrait être consécutive à des modifications de perméabilité calcique des récepteurs NMDA, notamment par les calpaïnes. En effet, il a été observé *in vitro*, que l'augmentation de la phosphorylation des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA est reliée à la diminution de leur protéolyse par la calpaïne et à une augmentation de l'excitotoxicité (Bi et al. 1998). Dans notre étude, il est possible que la phosphorylation des sous-unités NR2B soit diminuée favorisant leur protéolyse par les calpaïnes, ce qui diminuerait leur perméabilité au calcium. En accord avec cette hypothèse, certaines souris transgéniques pour l'huntingtine, comme les souris N171Q82 et les souris R6/2 présentent des modifications des récepteurs NMDA et sont résistantes à l'excitotoxicité lors du vieillissement (Hansson et al. 1999). Ainsi, les souris N171Q82 présentent des modifications de la phosphorylation de NR1 qui seraient à l'origine d'une protection contre l'excitotoxicité (Jarabek et al. 2004). De même, chez les souris R6/2, la diminution de la transcription des sous-unités NR2A, NR2B de PSD-95 et de l'alpha-actinine (Luthi-Carter et al. 2003) seraient à l'origine d'une protection contre l'excitotoxicité.

Vu que l'entrée de calcium n'est pas augmentée dans notre étude, l'origine de l'augmentation du calcium intracellulaire serait donc la conséquence soit de la réduction de la sortie du calcium intracellulaire, soit de la perturbation du stockage du calcium dans les compartiments intracellulaires (Figure 72) (Nicholls and Ward 2000; Carafoli 2004).

La sortie du calcium pourrait être perturbée à deux niveaux : celui de la Ca^{2+} -ATPase et celui des échangeurs $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$. L'ATP n'étant pas modifié par l'inhibition de la SDH dans notre étude, l'ATPase devrait fonctionner normalement. Par contre, il est possible que les échangeurs $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ fonctionnent mal mais uniquement secondairement à l'excitotoxicité car l'inhibition seule de la SDH ne modifie pas le calcium intracellulaire. En effet, les calpaïnes sont capables de protéolyser l'isoforme NCX3 échangeurs $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ dans l'ischémie (Bano et al. 2005). Cela pourrait être un des mécanismes impliquant les calpaïnes dans la neurodégénérescence dans notre modèle. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre l'efflux calcique proportionnellement à l'influx calcique, observé *in vitro* avec et sans 3-

NP dans l'expérience avec le $^{45}\text{Ca}^{2+}$. L'hypothèse la plus probable est donc la dysfonction du stockage cellulaire du calcium. Parmi les compartiments de stockage du calcium intracellulaire, le réticulum endoplasmique (Paschen and Mengesdorf 2005) et la mitochondrie (Saris and Carafoli 2005), le compartiment mitochondrial est le mieux placé physiquement et physiologiquement pour induire cette perturbation. En effet, c'est la seule organelle présente en grande quantité au niveau du lieu d'activation des calpaïnes, c'est-à-dire au niveau de l'arborisation dendritique des MSN. Par ailleurs, plusieurs études ont montré *in vitro* que le calcium entrant par les récepteurs NMDA avait un accès privilégié à la mitochondrie (Peng et al. 1998).

Les autres points communs aux deux articles seront discutés dans la discussion générale.

6.2.4. Conclusion

L'inhibition chronique et modérée du complexe II mitochondrial de 45-50 % est suffisante pour exacerber *in vivo*, la neurodégénérescence des MSN par le quinolinate subtoxique.

Cette potentialisation suit une loi de type « tout ou rien » et n'apparaît qu'au-delà de 35% d'inhibition de la SDH.

Elle dépend de l'augmentation du calcium intracellulaire. Cependant, cette augmentation ne résulte pas d'une hypersensibilité des récepteurs NMDA au quinolinate. L'entrée de Ca^{2+} induite par l'activation des récepteurs NMDA n'est pas augmentée en présence d'une inhibition de la SDH, mais elle est suivie d'une mauvaise gestion intracellulaire, possiblement d'origine mitochondriale, menant à l'activation des calpaïnes.

7. Discussion générale

L'objectif de cette thèse était, dans un premier temps, de participer à la détermination des voies de mort cellulaires impliquées dans un modèle de la maladie de Huntington modélisé par une inhibition toxique de la SDH. Nous avons ainsi mis en évidence l'activation de deux types de protéases dans la neurodégénérescence striatale induite par l'inhibition de la SDH, les caspases et les calpaïnes. Certaines sont activées lors d'une inhibition chronique et forte de la SDH comme la caspase 9 et les calpaïnes et d'autres lors d'une inhibition transitoire de la SDH, comme les caspase 9, 8 et 3 et les calpaïnes. La première situation mime plus la dysfonction observée à un stade tardif de la maladie de Huntington alors que la seconde se rapprocherait plus d'une situation aiguë comme l'ischémie de l'artère irrigant le striatum. Cependant, un tel niveau d'inhibition de la SDH n'est pas observé dans les stades précoces de la maladie (Guidetti et al. 2001), c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier une situation d'inhibition chronique et non directement toxique de la SDH. Nous avons cherché à connaître l'influence d'une telle inhibition sur un mécanisme possiblement mis en jeu de façon précoce dans la maladie, l'excitotoxicité (Guidetti et al. 2004). Notre travail a permis de valider l'existence de l'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte (Albin and Greenamyre 1992; Beal 1992a, 1992b, 1992c; Greene and Greenamyre 1996), en remettant cependant en question une partie de son mécanisme.

L'ensemble de ces résultats nous amène à discuter plusieurs points importants concernant la neurodégénérescence dans la maladie de Huntington, ses mécanismes et leurs implications du point de vue de la thérapeutique. Les points de discussion suivant seront exposés :

- Le lien entre la mutation de l'huntingtine et l'inhibition de la SDH ;
- Le lien entre la mutation de l'huntingtine et l'excitotoxicité ;
- Les mécanismes d'activation possibles des protéases dans la maladie de Huntington ;
- Les conséquences de l'activation des caspases et des calpaïnes dans la maladie de Huntington ;
- Le calcium intracellulaire et la maladie de Huntington ;
- L'activation des calpaïnes dans d'autres types de neurodégénérescence associées à une dysfonction d'un complexe mitochondrial et/ou à une dysfonction de la transmission glutamatergique ;
- Les implications de ces études sur la thérapeutique de la maladie de Huntington.

7.1. *Quel est le lien entre la mutation de l'huntingtine et l'inhibition de la SDH*

L'huntingtine mutée et le 3-NP ont deux points communs déroutants, ils sont présents dans tous les types cellulaires mais induisent une toxicité préférentiellement striatale. Dans le cas du 3-NP, il est la cause de la neurodégénérescence striatale par l'inhibition de la SDH. Dans le cas de l'huntingtine mutée, la neurodégénérescence striatale est associée à une diminution de l'activité de la SDH (Brennan et al. 1985; Gu et al. 1996; Browne et al. 1997). Il est difficile de dire si la réduction de l'activité de la SDH chez le patient est consécutive à la neurodégénérescence ou si elle est un des mécanismes intracellulaires responsable de la mort neuronale. Chez le patient atteint de la maladie de Huntington, les études de l'activité des

complexes II/III ont montré une réduction de l'activité de 67% au niveau du putamen et de 29-59% dans le noyau caudé sans modification au niveau des plaquettes, à des stades assez tardifs de la maladie (Brennan et al. 1985; Gu et al. 1996; Browne et al. 1997). Plus récemment, une étude a montré l'absence de réduction de l'activité de la SDH au stade présymptomatique et au stade I, suivie d'une diminution de l'activité de la SDH de 20% dans le putamen au stade II pour atteindre une réduction de 64% dans le néostriatum (Guidetti et al. 2001). Cette réduction d'activité semble suivre la perte neuronale observée dans la pathologie (Vonsattel et al. 1985). Chez les souris KI exprimant l'huntingtine entière avec 48 ou 89 glutamines, l'activité de la SDH n'est pas réduite dans le striatum mais aucune perte neuronale n'est observée alors qu'une réduction du nombre d'épines dendritiques est observée dans le striatum (Guidetti et al. 2001). Ces données sont en faveur d'une diminution concomitante de l'activité de la SDH et du nombre de neurones.

Cependant, il a été récemment montré une réduction de l'expression des deux sous-unités catalytiques de la SDH dans le noyau caudé et le putamen des patients décédés à des stades symptomatiques I, II et II/III, alors qu'aucune modification est observée au niveau du cortex et du cervelet (Benchoua et al. 2006). Cette diminution d'expression est significative pour la sous-unité Ip dans le putamen (Benchoua et al. 2006). Il apparaît donc que la diminution de l'activité de la SDH chez le patient est consécutive à une diminution de l'expression de Ip et de Fp, indépendamment d'une diminution du nombre de mitochondries car l'expression du complexe V n'est pas modifiée (Benchoua et al. 2006). Pour déterminer si la diminution de l'expression de la SDH pouvait être un élément de la cascade de mort cellulaire neuronale, elle a été étudiée en parallèle de la mort dans un système de culture primaire exprimant une forme tronquée de l'huntingtine mutée. Dans ce système, l'expression d'Ip est diminuée dès la 5^{ème} semaine, celle de Fp dès la 6^{ème} semaine et l'activité de la SDH est diminuée à la 6^{ème} semaine, alors que la mort cellulaire n'est détectée qu'à partir de 6 semaines et l'activation de la caspase 3 à la 8^{ème} semaine (Benchoua et al. 2006). Il y a donc une diminution de l'activité de la SDH consécutive à la diminution de l'expression de Ip et de Fp, avant la mort neuronale et consécutivement à une modification post-transcriptionnelle car la transcription des 4 sous-unités n'est pas modifiée (Benchoua et al. 2006). Il y a bien une relation de cause à effet entre la diminution d'expression de la SDH et la mort cellulaire, car la surexpression de Ip ou de Fp dans la culture prévient la mort neuronale induite par l'huntingtine mutée, même si la perte du marqueur DARPP32 n'est pas reversée (Benchoua et al. 2006). Ces données sont concordantes avec l'observation de la diminution de l'activité du complexe II dans le striatum de 8 patients atteints de la maladie de Huntington, décédés au stades 0/1 (Seo et al. 2004).

Le mécanisme de diminution de l'expression des sous-unités Ip et Fp chez l'homme pourrait être consécutif à la diminution de la traduction de l'ARNm, à la réduction de l'import ou de l'assemblage du complexe mitochondrial, ou à une augmentation de la dégradation.

La diminution de la traduction de l'ARN de la sous-unité Ip serait possible via l'augmentation de la fixation de la protéine répresseur de la traduction IRP2 (Kim et al. 1995) au niveau des régions IRE (iron responsive element) de l'ARN (Gray et al. 1996). L'augmentation de la fixation de la protéine IRP2 sur l'ARN pourrait être consécutive à deux types de phénomènes dans la maladie de Huntington. Le premier est la présence d'anomalies de l'homéostasie du fer induite par l'inactivation de l'huntingtine (Hilditch-Maguire et al. 2000), élément régulant l'activité d'IRP2 (Guo et al. 1995b). Le second phénomène est la diminution de l'activité chymotrypsine du protéasome dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Huntington (Seo et al. 2004), possiblement à l'origine d'une diminution de la dégradation de IRP2 par le protéasome (Guo et al. 1995a).

La réduction de l'import ou de l'assemblage du complexe mitochondrial pourrait être consécutive à l'association de l'huntingtine mutée à la membrane mitochondriale (Panov et al.

2002; Choo et al. 2004) ou à une dysfonction des protéines chaperonnes comme hsp70 (Zhou et al. 2001).

L'augmentation de la dégradation de la SDH pourrait être consécutive l'augmentation de l'activité trypsine et chymotrypsine du protéasome, détectée dans le cortex et le striatum des souris transgéniques (Diaz-Hernandez et al. 2003). De plus, une augmentation de l'expression de LMP2 et LMP7, protéines de l'immunoprotéasome induite par les interférons, a été observée dans les neurones des souris transgéniques et dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Huntington (Diaz-Hernandez et al. 2003). Cependant, il faut noter que selon les paramètres utilisés pour observer l'activité du système ubiquitine-protéasome et les modèles observés, les résultats sont opposés, soit en faveur d'une réduction soit en faveur d'une augmentation de son activité (Valera et al. 2005).

7.2. Quel est le lien entre la mutation de l'huntingtine et l'excitotoxicité

L'hypothèse de l'implication de l'excitotoxicité dans la maladie de Huntington était sous-tendue initialement par l'observation de l'existence d'une dégénérescence des corps cellulaires avec une préservation axonale (DiFiglia 1990), constituant l'aspect typique de la mort excitotoxique induite par l'injection intrastriatale de kaïnate ou de quinolinate (Coyle et al. 1978). La disparition préférentielle des MSN en parallèle de la disparition des récepteurs NMDA dans le putamen des patients a appuyé fortement cette hypothèse (Young et al. 1988a; Arzberger et al. 1997). Les autres points en faveur de l'excitotoxicité induite par l'huntingtine sont les modifications observées au niveau des excitotoxines et celles observées au niveau des récepteurs.

7.2.1. Excitotoxines et mutation de l'huntingtine

La possibilité de l'existence d'une neurotoxine circulante dans la maladie de Huntington responsable de la neurodégénérescence a été mise en évidence par l'observation de la réduction de l'activité de la GAD au niveau d'explant de striatum de rat nouveau-nés en présence de sérum de patients atteints de la maladie de Huntington et en présence du liquide céphalorachidien d'un de ces patients (Perry et al. 1987). La déprotéinisation du sérum ne reversant pas l'effet toxique du sérum, la molécule circulante responsable serait une petite molécule non protéique (Perry et al. 1987). Par la suite, différentes équipes ont recherché la neurotoxine responsable parmi le glutamate, le quinolinate et la glycine. La première possibilité était l'augmentation de la concentration du glutamate mais elle ne semble pas modifiée, tout au moins au niveau du LCR des patients atteints de la maladie de Huntington (Nicoli et al. 1993).

La seconde possibilité était l'augmentation du quinolinate, autre excitotoxine endogène, mais les premières études n'ont pas mis en évidence cette augmentation ni dans le LCR (Schwarcz et al. 1988a) ni dans le cerveau (Heyes et al. 1991). Ceci est probablement dû à la difficulté technique d'obtenir des résultats reproductibles (Schwarcz et al. 1988a) car il a été mis en évidence une augmentation de 3 à 4 fois de la concentration du quinolinate dans le striatum et le cortex frontal des patients au stades 0 et 1 de la maladie de Huntington (Guidetti et al. 2004). Cette augmentation n'est pas détectée chez les patients à risque ni dans les stades 3 et 4 de la maladie, indiquant que le quinolinate pourrait avoir un rôle dans l'induction de la dégénérescence striatale (Guidetti et al. 2004). De plus, l'activité de l'enzyme de biosynthèse du quinolinate, la 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase (EC 1.13.11.6), est augmentée dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Huntington (Schwarcz et al. 1988b). Il reste donc à déterminer le lien entre l'huntingtine mutée et le métabolisme du tryptophane en

NADH, à l'origine de l'augmentation de la 3-hydroxykynurénine, du quinolinate et de l'activité de la 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygénase. Une possibilité serait l'augmentation de la production de NADH pour apporter les électrons nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire, au niveau du complexe I afin de contrebalancer la diminution de l'activité du complexe II prenant en charge les FADH₂, observée précocement dans le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington (Seo et al. 2004).

La dernière possibilité est l'existence de l'augmentation de la concentration de la glycine observée dans le LCR des patients (Nicoli et al. 1993), coagoniste des récepteurs NMDA. En effet la glycine est un agoniste des sous-unité NR1 des récepteurs NMDA qui permet l'ouverture du canal lors de la fixation du glutamate sur une sous-unité NR2 (Cull-Candy et al. 2001) ou qui exerce une activité agoniste directe sur les récepteurs NR1/NR3 (Chatterton et al. 2002). Il a récemment été montré que la glycine était une neurotoxine capable d'induire la mort de cellules d'hippocampe. Cette étude a notamment montré que l'hypoxie ou l'hypoglycémie subtoxique permettraient d'induire une neurodégénérescence hippocampale avec une concentration de glycine proche de celle observée dans l'ischémie cérébrale (Barth et al. 2005). Au niveau du striatum, la sous-unité NR3s est exprimée chez le rat, donc ce mécanisme d'excitotoxicité n'est pas exclu (Sun et al. 1998).

7.2.2. Anomalies des Récepteurs NMDA, un effet direct de l'huntingtine mutée

En dehors d'anomalies excitotoxiques représentées par une augmentation de la concentration d'une excitotoxine, les récepteurs peuvent être impliqués directement dans la toxicité de l'huntingtine mutée. La levée du blocage des récepteurs NMDA par le Mg²⁺ est l'hypothèse principale permettant d'expliquer l'activation des récepteurs dans le cas d'un déficit énergétique en présence d'une concentration normale de glutamate (Albin and Greenamyre 1992; Beal 1992a, 1992c). Cependant, il n'est pas exclu que l'huntingtine puisse intervenir directement au niveau de la signalisation des récepteurs NMDA et augmenter ainsi la toxicité du glutamate libéré par les afférences corticostriatales. En effet, la mutation entraîne une diminution de l'interaction entre PSD-95 et l'huntingtine permettant une augmentation de l'interaction des récepteurs NMDA avec PSD-95 (Sun et al. 2001). Or il a été prouvé que l'abolition de l'interaction entre les récepteurs NMDA et PSD-95 est une stratégie neuroprotectrice efficace contre l'excitotoxicité par la dissociation de la production du NO de l'activation des récepteurs (Sattler et al. 1999). D'autre part la mutation de l'huntingtine est associée à une augmentation du taux de phosphorylation de NR2B par la Src (Song et al. 2003). Or, l'augmentation de l'état de phosphorylation des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs par les tyrosine-kinases Fyn et Src est reliée à une augmentation de l'interaction avec PSD-95 et la spectrine (Rong et al. 2001). En effet, l'inhibition de la Src ou la mutation des tyrosines phosphorylées par la Src permet de protéger les cellules de la mort cellulaire induite par l'huntingtine mutée (Song et al. 2003). En complément, les tranches corticostriatales de souris YAC72 présentent une plus grande amplitude de potentiel postsynaptique excitateur via l'activation des récepteurs NMDA du sous-type NR2B par rapport à celle des souris sauvage, en absence de différence de libération du glutamate par les afférences corticostriatales (Li et al. 2004a). En parallèle, cette activation des récepteurs NMDA NR1/NR2B au niveau des MSN s'accompagne d'une augmentation du calcium intracellulaire cytosolique et mitochondrial chez les souris YAC72 (Bezprozvanny and Hayden 2004).

7.3. Mécanisme d'activation des protéases dans la maladie de Huntington

Nos études sur les modèles 3-NP montrent que la dérégulation calcique joue un rôle central d'activateur des calpaïnes. Elles pourraient aussi activer les caspases. Dans la maladie de Huntington, d'autres mécanismes pourraient contribuer à l'activation des protéases.

7.3.1. Dérégulation calcique

Plusieurs similitudes relient la maladie de Huntington, les modèles génétiques et les modèles phénotypiques quant aux protéases activées, les caspases et les calpaïnes. Les mécanismes de leur activation pourraient être associés en partie à une dérégulation calcique. En premier lieu, que ce soit l'huntingtine mutée (Bezprozvanny and Hayden 2004; Tang et al. 2005), le 3-NP (Nasr et al. 2003) ou les analogues du glutamate (Hartley et al. 1993; Eimerl and Schramm 1994), des problèmes d'augmentation du calcium intracellulaire sont observés. Dans les trois cas, la mitochondrie semble impliquée dans la gestion du calcium (Peng et al. 1998; Panov et al. 2002; Maciel et al. 2004; Tang et al. 2005). Or le calcium est impliqué dans l'activation des calpaïnes et dans l'ouverture du PTP et l'activation de la cascade apoptotique comprenant la libération du cytochrome c (Brustovetsky et al. 2002), l'activation de la procaspase 9 en présence d'APAF1 (apoptosis associated factor1), la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 3 (Green and Reed 1998).

7.3.2. Activation des calpaïnes

Le mécanisme d'activation principal des calpaïnes est leur activation par l'augmentation du calcium intracellulaire permettant leur autoprotéolyse et la protéolyse consécutive d'une foule de substrats impliqués dans différentes fonctions cellulaires (Sorimachi et al. 1997). L'augmentation de la concentration du calcium cytosolique est observée dans les deux types de modèles phénotypiques (Hartley et al. 1993; Eimerl and Schramm 1994; Nasr et al. 2003) et dans la maladie de Huntington (Bezprozvanny and Hayden 2004; Tang et al. 2005).

Un autre mécanisme d'activation possible des calpaïnes est la diminution de l'expression de la calpastatine, l'inhibiteur endogène spécifique (Murachi et al. 1980). De façon intéressante, la caspase 3 active peut protéolyser la calpastatine et induire l'activation des calpaïnes (Wood and Newcomb 1999; Kato et al. 2000).

Le dernier mécanisme d'activation des calpaïnes est implique les phospholipides (Pontremoli et al. 1985) mais l'implication de ce type de mécanisme dans les modèles que nous avons étudiés ou dans la maladie de Huntington, reste très spéculative.

7.3.2.1. Limites techniques de l'étude de l'activation des calpaïnes

Les calpaïnes sont activées dans les modèles phénotypiques de la maladie de Huntington et différents éléments sont en faveur de leur activation dans la maladie de Huntington. Avant d'aborder ces différents éléments, il est important de prendre en compte les limites des différentes techniques utilisées pour étudier les calpaïnes. En effet, l'augmentation de l'expression des calpaïnes ne signifie pas nécessairement une augmentation

de leur activité alors que l'autoprotéolyse des calpaïnes est un bon témoin de leur activation. L'autoprotéolyse des calpaïnes dans les échantillons de rat est difficile à mettre en évidence en western blot. La mise en évidence de leur activité *ex vivo* sur des substrats fluorimétriques est dépendante de leur affinité pour le substrat ajouté et des substrats et inhibiteurs endogènes associés ce qui peut expliquer la difficulté de leur mise en évidence. Au contraire, l'observation de substrats protéolysés en fragments de poids moléculaire identifiables comme spécifiques d'une protéolyse par les calpaïnes constitue un élément solide de leur activation. Par contre cette technique ne donne pas d'indication sur le moment de l'activation des calpaïnes car il faut attendre l'accumulation des fragments pour pouvoir les observer. Enfin, seule l'observation d'une diminution de la mort neuronale lors de l'inhibition de l'activité des calpaïnes constitue la preuve de son intervention dans le mécanisme de neurodégénérescence.

7.3.2.2. Activation des calpaïnes dans la maladie de Huntington et isoformes impliquées

Dans les modèles phénotypiques induits par une toxine mitochondriale, comme le 3-NP, la calpaïne contribue à la mort cellulaire nécrotique *in vitro*, de cellules hippocampales (Pang et al. 2003) et de cellules striatales mais n'est pas impliquée dans la mort des cellules corticales préservées au début de la maladie (Galas et al. 2004). Dans les modèles excitotoxiques *in vitro*, la dégradation de la spectrine, témoin de l'activation des calpaïnes, est observée dans les tranches d'hippocampe en présence d'une activation des récepteurs NMDA (Seubert et al. 1988) et dans les cellules striatales en présence de quinolinate (Jacquard et al. 2006). Dans différents modèles phénotypiques cellulaires, l'inhibition des calpaïnes est protectrice, notamment lors de l'inhibition de la transcription de la calpaïne I par un antisens sur les tranches d'hippocampe en présence de NMDA (Bednarski et al. 1995) ou lors de l'inhibition de l'activité des calpaïnes en présence de kaïnate ou de NMDA sur les cellules de cervelet et d'hippocampes (Brorson et al. 1995), sur les cellules corticales en présence de kaïnate (Cheng and Sun 1994).

Dans le modèle de dysfonction mitochondriale induite par le 3-NP sur des culture striatale en présence de quinolinate, la calpaïne est activée mais il n'est pas prouvé qu'elle intervient dans le mécanisme de mort cellulaire (Jacquard et al. 2006). Cependant, le 3-NP ajouté sur des cellules striatales de souris KI pour l'huntingtine mutée augmente la mort cellulaire et l'orientent vers la nécrose par rapport aux cellules striatales contrôles (Ruan et al. 2004). Ceci est en faveur d'une orientation de la mort striatale impliquant la calpaïne lors d'une dysfonction mitochondriale ajoutée à une dysfonction des récepteurs NMDA.

Dans les modèles phénotypiques *in vivo*, le 3-NP induit une mort neuronale dépendante de la calpaïne car en partie reversée par le CI-1 et la forme activée de la μ -calpaïne a été détectée dans le striatum des rats (Bizat et al. 2003a). Dans ce modèle, le Z-VAD-FMK et QVD-OPH ont aussi un effet protecteur partiel indiquant l'intervention de différentes voies de mort étroitement intriquées qui peuvent être modifiées par l'inhibition des calpaïnes ou des caspases (Yang et al. 2004; Bizat et al. 2005). Dans le modèle quinolinate, les calpaïnes semblent activées dans les neurones striataux car la protéolyse de la spectrine est observée (Jacquard et al. 2006). Dans ce même modèle, présentant en plus une dysfonction mitochondriale induite par le 3-NP, l'activation des calpaïnes est fortement augmentée et devient détectable en fluorimétrie en plus de l'observation de la protéolyse de différentes protéines synaptiques comme la spectrine, PSD-95, NR2B et l'huntingtine, indiquant une activation de la m-calpaïne et de la μ -calpaïne (Jacquard et al. 2006).

Dans les modèles génétiques de la maladie de Huntington, une activation des calpaïnes parallèle à la protéolyse de l'huntingtine a été détectée dans les souris HdhQ92 après une

ischémie cérébrale (Namura et al. 2002). Dans les modèles transgéniques ne comportant pas de dégénérescence striatale comme les souris R6/2 et N171-Q82 à des stades symptomatiques, des études récentes menées au laboratoire n'ont pas mis en évidence une augmentation nette de l'activité des calpaïnes. Cependant, certains éléments sont en faveur de l'implication des calpaïnes dans les modèles génétiques. En effet, dans les souris R6/2 à un stade symptomatique, nous avons observé que le striatum est l'unique région dans laquelle l'activité des calpaïnes est inversement corrélée à celle de la caspase 3, au contraire du cervelet et du cortex. Ceci indique la possibilité de la régulation de l'activité de la caspase 3 par la calpaïne, décrite dans le modèle 3-NP (Bizat et al. 2003b). En parallèle, une dérégulation de la transcription des isoformes 5, 7 et 10 serait observée chez les souris R6/2 (Gafni et al. 2004). Les souris KI homozygotes, à un stade symptomatique, présentent différents signes d'activation des calpaïnes dans le striatum comme la présence de fragments de protéolyse de l'huntingtine compatibles avec une protéolyse par les calpaïnes et la présence d'un fragment de fodrin en plus grande quantité que dans les contrôles (Gafni et al. 2004). Chez ces souris, l'expression de la calpaïne 5 est augmentée dans le striatum donc cette isoforme pourrait intervenir dans la maladie de Huntington (Gafni et al. 2004).

Chez l'homme, trois éléments sont en faveur de l'activation des calpaïnes dans la maladie de Huntington. En effet, le noyau caudé des patients comporte une grande quantité de la forme protéolysée de la petite sous-unité de la calpaïne, témoin indiscutable de l'activation des calpaïnes, qui s'accompagne de l'augmentation de l'expression de la μ -calpaïne et de la m-calpaïne par rapport au noyau caudé de patients témoins (Gafni and Ellerby 2002).

On peut donc conclure que l'activation des calpaïnes observée dans la maladie de Huntington impliquerait les isoformes 1, 2 ou 5.

7.3.3. Activation de la caspase 9

L'activation de la caspase 9 requiert la sortie du cytochrome c du compartiment intermembranaire mitochondrial au cytosol. La relocalisation cytosolique du cytochrome c a été observé dans le modèle 3-NP *in vitro* (Galas et al. 2004) et *in vivo* (Antonawich et al. 2002; Bizat et al. 2003b; Yang et al. 2004), dans des cultures primaires d'hippocampe en présence de NMDA (Lankiewicz et al. 2000) et dans différentes lignées cellulaires exprimant l'huntingtine mutée (Li et al. 2000b; Jana et al. 2001). De plus la mutation de l'huntingtine est directement associée à une augmentation de perméabilité de la membrane mitochondriale associée à une libération de cytochrome c (Choo et al. 2004). Chez le patient atteint de la maladie de Huntington, il semble y avoir une augmentation d'immunoréactivité dans les MSN et une relocalisation cytosolique du cytochrome c dans les stades avancés de la maladie (Kiechle et al. 2002).

L'activation de la caspase 9 a été observée dans les modèles 3-NP *in vivo* (Bizat et al. 2003a; Yang et al. 2004) et l'huntingtine a une fonction inhibitrice de l'activation de la procaspase 9 en caspase 9, potentiellement altérée par la mutation (Rigamonti et al. 2001). D'autre part l'immunoréactivité de la caspase 9 active est augmentée dans le striatum lors de stades tardifs de la maladie de Huntington (Kiechle et al. 2002).

7.3.4. Activation de la caspase 3

Il a été montré *in vivo* que l'activation de la caspase 3 est masquée par l'activation de la calpaïne, notamment dans le modèle 3-NP (Bizat et al. 2003a; Bizat et al. 2003b). Apparemment cette protéolyse du fragment de la forme active de la caspase 3 entraîne

l'inactivation de la caspase 3 *in vitro* et *in vivo* (Lankiewicz et al. 2000; Bizat et al. 2003b) mais la protéolyse de la procaspase 3 par la calpaïne peut aussi augmenter son activation (Blomgren et al. 2001). Donc tout dépend du moment où la calpaïne est activée, dans le cas d'une activation précédant celle de la caspase 3, elle peut l'activer alors que dans le cas contraire, la calpaïne serait plutôt activée par la caspase 3 via la protéolyse de son inhibiteur endogène (Wood and Newcomb 1999; Kato et al. 2000), ce qui faciliterait la protéolyse de l'huntingtine par les calpaïnes et augmenterait potentiellement la toxicité de l'huntingtine (Kim et al. 2001b). Dans les modèles d'excitotoxicité *in vivo*, l'activation de la caspase 3 a été mise en évidence indirectement par l'observation de la protéolyse de IkappaB-alpha (Qin et al. 2000) et plus récemment par fluorimétrie après une injection intrastriale de quinolinate chez le rat (Perez-Navarro et al. 2005). En contradiction avec ces données, nous n'avons pas observé l'activation de la caspase 3 dans le modèle quinolinate ni en western blot ni en en fluorimétrie. Par contre, chez les souris YAC72, une protéolyse de l'huntingtine par la caspase 3 ou la caspase 2 précède la mort cellulaire dans le striatum (Wellington et al. 2002) et l'huntingtine a une fonction protectrice vis-à-vis de l'activation de la caspase 3 *in vitro* (Rigamonti et al. 2000). Enfin, l'activation de la caspase 3 a été observée dans les lymphoblastes de patients après un stress (Sawa et al. 1999) et la présence de fragments de l'huntingtine protéolysée par la caspase 3 ou la caspase 2 dans le striatum des patients, est en faveur de l'activation de l'une et/ou l'autre enzyme (Wellington et al. 2002).

7.3.5. Activation de la caspase 8

La caspase 8 est impliquée dans la mort cellulaire extrinsèque, mise en jeu dans l'activation du récepteur du TNF ou lors de l'activation du système Fas/Fas ligand au niveau de la membrane plasmique des leucocytes (Cohen 1997). Elle est activée par sa liaison à un domaine DED (death effector domain) et permet l'activation *in vitro* des caspases 1 à 7 et 9 et 10 (Cohen 1997). Elle est activée dans les modèles 3-NP *in vivo* et associée à la protéolyse de t-Bid (Bizat et al. 2003a; Yang et al. 2004) mais ne semble pas activée dans les modèles d'excitotoxicité, lors de l'ajout de NMDA sur des cellules de rétines, dont la mort est reversée par le MK-801 ou l'inhibiteur de la caspase 1 mais pas celui de la caspase 8, IETD-CHO (Kwong and Lam 2000). L'expression d'un fragment protéique avec une polyglutamine de 79 acides aminés est associée à une activation de la caspase 8 et à une mort cellulaire, reversée par l'expression d'une forme inactivée de la caspase 8 (Sanchez et al. 1999). En parallèle, il a été montré une relocalisation de la caspase 8 dans le noyau caudé des patients atteints de la maladie de Huntington au niveau de la fraction protéique insoluble dans les détergents, indiquant une relocalisation possible au niveau du noyau (Sanchez et al. 1999), compatible avec l'observation de l'association de l'huntingtine mutée avec la caspase 8 et la caspase 10 dans les agrégats nucléaires (U et al. 2001). L'activation de la caspase 8 dans le modèle 3-NP n'est pas élucidée mais il est possible qu'elle soit consécutive à l'activation de la jnk (Garcia et al. 2002), identifiée comme l'activateur de la caspase 8 dans l'ischémie transitoire des neurones CA1 hippocampaux (Carboni et al. 2005). Dans la maladie de Huntington, l'activation de la caspase 8 est probablement consécutive à sa liaison à Hipp1 (Hip-1 protein interactor). En effet, il a été démontré *in vitro* que l'huntingtine mutée interagit plus faiblement avec Hipp1 en fonction de la longueur de l'expansion polyglutamine, permettant ainsi sa liaison à Hipp1, formant un complexe d'activation de la caspase 8 par son domaine DED (Gervais et al. 2002). La caspase 8 active permettrait ensuite l'activation de la procaspase en caspase 3 car elle est inhibée par l'usurpine (Gervais et al. 2002). Enfin, il a récemment été démontré que la surexpression d'hippi dans une lignée cellulaire, induit une mort cellulaire associée à une activation de la caspase 1 et de la caspase 8, suivie de l'activation de la caspase 3 et de la fragmentation nucléaire d'une part, et de la protéolyse de

Bid en t-Bid permettant la libération du cytochrome c dans le cytosol, et l'activation de la caspase 9, d'autre part (Majumder et al. 2006). Dans cette étude, la mort cellulaire est aussi associée à deux autres voies, la libération d'AIF à partir de la mitochondrie, exerçant une toxicité nucléaire et la diminution de l'expression de bcl-2, protéine antiapoptotique et de 4 gènes nucléaires codant des sous-unités du complexe I (ND1 et ND4) et du complexe II respiratoire (SDHA et SDHB) (Majumder et al. 2006).

7.3.6. Activation de la caspase 1, 2, 6, 7 et 10

Les autres caspases potentiellement impliquées dans la maladie de Huntington, non observées dans les modèles phénotypiques, sont la caspase 1, la caspase 2, la caspase 6 et la caspase 10.

La caspase 1 a été associée précocement à la mort neuronale des vertébrés (Gagliardini et al. 1994) et interviendrait dans la mort induite par privation en facteur trophique comme IGF-1 (Jung et al. 1996). Trois éléments sont en faveur de l'intervention de la caspase 1 dans la maladie de Huntington. Tout d'abord, il a été montré que le croisement des souris R6/2 avec des souris exprimant la caspase 1 inactivée, améliore la survie des souris et que la forme active de la caspase 1 est présente dans le striatum des patients à un stade tardif (Ona et al. 1999). Par la suite, il a été montré que la présence de l'huntingtine mutée au niveau du noyau était associée *in vitro* à l'augmentation de l'expression de la caspase 1 qui conduit à l'activation de la caspase 3 (Li et al. 2000b). Enfin, il a été montré que la minocycline avait un effet neuroprotecteur via la diminution de l'expression de la caspase 1 et de la caspase 3 chez les souris R6/2 (Chen et al. 2000). Elle pourrait être activée par Hippin (Majumder et al. 2006).

La caspase 2 a été identifiée à l'origine comme une caspase impliquée lors du développement du cerveau chez la souris (Kumar et al. 1994). Elle serait activée par la caspase 1 ou la caspase 3 (Cohen 1997). L'expression d'un dominant négatif de la caspase 2 protège totalement les neurones striataux des souris YAC72 de la mort induite par l'huntingtine mutée et l'expression de la caspase 2 est augmentée dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Huntington (Wellington et al. 2002). En parallèle la caspase 2 colocalise avec l'huntingtine mutée dans le corps cellulaire et les neurites des neurones de souris YAC72 (Hermel et al. 2004).

La caspase 6 serait impliquée dans la protéolyse de l'huntingtine mutée (Wellington et al. 1998; Wellington et al. 2000; Gafni et al. 2004) et l'inactivation de la caspase 6 bloque partiellement les neurones striataux des souris YAC72 de la mort induite par l'huntingtine mutée (Hermel et al. 2004). De plus, chez les patients, une augmentation d'immunoréactivité de la caspase 6 active a été détectée dans les neurones striataux (Hermel et al. 2004).

La caspase 7 est capable de protéolyser l'huntingtine et elle colocalise avec l'huntingtine mutée dans le réticulum des neurones de souris YAC72 (Hermel et al. 2004).

La caspase 10 est associée à l'huntingtine mutée dans les agrégats nucléaires (U et al. 2001).

7.4. Conséquences de l'activation des caspases sur la mort cellulaire dans la maladie de Huntington

L'intervention des caspases dans la neurodégénérescence striatale observée dans la maladie de Huntington, est corroborée par l'observation de leur activation dans différents modèles de la pathologie. Dans ces modèles, le mécanisme de mort cellulaire mis en jeu par les caspases est de deux types. Le premier mécanisme est la protéolyse de l'huntingtine mutée par les caspases (paragraphe 2.10.1) (Qin and Gu 2004) en fragments N-terminaux toxiques et

la protéolyse de l'huntingtine normale en fragments ayant pour conséquence une perte des fonctions de la protéine. Le second mécanisme est la dégradation d'autres substrats cellulaires par ces deux types de protéases aboutissant à la mort neuronale (Wang 2000).

7.4.1. Protéolyse de l'huntingtine mutée par les caspases

La protéolyse de l'huntingtine par les caspases est en effet une des causes de la neurodégénérescence car elle précède la mort cellulaire (Wellington et al. 2002) et l'inhibition des caspases est capable de prévenir la protéolyse et la toxicité (Wellington et al. 2000).

La protéolyse de l'huntingtine par les caspases 2, 3, 6, et 7 (paragraphe 2.10.1) aurait lieu dans les neurites par la caspase 2, dans le corps cellulaire par la caspase 2, vers la membrane cellulaire neuronale par la caspase 3 et dans le réticulum endoplasmique par la caspase 7 (Kim et al. 2001b; Hermel et al. 2004). Les fragments toxiques N-terminaux formés par la protéolyse de l'huntingtine mutée vont induire une toxicité neuronale au niveau de différents compartiments cellulaires des MSN comme le noyau et les neurites, sous forme soluble (Saudou et al. 1998) ou inclus dans les agrégats (DiFiglia et al. 1997).

La protéolyse de l'huntingtine normale par les caspases pourrait de plus induire la neurodégénérescence par la perte des fonctions de l'huntingtine comme le rôle antiapoptotique (Rigamonti et al. 2000; Rigamonti et al. 2001), la transcription (Cha et al. 1998; Cha et al. 1999; Luthi-Carter et al. 2000; Chan et al. 2002; Luthi-Carter et al. 2002; Sipione et al. 2002; Borovecki et al. 2005), le transport intracellulaire (Crosby 2003) et la transmission synaptique (Metzler et al. 1999).

7.4.2. Protéolyse d'autres substrats cellulaires par les caspases

La mort cellulaire induite directement par les caspases effectrices peut faire intervenir la caspase 3, la caspase 6 et la caspase 7 (Thornberry and Lazebnik 1998), toutes les trois potentiellement activées dans la maladie de Huntington. Les mécanismes de mort cellulaire apoptotiques font intervenir dans la phase finale, la dégradation de protéines de survie cellulaire, l'activation d'endonucléases, la dégradation de protéines structurales nucléaires et du cytosquelette et la dégradation de protéines de réparation de l'ADN (Fischer et al. 2003).

7.4.2.1. Protéolyse de protéines de survie cellulaire par les caspases

La dégradation de protéine de survie cellulaire Bcl-2 a été observée chez les souris R6/2 et le croisement de souris surexprimant Bcl-2 permet l'allongement de la durée de vie des souris (Zhang et al. 2003). De même dans un modèle d'excitotoxicité induite par le quinolinate, les MSN ont une immunoréactivité diminuée pour Bcl-2 (Liang et al. 2005). Au contraire dans les modèles de mort cellulaire induite par le 3-NP, l'expression de Bcl-2 est augmentée (Vis et al. 2001; Antonawich et al. 2002), certainement par le fait d'une activation des calpaïnes responsable de l'inactivation de la caspase 3 (Bizat et al. 2003b). Bcl-2 et Bcl-X_L sont des protéines inhibant la translocation du cytochrome c dans le cytosol, permettant le blocage de l'activation de la voie caspase 9 (Kluck et al. 1997). Or, le cytochrome c est libéré dans le cytosol dans le modèle 3-NP chronique (Bizat et al. 2003b) et dans le cerveau des patients Huntington à un stade avancé (Kiechle et al. 2002). D'après ces observations, la

translocation du cytochrome c dans le cytosol des MSN du striatum de malades atteints de la maladie de Huntington pourrait être consécutive à une protéolyse de Bcl-2 et de Bcl-X_L par les caspases. Cette hypothèse est en outre supportée par le fait que la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-X_L participe à la protection de la mort cellulaire induite par les polyglutamines (Sanchez et al. 1999).

7.4.2.2. Activation d'endonucléases par les caspase

La protéolyse d'ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase) a été observé dans une culture de lignée cellulaire N2A exprimant l'huntingtine mutée (Wang et al. 1999). ICAD est un inhibiteur de l'activation des endonucléases, protéolysé par la caspase 3 dans la phase terminale de l'apoptose, et permettant ainsi la fragmentation de l'ADN (Sakahira et al. 1998). Dans la maladie de Huntington, la protéolyse d'ICAD n'a pas été évaluée mais une fragmentation de l'ADN est observée dans le striatum de différents modèles de la maladie de Huntington. En effet, le marquage TUNEL représentatif de la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose et de la nécrose est positif dans les modèles 3-NP (Dautry et al. 2000; Ouary et al. 2000; Kim and Chan 2001; Vis et al. 2001), les modèles quinolinate et dans un modèle murin transgénique (Reddy et al. 1998). Le marquage TUNEL a en outre été observé dans le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington (Dragunow et al. 1995; Portera-Cailliau et al. 1995; Thomas et al. 1995; Butterworth et al. 1998), démontrant la possibilité d'une participation des caspases à la protéolyse d'ICAD dans la maladie de Huntington.

7.4.2.3. Dégradation de protéines structurales par les caspases

La dégradation de protéines nucléaires comme la lamine B a été observée dans un modèle *in vitro* de la maladie de Huntington. Elle est reversée par l'inhibition des caspases (Wang et al. 1999). La lamine B est un composant de l'enveloppe nucléaire qui, sous forme protéolysée, est impliquée dans la facilitation des événements apoptotiques nucléaires, comme la dégradation de l'ADN (Rao et al. 1996). En effet la mutation de la lamine entraîne un retard dans la mort cellulaire avec une absence de condensation de la chromatine et de rétrécissement nucléaire, caractéristiques de l'apoptose (Rao et al. 1996). L'observation de la condensation nucléaire dans un modèle transgénique de la maladie de Huntington et surtout dans le striatum des patients décédés indique indirectement la possibilité d'une protéolyse de la lamine B dans la maladie de Huntington (Turmaine et al. 2000). Ceci indique que la dégradation de la lamine B par les caspases pourrait contribuer à la mort striatale dans la maladie de Huntington.

La dégradation de fodrin en un fragment de 120 kDa (Wang 2000) caractéristique de la protéolyse par la caspase 3 a été mise en évidence dans le modèle 3-NP aigu de la maladie de Huntington (Bizat et al. 2003b). Ceci concorde avec l'hypothèse qu'un déficit métabolique aigu et transitoire est associé à l'activation des caspases. En effet l'activation de la caspase 3 et la protéolyse de fodrin par la caspase 3 est aussi observée dans les atteintes neurologiques aiguës comme dans un modèle d'ischémie cérébrale (Shackelford et al. 1999) et de lésion de la moëlle épinière (Springer et al. 1999). Par contre, la protéolyse de fodrin par la caspase 3 n'est pas observée dans le modèle 3-NP chronique (Bizat et al. 2003b) ou dans le phénomène de potentialisation de l'excitotoxicité par l'inhibition chronique de la SDH (Jacquard et al. 2006), deux modèles plus représentatifs de la maladie de Huntington dans laquelle la diminution de l'activité de la SDH est progressive et partielle. Ceci indique que si la protéolyse de fodrin participe à la mort striatale dans la maladie de Huntington, elle est plutôt le fait de l'activation des calpaïnes (voir paragraphe suivant).

7.4.2.4. Dégradation des enzymes de réparation de l'ADN par les caspases

La protéolyse de PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) a été observée dans un modèle cellulaire exprimant une expansion de polyglutamine (Miyashita et al. 1999). La protéolyse en un fragment N-terminal a une activité proapoptotique par l'inhibition de la réparation de l'ADN (D'Amours et al. 2001). Au contraire, l'augmentation de l'activité de PARP s'accompagne d'une déplétion en NAD, nécessaire pour catalyser la synthèse du polyADP ribose ce qui entraîne une diminution de l'ATP pour régénérer le NAD et un phénomène de nécrose (Ha and Snyder 1999). Chez le patient atteint de la maladie de Huntington, la protéolyse de la PARP ne semble pas mise en jeu mais l'augmentation de son expression est observée (Vis et al. 2005). Cette augmentation de l'expression de PARP dans la maladie de Huntington est en défaveur de la protéolyse par la caspase 3 et de l'activation de la caspase 3 dans la maladie.

En conclusion, l'intervention des caspases dans la formation de fragments toxiques de l'huntingtine mutée semble acquise. Cependant, l'intervention des caspases dans la protéolyse de protéines de survie cellulaire (Bcl-2 et Bcl-X_L), l'activation d'endonucléases, la dégradation de protéines structurales nucléaires (Lamine B) et du cytosquelette (fodrin) et la dégradation de protéines de réparation de l'ADN (PARP), n'est pour l'instant que corroborée par des évidences indirectes chez l'homme et doit être investiguée plus précisément.

7.5. Conséquences de l'activation des calpaïnes sur la mort cellulaire dans la maladie de Huntington

Les calpaïnes seraient impliquées dans deux types de mécanismes conduisant à la neurodégénérescence striatale observée dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Huntington. Le premier est la protéolyse de l'huntingtine mutée et celle de l'huntingtine normale par les calpaïnes aboutissant à la formation de fragments toxiques N-terminaux et l'inactivation de l'huntingtine normale. Le second mécanisme de toxicité des calpaïnes est la protéolyse d'autres protéines impliquées dans la mort cellulaire. La mort cellulaire induite directement par la dégradation de substrats cellulaires autre que l'huntingtine par les calpaïnes pourrait faire intervenir la protéolyse de protéines de survie cellulaire Bcl-X_L, l'activation de protéines proapoptotiques comme Bax, l'activation de protéases impliquées dans la mort cellulaire comme la caspase 12 et les cathepsines, la dégradation de protéines structurales nucléaires et du cytosquelette (fodrin), et la dégradation des protéines synaptiques de la signalisation NMDA.

7.5.1. Protéolyse de l'huntingtine mutée par les calpaïnes

La protéolyse de l'huntingtine par les calpaïnes est en effet une des causes de la neurodégénérescence car mutation des sites de protéolyse de l'huntingtine par les calpaïnes s'accompagne d'une réduction de la toxicité cellulaire et de la protéolyse de l'huntingtine induite par une dérégulation calcique (Gafni et al. 2004).

La protéolyse de l'huntingtine par les calpaïnes 1, 2 et 5 aurait lieu dans le cytosol en cas de dérégulation calcique cytosolique alors que les isoformes 1, 5, 7 et 10 pourraient agir au niveau nucléaire (Gafni et al. 2004). Les fragments toxiques N-terminaux formés par la protéolyse de l'huntingtine mutée vont induire une toxicité neuronale au niveau de différents compartiments cellulaires des MSN comme le noyau et les neurites, sous forme soluble (Saudou et al. 1998) ou inclus dans les agrégats (DiFiglia et al. 1997).

La protéolyse de l'huntingtine normale par les calpaïnes pourrait de plus induire la neurodégénérescence par la perte des fonctions de l'huntingtine comme le rôle antiapoptotique (Rigamonti et al. 2000; Rigamonti et al. 2001), la transcription (Cha et al. 1998; Cha et al. 1999; Luthi-Carter et al. 2000; Chan et al. 2002; Luthi-Carter et al. 2002; Sipione et al. 2002; Borovecki et al. 2005), le transport intracellulaire (Crosby 2003) et la transmission synaptique (Metzler et al. 1999).

7.5.1.1. Protéolyse de Bcl-X_L par les calpaïnes

La protéolyse de Bcl-X_L en protéine à activité potentiellement proapoptotique par la calpaïne a été mise en évidence dans un modèle d'hypoxie et d'hypoglycémie sur une culture corticale primaire (Nakagawa and Yuan 2000). En effet le produit de la protéolyse de Bcl-X_L par la m-calpaïne est un fragment de 25 kDa dont le site de protéolyse est proche de celui de la caspase 1 et de la caspase 3, formant une protéine proapoptotique (Clem et al. 1998). En parallèle, la forme tronquée de Bcl-X_L pourrait être incapable d'inhiber HIP-1, protéine proapoptotique stimulée par l'expression de l'huntingtine mutée (Hackam et al. 2000). Ces deux mécanismes de toxicité du fragment de Bcl-X_L issu de la protéolyse par les calpaïnes restent hypothétiques car ils n'ont pas encore été observés dans la maladie de Huntington.

7.5.1.2. Protéolyse de Bax par les calpaïnes

L'activation de Bax par la protéolyse N-terminale par les calpaïnes s'accompagne d'une perméabilité de la membrane mitochondriale et d'une libération du cytochrome c (Gao and Dou 2000). La relocalisation de Bax dans la membrane mitochondriale consécutive à une protéolyse éventuelle de Bax par les calpaïnes, a été observée spécifiquement dans le modèle 3-NP *in vitro* sur les cultures striatales et est absent dans les cultures corticales (Galas et al. 2004). En parallèle, une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale par une dépolarisation membranaire est observée dans le modèle 3-NP (Nasr et al. 2003), dans un modèle génétique de la maladie de Huntington (Benchoua et al. 2006) et dans les lymphoblastes de patients atteints de la maladie de Huntington (Sawa et al. 1999; Panov et al. 2002). Il est intéressant de noter que le 3-NP induit une plus grande diminution du potentiel de membrane mitochondrial sur des cellules striatales issues de souris KI pour l'huntingtine que celles de souris contrôles (Ruan et al. 2004). De plus, nous avons vu précédemment que la libération du cytochrome c est bien documentée dans la maladie de Huntington (paragraphe 7.3.3). Il est donc plausible que l'activation de la calpaïne intervienne dans la neurodégénérescence de la maladie de Huntington par la protéolyse de Bax entraînant la libération du cytochrome c.

7.5.1.3. Activation de la caspase 12 par les calpaïnes

Les calpaïnes peuvent aussi exercer une neurotoxicité par l'activation de protéases cytotoxiques comme la caspase 12 (Nakagawa and Yuan 2000) ou la libération des cathepsines par rupture des membranes lysosomiales (Yamashima et al. 2003).

La caspase 12 est une protéase impliquée dans la mort cellulaire en présence d'une dérégulation calcique induite par un stress du réticulum endoplasmique. Sa protéolyse par la calpaïne au niveau du côté cytosolique de la membrane du réticulum a été observée dans un modèle d'hypoxie et d'hypoglycémie sur une culture corticale primaire (Nakagawa and Yuan 2000). L'activation de la caspase 12 par les calpaïnes, consécutive à un stress au niveau du réticulum, pourrait être mise en jeu dans la maladie de Huntington. En effet, les protéines à polyglutamines ont été impliquées dans l'induction d'un stress réticulaire à l'origine de la mort cellulaire neuronale (Nishitoh et al. 2002) et la perte d'enzymes associées au réticulum a été observée dans le putamen des patients atteints de la maladie de Huntington (Cross et al. 1985). La mutation de l'huntingtine est donc potentiellement associée à un stress du réticulum, à une dérégulation calcique induisant l'activation des calpaïnes qui activent la caspase 12 responsable de la neurodégénérescence via l'activation de la caspase 9, suivant le même schéma que celui observé dans la maladie d'Alzheimer (Nakagawa et al. 2000).

7.5.1.4. Libération des cathepsines par les calpaïnes

La libération des cathepsines par la rupture des membranes lysosomales consécutive à l'activation des calpaïnes est un phénomène observé dans l'ischémie cérébrale (Yamashima et al. 2003). Différents éléments sont en faveur de l'intervention des cathepsines dans la neurodégénérescence striatale suite à l'activation des calpaïnes dans la maladie de Huntington. Des vacuoles d'autophagie comprenant des réarrangements de membrane de mitochondrie, de l'appareil de Golgi et de la membrane nucléaire et une quantité de cathepsine D proportionnelle à la taille de l'expansion de CAG, sont observées dans une lignée cellulaire « striatale » (Kegel et al. 2000). De plus, dans le noyau caudé des patients atteints de la maladie de Huntington, l'activité des cathepsines D, H et de l'activité dipeptidylaminopeptidase II ainsi que l'activité des cathepsines B et L est augmentée (Mantle et al. 1995) en parallèle de l'apparition de compartiments vacuolaires de type endo-lysosomal contenant de l'huntingtine mutée dans le striatum des patients (Sapp et al. 1997).

7.5.1.5. Protéolyse de fodrin par les calpaïnes

La protéolyse de fodrin en fragments de 150/145 kDa caractéristiques de l'activation des calpaïnes a été mise en évidence dans les modèles phénotypiques 3-NP *in vitro* (Galas et al. 2004) et 3-NP aigu et chronique et dans la potentialisation *in vivo* (Bizat et al. 2003a; Bizat et al. 2003b; Jacquard et al. 2006). Elle a aussi été mise en évidence dans le striatum des souris KI homozygotes pour l'huntingtine (Gafni et al. 2004). Fodrin est l'isoforme α II de la spectrine participant à la structure cellulaire, à la transmission synaptique par une interaction avec les isoformes β II et Σ 1 impliquée dans la liaison aux vésicules synaptiques (Sikorski et al. 2000) et dans les processus de LTP et d'excitotoxicité par son interaction avec les récepteurs NMDA (Seubert et al. 1988). La contribution de la protéolyse de fodrin dans le mécanisme de mort neuronale impliquerait d'une part une diminution de son interaction avec les phosphatidylsérines de la membrane plasmique, permettant l'externalisation des phosphatidylsérines, observée lors de la formation des corps apoptotiques dans la phase finale de l'apoptose (Vanags et al. 1996). L'autre possibilité serait l'amplification de l'excitotoxicité au niveau de la signalisation des récepteurs NMDA (Czogalla and Sikorski 2005).

7.5.1.6. Protéolyse des protéines de la signalisation NMDA par les calpaïnes

La protéolyse de différents composants de la signalisation des récepteurs NMDA, comme NR2B et PSD-95 pourrait intervenir dans la neurodégénérescence striatale induite par l'activation des calpaïnes. En effet, la protéolyse de NR2B dans les cellules hippocampales ne s'accompagne pas d'une diminution des récepteurs à la surface membranaire ni de la diminution de la fixation de MK-801 marqué (Simpkins et al. 2003). Ceci est en faveur de l'augmentation du nombre de formes actives des récepteurs NMDA induite par la protéolyse des récepteurs NR2B dans le striatum. La protéolyse de PSD-95 pourrait être impliquée dans l'amplification de l'activation des enzymes de signalisation associées aux récepteurs NMDA. En effet, PSD-95 interagit avec la nNOS et NR2B au niveau de domaine protéique PDZ (Brenman et al. 1996) or différents éléments tendent à prouver l'implication de la NOS dans la maladie de Huntington. En effet, l'inhibition de la NOS a un effet protecteur dans le modèle quinolinate de la maladie de Huntington (Perez-Severiano et al. 1998), l'expression et l'activité de la NOS sont augmentées dans les souris R6/1 âgées de 19 semaines lors de l'apparition des symptômes (Perez-Severiano et al. 2002). De plus, les marqueurs de stress oxydatif résultant de l'activation de la NOS sont augmentés dans le striatum, comme la 3-nitrotyrosine chez les souris R6/2 (Tabrizi et al. 2000) et les peroxy-nitrites chez les rats quinolinate (Perez-De La Cruz et al. 2005) ainsi que l'oxydation de protéines chez les souris R6/2 (Perluigi et al. 2005). De plus, la présence d'une augmentation des 3-nitrotyrosines dans le striatum des patients atteints de la maladie de Huntington par rapport à des sujets sains permet d'impliquer la NOS (Browne et al. 1999) dans le mécanisme de neurodégénérescence et donc indirectement la protéolyse de PSD-95 par les calpaïnes. L'autre voie d'activation de la mort induite par la protéolyse de PSD-95 serait l'activation de la CAMKII via une voie dépendante des récepteurs AMPA et non NMDA, observée dans la mort de cellules d'hippocampe avec une expression réduite de PSD-95 (Gardoni et al. 2002).

7.6. Calcium intracellulaire et la maladie de Huntington

Nos résultats indiquent que, dans une situation de dysfonction partielle et stable du complexe II mitochondrial et d'excitotoxicité, il existerait une augmentation du calcium intracellulaire dans les neurones striataux induite par l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA mais consécutive à une dérégulation de la gestion intracellulaire du calcium et non consécutive à l'augmentation de l'influx calcique. Ces résultats sont compatibles avec l'observation de différentes anomalies calciques dans différents modèles de la maladie de Huntington. Celles-ci comprennent des modifications de l'influx calcique via les récepteurs NMDA, des modifications de la gestion calcium par la mitochondrie, une surcharge calcique intracellulaire et des phénomènes d'amplification de la surcharge calcique, potentiellement impliqués dans la maladie de Huntington.

7.6.1. Entrée du calcium via les récepteurs NMDA

La présence de l'huntingtine mutée dans les MSN de différentes souris transgéniques entraîne une potentialisation de l'activité des récepteurs NMDA accompagnée d'une augmentation du calcium intracellulaire en présence d'un agoniste NMDA par rapport à des MSN exprimant l'huntingtine normale. Cette potentialisation est en effet observée chez les

souris R6/2 (Cepeda et al. 2001), Hdh94CAG (Levine et al. 1999), YAC72 (Zeron et al. 2002; Bezprozvanny and Hayden 2004), YAC128 (Tang et al. 2005) et HD100 (Laforet et al. 2001). Tout ceci tend à prouver que l'origine de l'augmentation du calcium intracellulaire dans la maladie de Huntington provient de l'activation des récepteurs NMDA. Le mécanisme d'activation des récepteurs NMDA serait relié à des modifications de phosphorylation et de protéolyse des récepteurs (Young et al. 1988a) ainsi qu'à des modifications d'interaction avec PSD-95 (Sun et al. 2001; Song et al. 2003).

7.6.2. Gestion du calcium par la mitochondrie

Le calcium intracellulaire issu de l'activation des récepteurs NMDA est normalement géré par les compartiments de stockage neuronaux, dont la mitochondrie. En effet, une augmentation de la concentration du calcium mitochondrial est observé immédiatement après l'activation des récepteurs NMDA présents sur les MSN (Peng et al. 1998). Cette augmentation de concentration du calcium mitochondrial est inhibée par l'inhibiteur de l'uniporteur du Ca²⁺ mitochondrial ou par le CCCP, protonophore perturbant le potentiel de membrane mitochondrial (Peng et al. 1998). Ceci nous amène à penser que la perturbation du potentiel de membrane mitochondrial pourrait intervenir dans le phénomène potentialisation de l'augmentation du calcium intracellulaire par le blocage de l'entrée du calcium dans la mitochondrie ou par la sortie accrue par le PTP.

Or, il a été démontré que l'huntingtine mutée est associée à une hypersensibilisation des mitochondries à induire une dépolarisation de la membrane mitochondriale. En effet, il faut une concentration plus faible de calcium pour obtenir une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial des lymphoblastes chez le patient atteint de la forme précoce de maladie de Huntington (30 nmoles/mg), que chez le patient atteint de la forme classique de maladie de Huntington (60 nmoles/mg) et que chez le sujet sain (100 nmoles/mg) (Panov et al. 2002). En parallèle, une augmentation de la sensibilité de la membrane mitochondriale à la dépolarisation en présence de calcium, est observé dans les mitochondries de cerveau de souris YAC72 par rapport aux souris YAC18, avec un effet directement proportionnel au taux d'expression de l'huntingtine mutée (Panov et al. 2002). Et plus récemment, l'expression d'une forme courte de l'huntingtine dans une culture primaire de neurones striataux a été associée à une réduction du potentiel de membrane mitochondriale parallèle à la diminution de l'activité de la SDH uniquement lors de la présence de l'expansion de 82 glutamines et pas en présence de l'expansion de 19 glutamines (Benchoua et al. 2006). Cette expérience permet de faire le lien entre la mutation de l'huntingtine, une anomalie de l'activité de la SDH et la perturbation du potentiel de membrane mitochondrial. D'autre part, l'ajout du 3-NP sur des cultures primaires neuronales et des tranches striatales diminue l'activité de la SDH et induit l'ouverture du PTP et la dépolarisation de la membrane mitochondriale, qu'en présence de calcium (Nasr et al. 2003; Maciel et al. 2004). Ceci indique que la dépolarisation de la membrane mitochondriale est le résultat de l'inhibition de la SDH concomitante à la présence d'une concentration élevée de calcium. Il est intéressant de noter que l'inhibition des complexes I ou III de la chaîne respiratoire en présence de calcium n'induit pas de dépolarisation membranaire donc la SDH est spécifiquement impliquée dans la diminution du potentiel de membrane mitochondriale.

Le mécanisme de la dépolarisation de la membrane mitochondriale par le calcium et l'inhibition de la SDH impliquerait l'entrée du calcium par les récepteurs NMDA, puis la capture du calcium par l'uniporteur calcique mitochondrial qui permettrait l'ouverture du PTP et la dépolarisation membranaire. En effet, en présence d'une inhibition de la SDH par le 3-NP, la dépolarisation membranaire et la mort cellulaire sont bloquées par le MK-801,

antagoniste des récepteurs NMDA empêchant l'entrée de calcium induite par le glutamate résiduel (Nasr et al. 2003). D'autre part, en présence de calcium et d'une inhibition de la SDH par le méthylmalonate, la dépolarisation membranaire et la mort cellulaire sont bloquées par le ruthénium red, inhibiteur de l'unipporteur calcique mitochondrial empêchant l'import du calcium dans la mitochondrie (Maciel et al. 2004). De même, l'inhibition de la SDH par le 3-NP en présence d'huntingtine mutée dans des cellules striatales de souris KI induisent une dépolarisation membranaire et une mort cellulaire, bloquées par le ruthénium red (Ruan et al. 2004). La même approche s'est avérée efficace dans le cas d'une excitotoxicité induite par le glutamate (Stout et al. 1998). Enfin, en présence d'une inhibition de la SDH, l'inhibition du PTP par la cyclosporine A ou l'acide bongkréanique bloque la dépolarisation membranaire et la mort cellulaire en empêchant l'ouverture du PTP (Maciel et al. 2004). Le mécanisme de sensibilisation de l'ouverture du PTP par l'inhibition de la SDH impliquerait une augmentation de la sensibilité du PTP au calcium induite par les radicaux libres endogènes formés au niveau de la chaîne respiratoire consécutivement à la réduction du taux de transfert d'électrons par la SDH. En effet, l'inhibition du complexe II et l'augmentation du succinate en présence de calcium augmentent la formation de radicaux libres H_2O_2 (Adam-Vizi 2005). La présence d' H_2O_2 participe à l'ouverture du PTP car elle est bloquée par la catalase, enzyme de détoxification des H_2O_2 mitochondriaux (Maciel et al. 2001). Et, en effet, la surexpression de la catalase reverse partiellement la dépolarisation membranaire induite par le 3-NP (Maciel et al. 2004).

7.6.3. Surcharge calcique intracellulaire

Le calcium mitochondrial accumulé par l'unipporteur ressortirait par les échangeurs Na^+/Ca^{2+} et Na^+/H^+ mitochondriaux et par le PTP et s'accumulerait dans le cytosol à l'origine de la surcharge calcique cytosolique neuronale dans la maladie de Huntington. En effet, cette surcharge calcique neuronale a été observée dans les MSN de souris YAC128 en présence de glutamate (Tang et al. 2005) comme dans les MSN de rat en présence de 3-NP et de quinolinate (Jacquard et al. 2006) et dans les MSN (Greene et al. 1998) et les tranches corticostriatales de rat (Calabresi et al. 2001) en présence de 3-NP et de NMDA.

7.6.4. Voies d'amplification de la surcharge calcique intracellulaire

La surcharge calcique cytosolique neuronale dans la maladie de Huntington serait amplifiée par un cercle vicieux impliquant les calpaïnes par deux voies différentes. La première voie impliquerait l'augmentation de la protéolyse de l'huntingtine mutée par les calpaïnes. L'huntingtine mutée, en plus de son action sur l'influx calcique intracellulaire et le cycle de l'influx/efflux du calcium mitochondrial par le PTP, serait impliquée dans la libération accrue du calcium par le réticulum. En effet, une augmentation de la sensibilité des IP3R du réticulum à l'IP3 en présence de l'huntingtine mutée a été observée dans des neurones striataux (Tang et al. 2003). Cette augmentation de sensibilité permet la libération accrue du calcium à partir du réticulum et serait reliée à l'augmentation de l'interaction de HAP-1 avec IP3R1 ou directement à celle de l'huntingtine mutée avec IP3R1. En effet l'interaction de l'huntingtine avec IP3R1 n'existe qu'en présence de la mutation (Tang et al. 2003).

La seconde voie amplifiant la surcharge calcique intracellulaire serait consécutive à la protéolyse des échangeurs Na^+/Ca^{2+} de la membrane plasmique par les calpaïnes. La protéolyse de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} NCX3 par les calpaïnes pourrait être impliquée dans la

surcharge calcique striatale par inhibition de la fixation du calcium sur l'échangeur, diminuant l'efflux calcique intracellulaire. En effet, l'ajout du glutamate sur des cultures primaires neuronales de cervelet induit la protéolyse de l'échangeur NCX3 par les calpaïnes et une augmentation calcique intracellulaire tardive, reversée par la surexpression de la calpastatine ou la mutation du site de protéolyse des calpaïnes (Bano et al. 2005). Par ailleurs, l'isoforme NCX3 est exprimée dans le striatum des rats (Papa et al. 2003).

Donc le mécanisme général de la dysfonction de l'homéostasie calcique dans la maladie de Huntington impliquerait l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA, la présence d'une surcharge calcique mitochondriale induisant l'ouverture du PTP et la sortie du calcium dans le cytosol, la surcharge calcique cytosolique entretenue par l'huntingtine mutée au niveau des récepteurs NMDA, de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique ; et par la calpaïne au niveau des échangeurs membranaires NCX.

7.7. Activation des calpaïnes dans les autres maladies neurodégénératives et atteintes neurologiques aiguës

L'hypothèse du rôle des calpaïnes dans la neurodégénérescence, en association à un déficit énergétique mitochondrial et une dysfonction de la transmission glutamatergique, a été émise pour expliquer la physiopathologie, outre de maladie de Huntington, celles d'autres maladies neurodégénératives.

Ainsi, la maladie de Parkinson est associée à une diminution de l'activité du complexe I respiratoire (Parker et al. 1989; Schapira et al. 1990a; Schapira et al. 1990b) et à une activation probable des récepteurs NMDA, mise en évidence par l'effet neuroprotecteur de la décortication cérébrale et de l'administration du MK-801 dans un modèle de neurodégénérescence striatale induite par le MPP⁺ (Srivastava et al. 1993). Comme, dans le modèle de potentialisation de l'excitotoxicité par le 3-NP, la neurodégénérescence dans la maladie de Parkinson ferait intervenir les calpaïnes car l'expression de la m-calpaïne est spécifiquement augmentée dans le mésencéphale des patients atteints de la maladie de Parkinson (Mouatt-Prigent et al. 1996).

Dans la maladie d'Alzheimer, une dysfonction du complexe IV respiratoire a été observée (Casley et al. 2002) en parallèle d'une diminution de l'expression des récepteurs glutamatergiques au niveau cortical (Greenamyre et al. 1985). Dans cette situation de déficit énergétique induit par la diminution de l'activité du complexe IV en présence d'une anomalie de transmission glutamatergique, la calpaïne est activée dans le néocortex en parallèle d'une diminution de l'expression de son inhibiteur endogène, la calpastatine (Nixon et al. 1994).

En concordance avec le rôle des calpaïnes dans les atteintes aiguës neurologiques, un polymorphisme génétique portant sur le gène de la calpaïne 10 est associé à l'augmentation du risque d'ischémie cérébrale (Malecki et al. 2003).

7.8. Quelles sont les implications de ces études sur la thérapeutique de la maladie de Huntington ?

Nous avons mis en évidence dans ces études l'implication du calcium comme le point central des événements conduisant à la neurodégénérescence striatale aussi bien dans les conditions d'inhibition toxique aiguë et chronique de la SDH que dans le cas d'une inhibition subtoxique stable et chronique de la SDH en présence de quinolinate. Ces études pointent

donc le Ca^{2+} et les protéines impliquées dans l'homéostasie calcique comme cibles thérapeutiques préférentielles de la maladie de Huntington. Plusieurs classes de molécules agissant sur l'homéostasie calcique pourraient être testées dans les modèles quinolinate, 3-NP et 3-NP/quinolinate *in vitro* et *in vivo*. Par la suite, ils devront être testés dans des modèles génétiques de la maladie de Huntington permettant d'évaluer la neurodégénérescence striatale, comme les souris YAC72 ou 128 (Hodgson et al. 1999), les rats transgéniques (von Horsten et al. 2003) ou les rats infectés par un lentivirus codant l'huntingtine mutée (Regulier et al. 2003).

L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} pourrait être évitée avec des produits analogues aux sondes calciques de faible affinité comme le Mag-Fura-2 et le calcium Green5N, qui permettraient de chélater le calcium dans une gamme de concentration élevée (Stout and Reynolds 1999). En effet, la trop forte réduction du Ca^{2+} intracellulaire est associée à la mort neuronale induite par la privation en facteurs trophiques et par l'inhibition du protéasome (Canzoniero et al. 2004).

Les récepteurs NMDA impliqués dans l'augmentation de l'influx calcique dans la maladie de Huntington constituent une cible visée depuis des années. Plusieurs classes de molécules efficaces dans la réduction de la surcharge calcique consécutive à l'activation des récepteurs NMDA ont été identifiées. La classe de molécule la plus couramment employée est représentée par les antagonistes des récepteurs NMDA. Parmi ceux-ci, le MK-801 ou la dizocilpine s'est révélé efficace à inhiber l'influx calcique via les récepteurs NMDA *in vitro* (Hartley et al. 1993) et neuroprotecteur dans diverses conditions *in vitro* et *in vivo* en présence d'une activation des récepteurs NMDA (Beal et al. 1988; Foster et al. 1988) comme d'une inhibition de la SDH par le malonate (Beal et al. 1993a). Cependant, l'utilisation du MK-801 *in vivo* est difficile chez le rongeur pour des raisons de faible demi-vie et de forte toxicité (Beal et al. 1993b) et il n'est plus envisageable chez l'homme, comme ses analogues, la kétamine et le dextrorphan car ils sont responsables d'effets secondaires important comprenant la sédation, l'hypersensibilité à la lumière à faible dose mais surtout une dysphorie et un effet amnésique (Doble 1999). Le LY274614 est un antagoniste compétitif des récepteurs NMDA qui réduit l'influx calcique *in vitro* et qui s'est révélé efficace dans les modèles NMDA et quinolinate (Schoepp et al. 1991) et malonate (Henshaw et al. 1994). A côté des ces antagonistes NMDA, le rémacémide et la mémantine ont tous deux été évalués dans des essais cliniques chez le patient atteint de la maladie de Huntington, mais seul la mémantine a montré une efficacité modérée dans le retardement des symptômes (Beister et al. 2004).

Il semble donc qu'il soit préférable de choisir d'autres classes thérapeutiques impliquées dans la modulation des récepteurs NMDA comme les inhibiteurs de tPA (tissu plasminogen activator) ou le curcumin. En effet, les inhibiteurs de t-PA comme le PAI-1, le tPA stop (Liot et al. 2004) et la neuroserpine (Lebeurrier et al. 2005) représentent une classe thérapeutique prometteuse, permettant la réduction de la concentration de calcium intracellulaire *in vitro* et la diminution de la neurodégénérescence induite par l'activation des récepteurs NMDA *in vitro* et *in vivo*. Le mécanisme de protection mis en jeu est vraisemblablement consécutif à la diminution de la protéolyse de la partie N-terminale de NR1 par le t-PA, permettant la réduction de l'influx calcique (Nicole et al. 2001b). L'utilisation du curcumin pourrait aussi être bénéfique car il permet la réduction de la phosphorylation des récepteurs NMDA et une diminution de l'influx calcique ainsi qu'une neuroprotection de l'excitotoxicité induite par le NMDA en culture (Matteucci et al. 2005).

Les autres classes de molécules utiles dans la maladie de Huntington et visant l'homéostasie calcique cibleraient plutôt le cycle calcique de l'influx et de l'efflux mitochondrial en inhibant soit l'unipporteur calcique soit le PTP. En effet, le ruthénium red inhibe l'influx calcique mitochondrial et la mort neuronale induite par le glutamate en culture

(Stout et al. 1998), par le 3-NP et le calcium (Maciel et al. 2004) et par le 3-NP et l'huntingtine mutée (Ruan et al. 2004). De plus, l'application locale d'un analogue du ruthénium red, le RU360 permet l'inhibition *in vivo* de la mort neuronale de motoneurone dans un modèle d'axotomie (Vanderluit et al. 2003) et pourrait être testé en intrastriatal ou en icv dans des modèles de la maladie de Huntington. Par ailleurs, les inhibiteurs du PTP comme la cyclosporine A et l'acide bongkrélique permettent l'inhibition de la mort cellulaire induite par le méthylmalonate et le calcium (Maciel et al. 2004) et celle du 3-NP et de l'huntingtine mutée *in vitro* (Ruan et al. 2004) et la neuroprotection de lésions induites par le 3-NP après perméabilisation de la BHE (Leventhal et al. 2000). Le développement d'analogues de la cyclosporine vectorisés permettrait le passage de la BHE et pourrait s'avérer neuroprotecteurs *in vivo*. Par ailleurs, des analogues du diltiazem, antagoniste calcique des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitochondriaux utilisés en clinique comme antihypertenseurs pourraient aussi être utilisés mais localement pour éviter les hypotensions.

Si la surcharge calcique intraneuronale ne peut être reversée, il convient d'agir sur les voies calciques activées dans la maladie de Huntington, comme celle des calpaïnes. Les inhibiteurs des calpaïnes se sont en effet révélés neuroprotecteurs mais surtout *in vitro* comme le Z-Val-Phe.H et le Z-Leu-Phe-CONHEt en présence de 3-NP (Pang et al. 2003), le CI-1 en présence de 3-NP (Galas et al. 2004) et la calpastatine en présence de glutamate (Bano et al. 2005). L'utilisation du CI-1 par administration icv chez le rat 3-NP est neuroprotectrice (Bizat et al. 2003a) donc des analogues passant la BHE constituent un challenge thérapeutique majeur et certains produits vectorisés sont en cours d'évaluation. De même, des produits vectorisés à activité mixte antiradicalaires et inhibiteurs de calpaïnes, comme le BN82451 et le BN82270 permettraient d'obtenir une neuroprotection *in vivo* (Klivenyi et al. 2003; Burdi et al. 2006) qu'il serait intéressant d'évaluer dans les modèles de neurodégénérescence striatale. De plus, un autre produit à activité inhibiteur des calpaïnes et de la caspase 3, le Z-VAD-fmk, est un produit neuroprotecteur par voie icv dans le modèle 3-NP (Bizat et al. 2005) et constitue une classe thérapeutique de choix car elle permet théoriquement d'inhiber deux voies de mort cellulaire, permettant d'éviter que l'inhibition d'une seule voie induise l'activation de l'autre voie. Les nouveaux inhibiteurs de calpaïne devront en outre avoir une moindre affinité pour le protéasome, qui ne doit pas être inhibé car ceci induit une augmentation de la toxicité des formes solubles de l'huntingtine mutée (Kaytor et al. 2004).

En conclusion, les cibles thérapeutiques majeures dans la maladie de Huntington sont le calcium intracellulaire, les récepteurs NMDA, l'uniporteur calcique mitochondrial, le PTP et les calpaïnes mais le développement chimique de nouvelles molécules passant la BHE et à double activité semble le plus adapté pour obtenir un effet neuroprotecteur *in vivo*.

8. Conclusion et perspectives


Les dysfonctions mitochondriales énergétiques et ioniques ainsi que les anomalies de transmission glutamatergiques sont deux hypothèses mécanistiques importantes avancées depuis de nombreuses années pour expliquer la neurodégénérescence des atteintes neurologiques aiguës comme celle des maladies neurodégénératives chroniques.

Les travaux effectués au cours de ma thèse confirment les liens étroits existant entre l'excitotoxicité et la dysfonction mitochondriale dans l'induction et l'amplification de la neurodégénérescence striatale. Dans le cas particulier d'une inhibition de la SDH, mimant la réduction de l'activité de la SDH observée dans la maladie de Huntington, le calcium est le point central de la neurodégénérescence. Assez curieusement, en contradiction avec l'hypothèse de l'excitotoxicité indirecte, ce n'est pas l'hyperactivation des récepteurs NMDA qui est à l'origine de la neurodégénérescence mais plutôt la dérégulation de l'homéostasie calcique intraneuronale. L'origine et le mécanisme de la dérégulation de l'homéostasie calcique aboutissant à l'augmentation de la concentration de calcium intracytosolique neuronale n'a pas été identifiée au cours de la thèse mais différentes expériences devraient confirmer le rôle de la mitochondrie. Dans ce but, il serait utile d'étudier dans un premier temps la concentration du calcium et son évolution au cours du temps dans la mitochondrie par le ratio-pericam (Bano et al. 2005) et dans le réticulum par vidéomicroscopie, dans les conditions d'inhibition de la SDH ou non en présence de quinolinate. Il serait ensuite utile de déterminer si le potentiel de membrane mitochondrial est modifié dans ces conditions en utilisant différents marqueurs du potentiel de membrane comme le JC-1 ou la tétraméthylrhodamine méthylester (Nicholls and Ward 2000). Par la suite, l'implication de l'ouverture du PTP peut être investigué à l'aide de la cyclosporine alors que celui de l'uniporteur peut être observé avec le ruthénium red. Enfin, l'implication du stress oxydatif suite à l'inhibition de la SDH permettant l'ouverture du PTP pourrait être étudiée par la mesure du taux d' H_2O_2 et par l'effet de la catalase sur le potentiel de membrane mitochondrial.



L'implication de la calpaïne est indubitable dans le modèle 3-NP chronique toxique et il serait intéressant de tester l'action de la calpastatine vectorisée par un lentivirus sur la lésion striatale, en parallèle de l'évaluation dans un modèle génétique comme le rat transgénique ou le rat infecté par un lentivirus codant l'huntingtine mutée. Dans la potentialisation, il faudrait étudier l'effet d'inhibiteurs spécifiques de la calpaïne comme la calpastatine, au moins *in vitro* pour vérifier que la calpaïne est un acteur de la mort cellulaire et une cible thérapeutique. D'autre part, il faudrait étudier les isoformes des calpaïnes impliquées et éventuellement les compartiments cellulaires de leur activation par western blot sur des fractions protéiques enrichies en mitochondries, en réticulum et en noyaux.

ANNEXES

1. Annexe 1 : modèles rongeurs phénotypiques








espèce	souche	toxine	neuropathologie	comportement	références bibliographiques
Rat					
	<i>Rattus Norvegicus</i>	Kaïnate dans le striatum	lésion striatale		(Coyle et Schwartz, 1976 ; McGeer and McGeer, 1976)
	<i>Rattus Norvegicus/ Wistar, Sprague Dawley</i>	Quinolinate dans le striatum	lésion striatale, perte neuronale ↓ de GABA et substance P Hyperactivité dopaminergique, préservation cholinergique, ↗ de 5-HT et de 5-HIAA, ↗ de c-Fos, ↗ de l'amplitude de potentiels somatosensoriels évoqués, réaction microgliale, fragmentation de l'ADN, ↗ des GABAA-R dans la SNR ↗ de calbindine, ↓ et d'IP3-R ↗ du cuivre et du manganèse, déficit énergétique mitochondrial, ↗ de NGF translocation nucléaire de NFκB ↓ de MAP2 ↓ des D2-R ↓ de SOD ↓ des A2A-R	rotation, hyperactivité locomotrice, anomalie de mémoire spatiale, comportement anormal, augmentation de la fréquence de toilettage et de redressement	(Beal et al., 1986 ; Mazzari et al., 1986 ; Davies and Roberts, 1987, 1988 ; Boegman et al., 1987 ; Ellison et al., 1987 ; Sanberg et al., 1989 ; Beal et al., 1991 ; Aronin et al., 1991 ; Schwarz et al., 1992 ; Topper et al., 1993 ; Block et al., 1993 ; Dure et al., 1995 ; Nicholson, 1995 ; Brickell et al., 1999 ; Huang et al., 1995 ; Furtado et al., 1996 ; Haug et al., 1998 ; Perez et al., 1996 ; Bordelon et al., 1997 ; Canals et al., 1998 ; Qin et al., 1998 ; Shear et al., 1998 ; Bordelon et al., 1999 ; Francis et al., 2000 ; Araujo et al., 2000 ; Santamaria et al., 2001 ; Ishiwata et al., 2002 ; Scattoni et al., 2004)
					
	<i>Rattus Norvegicus/ Sprague Dawley</i>	Quinolinate perfusé dans le striatum	lésion striatale, perte neuronale	anomalies d'apprentissage	(Haik et al., 2000)
	<i>Rattus Norvegicus</i>	acide L-homocystéique dans le striatum	lésion striatale ↓ de GABA et de substance P		(Beal et al., 1990)
	<i>Rattus Norvegicus</i>	acide quisqualique dans le striatum	lésion striatale ↗ des Met-enképhalines		(Ruzicka et Jhamandas , 1990)
	<i>Rattus Norvegicus</i>	NMDA dans le striatum	lésion striatale ↗ des Met-enképhalines		(Ruzicka et Jhamandas , 1990)
	<i>Rattus Norvegicus/ Sprague Dawley</i>	acide amino-oxiacétique dans le striatum	lésion striatale ↗ des lactates ↓ de l'ATP		(Beal et al., 1991 ; Jenkins et al., 1996)

ANNEXES

espèce souche	toxine	neuropathologie	comportement	références bibliographiques
<i>Rattus Norvegicus</i>	3-NP en sc. unique	lésion striatale bilatérale, de l'hippocampe et du thalamus, mortalité	anomalies motrices position recumbens	(Gould et al., 1985 ; Hamilton et Gould, 1987)
<i>Rattus Norvegicus/Sprague Dawley</i>	3-NP en intrastriatal	lésion striatale, perte neuronale non spécifique <ul style="list-style-type: none"> ➤ de GABA, ➤ de dopamine, ➤ de l'ATP, ➤ des lactates ➤ SOD, mortalité 	rotation sous apomorphine, hypoactivité, force d'agrippement diminuée	(Beal et al., 1993 ; Koutouzis et al., 1994 ; Borlongan et al., 1995 ; Shear et al., 1998 ; Santamaria et al., 2001)
<i>Rattus Norvegicus/Sprague Dawley</i>	3-NP en ip. unique	lésion striatale et mort cellulaire et parfois lésion de l'hippocampe CA1, mortalité	hypoactivité	(Bossi et al., 1993 ; Alexi et al., 1998)
<i>Rattus Norvegicus/Fisher, Sprague Dawley ou Lewis</i>	3-NP en ip. répétée	lésion striatale, perte neuronale non spécifique, gliose mortalité	hyperactivité puis hypoactivité, incoordination de mouvements	(Beal et al., 1993 ; Miller et al., 1997 ; Koutouzis et al., 1994 ; Borlongan et al., 1995, 1997)
<i>Rattus Norvegicus/Wistar Sprague Dawley ou Lewis</i>	3-NP en infusion sc. continue	lésion striatale, perte neuronale spécifique, <ul style="list-style-type: none"> ➤ GABA, ➤ Substance P, ➤ Neuropeptide Y ➤ des lactates, ➤ de NAA, activation des calpaines	dystonie, position recumbens	(Beal et al., 1993 ; Vis et al., 1999 ; Ouary et al., 2000 ; Dautry et al., 2000 ; Bizat et al., 2003)
<i>Rattus Norvegicus/Sprague Dawley ou Wistar</i>	Malonate dans le striatum	lésion striatale, perte neuronale, <ul style="list-style-type: none"> ➤ de lactates ➤ de COX, ➤ dopamine et production de radicaux libres, induction du PT 	hypoactivité, rotation	(Beal et al., 1993 ; Bazzett et al., 1995 ; Ferger et al., 1999 ; Jenkins et al., 1996 ; Meldrum et al., 2000 ; Xia et al., 2001 ; Maciel et al., 2004 ; Fleck et al., 2004)
<i>Rattus Norvegicus/Wistar</i>	3-hydroxykinurénine dans le striatum	lésion striatale		(Nakagami et al., 1996)
<i>Mus musculus/Swiss Webster, Balb/c, 129 ou FVB/N</i>	3-NP en ip. unique	lésion striatale bilatérale mortalité		(Gould and Gustine, 1982 ; Gabrielson et al., 2001)
 <i>Mus musculus/Swiss Webster, CD-1 ou C57Bl6</i>	3-NP en ip. répétée	lésion striatale bilatérale et de la SN, perte neuronale, apoptose, stress oxydatif <ul style="list-style-type: none"> ➤ de Met-enképhaline ➤ de substance P mortalité, activation de MMP-9	dystonies, épilepsie	(Urbanska et al., 1998 ; Kim et al., 2000 ; Kim et chan, 2001 ; Fernagut, 2002 ; Kim et al., 2003)
 <i>Cavia porcellus</i> Cobaye ou cochon d'inde	Quinolinatate dans le striatum	Lésion striatale perte de 5HT1D-R et des H2-R		(Waeber et al., 1990 ; Martinez-Mir et al., 1993)


2. Annexe 2 : modèles primates phénotypiques

ANNEXES


espèce	souche	toxine	neuropathologie	comportement	références bibliographiques
 Macaque cynomolgus	<i>Macaca fascicularis</i>	Bicuculline dans le pallidum	déafférentation stiato-pallidale	Chorée Dyskinésies	(Crossman et al., 1988)
	<i>Macaca fascicularis</i>	Kaïnate dans le striatum + L-Dopa	Lésion stiatiale	Chorée	(Kanazawa et al., 1992)
	<i>Macaca fascicularis</i>	Quinolinate dans le caudé et le putamen	Lésion stiatiale atrophie corticale de la couche V		(Emerich et al., 1997)
	<i>Macaca fascicularis</i>	3-NP en intramusculaire répétée	Lésion stiatiale bilatérale	Dyskinésies Dystonies Anomalies cognitives	(Mittoux et al., 2000)
 Singe Rhésus	<i>Macaca mulatta</i>	Quinolinate dans le caudé et le putamen	Lésion stiatiale/ Perte neuronale Astrogliose ↘ capture du FDG	Dyskinésie sous apomorphine	(Ferrante et al., 1993 ; Storey et al., 1994 ; Brownell et al., 1994)
	<i>Macaca mulatta</i>	Acide iboténique dans le caudé et le putamen	Lésion stiatiale IRM		(Simmons et al., 1994)
 Macaque à queue de cochon	<i>Macaca nemestrina</i>	3-NP en im. répétée	Lésion stiatiale bilatérale, perte neuronale spécifique	Dyskinésies Dystonies	(Brouillet et al., 1995)
 Babouin olive	<i>Papio anubis</i>	3-NP en im. répétée	Lésion stiatiale bilatérale, perte neuronale spécifique ↘ N-acétylaspartate et de la créatine ↗ des lactates	Dyskinésies Dystonies Anomalies cognitives	(Brouillet et al., 1995; Palfi et al., 1996; Palfi et al., 1997; Dautry et al., 1999; Dautry et al., 2000)
 Babouin de Guinée	<i>Papio papio</i>	Acide iboténique dans le caudé et le putamen	↘ Récepteurs D2		(Isacson et al., 1989 ; Hantraye et al., 1990, 1992, Schumacher et al., 992)
 Marmoset commun	<i>Callithrix jacchus</i>	Quinolinate dans le putamen		Anomalies de la motricité	(Kendall et al., 2000)
 Singe capucin	<i>Cebus apella</i>	Quinolinate dans le striatum	Lésion stiatiale/ Perte neuronale IRM T2 anormale	Anomalie cognitive, Hyperactivité nocturne , Postures anormales	(Roitberg et al., 002)
	<i>Cebus apella</i>	3-NP en im.	Lésion stiatiale/ Perte neuronale	Anomalie cognitive, Postures anormales Dyskinésies Dystonie	(Roitberg et al., 2002)

3. Annexe 3 : modèles génétiques


ANNEXES

nom de la souris	espèce/souche	construction génique	neuropathologie et comportement	références bibliographiques
Souris KO				
	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6</i>	Hdh exon 5(-/-)	(-/-) organogenèse anormale, mortalité à E8.5 (+/-) déficit cognitif, hyperactivité locomotrice et perte neuronale ds le Noyau sous-thalamique	(Nasir et al, 1995)
	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6</i>	Hdh exon 4-5(-/-)	(-/-) gastrulation anormale, mortalité à E8.5 (+/-) absence de phénotype	Duyao et al., 1995
	<i>Mus musculus/</i>	Hdh (-/-)	(-/-) mortalité entre E8.5 et E10.5, augmentation du nombre de cellules en apoptose dans l'ectoderme	(Zeitlin et al., 1995)
	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6 et</i> <i>129/Sv</i>	Hdh (-/-) conditionnelle dans le cerveau et les testicules	(-/-) expression de htt diminuée à 84-90% dans le cerveau avec anomalies motrices nombreuses, hypoactivité et réduction de la durée de vie, dégénérescence partielle corticale, striatale et de l'hippocampe, gliose, atteinte de la spermatogénèse	(Dragatsis et al., 2000)
Souris transgéniques				
	<i>Mus musculus/</i>	HD full lenght 44 CAG promoteur CMV	taux de trascription élevé de htt, absence de protéine mutée, absence de phénotype	(Goldberg et al., 1996)
R6/1	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6 et CBA</i>	HD Exon-1 90 aa 115-116 CAG promoteur HD	expression à 31% de la forme endogène symptômes à 15 à 21 semaines, mortalité entre 32 et 40 semaines, inclusions intranucléaires neuronales avec htt mutée et ubiquitine	(Mangiarini et al., 1996 ; Davies et al., 1997)
			expression à 75% de la forme endogène symptômes à 4, 9 ou 11 semaines, mortalité à 6.5, 10 ou 13 semaines, nombreuses anomalies de motricité (rotarod), diabète, perte de poids, stérilité et infertilité, atrophie du cerveau homogène sans perte neuronale ni gliose, atrophie striatale homogène, inclusions intranucléaires neuronales avec htt mutée et ubiquitine, inclusions neuritiques avec htt mutée sans ubiquitine neurodégénérescence de type non apoptotique et non nécrotique dans le cortex cingulaire, le striatum dorsal et le cervelet, mitochondries déformées dans des structures lysosomiales en microscopie électronique.	(Mangiarini et al., 1996 ; Davies et al., 1997 ; Carter et al., 1999 ; Li et al., 1999 ; Turmaine et al., 2000 ; Yu et al., 2003)
R6/2	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6 et CBA</i>	HD Exon-1 90 aa 141-157 CAG promoteur HD		
R6/5	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6 et CBA</i>	HD Exon-1 90 aa 128-156 CAG promoteur HD	expression à 77% de la forme endogène, inclusions intranucléaires neuronales avec htt mutée et ubiquitine	(Mangiarini et al., 1996 ; Davies et al., 1997)



ANNEXES

nom de la souris	espèce/ souche	construction génique	neuropathologie et comportement	références bibliographiques
Souris transgéniques				
N171Q18 N171Q44	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6 et C3H</i>	HD Exon-1 171 aa 18, et 44 CAG promoteur de la Prp de souris	Absence de phénotype	(Schilling et al., 1999)
			Expression faible de la forme mutée (10 à 20%), symptômes à 12 ou 16 semaines, mortalité à 10 ou entre 24 et 30 ou à 50 semaines, anomalies motrices nombreuses (rotarod), perte de poids, atrophie du cerveau homogène, inclusions intranucléaires neuronales dans le striatum, l'hippocampe, le cervelet et le cortex cérébral et agrégats neuritiques dans le cortex et le noyau sous-thalamique, astrogliose striatale, corticale, hypothalamique et hippocampale, caspase 3 active détectée dans le striatum, le cortex, l'hypothalamus et l'aire préoptique, cellules avec un marquage TUNEL d'aspect apoptotique en microscopie électronique dans le cortex et le striatum.	
N171Q82	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6 et C3H</i>	HD Exon-1 171 aa 82 CAG promoteur de la Prp de souris		(Schilling et al., 1999 ; Yu et al., 2003)
CT18	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6 et SJL-1</i>	HD bases de 316 à 3210 codant la partie N-terminale de 120kDa + 18 CAG + épitope FLAG promoteur de l'isoforme neuronale de l'enolase du rat	Absence de phénotype	(Laforet et al., 2001)
HD46 HD100	<i>Mus musculus/</i> <i>C57Bl6 et SJL-1</i>	HD bases de 316 à 3210 codant la partie N-terminale de 120kDa + 46 ou 100 CAG + épitope FLAG promoteur de l'isoforme neuronale de l'enolase du rat	Expression faible de la forme mutée (1/5 de la forme endogène), symptômes entre 12 et 16 semaines, anomalies motrices nombreuses (rotarod), corrélation entre marquage diffus nucléaire cortical et gravité du score au rotarod, accumulation de l'huntingtine dans le soma et les dendrites des neurones corticaux et striataux, neurites dysmorphiques, inclusions intranucléaires ubiquitinées dont la fréquence augmente avec le nombre de CAG et qui s'accompagne d'un marquage cytosolique diffus, inclusions dans les neurones larges et de taille moyenne dans le striatum, réduction de la taille et du nombre de neurones marqués par l'huntingtine dans le striatum et la couche VI du cortex, atrophie du striatum parfois observée, anomalies électrophysiologiques et calciques des neurones striataux en tranche en réponse au NMDA.	(Laforet et al., 2001)

ANNEXES

nom de la souris	espèce/ souche	construction génique	neuropathologie et comportement	références bibliographiques
Souris transgéniques				
HD16 (A-E)	<i>Mus musculus/ FVB/N</i>	HD entière promoteur CMV	Absence de phénotype	(Reddy et al, 1998)
HD48 (B,C,D) HD89 (A,B,C)	<i>Mus musculus/ FVB/N</i>	HD entière promoteur CMV	Expression moyenne, intermédiaire ou élevée de la forme mutée (de 1, 2 à 5 fois la forme endogène) pour HD48C (1), HD48D,HD89A-C (2) et HD48B (5), symptômes dès 8 semaines, anomalies motrices nombreuses dont une hyperactivité puis évolution vers une hypoactivité et une akinésie, stéréotypies à 20 semaines, incontinence urinaire à 24 semaines, perte neuronale striatale préférentielle des neurones épineux et astrogliose pour HD48B et HD89A-C, perte neuronale supérieure chez les homozygotes, perte neuronale dans le thalamus, le cortex et l'hippocampe, mort cellulaire striatale et dans l'hippocampe (marquage TUNEL), inclusions intranucléaires neuronales peu nombreuses dans le striatum, marquage nucléaire et périnucléaire diffus de l'huntingtine.	(Reddy et al, 1998)
				
HDYAC18	<i>Mus musculus/ FVB/N</i>	HD entière promoteur htt	Absence de phénotype	(Hodgson et al., 1999)
HDYAC46 (664/668/1647) HDYAC72 (2498,2511)	<i>Mus musculus/ FVB/N</i>	HD entière promoteur htt	Expression de la forme mutée faible (1/3 à 1/2 la forme endogène), souris YAC46 664 et YAC72 2498 avec symptôme dès 6 semaines et stériles, comportement normal des souris YAC46 668 et 1647, perte de poids importante et nombreuses anomalies de motricité de YAC72 2498 dès 3mois, pas d'anomalies pour YAC 72 2511 jusqu'à l'apparition d'une hyperactivité à 7 mois, anomalies électrophysiologiques de tranche d'hippocampe de souris YAC 46 et 72 en réponse à D-AP5, au glutamate ou à l'induction de LTP, anomalies calciques au repos et après stimulation glutamatergique de YAC46 (668), inclusions intraneuronales striatales de forme courte N-terminale de htt chez YAC72 (2498 et 2511) de 12 semaines, présence de forme courte dans les pores nucléaires de neurones striataux, neurodégénérescence striatale chez les YAC72 seulement, avec anomalies de condensation de la chromatine, de la membrane nucléaire, du golgi et des mitochondries.	(Hodgson et al., 1999)


ANNEXES

nom de la souris	espèce/souche	construction génique	neuropathologie et comportement	références bibliographiques
Souris transgéniques				
HDYAC128(53)	 <i>Mus musculus/ FVB/N</i>	HD entière promoteur htt	Expression de la forme mutée élevée (3/4 la forma endogène), atrophie du cerveau dès 9 mois qui atteint 10% à 1an, atrophie striatale de 15% dès 9mois et atrophie corticale de 7%, apparaissant à 12mois, perte neuronale striatale de 15% à 12mois et réduction de la taille des neurones striataux de 18% à 12mois, anomalies motrice (rotarod) dès 6mois (corrélée avec la perte neuronale), hyperkinésie à 3mois puis hypokinésie dès 6mois, marquage nucléaire diffus à 12mois avec EM-48 puis agrégats nucléaires à 18mois dans le striatum.	(Slow et al., 2003)
HD94	<i>Mus musculus/ CBAx57Bl6</i> 	Htt chimérique exon-1 souris/humaine + 94CAG + promoteur CMV + + transgène régulateur Tet-off +promoteur CamKII + rapporteur galactosidase nucléaire	Expression inhibée de E15 àP0 par ajout de doxycycline dans l'eau, puis expression supérieure à la forme endogène sans doxycycline, agrégats nucléaires et extranucléaires dans le striatum et le cortex, atrophie du cerveau et du striatum, astrogliose striatale, ↓ des D1R dans le striatum, apparition des anomalies motrices à 4 semaines qui évolue vers l'hypoactivité puis la mort vers 36 semaines, un peu plus précoce que chez les contrôles, l'abolition de l'expression de l'huntingtine entre 18 et 34 semaines reverse l'atrophie striatale, l'astrogliose et la perte de D1R, ainsi que les anomalies motrices.	(Yamamoto, 2000)


ANNEXES

nom de la souris	espèce/souche	construction génique	neuropathologie et comportement	références bibliographiques
Souris KI				
Hdhneo50Q/neo50Q Hdhneo92Q/neo92Q Hdhneo111Q/neo111Q	<i>Mus musculus/129xCD1</i>	htt murine modifiée avec 50, 92 ou 111CAG + promoteur endogène <i>Hdh</i> de souris + inhibiteur d'expression néomycine	Mortalité des homozygotes 50Q à 111Q à faible expression Expression de l'huntingtine mutée importante, relocalisation nucléaire striatale progressive de l'huntingtine marquée par EM48, augmentant avec l'âge (4, 5 mois) et la longueur de l'expansion chez les homozygotes, relocalisation nucléaire striatale progressive de l'huntingtine marquée par EM48 chez les 111Q/7Q, présence de la forme entière et de fragments dans le noyau, inclusions nucléaires à 10 mois (111Q) et à 12-15 mois (92Q) avec htt tronquée, pas de perte neuronale ni d'anomalies motrices. Expression de l'huntingtine réduite à 1/10 par le régulateur néomycine, mortalité périnatale de 20Q/- et survie de 20Q/111Q avec un poids réduit dès la première semaine et toute la vie, anomalies motrices évoluant à partir de deux mois jusqu'à la paralysie et à la mort prématurée vers 11 mois, élargissement des ventricules latéraux chez les 20Q/111Q, absence de perte neuronale striatale, d'apoptose et d'astrogliose, inclusions et relocalisation nucléaire de l'huntingtine peu nombreuses dans le striatum.	(White et al., 1997)
Hdh92Q/7Q Hdh111Q/7Q Hdh20Q/20Q Hdh20Q/111Q	<i>Mus musculus/129xCD1</i>	htt murine modifiée avec 92 ou 111CAG + promoteur endogène <i>Hdh</i> de souris	Expression de l'huntingtine réduite à 1/10 par le régulateur néomycine, mortalité périnatale de 20Q/- et survie de 20Q/111Q avec un poids réduit dès la première semaine et toute la vie, anomalies motrices évoluant à partir de deux mois jusqu'à la paralysie et à la mort prématurée vers 11 mois, élargissement des ventricules latéraux chez les 20Q/111Q, absence de perte neuronale striatale, d'apoptose et d'astrogliose, inclusions et relocalisation nucléaire de l'huntingtine peu nombreuses dans le striatum.	(Wheeler et al., 2000)
Hdhneo20Q/Hdh- Hdhneo20Q/neo20Q Hdhneo20Q/neo111Q	<i>Mus musculus/Swiss Webster</i>	htt murine modifiée au niveau des deux allèles avec 20 ou 111CAG + promoteur endogène <i>Hdh</i> de souris + inhibiteur d'expression néomycine	Expression de l'huntingtine mutée à la moitié de la forme endogène, atrophie du cerveau de 10% à 4-6 mois, absence de perte neuronale, d'astrogliose et d'inclusions, comportement agressif des mâles des 3 mois.	(Auerbach et al., 2001)
Hdh72-80Q	<i>Mus musculus/FVB/Nx C57Bl6</i>	htt murine modifiée avec 72-80CAG + promoteur endogène <i>Hdh</i> de souris	Hdh71Q sans phénotype ni agrégats, Hdh94Q hyperactive dès 2 mois, puis hypoactive à 4 mois et anomalies motrices marquées à 24 mois, marquage nucléaire neuronal à 4 mois puis inclusions nucléaires à 12 mois.	(Shelbourne et al., 1999)
Hdh71Q Hdh94Q	<i>Mus musculus/129x C57Bl6</i>	htt murine modifiée avec 71 ou 94CAG + promoteur endogène <i>Hdh</i> de souris	Hdh71Q sans phénotype ni agrégats, Hdh94Q hyperactive dès 2 mois, puis hypoactive à 4 mois et anomalies motrices marquées à 24 mois, marquage nucléaire neuronal à 4 mois puis inclusions nucléaires à 12 mois.	(Levine et al., 1999 ; Menalled et al., 2002)

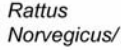


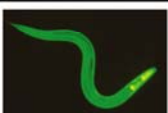

ANNEXES

nom de la souris	espèce/souche	construction génique	neuropathologie et comportement	références bibliographiques
Souris KI				
 <p>Hdh150Q/7Q (CHL1) Hdh150Q/150Q (CHL2)</p>	<p><i>Mus musculus</i>/ 129/Ola C57Bl6</p>	<p>htt murine modifiée avec 150CAG + promoteur endogène <i>Hdh</i> de souris</p>	<p>Expression de l'huntingtine mutée du même niveau que la forme endogène, apparition du phénotype à 60 semaine pour les hétérozygotes et 25 semaines pour les homozygotes, nombreuses anomalies motrices évoluant vers une hypoactivité, plus fréquente chez les homozygotes, convulsions parfois observées, poids réduit, glycémie normale, absence d'atrophie du cerveau et de perte neuronale, astrogliose striatale plus fréquente chez les homozygotes que chez les 150Q/7Q et les contrôles, inclusions intranucléaires striatales, corticales et dans le cervelet, pas de neurites dystrophiques, présence d'organelles cytosoliques anormales et de dégénérescence axonale en microscopie électronique.</p>	<p>(Lin et al., 2001 ; Yu et al., 2003)</p>

ANNEXES

espèce/souche	construction génique	neuropathologie et comportement	références bibliographiques
rat + virus-htt			
<i>Rattus Norvegicus/ Fischer344</i>	virus recombinant associé aux adénovirus (rAAV) + 13 ou 97CAG + GFP + promoteur CMV injection striatale de 3 x 10 ⁶ particules	Formation d'aggrégats intranucléaires ubiquitinés et d'aggrégats cytoplasmiques 12 jours après l'injection dans les neurones striataux épineux de taille moyenne et cholinergiques, parallèle à la mort neuronale (TUNEL) puis diminution du marquage à 35 jours au profit de gros agrégats détectables 6 mois après.	(Senut et al., 2000)
<i>Rattus Norvegicus/ Wistar</i>	lentivirus + Htt 171, 853 ou 1520 aa Nterm + 19, 44, 66 ou 82 CAG + promoteur PGK ou CMV injection striatale de 800ng de p24	Formation d'aggrégats intranucléaires dès la première semaine, augmentant jusqu'à la quatrième semaine et stable jusqu'à 3mois avec Htt171-82CAG, perte de ce marquage vers le site d'injection en parallèle de la perte de marquage NeuN et DARPP32 et de la mort cellulaire (fluorojade) à 2mois, astroglie striatale. le promoteur CMV infecte une zone plus réduite que PGK, mais induit des agrégats nucléaires et cytosoliques, la réduction du nombre de CAG augmente le délai de formation des agrégats de 1 et 3 semaines pour 66 et 44 CAG, les forme longues de l'huntingtine (853 et 1520aa) forment plus d'aggrégats cytosoliques et retardent la dégénérescence à 6mois pour htt853.	(de Almeida et al., 2002)
			
<i>Rattus Norvegicus/ Wistar</i>	lentivirus + Htt 171, 548 ou 853 aa Nterm + 19, 82 ou 128CAG + TRE + promoteur SIN-W / transactivateur tTA1 régulé par la tétracycline + promoteur PGK injection intrastriatiale des deux constructions à 200ng de p24	Expression réduite au niveau de base de l'huntingtine mutée par l'eau de boisson contenant la doxycycline, expression multipliée par 6 de la forme mutée par rapport à la forme endogène en absence de doxycycline in vitro, diminution du marquage DARPP32 à un mois sans changement de NeuN chez TRE-htt853-82CAG , baisse des 2 marqueurs chez TRE-htt171-82Q, inclusions neuronales et cytoplasmiques contenant des formes courtes de htt (reconnues par 2B4 marquant la partie N-term et pas par 1H6 dirigé contre aa 115-129) à 1 mois chez TRE-htt853-82Q, inclusions intranucléaires marquées par les deux anticorps chez les TRE-htt171-82Q, réversion de la perte de DARPP32 par administration de doxycycline deux mois après un mois d'expression de la forme mutée.	(Regulier et al., 2003)

ANNEXES

espèces	construction génique	neuropathologie et comportement	références bibliographiques
rat			
 <i>Rattus Norvegicus</i>	htt fragment N-terminal de rat 1962 pb soit 75kDa + 51CAG + promoteur endogène <i>Hdh</i> de rat	Expression de la forme mutée inférieure à la forme endogène et double chez l'homozygote par rapport à l'hétérozygote, gain de poids plus faible chez l'adulte avec atrophie musculaire finale et mortalité vers 2 ans, glycémie normale, réduction de l'anxiété dès 2 mois, anomalie de cognition à 10mois (mémoire de travail), motricité normale à 5 mois puis anormale à 10-15mois, inclusions intranucléaire et dans le neuropile du striatum et du cortex dès 12mois, présentes en plus grand nombre à 18 puis 24mois, réduction de la dopamine striatale de 20% et 80% pour les hétéozygotes et homozygotes, baisse du tryptophane striatal, baisse du métabolisme du glucose striatal, élargissement ventriculaire, ↓ des D2, D1, GABAA, M1, 5-HT2 et A2A-R chez les hétérozygotes et homozygotes à 2ans.	(von Horsten et al., 2003; Bauer et al., 2005)
mini-porc			
 <i>Sus scrofa domestica</i>	htt de porc de 3,3kb + + 75CAG + promoteur NSE de rat		(Uchida et al., 2001)
mouche			
 <i>drosophila melanogaster</i>	htt N terminale + 2, 75 ou 120 CAG + régulateur d'expression pGMR htt exon-1 + 20 ou 93 CAG + transactivateur GAL-4 + promoteur d'expression neuronal <i>elav</i>	Expression de la forme mutée spécifiquement au niveau des photorécepteurs, dégénérescence partielle à 10jours pour 75CAG et dès 2jours avec forte proportion à 10 jours pour 120CAG, condensation nucléaire et cytoplasmique proche de l'apoptose, localisation préférencielle de htt120CAG dans le noyau Expression de la forme mutée dans les neurones dès le stade embryonnaire, dégénérescence des photorécepteurs progressive avec 93 CAG passant de 7 rhabdomères (j0) à 6,35 (j1) puis 5,13 (j6) puis 4,66 (j12), mortalité de 70% et précoce chez l'adulte.	(Jackson et al., 1998) (Steffan et al., 2001)
nematode			
 <i>Caenorhabditis elegans</i>	htt humaine N terminale 57aa + 19, 88 ou 128 CAG + promoteur <i>Pmec3</i> + CFP	Expression de la forme mutée spécifiquement au niveau des mécanorécepteurs, anomalies mécanosensorielles augmentées par la taille de l'expansion, quelques agrégats périnucléaires, absence de mort cellulaire	(Parker et al., 2001)
poisson zebre			
 <i>Zebra fish</i>	htt humaine exon 1-3 + 82CAG + GFP ou GFP+19, 35, 56 ou 80CAG	Inclusions dans les cellules embryonnaires et mortalité cellulaire avec 56 et 80 CAG	(Miller et al., 2005)

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abdel-Hamid K. M. and Tymianski M. (1997) Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins. *J Neurosci* **17**, 3538-3553.
- Aboud L. G. (1969) *Handbook of Neurochemistry*. Plenum Press, New York.
- Acosta M. L. and Kalloniatis M. (2005) Short- and long-term enzymatic regulation secondary to metabolic insult in the rat retina. *J Neurochem* **92**, 1350-1362.
- Adam-Vizi V. (2005) Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1140-1149.
- Aiba A., Kano M., Chen C., Stanton M. E., Fox G. D., Herrup K., Zwingman T. A. and Tonegawa S. (1994) Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* **79**, 377-388.
- Aihara Y., Mashima H., Onda H., Hisano S., Kasuya H., Hori T., Yamada S., Tomura H., Yamada Y., Inoue I., Kojima I. and Takeda J. (2000) Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* **74**, 2622-2625.
- Akopian G. and Walsh J. P. (2002) Corticostriatal paired-pulse potentiation produced by voltage-dependent activation of NMDA receptors and L-type Ca(2+) channels. *J Neurophysiol* **87**, 157-165.
- Aksenov M. Y., Tucker H. M., Nair P., Aksenova M. V., Butterfield D. A., Estus S. and Markesbery W. R. (1999) The expression of several mitochondrial and nuclear genes encoding the subunits of electron transport chain enzyme complexes, cytochrome c oxidase, and NADH dehydrogenase, in different brain regions in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* **24**, 767-774.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition. Garland Science, New York.
- Albin R. L. and Greenamyre J. T. (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* **42**, 733-738.
- Albin R. L., Young A. B., Penney J. B., Handelin B., Balfour R., Anderson K. D., Markel D. S., Tourtellotte W. W. and Reiner A. (1990) Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. *N Engl J Med* **322**, 1293-1298.
- Albin R. L., Reiner A., Anderson K. D., Dure L. S. t., Handelin B., Balfour R., Whetsell W. O., Jr., Penney J. B. and Young A. B. (1992) Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* **31**, 425-430.
- Almeida R. D., Manadas B. J., Melo C. V., Gomes J. R., Mendes C. S., Graos M. M., Carvalho R. F., Carvalho A. P. and Duarte C. B. (2005) Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ* **12**, 1329-1343.
- Alston T. A., Mela L. and Bright H. J. (1977) 3-Nitropropionate, the toxic substance of Indigofera, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3767-3771.
- Altar C. A., Cai N., Bliven T., Juhasz M., Conner J. M., Acheson A. L., Lindsay R. M. and Wiegand S. J. (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* **389**, 856-860.
- Alzheimer A. (1911) Über die anatomische Grundlage der Huntingtonischen Chorea und der choreatischen Bewegungen überhaupt. *Neurol Centralblatt* **30**, 891-892.
- Amiel S. A. (1995) Organ fuel selection: brain. *Proc Nutr Soc* **54**, 151-155.
- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R. and Young I. G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465.
- Andersson O., Stenqvist A., Attersand A. and von Euler G. (2001) Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B. *Genomics* **78**, 178-184.
- Andrew S. E., Goldberg Y. P., Kremer B., Telenius H., Theilmann J., Adam S., Starr E., Squitieri F., Lin B., Kalchman M. A. and et al. (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* **4**, 398-403.

BIBLIOGRAPHIE

- Ango F., Prezeau L., Muller T., Tu J. C., Xiao B., Worley P. F., Pin J. P., Bockaert J. and Fagni L. (2001) Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* **411**, 962-965.
- Ankarcrona M., Dypbukt J. M., Bonfoco E., Zhivotovsky B., Orrenius S., Lipton S. A. and Nicotera P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* **15**, 961-973.
- Annunziato L., Pignataro G. and Di Renzo G. F. (2004) Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev* **56**, 633-654.
- Anton G. (1896) Über die beteiligung der grossen basalen Gehirnganglien bei Bewegungsstörungen und insbesondere bei Chorea. *Jahrbücher für Psychiat. Neurol. (Lpz)* **14**, 141-181.
- Antonawich F. J., Fiore-Marasa S. M. and Parker C. P. (2002) Modulation of apoptotic regulatory proteins and early activation of cytochrome C following systemic 3-nitropropionic acid administration. *Brain Res Bull* **57**, 647-649.
- Antonini A., Leenders K. L. and Eidelberg D. (1998) [¹¹C]raclopride-PET studies of the Huntington's disease rate of progression: relevance of the trinucleotide repeat length. *Ann Neurol* **43**, 253-255.
- Antonini A., Leenders K. L., Spiegel R., Meier D., Vontobel P., Weigell-Weber M., Sanchez-Pernaute R., de Yebenez J. G., Boesiger P., Weindl A. and Maguire R. P. (1996) Striatal glucose metabolism and dopamine D2 receptor binding in asymptomatic gene carriers and patients with Huntington's disease. *Brain* **119 (Pt 6)**, 2085-2095.
- Aoki E., Semba R., Kato K. and Kashiwamata S. (1987) Purification of specific antibody against aspartate and immunocytochemical localization of aspartergic neurons in the rat brain. *Neuroscience* **21**, 755-765.
- Aoki M., Lin C. L., Rothstein J. D., Geller B. A., Hosler B. A., Munsat T. L., Horvitz H. R. and Brown R. H., Jr. (1998) Mutations in the glutamate transporter EAAT2 gene do not cause abnormal EAAT2 transcripts in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **43**, 645-653.
- Appel S. H. (1993) Excitotoxic neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Neurosci* **16**, 3-5.
- Aquilonius S. M., Eckernas S. A. and Sundwall A. (1975) Regional distribution of choline acetyltransferase in the human brain: changes in Huntington's chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **38**, 669-677.
- Arpa J., Campos Y., Gutierrez-Molina M., Cruz-Martinez A., Arenas J., Caminero A. B., Palomo F., Morales C. and Barreiro P. (1994) Benign mitochondrial myopathy with decreased succinate cytochrome C reductase activity. *Acta Neurol Scand* **90**, 281-284.
- Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E. S., Segal M. R. and Finkbeiner S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* **431**, 805-810.
- Arriza J. L., Eliasof S., Kavanaugh M. P. and Amara S. G. (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4155-4160.
- Arzberger T., Krampfl K., Leimgruber S. and Weindl A. (1997) Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 440-454.
- Ashworth T. S., Brown E. G. and Roberts F. M. (1972) Biosynthesis of willardiine and isowillardiine in germinating pea seeds and seedlings. *Biochem J* **129**, 897-905.
- Attwell D. and Laughlin S. B. (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1133-1145.
- Aubeeluck A. (2005) Caring for the carers: quality of life in Huntington's disease. *Br J Nurs* **14**, 452-454.
- Auerbach W., Hurlbert M. S., Hilditch-Maguire P., Wadghiri Y. Z., Wheeler V. C., Cohen S. I., Joyner A. L., MacDonald M. E. and Turnbull D. H. (2001) The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Hum Mol Genet* **10**, 2515-2523.
- Ayata C., Ayata G., Hara H., Matthews R. T., Beal M. F., Ferrante R. J., Endres M., Kim A., Christie R. H., Waeber C., Huang P. L., Hyman B. T. and Moskowitz M. A. (1997) Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice. *J Neurosci* **17**, 6908-6917.
- Aylward E. H., Sparks B. F., Field K. M., Yallapragada V., Shpritz B. D., Rosenblatt A., Brandt J., Gourley L. M., Liang K., Zhou H., Margolis R. L. and Ross C. A. (2004) Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* **63**, 66-72.
- Azarashvili T., Krestinina O., Yurkov I., Evtodienko Y. and Reiser G. (2005) High-affinity peripheral benzodiazepine receptor ligand, PK11195, regulates protein phosphorylation in rat brain mitochondria under control of Ca²⁺. *J Neurochem* **94**, 1054-1062.

BIBLIOGRAPHIE

B

- Backman L., Robins-Wahlin T. B., Lundin A., Ginovart N. and Farde L. (1997) Cognitive deficits in Huntington's disease are predicted by dopaminergic PET markers and brain volumes. *Brain* **120** (Pt 12), 2207-2217.
- Bajgar R., Seetharaman S., Kowaltowski A. J., Garlid K. D. and Paucek P. (2001) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* **276**, 33369-33374.
- Bakken I. J., Johnsen S. F., White L. R., Unsgard G., Aasly J. and Sonnewald U. (1997) NMR spectroscopy study of the effect of 3-nitropropionic acid on glutamate metabolism in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* **47**, 642-649.
- Bano D., Young K. W., Guerin C. J., Lefevre R., Rothwell N. J., Naldini L., Rizzuto R., Carafoli E. and Nicotera P. (2005) Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* **120**, 275-285.
- Bantubungi K., Jacquard C., Greco A., Pintor A., Chtarto A., Tai K., Galas M. C., Tenenbaum L., Deglon N., Popoli P., Minghetti L., Brouillet E., Brotchi J., Leviair M., Schiffmann S. N. and Blum D. (2005) Minocycline in phenotypic models of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **18**, 206-217.
- Barth A., Nguyen L. B., Barth L. and Newell D. W. (2005) Glycine-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Brain Res* **161**, 351-357.
- Bartlett K. and Eaton S. (2004) Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem* **271**, 462-469.
- Bartoloni L., Wattenhofer M., Kudoh J., Berry A., Shibuya K., Kawasaki K., Wang J., Asakawa S., Talior I., Bonne-Tamir B., Rossier C., Michaud J., McCabe E. R., Minoshima S., Shimizu N., Scott H. S. and Antonarakis S. E. (2000) Cloning and characterization of a putative human glycerol 3-phosphate permease gene (SLC37A1 or G3PP) on 21q22.3: mutation analysis in two candidate phenotypes, DFNB10 and a glycerol kinase deficiency. *Genomics* **70**, 190-200.
- Bates G. P., Mangiarini L., Mahal A. and Davies S. W. (1997) Transgenic models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **6**, 1633-1637.
- Baysal B. E. (2004) Genomic imprinting and environment in hereditary paraganglioma. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **129**, 85-90.
- Baysal K., Jung D. W., Gunter K. K., Gunter T. E. and Brierley G. P. (1994) Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca²⁺/2Na⁺ exchanger. *Am J Physiol* **266**, C800-808.
- Bazzett T. J., Falik R. C., Becker J. B. and Albin R. L. (1995) Chronic administration of malonic acid produces selective neural degeneration and transient changes in calbindin immunoreactivity in rat striatum. *Exp Neurol* **134**, 244-252.
- Beadle G. W., Mitchell H. K. and Nyc J. F. (1947) Kynurenine as an Intermediate in the Formation of Nicotinic Acid from Tryptophane by Neurospora. *Proc Natl Acad Sci U S A* **33**, 155-158.
- Beal M. F. (1992a) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* **31**, 119-130.
- Beal M. F. (1992b) Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr Opin Neurobiol* **2**, 657-662.
- Beal M. F. (1992c) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *Faseb J* **6**, 3338-3344.
- Beal M. F. (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* **23**, 298-304.
- Beal M. F. (2001) Mitochondria and oxidative damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Funct Neurol* **16**, 161-169.
- Beal M. F. (2004a) Therapeutic effects of coenzyme Q10 in neurodegenerative diseases. *Methods Enzymol* **382**, 473-487.
- Beal M. F. (2004b) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 381-386.
- Beal M. F. (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* **58**, 495-505.
- Beal M. F., Kowall N. W., Swartz K. J., Ferrante R. J. and Martin J. B. (1988) Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. *J Neurosci* **8**, 3901-3908.
- Beal M. F., Kowall N. W., Ellison D. W., Mazurek M. F., Swartz K. J. and Martin J. B. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* **321**, 168-171.
- Beal M. F., Swartz K. J., Hyman B. T., Storey E., Finn S. F. and Koroshetz W. (1991) Aminooxyacetic acid results in excitotoxin lesions by a novel indirect mechanism. *J Neurochem* **57**, 1068-1073.
- Beal M. F., Brouillet E., Jenkins B., Henshaw R., Rosen B. and Hyman B. T. (1993a) Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J Neurochem* **61**, 1147-1150.

BIBLIOGRAPHIE

- Beal M. F., Brouillet E., Jenkins B. G., Ferrante R. J., Kowall N. W., Miller J. M., Storey E., Srivastava R., Rosen B. R. and Hyman B. T. (1993b) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* **13**, 4181-4192.
- Beck Y., Oren R., Amit B., Levanon A., Gorecki M. and Hartman J. R. (1987) Human Mn superoxide dismutase cDNA sequence. *Nucleic Acids Res* **15**, 9076.
- Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A. and Freeman B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1620-1624.
- Bednarczyk P., Kicinska A., Kominkova V., Ondrias K., Dolowy K. and Szewczyk A. (2004) Quinine inhibits mitochondrial ATP-regulated potassium channel from bovine heart. *J Membr Biol* **199**, 63-72.
- Bednarski E., Vanderklish P., Gall C., Saido T. C., Bahr B. A. and Lynch G. (1995) Translational suppression of calpain I reduces NMDA-induced spectrin proteolysis and pathophysiology in cultured hippocampal slices. *Brain Res* **694**, 147-157.
- Beister A., Kraus P., Kuhn W., Dose M., Weindl A. and Gerlach M. (2004) The N-methyl-D-aspartate antagonist memantine retards progression of Huntington's disease. *J Neural Transm Suppl*, 117-122.
- Bellomo M., Giuffrida R., Palmeri A. and Sapienza S. (1998) Excitatory amino acids as neurotransmitters of corticostriatal projections: immunocytochemical evidence in the rat. *Arch Ital Biol* **136**, 215-223.
- Ben-Ari Y., Lagowska J., Tremblay E. and Le Gal La Salle G. (1979) A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* **163**, 176-179.
- Benchoua A., Guegan C., Couriaud C., Hosseini H., Sampaio N., Morin D. and Onteniente B. (2001) Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* **21**, 7127-7134.
- Benchoua A., Trioulier Y., Zala D., Gaillard M. C., Lefort N., Dufour N., Saudou F., Elalouf J. M., Hirsch E., Hantraye P., Deglon N. and Brouillet E. (2006) Involvement of Mitochondrial Complex II Defects in Neuronal Death Produced by N-Terminus Fragment of Mutated Huntingtin. *Mol Biol Cell* **17**, 1652-1663.
- Benjamin D. R. (1992) Mushroom poisoning in infants and children: the Amanita pantherina/muscaria group. *J Toxicol Clin Toxicol* **30**, 13-22.
- Bennett J. C. and Plum F. (1997) *Cecil Traité de médecine interne*, Première édition française traduite de la vingtième édition américaine. Edition. Médecine Sciences Flammarion.
- Berman F. W. and Murray T. F. (1997) Domoic acid neurotoxicity in cultured cerebellar granule neurons is mediated predominantly by NMDA receptors that are activated as a consequence of excitatory amino acid release. *J Neurochem* **69**, 693-703.
- Bernardi P., Angrilli A. and Azzone G. F. (1990) A gated pathway for electrophoretic Na⁺ fluxes in rat liver mitochondria. Regulation by surface Mg²⁺. *Eur J Biochem* **188**, 91-97.
- Bessert D. A., Guttridge K. L., Dunbar J. C. and Carlock L. R. (1995) The identification of a functional nuclear localization signal in the Huntington disease protein. *Brain Res Mol Brain Res* **33**, 165-173.
- Betarbet R., Sherer T. B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A. V. and Greenamyre J. T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **3**, 1301-1306.
- Bezprozvanny I. and Hayden M. R. (2004) Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1310-1317.
- Bhaumik P., Koski M. K., Glumoff T., Hiltunen J. K. and Wierenga R. K. (2005) Structural biology of the thioester-dependent degradation and synthesis of fatty acids. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 621-628.
- Bhave G., Nadin B. M., Brasier D. J., Glauner K. S., Shah R. D., Heinemann S. F., Karim F. and Gereau R. W. t. (2003) Membrane topology of a metabotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* **278**, 30294-30301.
- Bi R., Bi X. and Baudry M. (1998) Phosphorylation regulates calpain-mediated truncation of glutamate ionotropic receptors. *Brain Res* **797**, 154-158.
- Bibb J. A., Yan Z., Svenningsson P., Snyder G. L., Pieribone V. A., Horiuchi A., Nairn A. C., Messer A. and Greengard P. (2000) Severe deficiencies in dopamine signaling in presymptomatic Huntington's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6809-6814.
- Binienda Z., Virmani A., Przybyla-Zawislak B. and Schmued L. (2004) Neuroprotective effect of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid (3-NPA)-evoked neurotoxicity in rats. *Neurosci Lett* **367**, 264-267.

BIBLIOGRAPHIE

- Bird E. D., Mackay A. V., Rayner C. N. and Iversen L. L. (1973) Reduced glutamic-acid-decarboxylase activity of post-mortem brain in Huntington's chorea. *Lancet* **1**, 1090-1092.
- Biscoe T. J., Evans R. H., Headley P. M., Martin M. and Watkins J. C. (1975) Domoic and quisqualic acids as potent amino acid excitants of frog and rat spinal neurones. *Nature* **255**, 166-167.
- Biscoe T. J., Evans R. H., Francis A. A., Martin M. R., Watkins J. C., Davies J. and Dray A. (1977) D-alpha-Aminoadipate as a selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation of mammalian spinal neurones. *Nature* **270**, 743-745.
- Biswas S., Harris F., Dennison S., Singh J. P. and Phoenix D. (2005) Calpains: enzymes of vision? *Med Sci Monit* **11**, RA301-310.
- Bizat N., Galas M. C., Jacquard C., Boyer F., Hermel J. M., Schiffmann S. N., Hantraye P., Blum D. and Brouillet E. (2005) Neuroprotective effect of zVAD against the neurotoxin 3-nitropropionic acid involves inhibition of calpain. *Neuropharmacology* **49**, 695-702.
- Bizat N., Hermel J. M., Boyer F., Jacquard C., Creminon C., Ouary S., Escartin C., Hantraye P., Kajewski S. and Brouillet E. (2003a) 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**, 5020-5030. Erratum in: *J Neurosci*. 2003 Oct 5029;5023(5030):9960.
- Bizat N., Hermel J. M., Humbert S., Jacquard C., Creminon C., Escartin C., Saudou F., Krajewski S., Hantraye P. and Brouillet E. (2003b) In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* **278**, 43245-43253.
- Blakely R. D. and Coyle J. T. (1988) The neurobiology of N-acetylaspartylglutamate. *Int Rev Neurobiol* **30**, 39-100.
- Blomgren K., McRae A., Elmered A., Bona E., Kawashima S., Saido T. C., Ono T. and Hagberg H. (1997) The calpain proteolytic system in neonatal hypoxic-ischemia. *Ann N Y Acad Sci* **825**, 104-119.
- Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J. O., Leverin A. L., Bahr B. A., Mallard C. and Hagberg H. (2001) Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* **276**, 10191-10198.
- Blum D., Galas M. C., Gall D., Cuvelier L. and Schiffmann S. N. (2002) Striatal and cortical neurochemical changes induced by chronic metabolic compromise in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **10**, 410-426.
- Bohnen N. I., Koeppe R. A., Meyer P., Ficarò E., Wernette K., Kilbourn M. R., Kuhl D. E., Frey K. A. and Albin R. L. (2000) Decreased striatal monoaminergic terminals in Huntington disease. *Neurology* **54**, 1753-1759.
- Bonifati V., Rizzu P., van Baren M. J., Schaap O., Breedveld G. J., Krieger E., Dekker M. C., Squitieri F., Ibanez P., Joosse M., van Dongen J. W., Vanacore N., van Swieten J. C., Brice A., Meco G., van Duijn C. M., Oostra B. A. and Heutink P. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* **299**, 256-259.
- Bonvento G., Sibson N. and Pellerin L. (2002) Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci* **25**, 359-364.
- Bordelon Y. M. and Chesselet M. F. (1999) Early effects of intrastriatal injections of quinolinic acid on microtubule-associated protein-2 and neuropeptides in rat basal ganglia. *Neuroscience* **93**, 843-853.
- Bordelon Y. M., Mackenzie L. and Chesselet M. F. (1999) Morphology and compartmental location of cells exhibiting DNA damage after quinolinic acid injections into rat striatum. *J Comp Neurol* **412**, 38-50.
- Borovecki F., Lovrecic L., Zhou J., Jeong H., Then F., Rosas H. D., Hersch S. M., Hogarth P., Bouzou B., Jensen R. V. 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**, 11023-11028.
- Bots G. T. and Bruyn G. W. (1981) Neuropathological changes of the nucleus accumbens in Huntington's chorea. *Acta Neuropathol (Berl)* **55**, 21-22.
- Botsch H., Oepen G., Deuschl G. and Wolff G. (1987) [SPECT studies with 99mTc-HMPAO in Huntington's chorea patients]. *Rofa* **147**, 666-668.
- Bourgeron T., Rustin P., Chretien D., Birch-Machin M., Bourgeois M., Viegas-Pequignot E., Munnich A. and Rotig A. (1995) Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* **11**, 144-149.
- Bourgeron T., Chretien D., Poggi-Bach J., Doonan S., Rabier D., Letouze P., Munnich A., Rotig A., Landrieu P. and Rustin P. (1994) Mutation of the fumarase gene in two siblings with progressive encephalopathy and fumarase deficiency. *J Clin Invest* **93**, 2514-2518.

BIBLIOGRAPHIE

- Boutell J. M., Thomas P., Neal J. W., Weston V. J., Duce J., Harper P. S. and Jones A. L. (1999) Aberrant interactions of transcriptional repressor proteins with the Huntington's disease gene product, huntingtin. *Hum Mol Genet* **8**, 1647-1655.
- Bove J., Prou D., Perier C. and Przedborski S. (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* **2**, 484-494.
- Boveris A. (1977) Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* **78**, 67-82.
- Brennan J. E., Chao D. S., Gee S. H., McGee A. W., Craven S. E., Santillano D. R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M. F., Froehner S. C. and Bredt D. S. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**, 757-767.
- Brennan W. A., Jr., Bird E. D. and Aprille J. R. (1985) Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J Neurochem* **44**, 1948-1950.
- Brett C. L., Wei Y., Donowitz M. and Rao R. (2002) Human Na(+)/H(+) exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C1031-1041.
- Bridges R. J. and Esslinger C. S. (2005) The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacol Ther* **107**, 271-285.
- Brierley G. P., Baysal K. and Jung D. W. (1994) Cation transport systems in mitochondria: Na⁺ and K⁺ uniports and exchangers. *J Bioenerg Biomembr* **26**, 519-526.
- Bronson J. R., Marcuccilli C. J. and Miller R. J. (1995) Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. *Stroke* **26**, 1259-1266; discussion 1267.
- Brouillet E., Conde F., Beal M. F. and Hantraye P. (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* **59**, 427-468.
- Brouillet E., Jacquard C., Bizat N. and Blum D. (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* **95**, 1521-1540.
- Brouillet E., Hyman B. T., Jenkins B. G., Henshaw D. R., Schulz J. B., Sodhi P., Rosen B. R. and Beal M. F. (1994) Systemic or local administration of azide produces striatal lesions by an energy impairment-induced excitotoxic mechanism. *Exp Neurol* **129**, 175-182.
- Brown G. C. (1992) Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J* **284** (Pt 1), 1-13.
- Brown G. C. (2005) <http://www.mitophysiology.org/index.php?browngc>.
- Brown R. M., Head R. A., Boubriak, II, Leonard J. V., Thomas N. H. and Brown G. K. (2004) Mutations in the gene for the E1beta subunit: a novel cause of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* **115**, 123-127.
- Browne S. E. and Beal M. F. (2002) Toxin-induced mitochondrial dysfunction. *Int Rev Neurobiol* **53**, 243-279.
- Browne S. E. and Beal M. F. (2004) The energetics of Huntington's disease. *Neurochem Res* **29**, 531-546.
- Browne S. E., Ferrante R. J. and Beal M. F. (1999) Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol* **9**, 147-163.
- Browne S. E., Bowling A. C., MacGarvey U., Baik M. J., Berger S. C., Muqit M. M., Bird E. D. and Beal M. F. (1997) Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* **41**, 646-653.
- Brownell A. L., Chen Y. I., Yu M., Wang X., Dedeoglu A., Cicchetti F., Jenkins B. G. and Beal M. F. (2004) 3-Nitropropionic acid-induced neurotoxicity--assessed by ultra high resolution positron emission tomography with comparison to magnetic resonance spectroscopy. *J Neurochem* **89**, 1206-1214.
- Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J. and Greenberg M. E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Brustovetsky N., Brustovetsky T., Jemmerson R. and Dubinsky J. M. (2002) Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. *J Neurochem* **80**, 207-218.
- Bruyn G. W. (1968) *Huntington's chorea: historical, clinical and laboratory synopsis*, Vol. 6, pp 379-396, Amsterdam.
- Buchan A. M., Xue D., Huang Z. G., Smith K. H. and Lesiuk H. (1991) Delayed AMPA receptor blockade reduces cerebral infarction induced by focal ischemia. *Neuroreport* **2**, 473-476.
- Buisson A., Margail I., Callebort J., Plotkine M. and Boulou R. G. (1993) Mechanisms involved in the neuroprotective activity of a nitric oxide synthase inhibitor during focal cerebral ischemia. *J Neurochem* **61**, 690-696.
- Bullock R., Zauner A., Woodward J. J., Myseros J., Choi S. C., Ward J. D., Marmarou A. and Young H. F. (1998) Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg* **89**, 507-518.

BIBLIOGRAPHIE

- Burdi R., Didonna M. P., Pignol B., Nico B., Mangieri D., Rolland J. F., Camerino C., Zallone A., Ferro P., Andreetta F., Confalonieri P. and De Luca A. (2006) First evaluation of the potential effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant. *Neuromuscul Disord* **16**, 237-248.
- Burns M. E., Sasaki T., Takai Y. and Augustine G. J. (1998) Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic. *J Gen Physiol* **111**, 243-255.
- Butcher S. P., Lazarewicz J. W. and Hamberger A. (1987) In vivo microdialysis studies on the effects of decortication and excitotoxic lesions on kainic acid-induced calcium fluxes, and endogenous amino acid release, in the rat striatum. *J Neurochem* **49**, 1355-1360.
- Butcher S. P., Henshall D. C., Teramura Y., Iwasaki K. and Sharkey J. (1997) Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. *J Neurosci* **17**, 6939-6946.
- Butterfield P. G., Valanis B. G., Spencer P. S., Lindeman C. A. and Nutt J. G. (1993) Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. *Neurology* **43**, 1150-1158.
- Butterworth J., Yates C. M. and Reynolds G. P. (1985) Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J Neurol Sci* **67**, 161-171.
- Butterworth N. J., Williams L., Bullock J. Y., Love D. R., Faull R. L. and Dragunow M. (1998) Trinucleotide (CAG) repeat length is positively correlated with the degree of DNA fragmentation in Huntington's disease striatum. *Neuroscience* **87**, 49-53.
- Butterworth R. F. and Besnard A. M. (1990) Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* **5**, 179-184.
- Bydder G. M., Steiner R. E., Young I. R., Hall A. S., Thomas D. J., Marshall J., Pallis C. A. and Legg N. J. (1982) Clinical NMR imaging of the brain: 140 cases. *AJR Am J Roentgenol* **139**, 215-236.
- Byers R. K., Gilles F. H. and Fung C. (1973) Huntington's disease in children. Neuropathologic study of four cases. *Neurology* **23**, 561-569.
- Bzdega T., Turi T., Wroblewska B., She D., Chung H. S., Kim H. and Neale J. H. (1997) Molecular cloning of a peptidase against N-acetylaspartylglutamate from a rat hippocampal cDNA library. *J Neurochem* **69**, 2270-2277.
- Bzdega T., Crowe S. L., Ramadan E. R., Sciarretta K. H., Olszewski R. T., Ojeifo O. A., Rafalski V. A., Wroblewska B. and Neale J. H. (2004) The cloning and characterization of a second brain enzyme with NAAG peptidase activity. *J Neurochem* **89**, 627-635.

C

- Cai J., Yang J. and Jones D. P. (1998) Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 139-149.
- Calabresi P., De Murtas M., Mercuri N. B. and Bernardi G. (1990) Kainic acid on neostriatal neurons intracellularly recorded in vitro: electrophysiological evidence for differential neuronal sensitivity. *J Neurosci* **10**, 3960-3969.
- Calabresi P., Gubellini P., Picconi B., Centonze D., Pisani A., Bonsi P., Greengard P., Hipskind R. A., Borrelli E. and Bernardi G. (2001) Inhibition of mitochondrial complex II induces a long-term potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J Neurosci* **21**, 5110-5120.
- Camacho J. A., Obie C., Biery B., Goodman B. K., Hu C. A., Almashanu S., Steel G., Casey R., Lambert M., Mitchell G. A. and Valle D. (1999) Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat Genet* **22**, 151-158.
- Candlish E., La Croix J. and Unrau A. M. (1969) The biosynthesis of 3-nitropropionic acid in creeping indigo (*Indigofera spicata*). *Biochemistry* **8**, 182-186.
- Canet-Aviles R. M., Wilson M. A., Miller D. W., Ahmad R., McLendon C., Bandyopadhyay S., Baptista M. J., Ringe D., Petsko G. A. and Cookson M. R. (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9103-9108.
- Cangro C. B., Nambodiri M. A., Sklar L. A., Corigliano-Murphy A. and Neale J. H. (1987) Immunohistochemistry and biosynthesis of N-acetylaspartylglutamate in spinal sensory ganglia. *J Neurochem* **49**, 1579-1588.
- Canzoniero L. M., Babcock D. J., Gottron F. J., Grabb M. C., Manzerra P., Snider B. J. and Choi D. W. (2004) Raising intracellular calcium attenuates neuronal apoptosis triggered by staurosporine or oxygen-glucose deprivation in the presence of glutamate receptor blockade. *Neurobiol Dis* **15**, 520-528.

BIBLIOGRAPHIE

- Cao G., Minami M., Pei W., Yan C., Chen D., O'Horo C., Graham S. H. and Chen J. (2001) Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 321-333.
- Cao G., Clark R. S., Pei W., Yin W., Zhang F., Sun F. Y., Graham S. H. and Chen J. (2003) Translocation of apoptosis-inducing factor in vulnerable neurons after transient cerebral ischemia and in neuronal cultures after oxygen-glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1137-1150.
- Carafoli E. (2003) Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem Sci* **28**, 175-181.
- Carafoli E. (2004) Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci* **29**, 371-379.
- Carboni S., Antonsson B., Gaillard P., Gotteland J. P., Gillon J. Y. and Vitte P. A. (2005) Control of death receptor and mitochondrial-dependent apoptosis by c-Jun N-terminal kinase in hippocampal CA1 neurones following global transient ischaemia. *J Neurochem* **92**, 1054-1060.
- Cardone M. H., Roy N., Stennicke H. R., Salvesen G. S., Franke T. F., Stanbridge E., Frisch S. and Reed J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321.
- Casari G., De Fusco M., Ciarmatori S., Zeviani M., Mora M., Fernandez P., De Michele G., Filla A., Coccozza S., Marconi R., Durr A., Fontaine B. and Ballabio A. (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* **93**, 973-983.
- Casey R. E., Zaleski W. A., Philp M., Mendelson I. S. and MacKenzie S. L. (1978) Biochemical and clinical studies of a new case of alpha-aminoaciduria. *J Inherit Metab Dis* **1**, 129-135.
- Casley C. S., Canevari L., Land J. M., Clark J. B. and Sharpe M. A. (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem* **80**, 91-100.
- Cassarino D. S., Parks J. K., Parker W. D., Jr. and Bennett J. P., Jr. (1999) The parkinsonian neurotoxin MPP+ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1453**, 49-62.
- Cassidy M. and Neale J. H. (1993) N-acetylaspartylglutamate catabolism is achieved by an enzyme on the cell surface of neurons and glia. *Neuropeptides* **24**, 271-278.
- Cavadini P., O'Neill H. A., Benada O. and Isaya G. (2002) Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* **11**, 217-227.
- Centonze D., Rossi S., Prosperetti C., Tschertner A., Bernardi G., Maccarrone M. and Calabresi P. (2005) Abnormal sensitivity to cannabinoid receptor stimulation might contribute to altered gamma-aminobutyric acid transmission in the striatum of R6/2 Huntington's disease mice. *Biol Psychiatry* **57**, 1583-1589.
- Cepeda C., Ariano M. A., Calvert C. R., Flores-Hernandez J., Chandler S. H., Leavitt B. R., Hayden M. R. and Levine M. S. (2001) NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J Neurosci Res* **66**, 525-539.
- Cepeda C., Hurst R. S., Calvert C. R., Hernandez-Echeagaray E., Nguyen O. K., Jocoy E., Christian L. J., Ariano M. A. and Levine M. S. (2003) Transient and progressive electrophysiological alterations in the corticostriatal pathway in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* **23**, 961-969.
- Cepeda C., Starling A. J., Wu N., Nguyen O. K., Uzgil B., Soda T., Andre V. M., Ariano M. A. and Levine M. S. (2004) Increased GABAergic function in mouse models of Huntington's disease: reversal by BDNF. *J Neurosci Res* **78**, 855-867.
- Cha J. H. (2000) Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci* **23**, 387-392.
- Cha J. H., Kosinski C. M., Kerner J. A., Alsdorf S. A., Mangiarini L., Davies S. W., Penney J. B., Bates G. P. and Young A. B. (1998) Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6480-6485.
- Cha J. H., Frey A. S., Alsdorf S. A., Kerner J. A., Kosinski C. M., Mangiarini L., Penney J. B., Jr., Davies S. W., Bates G. P. and Young A. B. (1999) Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 981-989.
- Chabrier P. E., Auguet M., Spinnewyn B., Auvin S., Cornet S., Demerle-Pallardy C., Guilnard-Favre C., Marin J. G., Pignol B., Gillard-Roubert V., Roussillot-Charnet C., Schulz J., Viossat I., Bigg D. and Moncada S. (1999) BN 80933, a dual inhibitor of neuronal nitric oxide synthase and lipid peroxidation: a promising neuroprotective strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10824-10829.
- Chai J., Du C., Wu J. W., Kyin S., Wang X. and Shi Y. (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855-862.

BIBLIOGRAPHIE

- Chan E. Y., Luthi-Carter R., Strand A., Solano S. M., Hanson S. A., DeJohn M. M., Kooperberg C., Chase K. O., DiFiglia M., Young A. B., Leavitt B. R., Cha J. H., Aronin N., Hayden M. R. and Olson J. M. (2002) Increased huntingtin protein length reduces the number of polyglutamine-induced gene expression changes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **11**, 1939-1951.
- Chan P., DeLanney L. E., Irwin I., Langston J. W. and Di Monte D. (1991) Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem* **57**, 348-351.
- Chan P. H. and Fishman R. A. (1980) Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J Neurochem* **35**, 1004-1007.
- Chang D. T., Rintoul G. L., Pandipati S. and Reynolds I. J. (2006) Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiol Dis*.
- Chantrel-Grossard K., Geromel V., Puccio H., Koenig M., Munnich A., Rotig A. and Rustin P. (2001) Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* **10**, 2061-2067.
- Chapman A. G., Smith S. E. and Meldrum B. S. (1991) The anticonvulsant effect of the non-NMDA antagonists, NBQX and GYKI 52466, in mice. *Epilepsy Res* **9**, 92-96.
- Charriaut-Marlangue C. and Ben-Ari Y. (1995) A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* **7**, 61-64.
- Charvin D., Vanhoutte P., Pages C., Borrelli 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**, 12218-12223.
- Chatterton J. E., Awobuluyi M., Premkumar L. S., Takahashi H., Talantova M., Shin Y., Cui J., Tu S., Sevarino K. A., Nakanishi N., Tong G., Lipton S. A. and Zhang D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**, 793-798.
- Chazot P. L., Cik M. and Stephenson F. A. (1995) An investigation into the role of N-glycosylation in the functional expression of a recombinant heteromeric NMDA receptor. *Mol Membr Biol* **12**, 331-337.
- Chen H. and Chan D. C. (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R283-289.
- Chen M., Ona V. O., Li M., Ferrante R. J., Fink K. B., Zhu S., Bian J., Guo L., Farrell L. A., Hersch S. M., Hobbs W., Vonsattel J. P., Cha J. H. and Friedlander R. M. (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* **6**, 797-801.
- Chen N., Luo T. and Raymond L. A. (1999a) Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J Neurosci* **19**, 6844-6854.
- Chen N., Luo T., Wellington C., Metzler M., McCutcheon K., Hayden M. R. and Raymond L. A. (1999b) Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. *J Neurochem* **72**, 1890-1898.
- Chen Q., Harris C., Brown C. S., Howe A., Surmeier D. J. and Reiner A. (1995) Glutamate-mediated excitotoxic death of cultured striatal neurons is mediated by non-NMDA receptors. *Exp Neurol* **136**, 212-224.
- Cheng Y. and Sun A. Y. (1994) Oxidative mechanisms involved in kainate-induced cytotoxicity in cortical neurons. *Neurochem Res* **19**, 1557-1564.
- Chesselet M. F. (1988) La chorée de Huntington. *M/S* **4**, 492-499.
- Chiamulera C., Epping-Jordan M. P., Zocchi A., Marcon C., Cottiny C., Tacconi S., Corsi M., Orzi F. and Conquet F. (2001) Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat Neurosci* **4**, 873-874.
- Chiang M. C., Lee Y. C., Huang C. L. and Chern Y. (2005) cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J Biol Chem* **280**, 14331-14340.
- Chiarugi A., Rapizzi E., Moroni F. and Moroni F. (1999) The kynurenine metabolic pathway in the eye: studies on 3-hydroxykynurenine, a putative cataractogenic compound. *FEBS Lett* **453**, 197-200.
- Chiesi M., Rogg H., Eichenberger K., Gazzotti P. and Carafoli E. (1987) Stereospecific action of diltiazem on the mitochondrial Na-Ca exchange system and on sarcolemmal Ca-channels. *Biochem Pharmacol* **36**, 2735-2740.
- Choi D. W. (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* **58**, 293-297.
- Choi D. W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* **7**, 369-379.
- Choi D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
- Choi D. W., Koh J. Y. and Peters S. (1988) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* **8**, 185-196.

BIBLIOGRAPHIE

- Choo Y. S., Johnson G. V., MacDonald M., Detloff P. J. and Lesort M. (2004) Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet* **13**, 1407-1420.
- Churn S. B., Limbrick D., Sombati S. and DeLorenzo R. J. (1995) Excitotoxic activation of the NMDA receptor results in inhibition of calcium/calmodulin kinase II activity in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **15**, 3200-3214.
- Clem R. J., Cheng E. H., Karp C. L., Kirsch D. G., Ueno K., Takahashi A., Kastan M. B., Griffin D. E., Earnshaw W. C., Veluona M. A. and Hardwick J. M. (1998) Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 554-559.
- Coesmans M., Smitt P. A., Linden D. J., Shigemoto R., Hirano T., Yamakawa Y., van Alphen A. M., Luo C., van der Geest J. N., Kros J. M., Gaillard C. A., Frens M. A. and de Zeeuw C. I. (2003) Mechanisms underlying cerebellar motor deficits due to mGluR1-autoantibodies. *Ann Neurol* **53**, 325-336.
- Cohen G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326** (Pt 1), 1-16.
- Coles C. J., Edmondson D. E. and Singer T. P. (1979) Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem* **254**, 5161-5167.
- 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**, 1478-1488.
- Collins C., Duff C., Duncan A. M., Planells-Cases R., Sun W., Norremolle A., Michaelis E., Montal M., Worton R. and Hayden M. R. (1993) Mapping of the human NMDA receptor subunit (NMDAR1) and the proposed NMDA receptor glutamate-binding subunit (NMDARA1) to chromosomes 9q34.3 and chromosome 8, respectively. *Genomics* **17**, 237-239.
- Collins F., Schmidt M. F., Guthrie P. B. and Kater S. B. (1991) Sustained increase in intracellular calcium promotes neuronal survival. *J Neurosci* **11**, 2582-2587.
- Colombini M. (2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* **256-257**, 107-115.
- Colwell C. S. and Levine M. S. (1996) Glutamate receptor-induced toxicity in neostriatal cells. *Brain Res* **724**, 205-212.
- Conquet F., Bashir Z. I., Davies C. H., Daniel H., Ferraguti F., Bordi F., Franz-Bacon K., Reggiani A., Matarese V., Conde F. and et al. (1994) Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* **372**, 237-243.
- Conti F. and Weinberg R. J. (1999) Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* **22**, 451-458.
- Cooper A. J., Abraham D. G., Gelbard A. S., Lai J. C. and Petito C. K. (1993) High activities of glutamine transaminase K (dichlorovinylcysteine beta-lyase) and omega-amidase in the choroid plexus of rat brain. *J Neurochem* **61**, 1731-1741.
- Cooper G. M. (2000) *The Cell, A Molecular Approach*, 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc., Washington.
- Copani A., Canonico P. L. and Nicoletti F. (1990) Beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a potent agonist of 'metabotropic' glutamate receptors. *Eur J Pharmacol* **181**, 327-328.
- Coyle J. T. (1987) Kainic acid: insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration. *Ciba Found Symp* **126**, 186-203.
- Coyle J. T. and Schwarcz R. (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* **263**, 244-246.
- Coyle J. T. and Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695.
- Coyle J. T., Molliver M. E. and Kuhar M. J. (1978) In situ injection of kainic acid: a new method for selectively lesioning neural cell bodies while sparing axons of passage. *J Comp Neurol* **180**, 301-323.
- Crocker S. J., Smith P. D., Jackson-Lewis V., Lamba W. R., Hayley S. P., Grimm E., Callaghan S. M., Slack R. S., Melloni E., Przedborski S., Robertson G. S., Anisman H., Merali Z. and Park D. S. (2003) Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **23**, 4081-4091.
- Crompton M., Kunzi M. and Carafoli E. (1977) The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. *Eur J Biochem* **79**, 549-558.
- Crompton M., Moser R., Ludi H. and Carafoli E. (1978) The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur J Biochem* **82**, 25-31.
- Crosby A. H. (2003) Disruption of cellular transport: a common cause of neurodegeneration? *Lancet Neurol* **2**, 311-316.
- Cross A. J., Crow T. J., Johnson J. A., Dawson J. M. and Peters T. J. (1985) Loss of endoplasmic reticulum-associated enzymes in affected brain regions in Huntington's disease and Alzheimer-type dementia. *J Neurol Sci* **71**, 137-143.

BIBLIOGRAPHIE

- Crossman A. R., Mitchell I. J., Sambrook M. A. and Jackson A. (1988) Chorea and myoclonus in the monkey induced by gamma-aminobutyric acid antagonism in the lentiform complex. The site of drug action and a hypothesis for the neural mechanisms of chorea. *Brain* **111** (Pt 5), 1211-1233.
- Cull-Candy S., Brickley S. and Farrant M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 327-335.
- Curtis D. R. and Watkins J. C. (1960) The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* **6**, 117-141.
- Curtis D. R. and Watkins J. C. (1961) Analogues of glutamic and gamma-amino-n-butyric acids having potent actions on mammalian neurones. *Nature* **191**, 1010-1011.
- Curtis D. R. and Watkins J. C. (1963) Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *J Physiol* **166**, 1-14.
- Curtis D. R. and Johnston G. A. (1974) Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergeb Physiol* **69**, 97-188.
- Curtis D. R., Phillis J. W. and Watkins J. C. (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* **183**, 611-612.
- Curtis D. R., Phillis J. W. and Watkins J. C. (1961) Actions of aminoacids on the isolated hemisectioned spinal cord of the toad. *Br J Pharmacol Chemother* **16**, 262-283.
- Czogalla A. and Sikorski A. F. (2005) Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1913-1924.

D

- D'Amours D., Sallmann F. R., Dixit V. M. and Poirier G. G. (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* **114**, 3771-3778.
- Damiano M., Starkov A. A., Petri S., Kipiani K., Kiaei M., Mattiazzi M., Flint Beal M. and Manfredi G. (2006) Neural mitochondrial Ca²⁺ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J Neurochem* **96**, 1349-1361.
- Danbolt N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* **65**, 1-105.
- Darios F., Corti O., Lucking C. B., Hampe C., Muriel M. P., Abbas N., Gu W. J., Hirsch E. C., Rooney T., Ruberg M. and Brice A. (2003) Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* **12**, 517-526.
- Das A. M. (2003) Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Mol Genet Metab* **79**, 71-82.
- Datta S. R., Brunet A. and Greenberg M. E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13**, 2905-2927.
- Dautry C., Conde F., Brouillet E., Mittoux V., Beal M. F., Bloch G. and Hantraye P. (1999) Serial 1H-NMR spectroscopy study of metabolic impairment in primates chronically treated with the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. *Neurobiol Dis* **6**, 259-268.
- Dautry C., Vaufrey F., Brouillet E., Bizat N., Henry P. G., Conde F., Bloch G. and Hantraye P. (2000) Early N-acetylaspartate depletion is a marker of neuronal dysfunction in rats and primates chronically treated with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 789-799.
- Davanger S., Torp R. and Ottersen O. P. (1994) Co-localization of glutamate and homocysteic acid immunoreactivities in human photoreceptor terminals. *Neuroscience* **63**, 123-133.
- Davey G. P. and Clark J. B. (1996) Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem* **66**, 1617-1624.
- Davey G. P., Peuchen S. and Clark J. B. (1998) Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration. *J Biol Chem* **273**, 12753-12757.
- David G. and Barrett E. F. (2003) Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol* **548**, 425-438.
- Davies K. J. and Doroshov J. H. (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* **261**, 3060-3067.
- Davies S. W., Turmaine M., Cozens B. A., DiFiglia M., Sharp A. H., Ross C. A., Scherzinger E., Wanker E. E., Mangiarini L. and Bates G. P. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-548.

BIBLIOGRAPHIE

- Dawson R., Jr., Beal M. F., Bondy S. C., Di Monte D. A. and Isom G. E. (1995) Excitotoxins, aging, and environmental neurotoxins: implications for understanding human neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* **134**, 1-17.
- Dawson T. M., Bredt D. S., Fotuhi M., Hwang P. M. and Snyder S. H. (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7797-7801.
- Dawson V. L., Dawson T. M., Bartley D. A., Uhl G. R. and Snyder S. H. (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* **13**, 2651-2661.
- de Almeida L. P., Ross C. A., 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**, 3473-3483.
- de Belleruche J., Orrell R. and King A. (1995) Familial amyotrophic lateral sclerosis/motor neurone disease (FALS): a review of current developments. *J Med Genet* **32**, 841-847.
- de la Monte S. M., Vonsattel J. P. and Richardson E. P., Jr. (1988) Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **47**, 516-525.
- De Rooij K. E., De Koning Gans P. A., Skraastad M. I., Belfroid R. D., Vegter-Van Der Vlis M., Roos R. A., Bakker E., Van Ommen G. J., Den Dunnen J. T. and Losekoot M. (1993) Dynamic mutation in Dutch Huntington's disease patients: increased paternal repeat instability extending to within the normal size range. *J Med Genet* **30**, 996-1002.
- de Tommaso M., Sciruicchio V., Spinelli A., Specchio N., Difruscolo O., Puca F. and Specchio L. M. (2001) Features of the blink reflex in individuals at risk for Huntington's disease. *Muscle Nerve* **24**, 1520-1525.
- Debonnel G., Weiss M. and de Montigny C. (1989) Reduced neuroexcitatory effect of domoic acid following mossy fiber denervation of the rat dorsal hippocampus: further evidence that toxicity of domoic acid involves kainate receptor activation. *Can J Physiol Pharmacol* **67**, 904-908.
- Debonnel G., Weiss M. and de Montigny C. (1990) Neurotoxic effect of domoic acid: mediation by kainate receptor electrophysiological studies in the rat. *Can Dis Wkly Rep* **16 Suppl 1E**, 59-68.
- DeGiorgio L. A., Konstantinov K. N., Lee S. C., Hardin J. A., Volpe B. T. and Diamond B. (2001) A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med* **7**, 1189-1193.
- Dejean L. M., Martinez-Caballero S., Guo L., Hughes C., Teijido O., Ducret T., Ichas F., Korsmeyer S. J., Antonsson B., Jonas E. A. and Kinnally K. W. (2005) Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell* **16**, 2424-2432.
- Delatycki M. B., Williamson R. and Forrest S. M. (2000) Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet* **37**, 1-8.
- Dell K. R. (2003) Dynactin polices two-way organelle traffic. *J Cell Biol* **160**, 291-293.
- Deng Y. P., Albin R. L., Penney J. B., Young A. B., Anderson K. D. and Reiner A. (2004) Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* **27**, 143-164.
- Denovan-Wright E. M. and Robertson H. A. (2000) Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice. *Neuroscience* **98**, 705-713.
- Denton R. M., Randle P. J. and Martin B. R. (1972) Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J* **128**, 161-163.
- Denton R. M., Richards D. A. and Chin J. G. (1978) Calcium ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem J* **176**, 899-906.
- Dev K. K., Nakanishi S. and Henley J. M. (2001) Regulation of mglu(7) receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 355-361.
- Diaz-Hernandez M., Hernandez F., Martin-Aparicio E., Gomez-Ramos P., Moran M. A., Castano J. G., Ferrer I., Avila J. and Lucas J. J. (2003) Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci* **23**, 11653-11661.
- Dienel G. A. (1984) Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J Neurochem* **43**, 913-925.
- DiFiglia M. (1990) Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* **13**, 286-289.
- DiFiglia M., Sapp E., Chase K. O., Davies S. W., Bates G. P., Vonsattel J. P. and Aronin N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-1993.
- DiMauro S. and Schon E. A. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* **348**, 2656-2668.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D. and Traynelis S. F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**, 7-61.
- DiProspero N. A., Chen E. Y., Charles V., Plomann M., Kordower J. H. and Tagle D. A. (2004) Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. *J Neurocytol* **33**, 517-533.

BIBLIOGRAPHIE

- Do K. Q., Mattenberger M., Streit P. and Cuenod M. (1986a) In vitro release of endogenous excitatory sulfur-containing amino acids from various rat brain regions. *J Neurochem* **46**, 779-786.
- Do K. Q., Herrling P. L., Streit P., Turski W. A. and Cuenod M. (1986b) In vitro release and electrophysiological effects in situ of homocysteic acid, an endogenous N-methyl-(D)-aspartic acid agonist, in the mammalian striatum. *J Neurosci* **6**, 2226-2234.
- Doble A. (1999) The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* **81**, 163-221.
- Dolinska M., Hilgier W. and Albrecht J. (1996) Ammonia stimulates glutamine uptake to the cerebral non-synaptic mitochondria of the rat. *Neurosci Lett* **213**, 45-48.
- Dom R., Malfroid M. and Baro F. (1976) Neuropathology of Huntington's chorea. Studies of the ventrobasal complex of the thalamus. *Neurology* **26**, 64-68.
- Domingue O. (2006) <http://www.callisto.si.usherb.ca:8080/infosbio/BIM606/Organites.pdf>.
- Dragatsis I., Levine M. S. and Zeitlin S. (2000) Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet* **26**, 300-306.
- Dragunow M., Faulk R. L., Lawlor P., Beilharz E. J., Singleton K., Walker E. B. and Mee E. (1995) In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport* **6**, 1053-1057.
- Drahota Z., Gazzotti P., Carafoli E. and Rossi C. S. (1969) A comparison of the effects of different divalent cations on a number of mitochondrial reactions linked to ion translocation. *Arch Biochem Biophys* **130**, 267-273.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L. and Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Duan W., Guo Z. and Mattson M. P. (2000) Participation of par-4 in the degeneration of striatal neurons induced by metabolic compromise with 3-nitropropionic acid. *Exp Neurol* **165**, 1-11.
- Dubinsky J. M. (1993) Intracellular calcium levels during the period of delayed excitotoxicity. *J Neurosci* **13**, 623-631.
- Duchen M. R. (1992) Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J* **283** (Pt 1), 41-50.
- Duggan A. W. (1974) The differential sensitivity to L-glutamate and L-aspartate of spinal interneurons and Renshaw cells. *Exp Brain Res* **19**, 522-528.
- Dumuis A., Sebben M., Haynes L., Pin J. P. and Bockaert J. (1988) NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* **336**, 68-70.
- Dunah A. W., Jeong H., Griffin A., Kim Y. M., Standaert D. G., Hersch S. M., Mouradian M. M., Young A. B., Tanese N. and Krainc D. (2002) Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* **296**, 2238-2243.
- Dunlap C. B. (1927) Pathologic changes in Huntington's chorea with special reference to the corpus striatum. *Arch Neurol Psychiat (Chicago)* **18**, 867-943.
- Durbach N. and Hayden M. R. (1993) George Huntington: the man behind the eponym. *J Med Genet* **30**, 406-409.
- During M. J., Heyes M. P., Freese A., Markey S. P., Martin J. B. and Roth R. H. (1989) Quinolinic acid concentrations in striatal extracellular fluid reach potentially neurotoxic levels following systemic L-tryptophan loading. *Brain Res* **476**, 384-387.
- Dutra J. C., Dutra-Filho C. S., Cardozo S. E., Wannmacher C. M., Sarkis J. J. and Wajner M. (1993) Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. *J Inherit Metab Dis* **16**, 147-153.
- Duval C., Negre-Salvayre A., Dogilo A., Salvayre R., Penicaud L. and Casteilla L. (2002) Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells. *Biochem Cell Biol* **80**, 757-764.
- Duyao M. P., Auerbach A. B., Ryan A., Persichetti F., Barnes G. T., McNeil S. M., Ge P., Vonsattel J. P., Gusella J. F., Joyner A. L. and et al. (1995) Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* **269**, 407-410.

E

- Edwardson J. M., Wang C. T., Gong B., Wyttenbach A., Bai J., Jackson M. B., Chapman E. R. and Morton A. J. (2003) Expression of mutant huntingtin blocks exocytosis in PC12 cells by depletion of complexin II. *J Biol Chem* **278**, 30849-30853.
- Eimerl S. and Schramm M. (1994) The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *J Neurochem* **62**, 1223-1226.

BIBLIOGRAPHIE

- Ellison D. W., Beal M. F., Mazurek M. F., Malloy J. R., Bird E. D. and Martin J. B. (1987) Amino acid neurotransmitter abnormalities in Huntington's disease and the quinolinic acid animal model of Huntington's disease. *Brain* **110** (Pt 6), 1657-1673.
- Endele S., Fuhry M., Pak S. J., Zabel B. U. and Winterpacht A. (1999) LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients. *Genomics* **60**, 218-225.
- Engelender S., Sharp A. H., Colomer V., Tokito M. K., Lanahan A., Worley P., Holzbaur E. L. and Ross C. A. (1997) Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet* **6**, 2205-2212.
- Erecinska M. and Nelson D. (1994) Effects of 3-nitropropionic acid on synaptosomal energy and transmitter metabolism: relevance to neurodegenerative brain diseases. *J Neurochem* **63**, 1033-1041.
- Erlander M. G., Tillakaratne N. J., Feldblum S., Patel N. and Tobin A. J. (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* **7**, 91-100.
- Eugster C. H., Muller G. F. and Good R. (1965) [The active ingredients from *Amanita muscaria*: ibotenic acid and muscazone]. *Tetrahedron Lett* **23**, 1813-1815.

F

- Faber P. W., Barnes G. T., Srinidhi J., Chen J., Gusella J. F. and MacDonald M. E. (1998) Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Hum Mol Genet* **7**, 1463-1474.
- Facundo H. T., de Paula J. G. and Kowaltowski A. J. (2005) Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. *J Bioenerg Biomembr* **37**, 75-82.
- Facundo H. T., Fornazari M. and Kowaltowski A. J. (2006) Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 202-212.
- Fairman W. A. and Amara S. G. (1999) Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *Am J Physiol* **277**, F481-486.
- Feldmeyer D., Kask K., Brusa R., Kornau H. C., Kolhekar R., Rozov A., Burnashev N., Jensen V., Hvalby O., Sprengel R. and Seeburg P. H. (1999) Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat Neurosci* **2**, 57-64.
- Fernagut P. O., Ghorayeb I., Diguët E. and Tison F. (2005) In vivo models of multiple system atrophy. *Mov Disord* **20 Suppl 12**, S57-63.
- Fernandes M. A., Jurado A. S., Videira R. A., Santos M. S., Moreno A. J., Veleza A., Duburs G., Oliveira C. R. and Vicente J. A. (2005) Cerebrocrast promotes the cotransport of H⁺ and Cl⁻ in rat liver mitochondria. *Mitochondrion* **5**, 341-351.
- Ferrante R. J. and Kowall N. W. (1987) Tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity is distributed in the matrix compartment of normal human and Huntington's disease striatum. *Brain Res* **416**, 141-146.
- Ferrante R. J., Kowall N. W. and Richardson E. P., Jr. (1991) Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: a combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *J Neurosci* **11**, 3877-3887.
- Ferrante R. J., Beal M. F., Kowall N. W., Richardson E. P., Jr. and Martin J. B. (1987) Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain Res* **411**, 162-166.
- Ferrante R. J., Kowall N. W., Cipolloni P. B., Storey E. and Beal M. F. (1993) Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* **119**, 46-71.
- Ferrante R. J., Kowall N. W., Beal M. F., Richardson E. P., Jr., Bird E. D. and Martin J. B. (1985) Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. *Science* **230**, 561-563.
- Ferrante R. J., Andreassen O. A., Dedeoglu A., Ferrante K. L., Jenkins B. G., Hersch S. M. and Beal M. F. (2002) Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* **22**, 1592-1599.
- Ferrari G., Lamantea E., Donati A., Filosto M., Briem E., Carrara F., Parini R., Simonati A., Santer R. and Zeviani M. (2005) Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA. *Brain* **128**, 723-731.
- Ferrer I., Goutan E., Marin C., Rey M. J. and Ribalta T. (2000) Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Res* **866**, 257-261.

BIBLIOGRAPHIE

- Fiermonte G., Dolce V., Palmieri L., Ventura M., Runswick M. J., Palmieri F. and Walker J. E. (2001) Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J Biol Chem* **276**, 8225-8230.
- Fink J. M., Dobyns W. B., Guerrini R. and Hirsch B. A. (1997) Identification of a duplication of Xq28 associated with bilateral periventricular nodular heterotopia. *Am J Hum Genet* **61**, 379-387.
- Fischer U., Janicke R. U. and Schulze-Osthoff K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**, 76-100.
- Fiskum G. and Lehninger A. L. (1979) Regulated release of Ca²⁺ from respiring mitochondria by Ca²⁺/2H⁺ antiport. *J Biol Chem* **254**, 6236-6239.
- Fiskum G., Reynafarje B. and Lehninger A. L. (1979) The electric charge stoichiometry of respiration-dependent Ca²⁺ uptake by mitochondria. *J Biol Chem* **254**, 6288-6295.
- Fleury C., Neverova M., Collins S., Raimbault S., Champigny O., Levi-Meyrueis C., Bouillaud F., Seldin M. F., Surwit R. S., Ricquier D. and Warden C. H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* **15**, 269-272.
- Folstein M. F., Folstein S. E. and McHugh P. R. (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* **12**, 189-198.
- Fonda M. L. (1972) Glutamate decarboxylase. Substrate specificity and inhibition by carboxylic acids. *Biochemistry* **11**, 1304-1309.
- Forno L. S. and Jose C. (1973) *Huntington's chorea: a pathological study*, Vol. 1, pp 473-470. Raven Press, New York.
- Forrest D., Yuzaki M., Soares H. D., Ng L., Luk D. C., Sheng M., Stewart C. L., Morgan J. I., Connor J. A. and Curran T. (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* **13**, 325-338.
- Foster A. C., White R. J. and Schwarcz R. (1986) Synthesis of quinolinic acid by 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase in rat brain tissue in vitro. *J Neurochem* **47**, 23-30.
- Foster A. C., Gill R. and Woodruff G. N. (1988) Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J Neurosci* **8**, 4745-4754.
- Foster A. C., Miller L. P., Oldendorf W. H. and Schwarcz R. (1984) Studies on the disposition of quinolinic acid after intracerebral or systemic administration in the rat. *Exp Neurol* **84**, 428-440.
- Franco S. J. and Huttenlocher A. (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* **118**, 3829-3838.
- Fredholm B. B. and Dunwiddie T. V. (1988) How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci* **9**, 130-134.
- Freese A., Finklestein S. P. and DiFiglia M. (1992) Basic fibroblast growth factor protects striatal neurons in vitro from NMDA-receptor mediated excitotoxicity. *Brain Res* **575**, 351-355.
- Freese A., DiFiglia M., Koroshetz W. J., Beal M. F. and Martin J. B. (1990) Characterization and mechanism of glutamate neurotoxicity in primary striatal cultures. *Brain Res* **521**, 254-264.
- Freneau R. T., Jr., Voglmaier S., Seal R. P. and Edwards R. H. (2004a) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* **27**, 98-103.
- Freneau R. T., Jr., Kam K., Qureshi T., Johnson J., Copenhagen D. R., Storm-Mathisen J., Chaudhry F. A., Nicoll R. A. and Edwards R. H. (2004b) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* **304**, 1815-1819.
- Friede R. L. and Pax R. A. (1961) Mitochondria and mitochondrial enzymes. A comparative study of localization in the cat's brain stem. *Z Zellforsch Microsk Anat Histochem* **2**, 186-191.
- Friedlander R. M. (2003) Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* **348**, 1365-1375.
- Furtado S., Suchowersky O., Rewcastle B., Graham L., Klimek M. L. and Garber A. (1996) Relationship between trinucleotide repeats and neuropathological changes in Huntington's disease. *Ann Neurol* **39**, 132-136.
- Fuxe K., Rivera A., Jacobsen K. X., Hoistad M., Leo G., Horvath T. L., Staines W., De la Calle A. and Agnati L. F. (2005) Dynamics of volume transmission in the brain. Focus on catecholamine and opioid peptide communication and the role of uncoupling protein 2. *J Neural Transm* **112**, 65-76.

G

BIBLIOGRAPHIE

- Gabellini N., Bortoluzzi S., Danieli G. A. and Carafoli E. (2002) The human SLC8A3 gene and the tissue-specific Na⁺/Ca²⁺ exchanger 3 isoforms. *Gene* **298**, 1-7.
- Gafni J. and Ellerby L. M. (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci* **22**, 4842-4849.
- Gafni J., Hermel E., Young J. E., Wellington C. L., Hayden M. R. and Ellerby L. M. (2004) Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem* **279**, 20211-20220.
- Gagliardini V., Fernandez P. A., Lee R. K., Drexler H. C., Rotello R. J., Fishman M. C. and Yuan J. (1994) Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science* **263**, 826-828.
- Galas M. C., Bizat N., Cuvelier L., Bantubungi K., Brouillet E., Schiffmann S. N. and Blum D. (2004) Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol Dis* **15**, 152-159.
- Gallo V. and Ghiani C. A. (2000) Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 252-258.
- Gallyas F., Jr., Ball S. M. and Molnar E. (2003) Assembly and cell surface expression of KA-2 subunit-containing kainate receptors. *J Neurochem* **86**, 1414-1427.
- Gao G. and Dou Q. P. (2000) N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* **80**, 53-72.
- 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**, 859-870.
- Garcia M., Vanhoutte P., Pages C., Besson M. J., 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**, 2174-2184.
- Gardoni F., Bellone C., Viviani B., Marinovich M., Meli E., Pellegrini-Giampietro D. E., Cattabeni F. and Di Luca M. (2002) Lack of PSD-95 drives hippocampal neuronal cell death through activation of an alpha CaMKII transduction pathway. *Eur J Neurosci* **16**, 777-786.
- Gargus J. J., Boyle K., Bocian M., Roe D. S., Vianey-Saban C. and Roe C. R. (2003) Respiratory complex II defect in siblings associated with a symptomatic secondary block in fatty acid oxidation. *J Inherit Metab Dis* **26**, 659-670.
- Garlid K. D. and Paucek P. (2003) Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle. *Biochim Biophys Acta* **1606**, 23-41.
- Garseth M., Sonnewald U., White L. R., Rod M., Zwart J. A., Nygaard O. and Aasly J. (2000) Proton magnetic resonance spectroscopy of cerebrospinal fluid in neurodegenerative disease: indication of glial energy impairment in Huntington chorea, but not Parkinson disease. *J Neurosci Res* **60**, 779-782.
- Garthwaite G. and Garthwaite J. (1986) Amino acid neurotoxicity: intracellular sites of calcium accumulation associated with the onset of irreversible damage to rat cerebellar neurones in vitro. *Neurosci Lett* **71**, 53-58.
- Garthwaite G., Hajos F. and Garthwaite J. (1986) Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in rat cerebellar slices. *Neuroscience* **18**, 437-447.
- Gath I. and Vinje B. (1968) Pneumoencephalographic findings in Huntington's chorea. *Neurology* **18**, 991-996.
- Gauthier L. R., Charrin B. C., Borrell-Page M., Dompierre J. P., Rangone H., Cordelieres F. P., De Mey J., MacDonald M. E., 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**, 127-138.
- Gavin C. E., Gunter K. K. and Gunter T. E. (1999) Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. *Neurotoxicology* **20**, 445-453.
- Gecz J., Barnett S., Liu J., Hollway G., Donnelly A., Eyre H., Eshkevari H. S., Baltazar R., Grunn A., Nagaraja R., Gilliam C., Peltonen L., Sutherland G. R., Baron M. and Mulley J. C. (1999) Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (GRIA3), a candidate for bipolar disorder and nonspecific X-linked mental retardation. *Genomics* **62**, 356-368.
- Gehl L. M., Saab O. H., Bzdega T., Wroblewska B. and Neale J. H. (2004) Biosynthesis of NAAG by an enzyme-mediated process in rat central nervous system neurons and glia. *J Neurochem* **90**, 989-997.
- Gellera C., Meoni C., Castellotti B., Zappacosta B., Girotti F., Taroni F. and DiDonato S. (1996) Errors in Huntington disease diagnostic test caused by trinucleotide deletion in the IT15 gene. *Am J Hum Genet* **59**, 475-477.
- Gerlai R., Roder J. C. and Hampson D. R. (1998a) Altered spatial learning and memory in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *Behav Neurosci* **112**, 525-532.
- Gerlai R., Henderson J. T., Roder J. C. and Jia Z. (1998b) Multiple behavioral anomalies in GluR2 mutant mice exhibiting enhanced LTP. *Behav Brain Res* **95**, 37-45.

BIBLIOGRAPHIE

- Gervais F. G., Singaraja R., Xanthoudakis S., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., Metzler M., Hackam A. S., Tam J., Vaillancourt J. P., Houtzager V., Rasper D. M., Roy S., Hayden M. R. and Nicholson D. W. (2002) Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hip1. *Nat Cell Biol* **4**, 95-105.
- Gholson R. K., Ueda I., Ogasawara N. and Henderson L. M. (1964) The Enzymatic Conversion Of Quinolate To Nicotinic Acid Mononucleotide In Mammalian Liver. *J Biol Chem* **239**, 1208-1214.
- Gibson G. E., Sheu K. F. and Blass J. P. (1998) Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm* **105**, 855-870.
- Gibson G. E., Park L. C., Sheu K. F., Blass J. P. and Calingasan N. Y. (2000) The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochem Int* **36**, 97-112.
- Gibson G. E., Kingsbury A. E., Xu H., Lindsay J. G., Daniel S., Foster O. J., Lees A. J. and Blass J. P. (2003) Deficits in a tricarboxylic acid cycle enzyme in brains from patients with Parkinson's disease. *Neurochem Int* **43**, 129-135.
- Gill R., Foster A. C. and Woodruff G. N. (1987) Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J Neurosci* **7**, 3343-3349.
- Ginovart N., Lundin A., Farde L., Halldin C., Backman L., Swahn C. G., Pauli S. and Sedvall G. (1997) PET study of the pre- and post-synaptic dopaminergic markers for the neurodegenerative process in Huntington's disease. *Brain* **120 (Pt 3)**, 503-514.
- Gjessing L. R., Gjesdahl P. and Sjaastad O. (1972) The free amino acids in human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* **19**, 1807-1808.
- Glass M. (2001) The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **25**, 743-765.
- Glass M., Dragunow M. and Faull R. L. (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* **97**, 505-519.
- Godfrey D. A., Carter J. A., Berger S. J., Lowry O. H. and Matschinsky F. M. (1977) Quantitative histochemical mapping of candidate transmitter amino acids in cat cochlear nucleus. *J Histochem Cytochem* **25**, 417-431.
- Goebel H. H., Heipertz R., Scholz W., Iqbal K. and Tellez-Nagel I. (1978) Juvenile Huntington chorea: clinical, ultrastructural, and biochemical studies. *Neurology* **28**, 23-31.
- Goffredo D., Rigamonti D., Zuccato C., Tartari M., Valenza M. and Cattaneo E. (2005) Prevention of cytosolic IAPs degradation: a potential pharmacological target in Huntington's Disease. *Pharmacol Res* **52**, 140-150.
- Goldberg Y. P., Andrew S. E., Clarke L. A. and Hayden M. R. (1993) A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in Huntington disease. *Hum Mol Genet* **2**, 635-636.
- Goldberg Y. P., Nicholson D. W., Rasper D. M., Kalchman M. A., Koide H. B., Graham R. K., Bromm M., Kazemi-Esfarjani P., Thornberry N. A., Vaillancourt J. P. and Hayden M. R. (1996a) Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nat Genet* **13**, 442-449.
- Goldberg Y. P., Kalchman M. A., Metzler M., Nasir J., Zeisler J., Graham R., Koide H. B., O'Kusky J., Sharp A. H., Ross C. A., Jirik F. and Hayden M. R. (1996b) Absence of disease phenotype and intergenerational stability of the CAG repeat in transgenic mice expressing the human Huntington disease transcript. *Hum Mol Genet* **5**, 177-185.
- Gordon N. (2006) Glutaric aciduria types I and II. *Brain Dev* **28**, 136-140.
- Gorell J. M., Johnson C. C., Rybicki B. A., Peterson E. L. and Richardson R. J. (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* **50**, 1346-1350.
- Goto S., Hirano A. and Rojas-Corona R. R. (1989) An immunohistochemical investigation of the human neostriatum in Huntington's disease. *Ann Neurol* **25**, 298-304.
- Goto S., Matsukado Y., Miyamoto E. and Yamada M. (1987) Morphological characterization of the rat striatal neurons expressing calcineurin immunoreactivity. *Neuroscience* **22**, 189-201.
- Goto S., Matsukado Y., Mihara Y., Inoue N. and Miyamoto E. (1986) Calcineurin in human brain and its relation to extrapyramidal system. Immunohistochemical study on postmortem human brains. *Acta Neuropathol (Berl)* **72**, 150-156.
- Gould D. H. and Gustine D. L. (1982) Basal ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropanoic acid. *Neuropathol Appl Neurobiol* **8**, 377-393.
- Graham D. G. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* **14**, 633-643.

BIBLIOGRAPHIE

- Gramsbergen J. B. and van der Sluijs-Gelling A. J. (1993) Time- and dose-dependent $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in rat striatum and substantia nigra after an intrastriatal injection of quinolinic acid. *Exp Neurol* **121**, 261-269.
- Gramsbergen J. B., Veenma-van der Duin L., Loopuijt L., Paans A. M., Vaalburg W. and Korf J. (1988) Imaging of the degeneration of neurons and their processes in rat or cat brain by $^{45}\text{CaCl}_2$ autoradiography or $^{55}\text{CoCl}_2$ positron emission tomography. *J Neurochem* **50**, 1798-1807.
- Graveland G. A., Williams R. S. and DiFiglia M. (1985a) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* **227**, 770-773.
- Graveland G. A., Williams R. S. and DiFiglia M. (1985b) A Golgi study of the human neostriatum: neurons and afferent fibers. *J Comp Neurol* **234**, 317-333.
- Gray M. W., Burger G. and Lang B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Gray N. K., Pantopoulos K., Dandekar T., Ackrell B. A. and Hentze M. W. (1996) Translational regulation of mammalian and *Drosophila* citric acid cycle enzymes via iron-responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4925-4930.
- Green D. R. and Reed J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Greenamyre J. T. and Young A. B. (1989) Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **10**, 593-602.
- Greenamyre J. T., Penney J. B., Young A. B., D'Amato C. J., Hicks S. P. and Shoulson I. (1985) Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Science* **227**, 1496-1499.
- Greene J. G. and Greenamyre J. T. (1995a) Exacerbation of NMDA, AMPA, and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* **64**, 2332-2338.
- Greene J. G. and Greenamyre J. T. (1995b) Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* **64**, 430-436.
- Greene J. G. and Greenamyre J. T. (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* **48**, 613-634.
- Greene J. G., Porter R. H., Eller R. V. and Greenamyre J. T. (1993) Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J Neurochem* **61**, 1151-1154.
- Greene J. G., Sheu S. S., Gross R. A. and Greenamyre J. T. (1998) 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms. *Neuroscience* **84**, 503-510.
- Greengard P., Valtorta F., Czernik A. J. and Benfenati F. (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**, 780-785.
- Grieve A., Dunlop J., Schousboe A. and Griffiths R. (1991) Kinetic characterisation of excitatory sulphur amino acid transport in synaptosomes and in primary cultures of different brain cells. *Biochem Soc Trans* **19**, 5S.
- Griffith O. W. (1983) Cysteinesulfinate metabolism. altered partitioning between transamination and decarboxylation following administration of beta-methylenespartate. *J Biol Chem* **258**, 1591-1598.
- Grynspan F., Griffin W. B., Mohan P. S., Shea T. B. and Nixon R. A. (1997) Calpains and calpastatin in SH-SY5Y neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation and neurite outgrowth: comparison with the human brain calpain system. *J Neurosci Res* **48**, 181-191.
- Gu M., Gash M. T., Mann V. M., Javoy-Agid F., Cooper J. M. and Schapira A. H. (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* **39**, 385-389.
- Guarda A. S., Robinson M. B., Ory-Lavallee L., Forloni G. L., Blakely R. D. and Coyle J. T. (1988) Quantitation of N-acetylaspartyl-glutamate in microdissected rat brain nuclei and peripheral tissues: findings with a novel liquid phase radioimmunoassay. *Brain Res* **427**, 223-231.
- Guglielmo M. A., Chan P. T., Cortez S., Stopa E. G., McMillan P., Johanson C. E., Epstein M. and Doberstein C. E. (1998) The temporal profile and morphologic features of neuronal death in human stroke resemble those observed in experimental forebrain ischemia: the potential role of apoptosis. *Neurol Res* **20**, 283-296.
- Guidetti P., Okuno E. and Schwarcz R. (1997) Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J Neurosci Res* **50**, 457-465.
- Guidetti P., Luthi-Carter R. E., Augood S. J. and Schwarcz R. (2004) Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **17**, 455-461.
- Guidetti P., Charles V., Chen E. Y., Reddy P. H., Kordower J. H., Whetsell W. O., Jr., Schwarcz R. and Tagle D. A. (2001) Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial energy production. *Exp Neurol* **169**, 340-350.

BIBLIOGRAPHIE

- Guiramand J., Vignes M. and Recasens M. (1991) A specific transduction mechanism for the glutamate action on phosphoinositide metabolism via the quisqualate metabotropic receptor in rat brain synaptoneurosomes: II. Calcium dependency, cadmium inhibition. *J Neurochem* **57**, 1501-1509.
- Gunawardena S., Her L. S., Brusck R. G., Laymon R. A., Niesman I. R., Gordesky-Gold B., Sintasath L., Bonini N. M. and Goldstein L. S. (2003) Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* **40**, 25-40.
- Gunter K. K. and Gunter T. E. (1994) Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **26**, 471-485.
- Gunter K. K., Zuscik M. J. and Gunter T. E. (1991) The Na⁽⁺⁾-independent Ca²⁺ efflux mechanism of liver mitochondria is not a passive Ca²⁺/2H⁺ exchanger. *J Biol Chem* **266**, 21640-21648.
- Gunter T. E. and Pfeiffer D. R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* **258**, C755-786.
- Gunter T. E., Chace J. H., Puskin J. S. and Gunter K. K. (1983) Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. *Biochemistry* **22**, 6341-6351.
- Gunter T. E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R. and Gunter K. (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* **28**, 285-296.
- Gunther M. R., Vangilder R., Fang J. and Beattie D. S. (2004) Expression of a familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant human superoxide dismutase in yeast leads to decreased mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* **431**, 207-214.
- Guo B., Phillips J. D., Yu Y. and Leibold E. A. (1995a) Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem* **270**, 21645-21651.
- Guo B., Brown F. M., Phillips J. D., Yu Y. and Leibold E. A. (1995b) Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). Presence of multiple IRP2 transcripts regulated by intracellular iron levels. *J Biol Chem* **270**, 16529-16535.
- Guo H., Lai L., Butchbach M. E., Stockinger M. P., Shan X., Bishop G. A. and Lin C. L. (2003) Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* **12**, 2519-2532.
- Gusella J. F., Wexler N. S., Conneally P. M., Naylor S. L., Anderson M. A., Tanzi R. E., Watkins P. C., Ottina K., Wallace M. R., Sakaguchi A. Y. and et al. (1983) A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234-238.
- Gutkunst C. A., Levey A. I., Heilman C. J., Whaley W. L., Yi H., Nash N. R., Rees H. D., Madden J. J. and Hersch S. M. (1995) Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8710-8714.
- Gutkunst C. A., Li S. H., Yi H., Mulroy J. S., Kuemmerle S., Jones R., Rye D., Ferrante R. J., Hersch S. M. and Li X. J. (1999) Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci* **19**, 2522-2534.

H

- Ha H. C. and Snyder S. H. (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13978-13982.
- Hackam A. S., Singaraja R., Zhang T., Gan L. and Hayden M. R. (1999) In vitro evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **8**, 25-33.
- Hackam A. S., Singaraja R., Wellington C. L., Metzler M., McCutcheon K., Zhang T., Kalchman M. and Hayden M. R. (1998) The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol* **141**, 1097-1105.
- Hackam A. S., Yassa A. S., Singaraja R., Metzler M., Gutkunst C. A., Gan L., Warby S., Wellington C. L., Vaillancourt J., Chen N., Gervais F. G., Raymond L., Nicholson D. W. and Hayden M. R. (2000) Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *J Biol Chem* **275**, 41299-41308.
- Hahn-Barma V., Deweer B., Durr A., Dode C., Feingold J., Pillon B., Agid Y., Brice A. and Dubois B. (1998) Are cognitive changes the first symptoms of Huntington's disease? A study of gene carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **64**, 172-177.
- Haigh B. (2006) <http://www.geneclinics.org/profiles/huntington/details.html>.
- Hajimohammadreza I., Probert A. W., Coughenour L. L., Borosky S. A., Marcoux F. W., Boxer P. A. and Wang K. K. (1995) A specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II provides neuroprotection against NMDA- and hypoxia/hypoglycemia-induced cell death. *J Neurosci* **15**, 4093-4101.

BIBLIOGRAPHIE

- Halestrap A. P. (1975) The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* **148**, 85-96.
- Halestrap A. P. (1978) Pyruvate and ketone-body transport across the mitochondrial membrane. Exchange properties, pH-dependence and mechanism of the carrier. *Biochem J* **172**, 377-387.
- Hallervorden J. (1957) *Huntingtonsche Chorea*, Lubarsch, O. Henke, F. Rössler, R. Uhlinger, F. Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie Edition, Vol. 13, pp 793-822. Springer -Verlag 1957; 13: 793-822, Berlin.
- Halliwell B. and Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**, 231-255.
- Halpain S. and Greengard P. (1990) Activation of NMDA receptors induces rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP2. *Neuron* **5**, 237-246.
- Halpain S., Girault J. A. and Greengard P. (1990) Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. *Nature* **343**, 369-372.
- Hamilton B. F. and Gould D. H. (1987) Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol (Berl)* **72**, 286-297.
- Hansen J. J. and Krosgaard-Larsen P. (1980) Isoxazole amino-acids as glutamic acid agonists. Synthesis of some analogues and homologues of ibotenic acid. *J Chem Soc [Perkin 1]* **8**, 1826-1833.
- Hansen J. J., Durr A., Cournu-Rebeix I., Georgopoulos C., Ang D., Nielsen M. N., Davoine C. S., Brice A., Fontaine B., Gregersen N. and Bross P. (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.
- Hansford R. G. (1985) Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **102**, 1-72.
- Hansford R. G. and Castro F. (1985) Role of Ca²⁺ in pyruvate dehydrogenase interconversion in brain mitochondria and synaptosomes. *Biochem J* **227**, 129-136.
- Hansson O., Petersen A., Leist M., Nicotera P., Castilho R. F. and Brundin P. (1999) Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid-induced striatal excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8727-8732.
- Hantraye P., Riche D., Maziere M. and Isacson O. (1990) A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp Neurol* **108**, 91-104.
- Harada T., Harada C., Watanabe M., Inoue Y., Sakagawa T., Nakayama N., Sasaki S., Okuyama S., Watase K., Wada K. and Tanaka K. (1998) Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4663-4666.
- Hardingham G. E. and Bading H. (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* **26**, 81-89.
- Hardingham G. E., Fukunaga Y. and Bading H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* **5**, 405-414.
- Harjes P. and Wanker E. E. (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* **28**, 425-433.
- Harper P. S. (1991) *Huntington's disease*. Saunders, London.
- Harper P. S. (1992) The epidemiology of Huntington's disease. *Hum Genet* **89**, 365-376.
- Harrington K. M. and Kowall N. W. (1991) Parvalbumin immunoreactive neurons resist degeneration in Huntington's disease striatum. *J Neuropathol Exp Neurol* **50**, 309.
- Harris G. J., Pearlson G. D., Peyser C. E., Aylward E. H., Roberts J., Barta P. E., Chase G. A. and Folstein S. E. (1992) Putamen volume reduction on magnetic resonance imaging exceeds caudate changes in mild Huntington's disease. *Ann Neurol* **31**, 69-75.
- Hartley D. M. and Choi D. W. (1989) Delayed rescue of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther* **250**, 752-758.
- Hartley D. M., Kurth M. C., Bjerkness L., Weiss J. H. and Choi D. W. (1993) Glutamate receptor-induced 45Ca²⁺ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci* **13**, 1993-2000.
- Hartmann A., Michel P. P., Troadec J. D., Mouatt-Prigent A., Faucheux B. A., Ruberg M., Agid Y. and Hirsch E. C. (2001a) Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J Neurochem* **76**, 1785-1793.

BIBLIOGRAPHIE

- Hartmann A., Troadec J. D., Hunot S., Kikly K., Faucheux B. A., Mouatt-Prigent A., Ruberg M., Agid Y. and Hirsch E. C. (2001b) Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci* **21**, 2247-2255.
- Hasbini D. A., Mikati M. A. and Habbal Z. M. (2001) Isolated adipic aciduria. *Pediatr Neurol* **24**, 77-78.
- Hashimoto T., Kitamura N., Saito N., Komure O., Nishino N. and Tanaka C. (1992) The loss of beta II-protein kinase C in the striatum from patients with Huntington's disease. *Brain Res* **585**, 303-306.
- Hashimoto T., Inazawa J., Okamoto N., Tagawa Y., Bessho Y., Honda Y. and Nakanishi S. (1997) The whole nucleotide sequence and chromosomal localization of the gene for human metabotropic glutamate receptor subtype 6. *Eur J Neurosci* **9**, 1226-1235.
- Hassel B. and Sonnewald U. (1995) Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of GABAergic neurons with 3-nitropropionic acid in vivo. *J Neurochem* **65**, 1184-1191.
- Hasselbalch S. G., Oberg G., Sorensen S. A., Andersen A. R., Waldemar G., Schmidt J. F., Fenger K. and Paulson O. B. (1992) Reduced regional cerebral blood flow in Huntington's disease studied by SPECT. *J Neural Neurosurg Psychiatry* **55**, 1018-1023.
- Hatefi Y. and Galante Y. M. (1977) Dehydrogenase and transhydrogenase properties of the soluble NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 846-850.
- Hayakawa Y., Nemoto T., Iino M. and Kasai H. (2005) Rapid Ca²⁺-dependent increase in oxygen consumption by mitochondria in single mammalian central neurons. *Cell Calcium* **37**, 359-370.
- Hayashi T. (1954) Effect of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* **3**, 192-193.
- Heafield M. T., Fearn S., Steventon G. B., Waring R. H., Williams A. C. and Sturman S. G. (1990) Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **110**, 216-220.
- Heath P. R. and Shaw P. J. (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* **26**, 438-458.
- Hedreen J. C. and Folstein S. E. (1995) Early loss of neostriatal striosome neurons in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**, 105-120.
- Hedreen J. C., Peyser C. E., Folstein S. E. and Ross C. A. (1991) Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett* **133**, 257-261.
- Hefter H., Homberg V., Lange H. W. and Freund H. J. (1987) Impairment of rapid movement in Huntington's disease. *Brain* **110** (Pt 3), 585-612.
- Heikkila R. E., Hess A. and Duvoisin R. C. (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* **224**, 1451-1453.
- Heinsen H., Strik M., Bauer M., Luther K., Ulmar G., Gangnus D., Jungkunz G., Eisenmenger W. and Gotz M. (1994) Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **88**, 320-333.
- Heisterkamp N., Mulder M. P., Langeveld A., ten Hoeve J., Wang Z., Roe B. A. and Groffen J. (1995) Localization of the human mitochondrial citrate transporter protein gene to chromosome 22Q11 in the DiGeorge syndrome critical region. *Genomics* **29**, 451-456.
- Henry P. G., Lebon V., Vaufray F., Brouillet E., Hantraye P. and Bloch G. (2002) Decreased TCA cycle rate in the rat brain after acute 3-NP treatment measured by in vivo 1H-[13C] NMR spectroscopy. *J Neurochem* **82**, 857-866.
- Henshaw R., Jenkins B. G., Schulz J. B., Ferrante R. J., Kowall N. W., Rosen B. R. and Beal M. F. (1994) Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation. *Brain Res* **647**, 161-166.
- Herdegen T. and Waetzig V. (2001) AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* **20**, 2424-2437.
- Hermel E., Gafni J., Propp S. S., Leavitt B. R., Wellington C. L., Young J. E., Hackam A. S., Logvinova A. V., Peel A. L., Chen S. F., Hook V., Singaraja R., Krajewski S., Goldsmith P. C., Ellerby H. M., Hayden M. R., Bredesen D. E. and Ellerby L. M. (2004) Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death Differ* **11**, 424-438.
- Herrling P. L., Maeder J., Meier C. L. and Do K. Q. (1989) Differential effects of (D)- and (L)-homocysteic acid on the membrane potential of cat caudate neurons in situ. *Neuroscience* **31**, 213-217.
- Hess S. D., Daggett L. P., Deal C., Lu C. C., Johnson E. C. and Velicelebi G. (1998) Functional characterization of human N-methyl-D-aspartate subtype 1A/2D receptors. *J Neurochem* **70**, 1269-1279.

BIBLIOGRAPHIE

- Hettinger B. D., Lee A., Linden J. and Rosin D. L. (2001) Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J Comp Neurol* **431**, 331-346.
- Heurteaux C., Bertaina V., Widmann C. and Lazdunski M. (1993) K⁺ channel openers prevent global ischemia-induced expression of c-fos, c-jun, heat shock protein, and amyloid beta-protein precursor genes and neuronal death in rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9431-9435.
- Heyes M. P. and Markey S. P. (1988) Quantification of quinolinic acid in rat brain, whole blood, and plasma by gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry: effects of systemic L-tryptophan administration on brain and blood quinolinic acid concentrations. *Anal Biochem* **174**, 349-359.
- Heyes M. P., Rubinow D., Lane C. and Markey S. P. (1989) Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. *Ann Neurol* **26**, 275-277.
- Heyes M. P., Swartz K. J., Markey S. P. and Beal M. F. (1991) Regional brain and cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations in Huntington's disease. *Neurosci Lett* **122**, 265-269.
- Hickey M. A. and Chesselet M. F. (2003) Apoptosis in Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 255-265.
- Hicks S. P. (1950) Brain metabolism in vivo. II. The distribution of lesions caused by azide, malononitrile, plasmocid and dinitrophenol poisoning in rats. *AMA Arch Pathol* **50**, 545-561.
- Higgins C. M., Jung C. and Xu Z. (2003) ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci* **4**, 16.
- Higuchi Y. (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* **66**, 1527-1535.
- Hilditch-Maguire P., Trettel F., Passani L. A., Auerbach A., Persichetti F. and MacDonald M. E. (2000) Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum Mol Genet* **9**, 2789-2797.
- Hildyard J. C. and Halestrap A. P. (2003) Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **374**, 607-611.
- Hirabayashi M., Inoue K., Tanaka K., Nakadate K., Ohsawa Y., Kamei Y., Popiel A. H., Sinohara A., Iwamatsu A., Kimura Y., Uchiyama Y., Hori S. and Kakizuka A. (2001) VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ* **8**, 977-984.
- Hirawake H., Wang H., Kuramochi T., Kojima S. and Kita K. (1994) Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of the flavoprotein (Fp) subunit of liver mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* **116**, 221-227.
- Hirawake H., Taniwaki M., Tamura A., Kojima S. and Kita K. (1997) Cytochrome b in human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of the components in liver mitochondria and chromosome assignment of the genes for the large (SDHC) and small (SDHD) subunits to 1q21 and 11q23. *Cytogenet Cell Genet* **79**, 132-138.
- Ho L. and Patel M. S. (1990) Cloning and cDNA sequence of the beta-subunit component of human pyruvate dehydrogenase complex. *Gene* **86**, 297-302.
- Ho L., Wexler I. D., Liu T. C., Thekkumkara T. J. and Patel M. S. (1989) Characterization of cDNAs encoding human pyruvate dehydrogenase alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5330-5334.
- Hodgson J. G., Agopyan N., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., LePiane F., Singaraja R., Smith D. J., Bissada N., McCutcheon K., Nasir J., Jamot L., Li X. J., Stevens M. E., Rosemond E., Roder J. C., Phillips A. G., Rubin E. M., Hersch S. M. and Hayden M. R. (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* **23**, 181-192.
- Hoffner G., Kahlem P. and Djian P. (2002) Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *J Cell Sci* **115**, 941-948.
- Holbert S., D Nghien I., Kiechle T., Rosenblatt A., Wellington C., Hayden M. R., Margolis R. L., Ross C. A., Dausset J., Ferrante R. J. 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**, 1811-1816.
- Hollmann M. and Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* **17**, 31-108.
- Holt I. J., Harding A. E., Petty R. K. and Morgan-Hughes J. A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* **46**, 428-433.
- Hori N., French-Mullen J. M. and Carpenter D. O. (1985) Kainic acid responses and toxicity show pronounced Ca²⁺ dependence. *Brain Res* **358**, 380-384.

BIBLIOGRAPHIE

- Hoshino M., Qi M. L., Yoshimura N., Miyashita T., Tagawa K., Wada Y., Enokido Y., Marubuchi S., Harjes P., Arai N., Oyanagi K., Blandino G., Sudol M., Rich T., Kanazawa I., Wanker E. E., Saitoe M. and Okazawa H. (2006) Transcriptional repression induces a slowly progressive atypical neuronal death associated with changes of YAP isoforms and p73. *J Cell Biol* **172**, 589-604.
- Hu W. H., Walters W. M., Xia X. M., Karmally S. A. and Bethea J. R. (2003) Neuronal glutamate transporter EAAT4 is expressed in astrocytes. *Glia* **44**, 13-25.
- Hu W. J. (1986) [Isolation and structure determination of Arthrimum toxin causing sugarcane poisoning. 3. Nitropropionic acid]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **20**, 321-323.
- Huang C. C., Faber P. W., Persichetti F., Mittal V., Vonsattel J. P., MacDonald M. E. and Gusella J. F. (1998) Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins. *Somat Cell Mol Genet* **24**, 217-233.
- Huang K., Yanai A., Kang R., Arstikaitis P., Singaraja R. R., Metzler M., Mullard A., Haigh B., Gauthier-Campbell C., Gutekunst C. A., Hayden M. R. and El-Husseini A. (2004) Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins. *Neuron* **44**, 977-986.
- Huang Y. and Wang K. K. (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* **7**, 355-362.
- Humbert S., Bryson E. A., Cordelieres F. P., Connors N. C., Datta S. R., Finkbeiner S., Greenberg M. E. and Saudou F. (2002) The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* **2**, 831-837.
- Huntington G. (2003) On chorea. George Huntington, M.D. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **15**, 109-112.

I

- Iacobazzi V., Ventura M., Fiermonte G., Prezioso G., Rocchi M. and Palmieri F. (2001) Genomic organization and mapping of the gene (SLC25A19) encoding the human mitochondrial deoxynucleotide carrier (DNC). *Cytogenet Cell Genet* **93**, 40-42.
- IGIS (2005) http://www.glutamate.org/media/glutamate_in_our_bodies.asp.
- Ikeda K., Araki K., Takayama C., Inoue Y., Yagi T., Aizawa S. and Mishina M. (1995) Reduced spontaneous activity of mice defective in the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. *Brain Res Mol Brain Res* **33**, 61-71.
- Inoue I., Nagase H., Kishi K. and Higuti T. (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**, 244-247.
- Irwin C. C. (1985) Comparison of protein synthesis in mitochondria, synaptosomes, and intact brain cells. *J Neurochem* **44**, 433-438.
- Itoh T., Koshihara S., Kigawa T., Kikuchi A., Yokoyama S. and Takenawa T. (2001) Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* **291**, 1047-1051.
- Iwamoto T. and Shigekawa M. (1998) Differential inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms by divalent cations and isothiourea derivative. *Am J Physiol* **275**, C423-430.
- Iwata A., Riley B. E., Johnston J. A. and Kopito R. R. (2005) HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* **280**, 40282-40292.

J

- Jaarsma D. (2006) Swelling and vacuolisation of mitochondria in transgenic SOD1-ALS mice: A consequence of supranormal SOD1 expression? *Mitochondrion* **6**, 63-64.
- Jaarsma D., Rognoni F., van Duijn W., Verspaget H. W., Haasdijk E. D. and Holstege J. C. (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol (Berl)* **102**, 293-305.
- Jackson G. R., Salecker I., Dong X., Yao X., Arnheim N., Faber P. W., MacDonald M. E. and Zipursky S. L. (1998) Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of Drosophila photoreceptor neurons. *Neuron* **21**, 633-642.
- Jackson M., Gentleman S., Lennox G., Ward L., Gray T., Randall K., Morrell K. and Lowe J. (1995) The cortical neuritic pathology of Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **21**, 18-26.

BIBLIOGRAPHIE

- Jacquard C., Trioulier Y., Cosker F., Escartin C., Bizat N., Hantraye P., Manuel Cancela J., Bonvento G. and Brouillet E. (2006) Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation. *FASEB J* **20**.
- Jahr C. E. and Stevens C. F. (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* **325**, 522-525.
- Jana N. R., Zemskov E. A., 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**, 1049-1059.
- Jarabek B. R., Yasuda R. P. and Wolfe B. B. (2004) Regulation of proteins affecting NMDA receptor-induced excitotoxicity in a Huntington's mouse model. *Brain* **127**, 505-516.
- Jayakumar A. R., Panickar K. S. and Norenberg M. D. (2002) Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. *J Neurochem* **83**, 1226-1234.
- Jelgersma G. (1908) Neue anatomische Bedunde bei Paralysis agitans und bei chronischer Chorea. *Neurol Centralblatt* **27**, 995-996.
- Jellinger K., Paulus W., Grundke-Iqbal I., Riederer P. and Youdim M. B. (1990) Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **2**, 327-340.
- Jen J. C., Wan J., Palos T. P., Howard B. D. and Baloh R. W. (2005) Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology* **65**, 529-534.
- Jenkins B. G., Koroshetz W. J., Beal M. F. and Rosen B. R. (1993) Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy. *Neurology* **43**, 2689-2695.
- Jenkins B. G., Brouillet E., Chen Y. C., Storey E., Schulz J. B., Kirschner P., Beal M. F. and Rosen B. R. (1996) Non-invasive neurochemical analysis of focal excitotoxic lesions in models of neurodegenerative illness using spectroscopic imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 450-461.
- Jenkins B. G., Rosas H. D., Chen Y. C., Makabe T., Myers R., MacDonald M., Rosen B. R., Beal M. F. and Koroshetz W. J. (1998) 1H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers. *Neurology* **50**, 1357-1365.
- Jernigan T. L., Salmon D. P., Butters N. and Hesselink J. R. (1991) Cerebral structure on MRI, Part II: Specific changes in Alzheimer's and Huntington's diseases. *Biol Psychiatry* **29**, 68-81.
- Jeste D. V., Barban L. and Parisi J. (1984) Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol* **85**, 78-86.
- Jezek P., Orosz D. E. and Garlid K. D. (1990) Reconstitution of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. Demonstration of GDP-sensitive halide anion uniport. *J Biol Chem* **265**, 19296-19302.
- Jezek P., Orosz D. E., Modriansky M. and Garlid K. D. (1994) Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J Biol Chem* **269**, 26184-26190.
- Jezek P., Beavis A. D., Diresta D. J., Cousino R. N. and Garlid K. D. (1989) Evidence for two distinct chloride uniport pathways in brown adipose tissue mitochondria. *Am J Physiol* **257**, C1142-1148.
- Jia Z., Agopyan N., Miu P., Xiong Z., Henderson J., Gerlai R., Taverna F. A., Velumian A., MacDonald J., Carlen P., Abramow-Newerly W. and Roder J. (1996) Enhanced LTP in mice deficient in the AMPA receptor GluR2. *Neuron* **17**, 945-956.
- Jiang Z. G., Lu X. C., Nelson V., Yang X., Pan W., Chen R. W., Lebowitz M. S., Almassian B., Tortella F. C., Brady R. O. and Ghanbari H. A. (2006) A multifunctional cytoprotective agent that reduces neurodegeneration after ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1581-1586.
- Jin H., May M., Tranebjaerg L., Kendall E., Fontan G., Jackson J., Subramony S. H., Arena F., Lubs H., Smith S., Stevenson R., Schwartz C. and Vetrie D. (1996) A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet* **14**, 177-180.
- Jones J. M., Datta P., Srinivasula S. M., Ji W., Gupta S., Zhang Z., Davies E., Hajnoczky G., Saunders T. L., Van Keuren M. L., Fernandes-Alnemri T., Meisler M. H. and Alnemri E. S. (2003) Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* **425**, 721-727.
- Jorda E. G., Jimenez A., Verdaguer E., Canudas A. M., Folch J., Sureda F. X., Camins A. and Pallas M. (2005) Evidence in favour of a role for peripheral-type benzodiazepine receptor ligands in amplification of neuronal apoptosis. *Apoptosis* **10**, 91-104.
- Jung D. W. and Brierley G. P. (1994) Magnesium transport by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **26**, 527-535.

BIBLIOGRAPHIE

- Jung D. W., Baysal K. and Brierley G. P. (1995) The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *J Biol Chem* **270**, 672-678.
- Jung D. W., Panzeter E., Baysal K. and Brierley G. P. (1997) On the relationship between matrix free Mg²⁺ concentration and total Mg²⁺ in heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1320**, 310-320.
- Jung Y., Miura M. and Yuan J. (1996) Suppression of interleukin-1 beta-converting enzyme-mediated cell death by insulin-like growth factor. *J Biol Chem* **271**, 5112-5117.
- Jurkowitz M. S., Altschuld R. A., Brierley G. P. and Cragoe E. J., Jr. (1983) Inhibition of Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux from heart mitochondria by amiloride analogues. *FEBS Lett* **162**, 262-265.

K

- Kaba H., Hayashi Y., Higuchi T. and Nakanishi S. (1994) Induction of an olfactory memory by the activation of a metabotropic glutamate receptor. *Science* **265**, 262-264.
- Kalchman M. A., Koide H. B., McCutcheon K., Graham R. K., Nichol K., Nishiyama K., Kazemi-Esfarjani P., Lynn F. C., Wellington C., Metzler M., Goldberg Y. P., Kanazawa I., Gietz R. D. and Hayden M. R. (1997) HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet* **16**, 44-53.
- Kanai Y. and Hediger M. A. (2003) The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol* **479**, 237-247.
- Kanazawa I. (1992) On chorea: possible neuronal mechanisms. *Clin Neurol Neurosurg* **94 Suppl**, S100-102.
- Kanazawa I., Sasaki H., Muramoto O., Matsushita M., Mizutani T., Iwabuchi K., Ikeda T. and Takahata N. (1985) Studies on neurotransmitter markers and striatal neuronal cell density in Huntington's disease and dentatorubropallidolusian atrophy. *J Neurol Sci* **70**, 151-165.
- Karp P. D., Caspi R., Fulcher C. A., Kaipa P., Krummenacker M., Paley S., Pick J., Foerster H., Tissier C., Zhang P. and Rhee S. (2006) <http://biocyc.org/META/organism-summary?object=META>. SRI International.
- Kato K., Puttfarcken P. S., Lyons W. E. and Coyle J. T. (1991) Developmental time course and ionic dependence of kainate-mediated toxicity in rat cerebellar granule cell cultures. *J Pharmacol Exp Ther* **256**, 402-411.
- Kato M., Nonaka T., Maki M., Kikuchi H. and Imajoh-Ohmi S. (2000) Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells. *J Biochem (Tokyo)* **127**, 297-305.
- Kawaguchi Y. (1997) Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res* **27**, 1-8.
- Kay B. K., Yamabhai M., Wendland B. and Emr S. D. (1999) Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Sci* **8**, 435-438.
- Kaytor M. D., Wilkinson K. D. and Warren S. T. (2004) Modulating huntingtin half-life alters polyglutamine-dependent aggregate formation and cell toxicity. *J Neurochem* **89**, 962-973.
- Keep M., Elmer E., Fong K. S. and Csiszar K. (2001) Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice. *Brain Res* **894**, 327-331.
- Kegel K. B., Kim M., Sapp E., McIntyre C., Castano J. G., Aronin N. and DiFiglia M. (2000) Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* **20**, 7268-7278.
- Kegel K. B., Meloni A. R., Yi Y., Kim Y. J., Doyle E., Cuiffo B. G., Sapp E., Wang Y., Qin Z. H., Chen J. D., Nevins J. R., 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**, 7466-7476.
- Kelner M. J. and Montoya M. A. (1998) Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): chromosomal localization to 19p13.3. *Biochem Biophys Res Commun* **249**, 53-55.
- Kelner M. J. and Montoya M. A. (2000) Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 366-368.
- Kendrick K. M., Guevara-Guzman R., de la Riva C., Christensen J., Ostergaard K. and Emson P. C. (1996) NMDA and kainate-evoked release of nitric oxide and classical transmitters in the rat striatum: in vivo evidence that nitric oxide may play a neuroprotective role. *Eur J Neurosci* **8**, 2619-2634.
- Keppen L. D., Gollin S. M., Edwards D., Sawyer J., Wilson W. and Overhauser J. (1992) Clinical phenotype and molecular analysis of a three-generation family with an interstitial deletion of the short arm of chromosome 5. *Am J Med Genet* **44**, 356-360.

BIBLIOGRAPHIE

- Kerchner G. A., Wilding T. J., Huettner J. E. and Zhuo M. (2002) Kainate receptor subunits underlying presynaptic regulation of transmitter release in the dorsal horn. *J Neurosci* **22**, 8010-8017.
- Kew J. N. and Kemp J. A. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* **179**, 4-29.
- Kiechle T., Dedeoglu A., Kubilus J., Kowall N. W., Beal M. F., Friedlander R. M., Hersch S. M. and Ferrante R. J. (2002) Cytochrome C and caspase-9 expression in Huntington's disease. *Neuromolecular Med* **1**, 183-195.
- Kiesselbach G. (1914) Anatomischer Befund eines falles von huntingtonscher Chorea. *Monatsschr f psychiat u Neurol (Berl)* **35**, 525-543.
- Kikuno R., Nagase T., Ishikawa K., Hirose M., Miyajima N., Tanaka A., Kotani H., Nomura N. and Ohara O. (1999) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* **6**, 197-205.
- Kim-Han J. S., Reichert S. A., Quick K. L. and Dugan L. L. (2001) BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production. *J Neurochem* **79**, 658-668.
- Kim G. W. and Chan P. H. (2001) Oxidative stress and neuronal DNA fragmentation mediate age-dependent vulnerability to the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid, in the mouse striatum. *Neurobiol Dis* **8**, 114-126.
- Kim G. W., Gasche Y., Grzeschik S., Copin J. C., Maier C. M. and Chan P. H. (2003) Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci* **23**, 8733-8742.
- Kim G. W., Copin J. C., Kawase M., Chen S. F., Sato S., Gobbel G. T. and Chan P. H. (2000) Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 119-129.
- Kim H. S., Lee J. H., Lee J. P., Kim E. M., Chang K. A., Park C. H., Jeong S. J., Wittendorp M. C., Seo J. H., Choi S. H. and Suh Y. H. (2002) Amyloid beta peptide induces cytochrome C release from isolated mitochondria. *Neuroreport* **13**, 1989-1993.
- Kim H. Y., Klausner R. D. and Rouault T. A. (1995) Translational repressor activity is equivalent and is quantitatively predicted by in vitro RNA binding for two iron-responsive element-binding proteins, IRP1 and IRP2. *J Biol Chem* **270**, 4983-4986.
- Kim M., Lee H. S., LaForet G., McIntyre C., Martin E. J., Chang P., Kim T. W., Williams M., Reddy P. H., Tagle D., Boyce F. M., Won L., Heller A., Aronin N. and DiFiglia M. (1999) Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J Neurosci* **19**, 964-973.
- Kim S. H., Vlkolinsky R., Cairns N., Fountoulakis M. and Lubec G. (2001a) The reduction of NADH ubiquinone oxidoreductase 24- and 75-kDa subunits in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Life Sci* **68**, 2741-2750.
- Kim Y. J., Yi Y., Sapp E., Wang Y., Cuiffo B., Kegel K. B., Qin Z. H., Aronin N. and DiFiglia M. (2001b) Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12784-12789.
- Kim Y. J., Sapp E., Cuiffo B. G., Sobin L., Yoder J., Kegel K. B., Qin Z. H., Detloff P., Aronin N. and DiFiglia M. (2006) Lysosomal proteases are involved in generation of N-terminal huntingtin fragments. *Neurobiol Dis*.
- Kirichok Y., Krapivinsky G. and Clapham D. E. (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360-364.
- Kirkwood S. C., Siemers E., Hodes M. E., Conneally P. M., Christian J. C. and Foroud T. (2000) Subtle changes among presymptomatic carriers of the Huntington's disease gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69**, 773-779.
- Kish S. J., Shannak K. and Hornykiewicz O. (1987) Elevated serotonin and reduced dopamine in subregionally divided Huntington's disease striatum. *Ann Neurol* **22**, 386-389.
- Kishida S., Shirataki H., Sasaki T., Kato M., Kaibuchi K. and Takai Y. (1993) Rab3A GTPase-activating protein-inhibiting activity of Rabphilin-3A, a putative Rab3A target protein. *J Biol Chem* **268**, 22259-22261.
- Kita K., Oya H., Gennis R. B., Ackrell B. A. and Kasahara M. (1990) Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): cDNA cloning of iron sulfur (Ip) subunit of liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **166**, 101-108.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y. and Shimizu N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608.
- Kitt T. M. and Spector R. (1987) Transport of quinolinic acid into rabbit and rat brain. *Neurochem Res* **12**, 625-628.

BIBLIOGRAPHIE

- Kittler J. T., Thomas P., Tretter V., Bogdanov Y. D., Haucke V., Smart T. G. and Moss S. J. (2004) Huntingtin-associated protein 1 regulates inhibitory synaptic transmission by modulating gamma-aminobutyric acid type A receptor membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12736-12741.
- Klancnik J. M., Cuenod M., Gahwiler B. H., Jiang Z. P. and Do K. Q. (1992) Release of endogenous amino acids, including homocysteic acid and cysteine sulphonic acid, from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation of Schaffer collateral-commissural fibres. *Neuroscience* **49**, 557-570.
- Klionsky D. J. and Emr S. D. (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717-1721.
- Klivenyi P., Ferrante R. J., Gardian G., Browne S., Chabrier P. E. and Beal M. F. (2003) Increased survival and neuroprotective effects of BN82451 in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* **86**, 267-272.
- Klivenyi P., Andreassen O. A., Ferrante R. J., Dedeoglu A., Mueller G., Lancelot E., Bogdanov M., Andersen J. K., Jiang D. and Beal M. F. (2000) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase show increased vulnerability to malonate, 3-nitropropionic acid, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci* **20**, 1-7.
- Klivenyi P., Starkov A. A., Calingasan N. Y., Gardian G., Browne S. E., Yang L., Bubber P., Gibson G. E., Patel M. S. and Beal M. F. (2004) Mice deficient in dihydrolipoamide dehydrogenase show increased vulnerability to MPTP, malonate and 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *J Neurochem* **88**, 1352-1360.
- Kluck R. M., Bossy-Wetzel E., Green D. R. and Newmeyer D. D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- Kniffin C. L. (2006a) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/entrez/dispmim.cgi?id=203450>.
- Kniffin C. L. (2006b) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/entrez/dispmim.cgi?id=256000>.
- Koehler C. M. (2004) New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 309-335.
- Koh J. Y., Goldberg M. P., Hartley D. M. and Choi D. W. (1990) Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J Neurosci* **10**, 693-705.
- Koike K., Urata Y., Matsuo S. and Koike M. (1990) Characterization and nucleotide sequence of the gene encoding the human pyruvate dehydrogenase alpha-subunit. *Gene* **93**, 307-311.
- Kolisek M., Zsurka G., Samaj J., Weghuber J., Schweyen R. J. and Schweigel M. (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *Embo J* **22**, 1235-1244.
- Komuro I., Wenninger K. E., Philipson K. D. and Izumo S. (1992) Molecular cloning and characterization of the human cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4769-4773.
- Koolman J. and Röhm K. H. (1994) *Atlas de poche de biochimie*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris.
- Koroshetz W. J., Freese A. and DiFiglia M. (1990) The correlation between excitatory amino acid-induced current responses and excitotoxicity in striatal cultures. *Brain Res* **521**, 265-272.
- Koroshetz W. J., Jenkins B. G., Rosen B. R. and Beal M. F. (1997) Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10. *Ann Neurol* **41**, 160-165.
- Kotlyar A. B., Sled V. D. and Vinogradov A. D. (1992) Effect of Ca²⁺ ions on the slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim Biophys Acta* **1098**, 144-150.
- Kowaltowski A. J., Seetharaman S., Paucek P. and Garlid K. D. (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H649-657.
- Krajewski S., Mai J. K., Krajewska M., Sikorska M., Mossakowski M. J. and Reed J. C. (1995) Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* **15**, 6364-6376.
- Krauss S., Zhang C. Y. and Lowell B. B. (2002) A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 118-122.
- Krauss S., Zhang C. Y. and Lowell B. B. (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 248-261.
- Kremer B., Almqvist E., Theilmann J., Spence N., Telenius H., Goldberg Y. P. and Hayden M. R. (1995) Sex-dependent mechanisms for expansions and contractions of the CAG repeat on affected Huntington disease chromosomes. *Am J Hum Genet* **57**, 343-350.
- Kremer B., Goldberg P., Andrew S. E., Theilmann J., Telenius H., Zeisler J., Squitieri F., Lin B., Bassett A., Almqvist E. and et al. (1994) A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* **330**, 1401-1406.
- Kremer H. P., Roos R. A., Dingjan G., Marani E. and Bots G. T. (1990) Atrophy of the hypothalamic lateral tuberal nucleus in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **49**, 371-382.

BIBLIOGRAPHIE

- Krogsgaard-Larsen P. and Hansen J. J. (1992) Naturally-occurring excitatory amino acids as neurotoxins and leads in drug design. *Toxicol Lett* **64-65 Spec No**, 409-416.
- Krogsgaard-Larsen P., Honore T., Hansen J. J., Curtis D. R. and Lodge D. (1980) New class of glutamate agonist structurally related to ibotenic acid. *Nature* **284**, 64-66.
- Kudin A. P., Bimpong-Buta N. Y., Vielhaber S., Elger C. E. and Kunz W. S. (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 4127-4135.
- Kuhl D. E. (1984) Imaging local brain function with emission computed tomography. *Radiology* **150**, 625-631.
- Kuhl D. E., Phelps M. E., Markham C. H., Metter E. J., Riege W. H. and Winter J. (1982) Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan. *Ann Neurol* **12**, 425-434.
- Kumar A. R. and Kurup P. A. (2002) Endogenous sodium-potassium ATPase inhibition related biochemical cascade in trisomy 21 and Huntington's disease: neural regulation of genomic function. *Neurol India* **50**, 174-180.
- Kumar S., Kinoshita M., Noda M., Copeland N. G. and Jenkins N. A. (1994) Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes Dev* **8**, 1613-1626.
- Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H. and Morikawa K. (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**, 971-977.
- Kuppenbender K. D., Standaert D. G., Feuerstein T. J., Penney J. B., Jr., Young A. B. and Landwehrmeyer G. B. (2000) Expression of NMDA receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the human striatum. *J Comp Neurol* **419**, 407-421.
- Kurth M. C., Weiss J. H. and Choi D. W. (1989) Relationship between glutamate-induced $dsCa^{++}$ influx and resultant neuronal injury in cultured cortical neurons. *Neurology* **39**, 217.
- Kutsuwada T., Sakimura K., Manabe T., Takayama C., Katakura N., Kushiya E., Natsume R., Watanabe M., Inoue Y., Yagi T., Aizawa S., Arakawa M., Takahashi T., Nakamura Y., Mori H. and Mishina M. (1996) Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* **16**, 333-344.
- Kvamme E., Roberg B. and Torgner I. A. (1991) Effects of mitochondrial swelling and calcium on phosphate-activated glutaminase in pig renal mitochondria. *Eur J Biochem* **197**, 675-680.
- Kwak S., Aizawa H., Ishida M. and Shinozaki H. (1992) New, potent kainate derivatives: comparison of their affinity for [3H]kainate and [3H]AMPA binding sites. *Neurosci Lett* **139**, 114-117.
- Kwok R. P., Lundblad J. R., Chrivia J. C., Richards J. P., Bachinger H. P., Brennan R. G., Roberts S. G., Green M. R. and Goodman R. H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**, 223-226.
- Kwong J. M. and Lam T. T. (2000) N -methyl- D -aspartate (NMDA) induced apoptosis in adult rabbit retinas. *Exp Eye Res* **71**, 437-444.

L

- Lafon-Cazal M., Pietri S., Culcasi M. and Bockaert J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* **364**, 535-537.
- Laforet G. A., Sapp E., Chase K., McIntyre C., Boyce F. M., Campbell M., Cadigan B. A., Warzecki L., Tagle D. A., Reddy P. H., Cepeda C., Calvert C. R., Jokel E. S., Klapstein G. J., Ariano M. A., Levine M. S., DiFiglia M. and Aronin N. (2001) Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* **21**, 9112-9123.
- Lamantea E., Tiranti V., Bordoni A., Toscano A., Bono F., Servidei S., Papadimitriou A., Spelbrink H., Silvestri L., Casari G., Comi G. P. and Zeviani M. (2002) Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol* **52**, 211-219.
- Lambert A. J. and Brand M. D. (2004) Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* **279**, 39414-39420.
- Landwehrmeyer G. B., Standaert D. G., Testa C. M., Penney J. B., Jr. and Young A. B. (1995) NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *J Neurosci* **15**, 5297-5307.
- Langston J. W. and Irwin I. (1986) MPTP: current concepts and controversies. *Clin Neuropharmacol* **9**, 485-507.

BIBLIOGRAPHIE

- Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W. and Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979-980.
- Lankiewicz S., Marc Luetjens C., Truc Bui N., Krohn A. J., Poppe M., Cole G. M., Saido T. C. and Prehn J. H. (2000) Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem* **275**, 17064-17071.
- Lannois M. and Paviot J. (1897) Deux cas de Chorée héréditaire avec autopsie. *Arch Neurol* **4**, 333-334.
- Lapin I. P. (1978a) Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm* **42**, 37-43.
- Lapin I. P. (1978b) Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites. *Pharmacol Res Commun* **10**, 81-84.
- Larsen K. E. and Sulzer D. (2002) Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol* **17**, 897-908.
- Lastres-Becker I., Berrendero F., Lucas J. J., Martin-Aparicio E., Yamamoto A., Ramos J. A. and Fernandez-Ruiz J. J. (2002) Loss of mRNA levels, binding and activation of GTP-binding proteins for cannabinoid CB1 receptors in the basal ganglia of a transgenic model of Huntington's disease. *Brain Res* **929**, 236-242.
- Lastres-Becker I., Fezza F., Cebeira M., Bisogno T., Ramos J. A., Milone A., Fernandez-Ruiz J. and Di Marzo V. (2001) Changes in endocannabinoid transmission in the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease. *Neuroreport* **12**, 2125-2129.
- Lawrence A. D., Weeks R. A., Brooks D. J., Andrews T. C., Watkins L. H., Harding A. E., Robbins T. W. and Sahakian B. J. (1998) The relationship between striatal dopamine receptor binding and cognitive performance in Huntington's disease. *Brain* **121 (Pt 7)**, 1343-1355.
- Lazarewicz J. W., Wroblewski J. T., Palmer M. E. and Costa E. (1988) Activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors stimulates arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* **27**, 765-769.
- Leavitt B. R., Guttman J. A., Hodgson J. G., Kimel G. H., Singaraja R., Vogl A. W. and Hayden M. R. (2001) Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *Am J Hum Genet* **68**, 313-324.
- Lebourrier N., Liot G., Lopez-Atalaya J. P., Orset C., Fernandez-Monreal M., Sonderegger P., Ali C. and Vivien D. (2005) The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci* **30**, 552-558.
- Lee W. C., Yoshihara M. and Littleton J. T. (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**, 3224-3229.
- Leeds N. E. and Kieffer S. A. (2000) Evolution of diagnostic neuroradiology from 1904 to 1999. *Radiology* **217**, 309-318.
- Lehmann J., Tsai C. and Wood P. L. (1988) Homocysteic acid as a putative excitatory amino acid neurotransmitter: I. Postsynaptic characteristics at N-methyl-D-aspartate-type receptors on striatal cholinergic interneurons. *J Neurochem* **51**, 1765-1770.
- Leigh P. N. and Meldrum B. S. (1996) Excitotoxicity in ALS. *Neurology* **47**, S221-227.
- Leist M., Single B., Castoldi A. F., Kuhnl S. and Nicotera P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* **185**, 1481-1486.
- Lemasters J. J., Nieminen A. L., Qian T., Trost L. C., Elmore S. P., Nishimura Y., Crowe R. A., Cascio W. E., Bradham C. A., Brenner D. A. and Herman B. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 177-196.
- Lesort M., Lee M., Tucholski J. and Johnson G. V. (2003) Cystamine inhibits caspase activity. Implications for the treatment of polyglutamine disorders. *J Biol Chem* **278**, 3825-3830.
- Leventhal L., Sortwell C. E., Hanbury R., Collier T. J., Kordower J. H. and Palfi S. (2000) Cyclosporin A protects striatal neurons in vitro and in vivo from 3-nitropropionic acid toxicity. *J Comp Neurol* **425**, 471-478.
- Levine M. S., Klapstein G. J., Koppel A., Gruen E., Cepeda C., Vargas M. E., Jokel E. S., Carpenter E. M., Zanjani H., Hurst R. S., Efstratiadis A., Zeitlin S. and Chesselet M. F. (1999) Enhanced sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor activation in transgenic and knockin mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci Res* **58**, 515-532.
- Levivier M. and Przedborski S. (1998) Quinolinic acid-induced lesions of the rat striatum: quantitative autoradiographic binding assessment. *Neurol Res* **20**, 46-56.
- LeWitt P. A. (1993) Neuroprotection by anti-oxidant strategies in Parkinson's disease. *Eur Neurol* **33 Suppl 1**, 24-30.
- Li H., Li S. H., Johnston H., Shelbourne P. F. and Li X. J. (2000a) Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet* **25**, 385-389.

BIBLIOGRAPHIE

- Li H., Wyman T., Yu Z. X., Li S. H. and Li X. J. (2003) Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Hum Mol Genet* **12**, 2021-2030.
- Li H., Li S. H., Cheng A. L., Mangiarini L., Bates G. P. and Li X. J. (1999) Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice. *Hum Mol Genet* **8**, 1227-1236.
- Li L., Murphy T. H., Hayden M. R. and Raymond L. A. (2004a) Enhanced striatal NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic currents in a mouse model of Huntington disease. *J Neurophysiol* **92**, 2738-2746.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. and Wang X. (1997a) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Li S., Mallory M., Alford M., Tanaka S. and Masliah E. (1997b) Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 901-911.
- Li S. H. and Li X. J. (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* **20**, 146-154.
- Li S. H., Lam S., Cheng A. L. and Li X. J. (2000b) Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis. *Hum Mol Genet* **9**, 2859-2867.
- Li S. H., Cheng A. L., Zhou H., Lam S., Rao M., Li H. and Li X. J. (2002) Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol* **22**, 1277-1287.
- Li X. J., Li S. H., Sharp A. H., Nucifora F. C., Jr., Schilling G., Lanahan A., Worley P., Snyder S. H. and Ross C. A. (1995) A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* **378**, 398-402.
- Li Y., Erzurumlu R. S., Chen C., Jhaveri S. and Tonegawa S. (1994a) Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* **76**, 427-437.
- Li Y., Johnson N., Capano M., Edwards M. and Crompton M. (2004b) Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem J* **383**, 101-109.
- Li Z., Matsuoka S., Hryshko L. V., Nicoll D. A., Bersohn M. M., Burke E. P., Lifton R. P. and Philipson K. D. (1994b) Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* **269**, 17434-17439.
- Liang Z. Q., Wang X. X., Wang Y., Chuang D. M., DiFiglia M., Chase T. N. and Qin Z. H. (2005) Susceptibility of striatal neurons to excitotoxic injury correlates with basal levels of Bcl-2 and the induction of P53 and c-Myc immunoreactivity. *Neurobiol Dis* **20**, 562-573.
- Lieman-Hurwitz J., Dafni N., Lavie V. and Groner Y. (1982) Human cytoplasmic superoxide dismutase cDNA clone: a probe for studying the molecular biology of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2808-2811.
- Lievens J. C., Woodman B., Mahal A. and Bates G. P. (2002) Abnormal phosphorylation of synapsin I predicts a neuronal transmission impairment in the R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* **20**, 638-648.
- Lievens J. C., Dutertre M., Forni C., Salin P. and Kerkerian-Le Goff L. (1997) Continuous administration of the glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate produces striatal lesion. *Brain Res Mol Brain Res* **50**, 181-189.
- Lievens J. C., Bernal F., Forni C., Mahy N. and Kerkerian-Le Goff L. (2000a) Characterization of striatal lesions produced by glutamate uptake alteration: cell death, reactive gliosis, and changes in GLT1 and GADD45 mRNA expression. *Glia* **29**, 222-232.
- Lievens J. C., Salin P., Had-Aissouni L., Mahy N. and Kerkerian-Le Goff L. (2000b) Differential effects of corticostriatal and thalamostriatal deafferentation on expression of the glutamate transporter GLT1 in the rat striatum. *J Neurochem* **74**, 909-919.
- Lievens J. C., Woodman B., Mahal A., Spasic-Boscovic O., Samuel D., Kerkerian-Le Goff L. and Bates G. P. (2001) Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* **8**, 807-821.
- Lin C. H., Tallaksen-Greene S., Chien W. M., Cearley J. A., Jackson W. S., Crouse A. B., Ren S., Li X. J., Albin R. L. and Detloff P. J. (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **10**, 137-144.
- Lin C. L., Bristol L. A., Jin L., Dykes-Hoberg M., Crawford T., Clawson L. and Rothstein J. D. (1998) Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **20**, 589-602.
- Lin R. C. and Scheller R. H. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 19-49.
- Liot G., Benchenane K., Leveille F., Lopez-Atalaya J. P., Fernandez-Monreal M., Ruocco A., Mackenzie E. T., Buisson A., Ali C. and Vivien D. (2004) 2,7-Bis-(4-amidinobenzylidene)-cycloheptan-1-one dihydrochloride, tPA stop, prevents tPA-enhanced excitotoxicity both in vitro and in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 1153-1159.

BIBLIOGRAPHIE

- Lipton S. A. (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 160-170.
- Lipton S. A. and Rosenberg P. A. (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* **330**, 613-622.
- Lipton S. A., Choi Y. B., Pan Z. H., Lei S. Z., Chen H. S., Sucher N. J., Loscalzo J., Singel D. J. and Stamler J. S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**, 626-632.
- Litsky M. L. and Pfeiffer D. R. (1997) Regulation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. *Biochemistry* **36**, 7071-7080.
- Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Oda Y., Tomizawa K. and Gong C. X. (2005) Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *J Biol Chem* **280**, 37755-37762.
- Liu Q. S., Xu Q., Arcuino G., Kang J. and Nedergaard M. (2004a) Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3172-3177.
- Liu X., Van Vleet T. and Schnellmann R. G. (2004b) The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 349-370.
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemerson R. and Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.
- Liu Y., Fiskum G. and Schubert D. (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**, 780-787.
- Liu Y. F. (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 Y. F., Dorow D. and Marshall J. (2000) Activation of MLK2-mediated signaling cascades by polyglutamine-expanded huntingtin. *J Biol Chem* **275**, 19035-19040.
- Lodi R., Schapira A. H., Manners D., Styles P., Wood N. W., Taylor D. J. and Warner T. T. (2000) Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidolusian atrophy. *Ann Neurol* **48**, 72-76.
- Lodi R., Tonon C., Valentino M. L., Iotti S., Clementi V., Malucelli E., Barboni P., Longanesi L., Schimpf S., Wissinger B., Baruzzi A., Barbiroli B. and Carelli V. (2004) Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* **56**, 719-723.
- Lok J. and Martin L. J. (2002) Rapid subcellular redistribution of Bax precedes caspase-3 and endonuclease activation during excitotoxic neuronal apoptosis in rat brain. *J Neurotrauma* **19**, 815-828.
- Loschmann P. A., Lange K. W., Wachtel H. and Turski L. (1994) MPTP-induced degeneration: interference with glutamatergic toxicity. *J Neural Transm Suppl* **43**, 133-143.
- Lu Y. M., Jia Z., Janus C., Henderson J. T., Gerlai R., Wojtowicz J. M. and Roder J. C. (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci* **17**, 5196-5205.
- Lucas D. R. and Newhouse J. P. (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* **58**, 193-201.
- Ludolph A. C. and Spencer P. S. (1996) Toxic models of upper motor neuron disease. *J Neurol Sci* **139 Suppl**, 53-59.
- Ludolph A. C., He F., Spencer P. S., Hammerstad J. and Sabri M. (1991) 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* **18**, 492-498.
- Ludolph A. C., Seelig M., Ludolph A. G., Sabri M. I. and Spencer P. S. (1992) ATP deficits and neuronal degeneration induced by 3-nitropropionic acid. *Ann N Y Acad Sci* **648**, 300-302.
- Lunkes A., Lindenberg K. S., Ben-Haiem L., Weber C., Devys D., Landwehrmeyer G. B., Mandel J. L. and Trotter Y. (2002) Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* **10**, 259-269.
- Luo H. R., Hattori H., Hossain M. A., Hester L., Huang Y., Lee-Kwon W., Donowitz M., Nagata E. and Snyder S. H. (2003) Akt as a mediator of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11712-11717.
- Luoma P., Melberg A., Rinne J. O., Kaukonen J. A., Nupponen N. N., Chalmers R. M., Oldfors A., Rautakorpi I., Peltonen L., Majamaa K., Somer H. and Suomalainen A. (2004) Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* **364**, 875-882.

BIBLIOGRAPHIE

- Luthi-Carter R., Apostol B. L., Dunah A. W., DeJohn M. M., Farrell L. A., Bates G. P., Young A. B., Standaert D. G., Thompson L. M. and Cha J. H. (2003) Complex alteration of NMDA receptors in transgenic Huntington's disease mouse brain: analysis of mRNA and protein expression, plasma membrane association, interacting proteins, and phosphorylation. *Neurobiol Dis* **14**, 624-636.
- Luthi-Carter R., Strand A. D., Hanson S. A., Kooperberg C., Schilling G., La Spada A. R., Merry D. E., Young A. B., Ross C. A., Borchelt D. R. and Olson J. M. (2002) Polyglutamine and transcription: gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal context-independent effects. *Hum Mol Genet* **11**, 1927-1937.
- Luthi-Carter R., Strand A., Peters N. L., Solano S. M., Hollingsworth Z. R., Menon A. S., Frey A. S., Spektor B. S., Penney E. B., Schilling G., Ross C. A., Borchelt D. R., Tapscott S. J., Young A. B., Cha J. H. and Olson J. M. (2000) Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **9**, 1259-1271.

M

- MacDermott A. B., Mayer M. L., Westbrook G. L., Smith S. J. and Barker J. L. (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* **321**, 519-522.
- MacDonald J. F. and Nistri A. (1978) A comparison of the action of glutamate, ibotenate and other related amino acids on feline spinal interneurons. *J Physiol* **275**, 449-465.
- MacDonald M. E., Vonsattel J. P., Shrinidhi J., Couropmitree N. N., Cupples L. A., Bird E. D., Gusella J. F. and Myers R. H. (1999) Evidence for the GluR6 gene associated with younger onset age of Huntington's disease. *Neurology* **53**, 1330-1332.
- Macdonald V. and Halliday G. (2002) Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **10**, 378-386.
- Macdonald V., Halliday G. M., Trent R. J. and McCusker E. A. (1997) Significant loss of pyramidal neurons in the angular gyrus of patients with Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**, 492-495.
- Maciel E. N., Vercesi A. E. and Castilho R. F. (2001) Oxidative stress in Ca(2+)-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J Neurochem* **79**, 1237-1245.
- Maciel E. N., Kowaltowski A. J., Schwalm F. D., Rodrigues J. M., Souza D. O., Vercesi A. E., Wajner M. and Castilho R. F. (2004) Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem* **90**, 1025-1035.
- Magistretti P. J., Pellerin L., Rothman D. L. and Shulman R. G. (1999) Energy on demand. *Science* **283**, 496-497.
- Maglione V., Cannella M., Gradini R., Cislighi G. and Squitieri F. (2006) Huntingtin fragmentation and increased caspase 3, 8 and 9 activities in lymphoblasts with heterozygous and homozygous Huntington's disease mutation. *Mech Ageing Dev* **127**, 213-216.
- Majumder P., Chattopadhyay B., Mazumder A., Das P. and Bhattacharyya N. P. (2006) Induction of apoptosis in cells expressing exogenous Hipp1, a molecular partner of huntingtin-interacting protein Hip1. *Neurobiol Dis* **22**, 242-256.
- Makoff A., Pilling C., Harrington K. and Emson P. (1996a) Human metabotropic glutamate receptor type 7: molecular cloning and mRNA distribution in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* **40**, 165-170.
- Makoff A., Lelchuk R., Oxeer M., Harrington K. and Emson P. (1996b) Molecular characterization and localization of human metabotropic glutamate receptor type 4. *Brain Res Mol Brain Res* **37**, 239-248.
- Makoff A., Volpe F., Lelchuk R., Harrington K. and Emson P. (1996c) Molecular characterization and localization of human metabotropic glutamate receptor type 3. *Brain Res Mol Brain Res* **40**, 55-63.
- Malecki M. T., Slowik A., Sado M., Turaj W., Klupa T., Sieradzki J. and Szczudlik A. (2003) Calpain 10 gene polymorphisms and the risk of ischaemic stroke in a Polish population. *Przegl Lek* **60**, 519-522.
- Malherbe P., Knoflach F., Broger C., Ohresser S., Kratzeisen C., Adam G., Stadler H., Kemp J. A. and Mutel V. (2001) Identification of essential residues involved in the glutamate binding pocket of the group II metabotropic glutamate receptor. *Mol Pharmacol* **60**, 944-954.
- Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M., Cozens B., Harper A., Hetherington C., Lawton M., Trotter Y., Leach H., Davies S. W. and Bates G. P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506.
- Mantle D., Falkous G., Ishiura S., Perry R. H. and Perry E. K. (1995) Comparison of cathepsin protease activities in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neurol Sci* **131**, 65-70.

BIBLIOGRAPHIE

- Manzoni O. J., Manabe T. and Nicoll R. A. (1994) Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science* **265**, 2098-2101.
- Mao W., Yu X. X., Zhong A., Li W., Brush J., Sherwood S. W., Adams S. H. and Pan G. (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* **443**, 326-330.
- Margolis R. L., O'Hearn E., Rosenblatt A., Willour V., Holmes S. E., Franz M. L., Callahan C., Hwang H. S., Troncoso J. C. and Ross C. A. (2001) A disorder similar to Huntington's disease is associated with a novel CAG repeat expansion. *Ann Neurol* **50**, 373-380.
- Margulis L. (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press.
- Marin P., Lafon-Cazal M. and Bockaert J. (1992) A Nitric Oxide Synthase Activity Selectively Stimulated by NMDA Receptors Depends on Protein Kinase C Activation in Mouse Striatal Neurons. *Eur J Neurosci* **4**, 425-432.
- Marsh J. L., Pallos J. and Thompson L. M. (2003) Fly models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, R187-193.
- Marshall P. E., Landis D. M. and Zalneraitis E. L. (1983) Immunocytochemical studies of substance P and leucine-enkephalin in Huntington's disease. *Brain Res* **289**, 11-26.
- Marti M., Mela F., Ulazzi L., Hanau S., Stocchi S., Paganini F., Beani L., Bianchi C. and Morari M. (2003) Differential responsiveness of rat striatal nerve endings to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: implications for Huntington's disease. *Eur J Neurosci* **18**, 759-767.
- Martin W. H., Beavis A. D. and Garlid K. D. (1984) Identification of an 82,000-dalton protein responsible for K⁺/H⁺ antiport in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **259**, 2062-2065.
- Martindale D., Hackam A., Wieczorek A., Ellerby L., Wellington C., McCutcheon K., Singaraja R., Kazemi-Esfarjani P., Devon R., Kim S. U., Bredesen D. E., Tufaro F. and Hayden M. R. (1998) Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat Genet* **18**, 150-154.
- Martinez-Mir M. I., Probst A. and Palacios J. M. (1991) Adenosine A2 receptors: selective localization in the human basal ganglia and alterations with disease. *Neuroscience* **42**, 697-706.
- Masliah E., Cole G., Shimohama S., Hansen L., DeTeresa R., Terry R. D. and Saitoh T. (1990) Differential involvement of protein kinase C isozymes in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **10**, 2113-2124.
- Masu M., Iwakabe H., Tagawa Y., Miyoshi T., Yamashita M., Fukuda Y., Sasaki H., Hiroi K., Nakamura Y., Shigemoto R. and et al. (1995) Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* **80**, 757-765.
- Masugi M., Yokoi M., Shigemoto R., Muguruma K., Watanabe Y., Sansig G., van der Putten H. and Nakanishi S. (1999) Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes deficit in fear response and conditioned taste aversion. *J Neurosci* **19**, 955-963.
- Mathern G. W., Mendoza D., Lozada A., Pretorius J. K., Dehnes Y., Danbolt N. C., Nelson N., Leite J. P., Chimelli L., Born D. E., Sakamoto A. C., Assirati J. A., Fried I., Peacock W. J., Ojemann G. A. and Adelson P. D. (1999) Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* **52**, 453-472.
- Matteucci A., Frank C., Domenici M. R., Balduzzi M., Paradisi S., Carnovale-Scalzo G., Scoria G. and Malchiodi-Albedi F. (2005) Curcumin treatment protects rat retinal neurons against excitotoxicity: effect on N-methyl-D: -aspartate-induced intracellular Ca(2+) increase. *Exp Brain Res* **167**, 641-648.
- Mattiazzi M., D'Aurelio M., Gajewski C. D., Martushova K., Kiaei M., Beal M. F. and Manfredi G. (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* **277**, 29626-29633.
- Mattson M. P. (2003) Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* **3**, 65-94.
- Mattson M. P. and Kroemer G. (2003) Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* **9**, 196-205.
- Mayer M. L. and Armstrong N. (2004) Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* **66**, 161-181.
- McBain C. J. and Mayer M. L. (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* **74**, 723-760.
- McCord J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* **312**, 159-163.
- McCormack J. G. and Denton R. M. (1979) The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J* **180**, 533-544.
- McCormack J. G. and Denton R. M. (1984) Role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-

BIBLIOGRAPHIE

- oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of Ca²⁺. *Biochem J* **218**, 235-247.
- McCormack J. G., Halestrap A. P. and Denton R. M. (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* **70**, 391-425.
- McDonald J. W. and Johnston M. V. (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* **15**, 41-70.
- McEnery M. W., Snowman A. M., Trifiletti R. R. and Snyder S. H. (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3170-3174.
- McGeer E. G. and McGeer P. L. (1976) Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature* **263**, 517-519.
- McGeer E. G., Singh E. A. and McGeer P. L. (1988) Peripheral-type benzodiazepine binding in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **2**, 331-336.
- McGeer P. L., McGeer E. G. and Fibiger H. C. (1973) Choline acetylase and glutamic acid decarboxylase in Huntington's chorea. A preliminary study. *Neurology* **23**, 912-917.
- McGuire J. R., Rong J., Li S. H. and Li X. J. (2006) Interaction of Huntingtin-associated Protein-1 with Kinesin Light Chain: IMPLICATIONS IN INTRACELLULAR TRAFFICKING IN NEURONS. *J Biol Chem* **281**, 3552-3559.
- McKenna M. C., Waagepetersen H. S., Schousboe A. and Sonnewald U. (2006) Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. *Biochem Pharmacol* **71**, 399-407.
- McKusick V. A. (2002) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/entrez/dispmim.cgi?id=603358>.
- McKusick V. A. (2005) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/entrez/dispmim.cgi?id=540000>.
- McKusick V. A. (2006a) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/entrez/dispmim.cgi?id=105400>.
- McKusick V. A. (2006b) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/entrez/dispmim.cgi?id=535000>.
- McLennan H. (1980) The effect of decortication on the excitatory amino acid sensitivity of striatal neurones. *Neurosci Lett* **18**, 313-316.
- McNamara J. O., Eubanks J. H., McPherson J. D., Wasmuth J. J., Evans G. A. and Heinemann S. F. (1992) Chromosomal localization of human glutamate receptor genes. *J Neurosci* **12**, 2555-2562.
- Menalled L., Zanjani H., MacKenzie L., Koppel A., Carpenter E., Zeitlin S. and Chesselet M. F. (2000) Decrease in striatal enkephalin mRNA in mouse models of Huntington's disease. *Exp Neurol* **162**, 328-342.
- Menalled L. B. (2005) Knock-in mouse models of Huntington's disease. *NeuroRx* **2**, 465-470.
- Menalled L. B. and Chesselet M. F. (2002) Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 32-39.
- Mende-Mueller L. M., Toneff T., Hwang S. R., Chesselet M. F. and Hook V. Y. (2001) Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum. *J Neurosci* **21**, 1830-1837.
- Meng F., Guo J., Zhang Q., Song B. and Zhang G. (2003) Autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha (CaMKII alpha) reversibly targets to and phosphorylates N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B (NR2B) in cerebral ischemia and reperfusion in hippocampus of rats. *Brain Res* **967**, 161-169.
- Menini C., Meldrum B. S., Riche D., Silva-Comte C. and Stutzmann J. M. (1980) Sustained limbic seizures induced by intraamygdaloid kainic acid in the baboon: Symptomatology and neuropathological consequences. *Ann Neurol* **8**, 501-509.
- Menkes J. H. and Hanoch A. (1977) Huntington's disease--growth of fibroblast cultures in lipid-deficient medium: a preliminary report. *Ann Neurol* **1**, 423-425.
- Messmer K. and Reynolds G. P. (1998) Increased peripheral benzodiazepine binding sites in the brain of patients with Huntington's disease. *Neurosci Lett* **241**, 53-56.
- Metzler M., Helgason C. D., Dragatsis I., Zhang T., Gan L., Pineault N., Zeitlin S. O., Humphries R. K. and Hayden M. R. (2000) Huntingtin is required for normal hematopoiesis. *Hum Mol Genet* **9**, 387-394.
- Metzler M., Chen N., Helgason C. D., Graham R. K., Nichol K., McCutcheon K., Nasir J., Humphries R. K., Raymond L. A. and Hayden M. R. (1999) Life without huntingtin: normal differentiation into functional neurons. *J Neurochem* **72**, 1009-1018.
- Metzler M., Li B., Gan L., Georgiou J., Gutekunst C. A., Wang Y., Torre E., Devon R. S., Oh R., Legendre-Guillemin V., Rich M., Alvarez C., Gertsenstein M., McPherson P. S., Nagy A., Wang Y. T., Roder J. C., Raymond L. A. and Hayden M. R.

BIBLIOGRAPHIE

- (2003) Disruption of the endocytic protein HIP1 results in neurological deficits and decreased AMPA receptor trafficking. *Embo J* **22**, 3254-3266.
- Meyer T., Munch C., Volkel H., Booms P. and Ludolph A. C. (1998) The EAAT2 (GLT-1) gene in motor neuron disease: absence of mutations in amyotrophic lateral sclerosis and a point mutation in patients with hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **65**, 594-596.
- Michaels R. L. and Rothman S. M. (1990) Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci* **10**, 283-292.
- Mikaelian E. (2001) La maladie de Huntington, in *Université Paris V Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques*, p 82, Paris.
- Milakovic T. and Johnson G. V. (2005) Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* **280**, 30773-30782.
- Milani D., Guidolin D., Facci L., Pozzan T., Buso M., Leon A. and Skaper S. D. (1991) Excitatory amino acid-induced alterations of cytoplasmic free Ca²⁺ in individual cerebellar granule neurons: role in neurotoxicity. *J Neurosci Res* **28**, 434-441.
- Miller V. M., Nelson R. F., Gouvion C. M., Williams A., Rodriguez-Lebron E., Harper S. Q., Davidson B. L., Rebagliati M. R. and Paulson H. L. (2005) CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J Neurosci* **25**, 9152-9161.
- Minn A. (1982) Glutamine uptake by isolated rat brain mitochondria. *Neuroscience* **7**, 2859-2865.
- Miralles V. J., Martinez-Lopez I., Zaragoza R., Borrás E., Garcia C., Pallardo F. V. and Vina J. R. (2001) Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Res* **922**, 21-29.
- Mironova G. D., Baumann M., Kolomytkin O., Krasichkova Z., Berdimuratov A., Sirota T., Virtanen I. and Saris N. E. (1994) Purification of the channel component of the mitochondrial calcium uniporter and its reconstitution into planar lipid bilayers. *J Bioenerg Biomembr* **26**, 231-238.
- Miyake M., Kakimoto Y. and Sorimachi M. (1981) A gas chromatographic method for the determination of N-acetyl-L-aspartic acid, N-acetyl-alpha-aspartylglutamic acid and beta-citryl-L-glutamic acid and their distributions in the brain and other organs of various species of animals. *J Neurochem* **36**, 804-810.
- Miyamoto T., Kanazawa N., Hayakawa C. and Tsujino S. (2002a) A novel mutation, P126R, in a Japanese patient with HHH syndrome. *Pediatr Neurol* **26**, 65-67.
- Miyamoto Y., Yamada K., Noda Y., Mori H., Mishina M. and Nabeshima T. (2002b) Lower sensitivity to stress and altered monoaminergic neuronal function in mice lacking the NMDA receptor epsilon 4 subunit. *J Neurosci* **22**, 2335-2342.
- Miyashita T., Matsui J., Ohtsuka Y., Mami U., Fujishima S., Okamura-Oho Y., Inoue T. and Yamada M. (1999) Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 724-730.
- Miyazaki E., Sakaguchi M., Wakabayashi S., Shigekawa M. and Mihara K. (2001) NHE6 protein possesses a signal peptide destined for endoplasmic reticulum membrane and localizes in secretory organelles of the cell. *J Biol Chem* **276**, 49221-49227.
- Mizuno Y., Suzuki K. and Ohta S. (1990) Postmortem changes in mitochondrial respiratory enzymes in brain and a preliminary observation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **96**, 49-57.
- Mizuno Y., Matuda S., Yoshino H., Mori H., Hattori N. and Ikebe S. (1994) An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **35**, 204-210.
- Modregger J., DiProspero N. A., Charles V., Tagle D. A. and Plomann M. (2002) PACSIN 1 interacts with huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* **11**, 2547-2558.
- Modregger J., Schmidt A. A., Ritter B., Huttner W. B. and Plomann M. (2003) Characterization of Endophilin B1b, a brain-specific membrane-associated lysophosphatidic acid acyl transferase with properties distinct from endophilin A1. *J Biol Chem* **278**, 4160-4167.
- Mohn A. R., Gainetdinov R. R., Caron M. G. and Koller B. H. (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* **98**, 427-436.
- Monaghan D. T., Bridges R. J. and Cotman C. W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **29**, 365-402.
- Montero M., Alonso M. T., Albillos A., Garcia-Sancho J. and Alvarez J. (2001) Mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediated by the Ca²⁺ uniporter. *Mol Biol Cell* **12**, 63-71.

BIBLIOGRAPHIE

- Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B. and Seeburg P. H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**, 1217-1221.
- Moreno-Sanchez R. (1985) Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J Biol Chem* **260**, 12554-12560.
- Moriyama Y. and Yamamoto A. (2004) Glutamatergic chemical transmission: look! Here, there, and anywhere. *J Biochem (Tokyo)* **135**, 155-163.
- Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N. and Nakanishi S. (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**, 31-37.
- Moroni F., Lombardi A. and Carla V. (1989) *The measurement of the quinolinic acid in the mammalian brain: neuropharmacological and physiopathological studies.*, pp 53-63. CRC Press, Boca Raton.
- Moroni F., Russi P., Gallo-Mezo M. A., Moneti G. and Pellicciari R. (1991) Modulation of quinolinic and kynurenic acid content in the rat brain: effects of endotoxins and nicotinylalanine. *J Neurochem* **57**, 1630-1635.
- Morton A. J. and Edwardson J. M. (2001) Progressive depletion of complexin II in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* **76**, 166-172.
- Mouatt-Prigent A., Karlsson J. O., Agid Y. and Hirsch E. C. (1996) Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience* **73**, 979-987.
- Murachi T., Tanaka K., Hatanaka M. and Murakami T. (1980) Intracellular Ca²⁺-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv Enzyme Regul* **19**, 407-424.
- Murphy D. E. and Williams M. (1987) *Interaction of sulfur-containing amino-acids with quisqualate and kainate excitatory amino acid receptors in rat brain.*, Vol. 24, pp 63-66. Alan R. Liss, New York.
- Murphy D. E., Snowhill E. W. and Williams M. (1987a) Characterization of quisqualate recognition sites in rat brain tissue using DL-[³H]alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) and a filtration assay. *Neurochem Res* **12**, 775-781.
- Murphy S. N., Thayer S. A. and Miller R. J. (1987b) The effects of excitatory amino acids on intracellular calcium in single mouse striatal neurons in vitro. *J Neurosci* **7**, 4145-4158.
- Myers R. H., Goldman D., Bird E. D., Sax D. S., Merrill C. R., Schoenfeld M. and Wolf P. A. (1983) Maternal transmission in Huntington's disease. *Lancet* **1**, 208-210.
- Myers R. H., Vonsattel J. P., Paskevich P. A., Kiely D. K., Stevens T. J., Cupples L. A., Richardson E. P., Jr. and Bird E. D. (1991) Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol* **50**, 729-742.

N

- Nadi N. S., Kanter D., McBride W. J. and Aprison M. H. (1977) Effects of 3-acetylpyridine on several putative neurotransmitter amino acids in the cerebellum and medulla of the rat. *J Neurochem* **28**, 661-662.
- Nadler J. V., Perry B. W. and Cotman C. W. (1978) Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* **271**, 676-677.
- Nagata E., Sawa A., Ross C. A. and Snyder S. H. (2004) Autophagosome-like vacuole formation in Huntington's disease lymphoblasts. *Neuroreport* **15**, 1325-1328.
- Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N. and Fukuyama H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 108-116.
- Nakagawa T. and Yuan J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* **150**, 887-894.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B. A. and Yuan J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103.
- Nakagawa Y. (2004) Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* **1011**, 177-184.
- Nakashima R. A. and Garlid K. D. (1982) Quinine inhibition of Na⁺ and K⁺ transport provides evidence for two cation/H⁺ exchangers in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **257**, 9252-9254.

BIBLIOGRAPHIE

- Nakashima R. A., Dordick R. S. and Garlid K. D. (1982) On the relative roles of Ca²⁺ and Mg²⁺ in regulating the endogenous K⁺/H⁺ exchanger of rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **257**, 12540-12545.
- Namura S., Zhu J., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K. J., Yuan J. and Moskowitz M. A. (1998) Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* **18**, 3659-3668.
- Namura S., Hirt L., Wheeler V. C., McGinnis K. M., Hilditch-Maguire P., Moskowitz M. A., MacDonald M. E. and Persichetti F. (2002) The HD mutation does not alter neuronal death in the striatum of Hdh(Q92) knock-in mice after mild focal ischemia. *Neurobiol Dis* **11**, 147-154.
- Narasimhan P., Sklar R., Murrell M., Swanson R. A. and Sharp F. R. (1996) Methylmalonyl-CoA mutase induction by cerebral ischemia and neurotoxicity of the mitochondrial toxin methylmalonic acid. *J Neurosci* **16**, 7336-7346.
- Nasir J., Floresco S. B., O'Kusky J. R., Diewert V. M., Richman J. M., Zeisler J., Borowski A., Marth J. D., Phillips A. G. and Hayden M. R. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**, 811-823.
- Nasr P., Gursahani H. I., Pang Z., Bondada V., Lee J., Hadley R. W. and Geddes J. W. (2003) Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int* **43**, 89-99.
- Navarrete C., Martinez I. and Salamanca F. (1994) Paternal line of transmission in chorea of Huntington with very early onset. *Genet Couns* **5**, 175-178.
- Neale J. H., Bzdega T. and Wroblewska B. (2000) N-Acetylaspartylglutamate: the most abundant peptide neurotransmitter in the mammalian central nervous system. *J Neurochem* **75**, 443-452.
- Neale J. H., Olszewski R. T., Gehl L. M., Wroblewska B. and Bzdega T. (2005) The neurotransmitter N-acetylaspartylglutamate in models of pain, ALS, diabetic neuropathy, CNS injury and schizophrenia. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 477-484.
- Neuwald A. F. and Hirano T. (2000) HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome Res* **10**, 1445-1452.
- Nguyen N. H., Brathe A. and Hassel B. (2003) Neuronal uptake and metabolism of glycerol and the neuronal expression of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J Neurochem* **85**, 831-842.
- Ni B., Du Y., Wu X., DeHoff B. S., Rosteck P. R., Jr. and Paul S. M. (1996) Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* **66**, 2227-2238.
- Nicchitta C. V. and Williamson J. R. (1984) Spermine. A regulator of mitochondrial calcium cycling. *J Biol Chem* **259**, 12978-12983.
- Nicholls D. and Attwell D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 462-468.
- Nicholls D. G. (1974) The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem* **50**, 305-315.
- Nicholls D. G. (2005) Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium* **38**, 311-317.
- Nicholls D. G. and Ward M. W. (2000) Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci* **23**, 166-174.
- Nicole O., Ali C., Docagne F., Plawinski L., MacKenzie E. T., Vivien D. and Buisson A. (2001a) Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* **21**, 3024-3033.
- Nicole O., Docagne F., Ali C., Margail I., Carmeliet P., MacKenzie E. T., Vivien D. and Buisson A. (2001b) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* **7**, 59-64.
- Nicoli F., Vion-Dury J., Maloteaux J. M., Delwaide C., Confort-Gouny S., Sciaky M. and Cozzone P. J. (1993) CSF and serum metabolic profile of patients with Huntington's chorea: a study by high resolution proton NMR spectroscopy and HPLC. *Neurosci Lett* **154**, 47-51.
- Nicoll D. A., Quednau B. D., Qui Z., Xia Y. R., Lusic A. J. and Philipson K. D. (1996) Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. *J Biol Chem* **271**, 24914-24921.
- Nijjar M. S. and Nijjar S. S. (2000) Domoic acid-induced neurodegeneration resulting in memory loss is mediated by Ca²⁺ overload and inhibition of Ca²⁺ + calmodulin-stimulated adenylate cyclase in rat brain (review). *Int J Mol Med* **6**, 377-389.
- Nishitoh H., Matsuzawa A., Tobiume K., Saegusa K., Takeda K., Inoue K., Hori S., Kakizuka A. and Ichijo H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16**, 1345-1355.

BIBLIOGRAPHIE

- Nixon R. A., Saito K. I., Grynspan F., Griffin W. R., Katayama S., Honda T., Mohan P. S., Shea T. B. and Beermann M. (1994) Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **747**, 77-91.
- Nonaka S., Hough C. J. and Chuang D. M. (1998) Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2642-2647.
- Novelli A., Reilly J. A., Lysko P. G. and Henneberry R. C. (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* **451**, 205-212.
- 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., Dawson T. M. and Ross C. A. (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* **291**, 2423-2428.
- Numata M., Petrecca K., Lake N. and Orlowski J. (1998) Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem* **273**, 6951-6959.
- Nunn P. B., Seelig M., Zagoren J. C. and Spencer P. S. (1987) Stereospecific acute neuronotoxicity of 'uncommon' plant amino acids linked to human motor-system diseases. *Brain Res* **410**, 375-379.
- Nury H., Dahout-Gonzalez C., Trezeguet V., Lauquin G. J., Brandolin G. and Pebay-Peyroula E. (2006) Relations Between Structure and Function of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. *Annu Rev Biochem*.
- Nusser Z. (2000) AMPA and NMDA receptors: similarities and differences in their synaptic distribution. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 337-341.

O

- Ogata T., Nakamura Y., Tsuji K., Shibata T., Kataoka K., Ishida M. and Shinozaki H. (1994) A marked increase in intracellular Ca²⁺ concentration induced by acromelic acid in cultured rat spinal neurons. *Neuropharmacology* **33**, 1079-1085.
- Okado-Matsumoto A. and Fridovich I. (2002) Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9010-9014.
- Okun J. G., Zickermann V. and Brandt U. (1999) Properties of the common inhibitor-binding domain in mitochondrial NADH-dehydrogenase (complex I). *Biochem Soc Trans* **27**, 596-601.
- Okuno E. and Schwarcz R. (1985) Purification of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from rat liver and brain. *Biochim Biophys Acta* **841**, 112-119.
- Okuno E., Du F., Ishikawa T., Tsujimoto M., Nakamura M., Schwarcz R. and Kido R. (1990) Purification and characterization of kynurenine-pyruvate aminotransferase from rat kidney and brain. *Brain Res* **534**, 37-44.
- Olichon A., Baricault L., Gas N., Guillou E., Valette A., Belenguer P. and Lenaers G. (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 7743-7746.
- Oliva D., Carella F., Savoiano M., Strada L., Giovannini P., Testa D., Filippini G., Caraceni T. and Girotti F. (1993) Clinical and magnetic resonance features of the classic and akinetic-rigid variants of Huntington's disease. *Arch Neurol* **50**, 17-19.
- Olney J. W. (1971) Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* **30**, 75-90.
- Olney J. W. and Sharpe L. G. (1969) Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* **166**, 386-388.
- Olney J. W. and Ho O. L. (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* **227**, 609-611.
- Olney J. W. and de Gubareff T. (1978) Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea. *Nature* **271**, 557-559.
- Olney J. W., Ho O. L. and Rhee V. (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* **14**, 61-76.
- Olney J. W., Sharpe L. G. and Feigin R. D. (1972) Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J Neuropathol Exp Neurol* **31**, 464-488.
- Olney J. W., Rhee V. and Gubareff T. D. (1977) Neurotoxic effects of glutamate on mouse area postrema. *Brain Res* **120**, 151-157.
- Olney J. W., Collins R. C. and Sloviter R. S. (1986) Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv Neurol* **44**, 857-877.

BIBLIOGRAPHIE

- Olney J. W., Price M. T., Salles K. S., Labruyere J., Ryerson R., Mahan K., Frierdich G. and Samson L. (1987) L-homocysteic acid: an endogenous excitotoxic ligand of the NMDA receptor. *Brain Res Bull* **19**, 597-602.
- Olsen R. K., Andresen B. S., Christensen E., Bross P., Skovby F. and Gregersen N. (2003) Clear relationship between ETF/ETFDH genotype and phenotype in patients with multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Hum Mutat* **22**, 12-23.
- Olverman H. J., Jones A. W. and Watkins J. C. (1984) L-glutamate has higher affinity than other amino acids for [3H]-D-AP5 binding sites in rat brain membranes. *Nature* **307**, 460-462.
- Ona V. O., Li M., Vonsattel J. P., Andrews L. J., Khan S. Q., Chung W. M., Frey A. S., Menon A. S., Li X. J., Stieg P. E., Yuan J., Penney J. B., Young A. B., Cha J. H. and Friedlander R. M. (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* **399**, 263-267.
- Ortega F., Pomposo I., Streit P. and Grandes P. (1994) Homocysteate-like immunoreactivity in multiform glioblastoma of human brain. *Neurosci Lett* **168**, 41-44.
- Ottersen O. P. and Storm-Mathisen J. (1985) Different neuronal localization of aspartate-like and glutamate-like immunoreactivities in the hippocampus of rat, guinea-pig and Senegalese baboon (*Papio papio*), with a note on the distribution of gamma-aminobutyrate. *Neuroscience* **16**, 589-606.
- Ouary S., Bizat N., Altairac S., Menetrat H., Mittoux V., Conde F., Hantraye P. and Brouillet E. (2000) Major strain differences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in rats: implications for neuroprotection studies. *Neuroscience* **97**, 521-530.
- Owen F., Poulter M., Waddington J. L., Mashal R. D. and Crow T. J. (1983) [3H]R05-4864 and [3H]flunitrazepam binding in kainate-lesioned rat striatum and in temporal cortex of brains from patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* **278**, 373-375.

P

- Page K. J., Besret L., Jain M., Monaghan E. M., Dunnett S. B. and Everitt B. J. (2000) Effects of systemic 3-nitropropionic acid-induced lesions of the dorsal striatum on cannabinoid and mu-opioid receptor binding in the basal ganglia. *Exp Brain Res* **130**, 142-150.
- Palaiologos G., Hertz L. and Schousboe A. (1988) Evidence that aspartate aminotransferase activity and ketodicarboxylate carrier function are essential for biosynthesis of transmitter glutamate. *J Neurochem* **51**, 317-320.
- Palfi S., Leventhal L., Goetz C. G., Hantraye T., Roitberg B. Z., Sramek J., Emborg M. and Kordower J. H. (2000) Delayed onset of progressive dystonia following subacute 3-nitropropionic acid treatment in *Cebus apella* monkeys. *Mov Disord* **15**, 524-530.
- Palo J., Somer H., Ikonen E., Karila L. and Peltonen L. (1987) Low prevalence of Huntington's disease in Finland. *Lancet* **2**, 805-806.
- Pang Z. and Geddes J. W. (1997) Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci* **17**, 3064-3073.
- Pang Z., Bondada V., Sengoku T., Siman R. and Geddes J. W. (2003) Calpain facilitates the neuron death induced by 3-nitropropionic acid and contributes to the necrotic morphology. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 633-643.
- Panov A., Obertone T., Bennett-Desmelik J. and Greenamyre J. T. (1999) Ca(2+)-dependent permeability transition and complex I activity in lymphoblast mitochondria from normal individuals and patients with Huntington's or Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **893**, 365-368.
- Panov A. V. and Scaduto R. C., Jr. (1995) Influence of calcium on NADH and succinate oxidation by rat heart submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* **316**, 815-820.
- Panov A. V., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., Hayden M. R., Burke J. R., Strittmatter W. J. and Greenamyre J. T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* **5**, 731-736.
- Papa M., Canitano A., Boscia F., Castaldo P., Sellitti S., Porzig H., Tagliatela M. and Annunziato L. (2003) Differential expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger transcripts and proteins in rat brain regions. *J Comp Neurol* **461**, 31-48.
- Paradis E., Douillard H., Koutroumanis M., Goodyer C. and LeBlanc A. (1996) Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J Neurosci* **16**, 7533-7539.

BIBLIOGRAPHIE

- Parker J. A., Connolly J. B., Wellington C., Hayden M., Dausset J. and Neri C. (2001) Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13318-13323.
- Parker W. D., Jr., Boyson S. J. and Parks J. K. (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* **26**, 719-723.
- Paschen W. and Mengesdorf T. (2005) Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium* **38**, 409-415.
- Passani L., Elkabes S. and Coyle J. T. (1998) Evidence for the presence of N-acetylaspartylglutamate in cultured oligodendrocytes and LPS activated microglia. *Brain Res* **794**, 143-145.
- Paucek P., Yarov-Yarovoy V., Sun X. and Garlid K. D. (1996) Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. *J Biol Chem* **271**, 32084-32088.
- Paucek P., Mironova G., Mahdi F., Beavis A. D., Woldegiorgis G. and Garlid K. D. (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* **267**, 26062-26069.
- Pavese N., Andrews T. C., Brooks D. J., Ho A. K., Rosser A. E., Barker R. A., Robbins T. W., Sahakian B. J., Dunnett S. B. and Piccini P. (2003) Progressive striatal and cortical dopamine receptor dysfunction in Huntington's disease: a PET study. *Brain* **126**, 1127-1135.
- Pearson S. J. and Reynolds G. P. (1994) Neocortical neurotransmitter markers in Huntington's disease. *J Neural Transm Gen Sect* **98**, 197-207.
- Pedata F., Corsi C., Melani A., Bordoni F. and Latini S. (2001) Adenosine extracellular brain concentrations and role of A2A receptors in ischemia. *Ann N Y Acad Sci* **939**, 74-84.
- Pekhletski R., Gerlai R., Overstreet L. S., Huang X. P., Agopyan N., Slater N. T., Abramow-Newerly W., Roder J. C. and Hampson D. R. (1996) Impaired cerebellar synaptic plasticity and motor performance in mice lacking the mGluR4 subtype of metabotropic glutamate receptor. *J Neurosci* **16**, 6364-6373.
- Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V. and Moroni F. (1988) Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J Neurochem* **51**, 1960-1963.
- Peng L., Hertz L., Huang R., Sonnewald U., Petersen S. B., Westergaard N., Larsson O. and Schousboe A. (1993) Utilization of glutamine and of TCA cycle constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA. *Dev Neurosci* **15**, 367-377.
- Peng T. I., Jou M. J., Sheu S. S. and Greenamyre J. T. (1998) Visualization of NMDA receptor-induced mitochondrial calcium accumulation in striatal neurons. *Exp Neurol* **149**, 1-12.
- Penney J. B., Jr., Young A. B., Shoulson I., Starosta-Rubenstein S., Snodgrass S. R., 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**, 93-99.
- Perez-De La Cruz V., Gonzalez-Cortes C., Galvan-Arzate S., Medina-Campos O. N., Perez-Severiano F., Ali S. F., Pedraza-Chaverri J. and Santamaria A. (2005) Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III). *Neuroscience* **135**, 463-474.
- Perez-Navarro E., Gavalda N., Gratacos E. and Alberch J. (2005) Brain-derived neurotrophic factor prevents changes in Bcl-2 family members and caspase-3 activation induced by excitotoxicity in the striatum. *J Neurochem* **92**, 678-691.
- Perez-Severiano F., Escalante B. and Rios C. (1998) Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem Res* **23**, 1297-1302.
- Perez-Severiano F., Escalante B., Vergara P., Rios C. and Segovia J. (2002) Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res* **951**, 36-42.
- Perkins M. N. and Stone T. W. (1982) An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res* **247**, 184-187.
- Perkins M. N. and Stone T. W. (1983a) Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* **226**, 551-557.
- Perkins M. N. and Stone T. W. (1983b) Quinolinic acid: regional variations in neuronal sensitivity. *Brain Res* **259**, 172-176.
- Perl T. M., Bedard L., Kosatsky T., Hockin J. C., Todd E. C. and Remis R. S. (1990) An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N Engl J Med* **322**, 1775-1780.

BIBLIOGRAPHIE

- Perluigi M., Poon H. F., Maragos W., Pierce W. M., Klein J. B., Calabrese V., Cini C., De Marco C. and Butterfield D. A. (2005) Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1849-1861.
- Perry T. L., Hansen S. and Kloster M. (1973) Huntington's chorea. Deficiency of gamma-aminobutyric acid in brain. *N Engl J Med* **288**, 337-342.
- Perry T. L., Godin D. V. and Hansen S. (1982) Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett* **33**, 305-310.
- Perry T. L., Yong V. W., Hansen S., Jones K., Kim S. U., Kurlan R. and Shoulson I. (1987) Tissue culture evidence for a circulating neurotoxin in Huntington's chorea. *J Neurol Sci* **78**, 139-150.
- Peters J. C. (1991) Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Adv Exp Med Biol* **294**, 345-358.
- Petersen A., Larsen K. E., Behr G. G., 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**, 1243-1254.
- Pfanner N., Wiedemann N., Meisinger C. and Lithgow T. (2004) Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1044-1048.
- Pfeiffer J. A. F. (1913) A contribution to the pathology of chronic progressive chorea. *Brain* **35**, 276-292.
- Phelka A. D., Beck M. J. and Philbert M. A. (2003) 1,3-Dinitrobenzene inhibits mitochondrial complex II in rat and mouse brainstem and cortical astrocytes. *Neurotoxicology* **24**, 403-415.
- Phillis J. W., Ren J. and O'Regan M. H. (2000) Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res* **868**, 105-112.
- Pin J. P., Galvez T. and Prezeau L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **98**, 325-354.
- Pitche P. T. (2005) [Pellagra]. *Sante* **15**, 205-208.
- Polster B. M. and Fiskum G. (2004) Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem* **90**, 1281-1289.
- Pons G., Raefsky-Estrin C., Carothers D. J., Pepin R. A., Javed A. A., Jesse B. W., Ganapathi M. K., Samols D. and Patel M. S. (1988) Cloning and cDNA sequence of the dihydroliipoamide dehydrogenase component human alpha-ketoacid dehydrogenase complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1422-1426.
- Pontremoli S., Melloni E., Sparatore B., Salamino F., Michetti M., Sacco O. and Horecker B. L. (1985) Role of phospholipids in the activation of the Ca²⁺-dependent neutral proteinase of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **129**, 389-395.
- Popov V., Medvedev N. I., Davies H. A. and Stewart M. G. (2005) Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: a three-dimensional ultrastructural study. *J Comp Neurol* **492**, 50-65.
- Porter D. J. and Bright H. J. (1980) 3-Carbanionic substrate analogues bind very tightly to fumarase and aspartase. *J Biol Chem* **255**, 4772-4780.
- Portera-Cailliau C., Hedreen J. C., Price D. L. and Koliatsos V. E. (1995) Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* **15**, 3775-3787.
- Potier M. C., Spillantini M. G. and Carter N. P. (1992) The human glutamate receptor cDNA GluR1: cloning, sequencing, expression and localization to chromosome 5. *DNA Seq* **2**, 211-218.
- Poulopoulou C., Davaki P., Koliaraki V., Kolovou D., Markakis I. and Vassilopoulos D. (2005) Reduced expression of metabotropic glutamate receptor 2mRNA in T cells of ALS patients. *Ann Neurol* **58**, 946-949.
- Price M. T., Olney J. W., Samson L. and Labruyere J. (1985) Calcium influx accompanies but does not cause excitotoxin-induced neuronal necrosis in retina. *Brain Res Bull* **14**, 369-376.
- Przedborski S., Tieu K., Perier C. and Vila M. (2004) MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 375-379.
- Puccio H., Simon D., Cossee M., Criqui-Filipe P., Tiziano F., Melki J., Hindelang C., Matyas R., Rustin P. and Koenig M. (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* **27**, 181-186.
- Pullan L. M., Olney J. W., Price M. T., Compton R. P., Hood W. F., Michel J. and Monahan J. B. (1987) Excitatory amino acid receptor potency and subclass specificity of sulfur-containing amino acids. *J Neurochem* **49**, 1301-1307.

BIBLIOGRAPHIE

Q

- Qin Z., Wang Y. and Chaisea T. N. (2000) A caspase-3-like protease is involved in NF-kappaB activation induced by stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* **80**, 111-122.
- Qin Z. H. and Gu Z. L. (2004) Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington disease. *Acta Pharmacol Sin* **25**, 1243-1249.
- Qin Z. H., Chen R. W., Wang Y., Nakai M., Chuang D. M. and Chase T. N. (1999) Nuclear factor kappaB nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum. *J Neurosci* **19**, 4023-4033.
- Qin Z. H., Wang Y., Kegel K. B., Kazantsev A., Apostol B. L., Thompson L. M., Yoder J., Aronin N. and DiFiglia M. (2003) Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet* **12**, 3231-3244.
- Qin Z. H., Wang Y., Sapp E., Cuiffo B., Wanker E., Hayden M. R., Kegel K. B., Aronin N. and DiFiglia M. (2004) Huntingtin bodies sequester vesicle-associated proteins by a polyproline-dependent interaction. *J Neurosci* **24**, 269-281.

R

- Ramonet D., Pugliese M., Rodriguez M. J., de Yebra L., Andrade C., Adroer R., Ribalta T., Mascort J. and Mahy N. (2002) Calcium precipitation in acute and chronic brain diseases. *J Physiol Paris* **96**, 307-312.
- Ramsay R. R., Kowal A. T., Johnson M. K., Salach J. I. and Singer T. P. (1987) The inhibition site of MPP+, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* **259**, 645-649.
- Rao L., Perez D. and White E. (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* **135**, 1441-1455.
- Rathke-Hartlieb S., Schlomann U., Heimann P., Meisler M. H., Jockusch H. and Bartsch J. W. (2002) Progressive loss of striatal neurons causes motor dysfunction in MND2 mutant mice and is not prevented by Bcl-2. *Exp Neurol* **175**, 87-97.
- Ravikumar B., Acevedo-Arozena A., Imarisio S., Berger Z., Vacher C., O'Kane C. J., Brown S. D. and Rubinsztein D. C. (2005) Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet* **37**, 771-776.
- Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J. E., Luo S., Oroz L. G., Scaravilli F., Easton D. F., Duden R., O'Kane C. J. and Rubinsztein D. C. (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* **36**, 585-595.
- Reddy P. H., Williams M., Charles V., Garrett L., Pike-Buchanan L., Whetsell W. O., Jr., Miller G. and Tagle D. A. (1998) Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet* **20**, 198-202.
- Reed K. C. and Bygrave F. L. (1974) The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. *Biochem J* **140**, 143-155.
- Regulier E., Trottier Y., Perrin V., Aebischer P. and Deglon N. (2003) Early and reversible neuropathology induced by tetracycline-regulated lentiviral overexpression of mutant huntingtin in rat striatum. *Hum Mol Genet* **12**, 2827-2836.
- Reim K., Mansour M., Varoquaux F., McMahon H. T., Sudhof T. C., Brose N. and Rosenmund C. (2001) Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* **104**, 71-81.
- Reiner A., Dragatsis I., Zeitlin S. and Goldowitz D. (2003) Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Mol Neurobiol* **28**, 259-276.
- Reisel D., Bannerman D. M., Schmitt W. B., Deacon R. M., Flint J., Borchardt T., Seeburg P. H. and Rawlins J. N. (2002) Spatial memory dissociations in mice lacking GluR1. *Nat Neurosci* **5**, 868-873.
- Reshef A., Sperling O. and Zoref-Shani E. (1998) Opening of ATP-sensitive potassium channels by cromakalim confers tolerance against chemical ischemia in rat neuronal cultures. *Neurosci Lett* **250**, 111-114.
- Rice A. C., Zsoldos R., Chen T., Wilson M. S., Alessandri B., Hamm R. J. and Bullock M. R. (2002) Lactate administration attenuates cognitive deficits following traumatic brain injury. *Brain Res* **928**, 156-159.
- Riepe M., Ludolph A., Seelig M., Spencer P. S. and Ludolph A. C. (1994) Increase of ATP levels by glutamate antagonists is unrelated to neuroprotection. *Neuroreport* **5**, 2130-2132.
- Rigamonti D., Sipione S., Goffredo D., Zuccato C., Fossale E. and Cattaneo E. (2001) Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *J Biol Chem* **276**, 14545-14548.

BIBLIOGRAPHIE

- Rigamonti D., Bauer J. H., De-Fraja C., Conti L., Sipione S., Sciorati C., Clementi E., Hackam A., Hayden M. R., Li Y., Cooper J. K., Ross C. A., Govoni S., Vincenz C. and Cattaneo E. (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* **20**, 3705-3713.
- Riley K. M., Dickson A. C. and Koeppen A. H. (1991) The origin of free brain malonate. *Neurochem Res* **16**, 117-122.
- Rivkees S. A., Price S. L. and Zhou F. C. (1995) Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res* **677**, 193-203.
- Roberg B., Torgner I. A. and Kvamme E. (1995) The orientation of phosphate activated glutaminase in the inner mitochondrial membrane of synaptic and non-synaptic rat brain mitochondria. *Neurochem Int* **27**, 367-376.
- Robinson M. B., Blakely R. D., Couto R. and Coyle J. T. (1987) Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *J Biol Chem* **262**, 14498-14506.
- Rodda R. A. (1981) Cerebellar atrophy in Huntington's disease. *J Neurol Sci* **50**, 147-157.
- Rodriguez-Zavala J. S. and Moreno-Sanchez R. (1998) Modulation of oxidative phosphorylation by Mg²⁺ in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* **273**, 7850-7855.
- Rodriguez M. J., Bernal F., Andres N., Malpesa Y. and Mahy N. (2000) Excitatory amino acids and neurodegeneration: a hypothetical role of calcium precipitation. *Int J Dev Neurosci* **18**, 299-307.
- Roizin L., Stellar S., Willson N., Whittier J. and Liu J. C. (1974) Electron microscope and enzyme studies in cerebral biopsies of Huntington's chorea. *Trans Am Neurol Assoc* **99**, 240-243.
- Rong Y., Lu X., Bernard A., Khrestchatsky M. and Baudry M. (2001) Tyrosine phosphorylation of ionotropic glutamate receptors by Fyn or Src differentially modulates their susceptibility to calpain and enhances their binding to spectrin and PSD-95. *J Neurochem* **79**, 382-390.
- Roos R. A. and Bots G. T. (1983) Nuclear membrane indentations in Huntington's chorea. *J Neurol Sci* **61**, 37-47.
- Roos R. A., Pruyt J. F., de Vries J. and Bots G. T. (1985) Neuronal distribution in the putamen in Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **48**, 422-425.
- Ropp P. A. and Copeland W. C. (1996) Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics* **36**, 449-458.
- Rosenberg M. J., Agarwala R., Bouffard G., Davis J., Fiermonte G., Hilliard M. S., Koch T., Kalikin L. M., Makalowska I., Morton D. H., Petty E. M., Weber J. L., Palmieri F., Kelley R. I., Schaffer A. A. and Biesecker L. G. (2002) Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nat Genet* **32**, 175-179.
- Rosenstock T. R., Carvalho A. C., Jurkiewicz A., Frussa-Filho R. and Smali S. S. (2004) Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* **88**, 1220-1228.
- Ross I. A., Johnson W., Sapienza P. P. and Kim C. S. (2000) Effects of the seafood toxin domoic acid on glutamate uptake by rat astrocytes. *Food Chem Toxicol* **38**, 1005-1011.
- Rossetti Z. L., Sotgiu A., Sharp D. E., Hadjiconstantinou M. and Neff N. H. (1988) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro. *Biochem Pharmacol* **37**, 4573-4574.
- Rossi C. S., Vasington F. D. and Carafoli E. (1973) The effect of ruthenium red on the uptake and release of Ca²⁺ by mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **50**, 846-852.
- Rothman S. (1984) Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* **4**, 1884-1891.
- Rothman S. M. (1985) The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* **5**, 1483-1489.
- Rothman S. M., Thurston J. H. and Hauhart R. E. (1987) Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro. *Neuroscience* **22**, 471-480.
- Rothstein J. D., Martin L. J. and Kuncl R. W. (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* **326**, 1464-1468.
- Rothstein J. D., Van Kammen M., Levey A. I., Martin L. J. and Kuncl R. W. (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **38**, 73-84.
- Rothstein J. D., Patel S., Regan M. R., Haenggeli C., Huang Y. H., Bergles D. E., Jin L., Dykes Hoberg M., Vidensky S., Chung D. S., Toan S. V., Bruijn L. I., Su Z. Z., Gupta P. and Fisher P. B. (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* **433**, 73-77.

BIBLIOGRAPHIE

- Ruan Q., Lesort M., MacDonald M. E. and Johnson G. V. (2004) Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway. *Hum Mol Genet* **13**, 669-681.
- Rubinsztein D. C. (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet* **18**, 202-209.
- Rubinsztein D. C., 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**, 3872-3876.
- Rustenbeck I., Loptien D., Fricke K., Lenzen S. and Reiter H. (1998a) Polyamine modulation of mitochondrial calcium transport. II. Inhibition of mitochondrial permeability transition by aliphatic polyamines but not by aminoglucoisides. *Biochem Pharmacol* **56**, 987-995.
- Rustenbeck I., Eggers G., Reiter H., Munster W. and Lenzen S. (1998b) Polyamine modulation of mitochondrial calcium transport. I. Stimulatory and inhibitory effects of aliphatic polyamines, aminoglucoisides and other polyamine analogues on mitochondrial calcium uptake. *Biochem Pharmacol* **56**, 977-985.
- Rustin P., Rotig A., Munnich A. and Sidi D. (2002) Heart hypertrophy and function are improved by idebenone in Friedreich's ataxia. *Free Radic Res* **36**, 467-469.
- Rutter G. A., Pralong W. F. and Wollheim C. B. (1992) Regulation of mitochondrial glycerol-phosphate dehydrogenase by Ca²⁺ within electroporabilized insulin-secreting cells (INS-1). *Biochim Biophys Acta* **1175**, 107-113.
- Rutter G. A., Osbaldeston N. J., McCormack J. G. and Denton R. M. (1990) Measurement of matrix free Mg²⁺ concentration in rat heart mitochondria by using entrapped fluorescent probes. *Biochem J* **271**, 627-634.
- Ruzicka B. B. and Jhamandas K. (1990) Elevation of Met-enkephalin-like immunoreactivity in the rat striatum and globus pallidus following the focal injection of excitotoxins. *Brain Res* **536**, 227-239.
- Ryu J. K., Choi H. B. and McLarnon J. G. (2005) Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum. *Neurobiol Dis* **20**, 550-561.
- Ryu J. K., Nagai A., Kim J., Lee M. C., McLarnon J. G. and Kim S. U. (2003) Microglial activation and cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: in vitro and in vivo studies. *Neurobiol Dis* **12**, 121-132.

S

- Saft C., Zange J., Andrich J., Muller K., Lindenberg K., Landwehrmeyer B., Vorgerd M., Kraus P. H., Przuntek H. and Schols L. (2005) Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's disease. *Mov Disord* **20**, 674-679.
- Sakahira H., Enari M. and Nagata S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-99.
- Sakimura K., Kutsuwada T., Ito I., Manabe T., Takayama C., Kushiya E., Yagi T., Aizawa S., Inoue Y., Sugiyama H. and et al. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* **373**, 151-155.
- Sanberg P. R., Nishino H. and Borlongan C. V. (2000) *Mitochondrial inhibitors and neurodegenerative disorders*, p 313. Humana Press, Totowa.
- Sanchez I., Xu C. J., Juo P., Kakizaka A., Blenis J. and Yuan J. (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* **22**, 623-633.
- Sanchis D., Fleury C., Chomiki N., Gubern M., Huang Q., Neverova M., Gregoire F., Easlick J., Raimbault S., Levi-Meyrueis C., Miroux B., Collins S., Seldin M., Richard D., Warden C., Bouillaud F. and Ricquier D. (1998) BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* **273**, 34611-34615.
- Sanganahalli B. G., Joshi P. G. and Joshi N. B. (2005) Xanthine oxidase, nitric oxide synthase and phospholipase A(2) produce reactive oxygen species via mitochondria. *Brain Res* **1037**, 200-203.
- Sansig G., Bushell T. J., Clarke V. R., Rozov A., Burnashev N., Portet C., Gasparini F., Schmutz M., Klebs K., Shigemoto R., Flor P. J., Kuhn R., Knoepfel T., Schroeder M., Hampson D. R., Collett V. J., Zhang C., Duvoisin R. M., Collingridge G. L. and van Der Putten H. (2001) Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J Neurosci* **21**, 8734-8745.

BIBLIOGRAPHIE

- Santella L., Kyojuka K., De Riso L. and Carafoli E. (1998) Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium* **23**, 123-130.
- Santos M. S., Moreno A. J. and Carvalho A. P. (1996) Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke* **27**, 941-950.
- Sapp E., Schwarz C., Chase K., Bhide P. G., Young A. B., Penney J., Vonsattel J. P., Aronin N. and DiFiglia M. (1997) Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* **42**, 604-612.
- Sapp E., Kegel K. B., Aronin N., Hashikawa T., Uchiyama Y., Tohyama K., Bhide P. G., Vonsattel J. P. and DiFiglia M. (2001) Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 161-172.
- Saris N. E. and Bernardi P. (1983) Inhibition by Sr²⁺ of specific mitochondrial Ca²⁺-efflux pathways. *Biochim Biophys Acta* **725**, 19-24.
- Saris N. E. and Carafoli E. (2005) A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 187-194.
- Saris N. E., Sirota T. V., Virtanen I., Niva K., Penttila T., Dolgachova L. P. and Mironova G. D. (1993) Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by antibodies against a 40-kDa glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr* **25**, 307-312.
- Sasaki S., Warita H., Murakami T., Abe K. and Iwata M. (2004) Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol (Berl)* **107**, 461-474.
- Sastry P. S. and Rao K. S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* **74**, 1-20.
- Sato K. and Abe K. (2002) [Juvenile onset Huntington's disease: correlation with progressive myoclonus epilepsy]. *Ryokibetsu Shokogun Shirizu*, 198-200.
- Sattler R. and Tymianski M. (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* **78**, 3-13.
- Sattler R., Xiong Z., Lu W. Y., Hafner M., MacDonald J. F. and Tymianski M. (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* **284**, 1845-1848.
- Saudou F., Finkbeiner S., Devys D. and Greenberg M. E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* **95**, 55-66.
- Saulle E., Gubellini P., Picconi B., Centonze D., Tropepi D., Pisani A., Morari M., Marti M., Rossi L., Papa M., Bernardi G. and Calabresi P. (2004) Neuronal vulnerability following inhibition of mitochondrial complex II: a possible ionic mechanism for Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* **25**, 9-20.
- Saviuc P. F., Danel V. C., Moreau P. A., Guez D. R., Claustre A. M., Carpentier P. H., Mallaret M. P. and Ducluzeau R. (2001) Erythromelalgia and mushroom poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* **39**, 403-407.
- Savoirdo M., Strada L., Oliva D., Girotti F. and D'Incerti L. (1991) Abnormal MRI signal in the rigid form of Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **54**, 888-891.
- Sawa A., Wiegand G. W., Cooper J., Margolis R. L., Sharp A. H., Lawler J. F., Jr., Greenamyre J. T., Snyder S. H. and Ross C. A. (1999) Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat Med* **5**, 1194-1198.
- Scallet A. C., Binienda Z., Caputo F. A., Hall S., Paule M. G., Rountree R. L., Schmued L., Sobotka T. and Slikker W., Jr. (1993) Domoic acid-treated cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*): effects of dose on hippocampal neuronal and terminal degeneration. *Brain Res* **627**, 307-313.
- Schapira A. H., Cooper J. M., Dexter D., Clark J. B., Jenner P. and Marsden C. D. (1990a) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* **54**, 823-827.
- Schapira A. H., Mann V. M., Cooper J. M., Dexter D., Daniel S. E., Jenner P., Clark J. B. and Marsden C. D. (1990b) Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* **55**, 2142-2145.
- Scherer S. W., Duvoisin R. M., Kuhn R., Heng H. H., Belloni E. and Tsui L. C. (1996) Localization of two metabotropic glutamate receptor genes, GRM3 and GRM8, to human chromosome 7q. *Genomics* **31**, 230-233.
- Schiefer J., Sprunken A., Puls C., Luesse H. G., Milkereit A., Milkereit E., Johann V. and Kosinski C. M. (2004) The metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP and the mGluR2 agonist LY379268 modify disease progression in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Brain Res* **1019**, 246-254.

BIBLIOGRAPHIE

- Schilling G., Becher M. W., Sharp A. H., Jinnah H. A., Duan K., Kotzok J. A., Slunt H. H., Ratovitski T., Cooper J. K., Jenkins N. A., Copeland N. G., Price D. L., Ross C. A. and Borchelt D. R. (1999) Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* **8**, 397-407.
- Schinzel A. C., Takeuchi O., Huang Z., Fisher J. K., Zhou Z., Rubens J., Hetz C., Danial N. N., Moskowitz M. A. and Korsmeyer S. J. (2005) Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12005-12010.
- Schlaepfer W. W. and Bunge R. P. (1973) Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. *J Cell Biol* **59**, 456-470.
- Schloss J. V. and Cleland W. W. (1982) Inhibition of isocitrate lyase by 3-nitropropionate, a reaction-intermediate analogue. *Biochemistry* **21**, 4420-4427.
- Schmitt A., Asan E., Lesch K. P. and Kugler P. (2002) A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* **109**, 45-61.
- Schoepp D. D., Ornstein P. L., Salhoff C. R. and Leander J. D. (1991) Neuroprotectant effects of LY274614, a structurally novel systemically active competitive NMDA receptor antagonist. *J Neural Transm Gen Sect* **85**, 131-143.
- Schulz J. B., Henshaw D. R., MacGarvey U. and Beal M. F. (1996) Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem Int* **29**, 167-171.
- Schulz J. B., Weller M., Matthews R. T., Heneka M. T., Groscurth P., Martinou J. C., Lommatzsch J., von Coelln R., Wullner U., Loschmann P. A., Beal M. F., Dichgans J. and Klockgether T. (1998) Extended therapeutic window for caspase inhibition and synergy with MK-801 in the treatment of cerebral histotoxic hypoxia. *Cell Death Differ* **5**, 847-857.
- Schurr A. and Rigor B. M. (1998) Brain anaerobic lactate production: a suicide note or a survival kit? *Dev Neurosci* **20**, 348-357.
- Schwarcz R. and Coyle J. T. (1977a) Kainic acid: neurotoxic effects after intraocular injection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **16**, 141-148.
- Schwarcz R. and Coyle J. T. (1977b) Neurochemical sequelae of kainate injections in corpus striatum and substantia nigra of the rat. *Life Sci* **20**, 431-436.
- Schwarcz R., Tamminga C. A., Kurlan R. and Shoulson I. (1988a) Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. *Ann Neurol* **24**, 580-582.
- Schwarcz R., Foster A. C., French E. D., Whetsell W. O., Jr. and Kohler C. (1984) Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* **35**, 19-32.
- Schwarcz R., Okuno E., White R. J., Bird E. D. and Whetsell W. O., Jr. (1988b) 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4079-4081.
- Seaton T. A., Cooper J. M. and Schapira A. H. (1998) Cyclosporin inhibition of apoptosis induced by mitochondrial complex I toxins. *Brain Res* **809**, 12-17.
- Sedvall G., Karlsson P., Lundin A., Anvret M., Suhara T., Halldin C. and Farde L. (1994) Dopamine D1 receptor number--a sensitive PET marker for early brain degeneration in Huntington's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **243**, 249-255.
- Selemon L. D., Rajkowska G. and Goldman-Rakic P. S. (2004) Evidence for progression in frontal cortical pathology in late-stage Huntington's disease. *J Comp Neurol* **468**, 190-204.
- Senut M. C., Suhr S. T., Kaspar B. and Gage F. H. (2000) Intraneuronal aggregate formation and cell death after viral expression of expanded polyglutamine tracts in the adult rat brain. *J Neurosci* **20**, 219-229.
- Seo H., Sonntag K. C. and Isacson O. (2004) Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann Neurol* **56**, 319-328.
- Seong I. S., Ivanova E., Lee J. M., Choo Y. S., Fossale E., Anderson M., Gusella J. F., Laramie J. M., Myers R. H., Lesort M. and MacDonald M. E. (2005) HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Hum Mol Genet* **14**, 2871-2880.
- Seubert P., Larson J., Oliver M., Jung M. W., Baudry M. and Lynch G. (1988) Stimulation of NMDA receptors induces proteolysis of spectrin in hippocampus. *Brain Res* **460**, 189-194.
- Shackelford D. A., Tobaru T., Zhang S. and Zivin J. A. (1999) Changes in expression of the DNA repair protein complex DNA-dependent protein kinase after ischemia and reperfusion. *J Neurosci* **19**, 4727-4738.
- Shamloo M., Soriano L., Wieloch T., Nikolich K., Urfer R. and Oksenberg D. (2005) Death-associated protein kinase is activated by dephosphorylation in response to cerebral ischemia. *J Biol Chem* **280**, 42290-42299.

BIBLIOGRAPHIE

- Shapira Y., Yadid G., Cotev S., Niska A. and Shohami E. (1990) Protective effect of MK801 in experimental brain injury. *J Neurotrauma* **7**, 131-139.
- Shashidharan P., Huntley G. W., Meyer T., Morrison J. H. and Plaitakis A. (1994) Neuron-specific human glutamate transporter: molecular cloning, characterization and expression in human brain. *Brain Res* **662**, 245-250.
- Sheetz M. P., Pfister K. K., Bulinski J. C. and Cotman C. W. (1998) Mechanisms of trafficking in axons and dendrites: implications for development and neurodegeneration. *Prog Neurobiol* **55**, 577-594.
- Shelbourne P. F., Killeen N., Hevner R. F., Johnston H. M., Tecott L., Lewandoski M., Ennis M., Ramirez L., Li Z., Iannicola C., Littman D. R. and Myers R. M. (1999) A Huntington's disease CAG expansion at the murine Hdh locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Hum Mol Genet* **8**, 763-774.
- Shibata M., Hattori H., Sasaki T., Gotoh J., Hamada J. and Fukuuchi Y. (2002) Subcellular localization of a promoter and an inhibitor of apoptosis (Smac/DIABLO and XIAP) during brain ischemia/reperfusion. *Neuroreport* **13**, 1985-1988.
- Shinozaki H. and Shibuya I. (1974) A new potent excitant, quisqualic acid: effects on crayfish neuromuscular junction. *Neuropharmacology* **13**, 665-672.
- Shinozaki H., Ishida M. and Okamoto T. (1986) Acromelic acid, a novel excitatory amino acid from a poisonous mushroom: effects on the crayfish neuromuscular junction. *Brain Res* **399**, 395-398.
- Shinozaki H., Ishida M., Gotoh Y. and Kwak S. (1989) Specific lesions of rat spinal interneurons induced by systemic administration of acromelic acid, a new potent kainate analogue. *Brain Res* **503**, 330-333.
- Siabas O. (1991) La chorée de Huntington: aspects physiopathologiques et thérapeutiques, in *Laboratoire de pharmacologie, pharmacocinétique et pharmacie clinique. UFR de pharmacie.*, p 178. Université de Lille II.
- Sibson N. R., Dhankhar A., Mason G. F., Rothman D. L., Behar K. L. and Shulman R. G. (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 316-321.
- Siddique T., Figlewicz D. A., Pericak-Vance M. A., Haines J. L., Rouleau G., Jeffers A. J., Sapp P., Hung W. Y., Bebout J., McKenna-Yasek D. and et al. (1991) Linkage of a gene causing familial amyotrophic lateral sclerosis to chromosome 21 and evidence of genetic-locus heterogeneity. *N Engl J Med* **324**, 1381-1384.
- Siemen D., Loupatatzis C., Borecky J., Gulbins E. and Lang F. (1999) Ca²⁺-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 549-554.
- Siesling S., van Vugt J. P., Zwinderman K. A., Kieburz K. and Roos R. A. (1998) Unified Huntington's disease rating scale: a follow up. *Mov Disord* **13**, 915-919.
- Sikorski A. F., Sangerman J., Goodman S. R. and Critz S. D. (2000) Spectrin (betaSp1sigma1) is an essential component of synaptic transmission. *Brain Res* **852**, 161-166.
- Sillevis Smitt P. A. and de Jong J. M. (1989) Animal models of amyotrophic lateral sclerosis and the spinal muscular atrophies. *J Neurol Sci* **91**, 231-258.
- Simon R. P., Schmidley J. W., Meldrum B. S., Swan J. H. and Chapman A. G. (1986) Excitotoxic mechanisms in hypoglycaemic hippocampal injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* **12**, 567-576.
- Simpkins K. L., Guttman R. P., Dong Y., Chen Z., Sokol S., Neumar R. W. and Lynch D. R. (2003) Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* **23**, 11322-11331.
- Simpson J. R. and Isacson O. (1993) Mitochondrial impairment reduces the threshold for in vivo NMDA-mediated neuronal death in the striatum. *Exp Neurol* **121**, 57-64.
- Simpson S. A. and Johnston A. W. (1989) The prevalence and patterns of care of Huntington's chorea in Grampian. *Br J Psychiatry* **155**, 799-804.
- Singaraja R. R., Hadano S., Metzler M., Givan S., Wellington C. L., Warby S., Yanai A., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., Yi H., Fichter K., Gan L., McCutcheon K., Chopra V., Michel J., Hersch S. M., Ikeda J. E. and Hayden M. R. (2002) HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum Mol Genet* **11**, 2815-2828.
- Singh Rao S. K., Neal J. W., Morgan B. P. and Gasque P. (1999) Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Exp Neurol* **159**, 362-376.
- Sipione S., Rigamonti D., Valenza M., Zuccato C., Conti L., Pritchard J., Kooperberg C., Olson J. M. and Cattaneo E. (2002) Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum Mol Genet* **11**, 1953-1965.
- Sittler A., Walter S., Wedemeyer N., Hasenbank R., Scherzinger E., Eickhoff H., Bates G. P., Lehrach H. and Wanker E. E. (1998) SH3GL3 associates with the Huntingtin exon 1 protein and promotes the formation of polyGln-containing protein aggregates. *Mol Cell* **2**, 427-436.

BIBLIOGRAPHIE

- Skirton H. and Glendinning N. (1997) Using research to develop care for patients with Huntington's disease. *Br J Nurs* **6**, 83-90.
- Slow E. J., van Raamsdonk J., Rogers D., Coleman S. H., Graham R. K., Deng Y., Oh R., Bissada N., Hossain S. M., Yang Y. Z., Li X. J., Simpson E. M., Gutekunst C. A., Leavitt B. R. and Hayden M. R. (2003) Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* **12**, 1555-1567.
- Smale G., Nichols N. R., Brady D. R., Finch C. E. and Horton W. E., Jr. (1995) Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **133**, 225-230.
- Smith C. P., Weremowicz S., Kanai Y., Stelzner M., Morton C. C. and Hediger M. A. (1994) Assignment of the gene coding for the human high-affinity glutamate transporter EAAC1 to 9p24: potential role in dicarboxylic aminoaciduria and neurodegenerative disorders. *Genomics* **20**, 335-336.
- Smith F. M., Raghupathi R., MacKinnon M. A., McIntosh T. K., Saatman K. E., Meaney D. F. and Graham D. I. (2000a) TUNEL-positive staining of surface contusions after fatal head injury in man. *Acta Neuropathol (Berl)* **100**, 537-545.
- Smith R., Brundin P. and Li J. Y. (2005a) Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1901-1912.
- Smith R., Petersen A., Bates G. P., Brundin P. and Li J. Y. (2005b) Depletion of rabphilin 3A in a transgenic mouse model (R6/1) of Huntington's disease, a possible culprit in synaptic dysfunction. *Neurobiol Dis*.
- Smith S. L., Heal D. J. and Martin K. F. (2005c) KTX 0101: a potential metabolic approach to cytoprotection in major surgery and neurological disorders. *CNS Drug Rev* **11**, 113-140.
- Smith Y., Charara A., Hanson J. E., Paquet M. and Levey A. I. (2000b) GABA(B) and group I metabotropic glutamate receptors in the striatopallidal complex in primates. *J Anat* **196 (Pt 4)**, 555-576.
- Snell R. G., MacMillan J. C., Cheadle J. P., Fenton I., Lazarou L. P., Davies P., MacDonald M. E., Gusella J. F., Harper P. S. and Shaw D. J. (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* **4**, 393-397.
- Sommer B., Keinanen K., Verdoorn T. A., Wisden W., Burnashev N., Herb A., Kohler M., Takagi T., Sakmann B. and Seeburg P. H. (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* **249**, 1580-1585.
- Song C., Zhang Y., Parsons C. G. and Liu Y. F. (2003) Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **278**, 33364-33369.
- Sorbi S., Bird E. D. and Blass J. P. (1983) Decreased pyruvate dehydrogenase complex activity in Huntington and Alzheimer brain. *Ann Neurol* **13**, 72-78.
- Sordahl L. A., LaBelle E. F. and Rex K. A. (1984) Amiloride and diltiazem inhibition of microsomal and mitochondrial Na⁺ and Ca²⁺ transport. *Am J Physiol* **246**, C172-176.
- Sorimachi H., Ishiura S. and Suzuki K. (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **328 (Pt 3)**, 721-732.
- Sotrel A., Williams R. S., Kaufmann W. E. and Myers R. H. (1993) Evidence for neuronal degeneration and dendritic plasticity in cortical pyramidal neurons of Huntington's disease: a quantitative Golgi study. *Neurology* **43**, 2088-2096.
- Sotrel A., Paskevich P. A., Kiely D. K., Bird E. D., Williams R. S. and Myers R. H. (1991) Morphometric analysis of the prefrontal cortex in Huntington's disease. *Neurology* **41**, 1117-1123.
- Sparenborg S., Brennecke L. H., Jaax N. K. and Braitman D. J. (1992) Dizocilpine (MK-801) arrests status epilepticus and prevents brain damage induced by soman. *Neuropharmacology* **31**, 357-368.
- Spargo E., Everall I. P. and Lantos P. L. (1993) Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **56**, 487-491.
- Spencer P. S. and Schaumburg H. H. (1983) Lathyrism: a neurotoxic disease. *Neurobehav Toxicol Teratol* **5**, 625-629.
- Spencer P. S., Kisby G. E. and Ludolph A. C. (1991) Slow toxins, biologic markers, and long-latency neurodegenerative disease in the western Pacific region. *Neurology* **41**, 62-66; discussion 66-68.
- Spielmeyer W. (1926) Die anatomische krankheitsforschung am Beispiel einer Huntingtonschen Chorea mit Wilsonschem Symptomenbild. *Z ges Neurol Psychiat* **101**, 701-728.
- Sprengel R., Suchanek B., Amico C., Brusa R., Burnashev N., Rozov A., Hvalby O., Jensen V., Paulsen O., Andersen P., Kim J. J., Thompson R. F., Sun W., Webster L. C., Grant S. G., Eilers J., Konnerth A., Li J., McNamara J. O. and Seeburg P. H. (1998) Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* **92**, 279-289.
- Springer J. E., Azbill R. D. and Knapp P. E. (1999) Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med* **5**, 943-946.

BIBLIOGRAPHIE

- Squier M. K., Sehnert A. J., Sellins K. S., Malkinson A. M., Takano E. and Cohen J. J. (1999) Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol* **178**, 311-319.
- Squitieri F., Gellera C., Cannella M., Mariotti C., Cislighi G., Rubinsztein D. C., Almqvist E. W., Turner D., Bachoud-Levi A. C., Simpson S. A., Delatycki M., Maglione V., Hayden M. R. and Donato S. D. (2003) Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain* **126**, 946-955.
- Squitieri F., Cannella M., Sgarbi G., Maglione V., Falleni A., Lenzi P., Baracca A., Cislighi G., Saft C., Ragona G., Russo M. A., Thompson L. M., Solaini G. and Fornai F. (2006) Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation. *Mech Ageing Dev* **127**, 217-220.
- Srivastava R., Brouillet E., Beal M. F., Storey E. and Hyman B. T. (1993) Blockade of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) nigral toxicity in the rat by prior decortication or MK-801 treatment: a stereological estimate of neuronal loss. *Neurobiol Aging* **14**, 295-301.
- Starkov A. A., Fiskum G., Chinopoulos C., Lorenzo B. J., Browne S. E., Patel M. S. and Beal M. F. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci* **24**, 7779-7788.
- Starkstein S. E., Brandt J., Bylsma F., Peyser C., Folstein M. and Folstein S. E. (1992) Neuropsychological correlates of brain atrophy in Huntington's disease: a magnetic resonance imaging study. *Neuroradiology* **34**, 487-489.
- Starling A. J., Andre V. M., Cepeda C., de Lima M., Chandler S. H. and Levine M. S. (2005) Alterations in N-methyl-D-aspartate receptor sensitivity and magnesium blockade occur early in development in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci Res* **82**, 377-386.
- Steffan J. S., Kazantsev A., Spasic-Boskovic O., Greenwald M., Zhu Y. Z., Gohler H., Wanker E. E., Bates G. P., Housman D. E. and Thompson L. M. (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6763-6768.
- Steffan J. S., Agrawal N., Pallos J., Rockabrand E., Trotman L. C., Slepko N., Illes K., Lukacsovich T., Zhu Y. Z., Cattaneo E., Pandolfi P. P., Thompson L. M. and Marsh J. L. (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304**, 100-104.
- Steib A., Rendon A., Mark J. and Borg J. (1986) Preferential glutamine uptake in rat brain synaptic mitochondria. *FEBS Lett* **207**, 63-68.
- Stewart G. R., Zorumski C. F., Price M. T. and Olney J. W. (1990) Domoic acid: a dementia-inducing excitotoxic food poison with kainic acid receptor specificity. *Exp Neurol* **110**, 127-138.
- Stockler S., Radner H., Karpf E. F., Hauer A. and Ebner F. (1994) Symmetric hypoplasia of the temporal cerebral lobes in an infant with glutaric aciduria type II (multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency). *J Pediatr* **124**, 601-604.
- Stone T. W. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* **45**, 309-379.
- Stone T. W. (2001) Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol* **64**, 185-218.
- Stone T. W. and Perkins M. N. (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* **72**, 411-412.
- Stout A. K. and Reynolds I. J. (1999) High-affinity calcium indicators underestimate increases in intracellular calcium concentrations associated with excitotoxic glutamate stimulations. *Neuroscience* **89**, 91-100.
- Stout A. K., Raphael H. M., Kanterewicz B. I., Klann E. and Reynolds I. J. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* **1**, 366-373.
- Strauss K. M., Martins L. M., Plun-Favreau H., Marx F. P., Kautzmann S., Berg D., Gasser T., Wszolek Z., Muller T., Bornemann A., Wolburg H., Downward J., Riess O., Schulz J. B. and Kruger R. (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **14**, 2099-2111.
- Subbarao K. V., Richardson J. S. and Ang L. C. (1990) Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J Neurochem* **55**, 342-345.
- Sugars K. L. and Rubinsztein D. C. (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet* **19**, 233-238.
- Sugars K. L., Brown R., Cook L. J., Swartz J. and Rubinsztein D. C. (2004) Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *J Biol Chem* **279**, 4988-4999.
- Sullivan P. G., Dube C., Dorenbos K., Steward O. and Baram T. Z. (2003) Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. *Ann Neurol* **53**, 711-717.
- Sun L., Margolis F. L., Shipley M. T. and Lidow M. S. (1998) Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Lett* **441**, 392-396.

BIBLIOGRAPHIE

- Sun W., Ferrer-Montiel A. V. and Montal M. (1994) Primary structure and functional expression of the AMPA/kainate receptor subunit 2 from human brain. *Neuroreport* **5**, 441-444.
- Sun Y., Savanenin A., Reddy P. H. and Liu Y. F. (2001) Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* **276**, 24713-24718.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M. C., Alzari P. M. and Kroemer G. (1999a) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* **189**, 381-394.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M. and Kroemer G. (1999b) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Suzuki Y., Takahashi-Niki K., Akagi T., Hashikawa T. and Takahashi R. (2004) Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death Differ* **11**, 208-216.
- Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K. and Takahashi R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**, 613-621.
- Szabo I. and Zoratti M. (1993) The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett* **330**, 201-205.
- Szebenyi G., Morfini G. A., Babcock A., Gould M., Selkoe K., Stenoien D. L., Young M., Faber P. W., MacDonald M. E., McPhaul M. J. and Brady S. T. (2003) Neuropathogenic forms of huntingtin and androgen receptor inhibit fast axonal transport. *Neuron* **40**, 41-52.

T

- Tabrizi S. J., Cleeter M. W., Xuereb J., Taanman J. W., Cooper J. M. and Schapira A. H. (1999) Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* **45**, 25-32.
- Tabrizi S. J., Workman J., Hart P. E., Mangiarini L., Mahal A., Bates G., Cooper J. M. and Schapira A. H. (2000) Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Ann Neurol* **47**, 80-86.
- Takahashi M., Sarantis M. and Attwell D. (1998) Glutamate uptake in Purkinje cells in rat cerebellar slices. *Methods Enzymol* **296**, 608-617.
- Takamori S., Malherbe P., Broger C. and Jahn R. (2002) Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* **3**, 798-803.
- Takano H. and Gusella J. F. (2002) The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF- κ B/Rel/dorsal family transcription factor. *BMC Neurosci* **3**, 15.
- Takemoto T., Nakajima T., Arihara S. and Koike K. (1975) [Studies on the constituents of Quisqualis Fructus. II. Structure of quisqualic acid (author's transl)]. *Yakugaku Zasshi* **95**, 326-332.
- Talbot J. D., David G. and Barrett E. F. (2003) Inhibition of mitochondrial Ca²⁺ uptake affects phasic release from motor terminals differently depending on external [Ca²⁺]. *J Neurophysiol* **90**, 491-502.
- Tanaka K., Watase K., Manabe T., Yamada K., Watanabe M., Takahashi K., Iwama H., Nishikawa T., Ichihara N., Kikuchi T., Okuyama S., Kawashima N., Hori S., Takimoto M. and Wada K. (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **276**, 1699-1702.
- Tang T. S., Tu H., Chan E. Y., Maximov A., Wang Z., Wellington C. L., Hayden M. R. and Bezprozvanny I. (2003) Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron* **39**, 227-239.
- Tang T. S., Slow E., Lupu V., Stavrovskaya I. G., Sugimori M., Llinas R., Kristal B. S., Hayden M. R. and Bezprozvanny I. (2005) Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2602-2607.
- Tang Y. P., Shimizu E., Dube G. R., Rampon C., Kerchner G. A., Zhuo M., Liu G. and Tsien J. Z. (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**, 63-69.
- Tamopolsky M. A. and Beal M. F. (2001) Potential for creatine and other therapies targeting cellular energy dysfunction in neurological disorders. *Ann Neurol* **49**, 561-574.
- Tavares R. G., Schmidt A. P., Abud J., Tasca C. I. and Souza D. O. (2005) In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. *Neurochem Res* **30**, 439-444.

BIBLIOGRAPHIE

- Tavares R. G., Tasca C. I., Santos C. E., Wajner M., Souza D. O. and Dutra-Filho C. S. (2000) Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport* **11**, 249-253.
- Tavares R. G., Tasca C. I., Santos C. E., Alves L. B., Porciuncula L. O., Emanuelli T. and Souza D. O. (2002) Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* **40**, 621-627.
- Taylor S. W., Fahy E., Zhang B., Glenn G. M., Warnock D. E., Wiley S., Murphy A. N., Gaucher S. P., Capaldi R. A., Gibson B. W. and Ghosh S. S. (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* **21**, 281-286.
- Telenius H., Kremer H. P., Theilmann J., Andrew S. E., Almqvist E., Anvret M., Greenberg C., Greenberg J., Lucotte G., Squitieri F. and et al. (1993) Molecular analysis of juvenile Huntington disease: the major influence on (CAG)_n repeat length is the sex of the affected parent. *Hum Mol Genet* **2**, 1535-1540.
- Temple M. D., Perrone G. G. and Dawes I. W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**, 319-326.
- Terplan K. (1924) Zur pathologischen Anatomie der chronischen progressiven Chorea. *Virchow's Arch f Pathol Anat (Berl)* **252**, 146-176.
- Terrence C. F. and Rao G. (1980) Neuropathologic correlation of computerized tomography in Huntington's disease. *South Med J* **73**, 817-818.
- Terrence C. F., Delaney J. F. and Alberts M. C. (1977) Computed tomography for Huntington's disease. *Neuroradiology* **13**, 173-175.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971-983.
- Thomas L. B., Gates D. J., Richfield E. K., O'Brien T. F., Schweitzer J. B. and Steindler D. A. (1995) DNA end labeling (TUNEL) in Huntington's disease and other neuropathological conditions. *Exp Neurol* **133**, 265-272.
- Thompson G. A. and Kilpatrick I. C. (1996) The neurotransmitter candidature of sulphur-containing excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Pharmacol Ther* **72**, 25-36.
- Thornberry N. A. and Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Tildon J. T., Roeder L. M. and Stevenson J. H. (1985) Substrate oxidation by isolated rat brain mitochondria and synaptosomes. *J Neurosci Res* **14**, 207-215.
- Tingley W. G., Roche K. W., Thompson A. K. and Haganir R. L. (1993) Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* **364**, 70-73.
- Tompa P., Buzder-Lantos P., Tantos A., Farkas A., Szilagyi A., Banoczi Z., Hudecz F. and Friedrich P. (2004) On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem* **279**, 20775-20785.
- Torgner I. and Kvamme E. (1990) Synthesis of transmitter glutamate and the glial-neuron interrelationship. *Mol Chem Neuropathol* **12**, 11-17.
- Toth T., Nemeti M. and Papp Z. (1996) [Pre-symptomatic diagnosis of Huntington disease by polymerase chain reaction]. *Orv Hetil* **137**, 451-454.
- Tranebjaerg L., Schwartz C., Eriksen H., Andreasson S., Ponjavic V., Dahl A., Stevenson R. E., May M., Arena F., Barker D. and et al. (1995) A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet* **32**, 257-263.
- Tretter L. and Adam-Vizi V. (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci* **24**, 7771-7778.
- Trotti D., Rossi D., Gjesdal O., Levy L. M., Racagni G., Danbolt N. C. and Volterra A. (1996) Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem* **271**, 5976-5979.
- Trotti D., Aoki M., Pasinelli P., Berger U. V., Danbolt N. C., Brown R. H., Jr. and Hediger M. A. (2001) Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J Biol Chem* **276**, 576-582.
- Trushina E., Dyer R. B., Badger J. D., 2nd, Ure D., Eide L., Tran D. D., Vrieze B. T., Legendre-Guillemin V., McPherson P. S., Mandavilli B. S., Van Houten B., Zeitlin S., McNiven M., Aebersold R., Hayden M., Parisi J. E., Seeberg E., Dragatsis I., Doyle K., Bender A., Chacko C. and McMurray C. T. (2004) Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **24**, 8195-8209.
- Tsai G., Forloni G., Robinson M. B., Stauch B. L. and Coyle J. T. (1988) Calcium-dependent evoked release of N-[³H]acetylcholinylglutamate from the optic pathway. *J Neurochem* **51**, 1956-1959.
- Tsien J. Z., Huerta P. T. and Tonegawa S. (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**, 1327-1338.

BIBLIOGRAPHIE

- Tsujino S., Miyamoto T. and Kanazawa N. (2001) [Molecular genetic studies of mitochondrial ornithine transporter deficiency (HHH syndrome)]. *Nippon Rinsho* **59**, 2278-2284.
- Tsuzuki K., Iino M. and Ozawa S. (1989) Ion channels activated by quinolinic acid in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* **481**, 258-264.
- Tukamoto T., Nukina N., Ide K. and Kanazawa I. (1997) Huntington's disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. *Brain Res Mol Brain Res* **51**, 8-14.
- Turmaine M., Raza A., Mahal A., Mangiarini L., Bates G. P. and Davies S. W. (2000) Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8093-8097.
- Turski L. and Turski W. A. (1993) Towards an understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders: energy metabolism and neuropathology. *Experientia* **49**, 1064-1072.
- Turski L., Bressler K., Rettig K. J., Loschmann P. A. and Wachtel H. (1991) Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* **349**, 414-418.
- Tyson R. L. and Sutherland G. R. (1998) Labeling of N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate in rat neocortex, hippocampus and cerebellum from [1-13C]glucose. *Neurosci Lett* **251**, 181-184.

U

- U M., Miyashita T., Ohtsuka Y., Okamura-Oho Y., Shikama Y. and Yamada M. (2001) Extended polyglutamine selectively interacts with caspase-8 and -10 in nuclear aggregates. *Cell Death Differ* **8**, 377-386.
- Uchida M., Shimatsu Y., Onoe K., Matsuyama N., Niki R., Ikeda J. E. and Imai H. (2001) Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res* **10**, 577-582.
- Urbanska E., Ikonomidou C., Sieklucka M. and Turski W. A. (1991) Aminooxyacetic acid produces excitotoxic lesions in the rat striatum. *Synapse* **9**, 129-135.
- Uziel G., Moroni I., Lamantea E., Fratta G. M., Ciceri E., Carrara F. and Zeviani M. (1997) Mitochondrial disease associated with the T8993G mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene: a clinical, biochemical, and molecular study in six families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **63**, 16-22.

V

- Vainio H., Mela L. and Chance B. (1970) Energy dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* **12**, 387-391.
- Valente E. M., Abou-Sleiman P. M., Caputo V., Muqit M. M., Harvey K., Gispert S., Ali Z., Del Turco D., Bentivoglio A. R., Healy D. G., Albanese A., Nussbaum R., Gonzalez-Maldonado R., Deller T., Salvi S., Cortelli P., Gilks W. P., Latchman D. S., Harvey R. J., Dallapiccola B., Auburger G. and Wood N. W. (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158-1160.
- Valera A. G., Diaz-Hernandez M., Hernandez F., Ortega Z. and Lucas J. J. (2005) The ubiquitin-proteasome system in Huntington's disease. *Neuroscientist* **11**, 583-594.
- van der Knaap M. S., Bakker H. D. and Valk J. (1998) MR imaging and proton spectroscopy in 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase deficiency. *AJNR Am J Neuroradiol* **19**, 378-382.
- van der Leij F. R., Huijckman N. C., Boomsma C., Kuipers J. R. and Bartelds B. (2000) Genomics of the human carnitine acyltransferase genes. *Mol Genet Metab* **71**, 139-153.
- Van Goethem G., Luoma P., Rantamaki M., Al Memar A., Kaakkola S., Hackman P., Krahe R., Lofgren A., Martin J. J., De Jonghe P., Suomalainen A., Udd B. and Van Broeckhoven C. (2004) POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement. *Neurology* **63**, 1251-1257.
- Van Raamsdonk J. M., Murphy Z., Slow E. J., Leavitt B. R. and Hayden M. R. (2005) Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* **14**, 3823-3835.
- Vanags D. M., Porn-Ares M. I., Coppola S., Burgess D. H. and Orrenius S. (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* **271**, 31075-31085.
- Vanderluit J. L., McPhail L. T., Fernandes K. J., Kobayashi N. R. and Tetzlaff W. (2003) In vivo application of mitochondrial pore inhibitors blocks the induction of apoptosis in axotomized neonatal facial motoneurons. *Cell Death Differ* **10**, 969-976.

BIBLIOGRAPHIE

- Vanhoutte P., Barnier J. V., Guibert B., Pages C., Besson M. J., Hipskind R. A. and Caboche J. (1999) Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol* **19**, 136-146.
- Varani K., Rigamonti D., Sipione S., Camurri A., Borea P. A., Cattabeni F., Abbracchio M. P. and Cattaneo E. (2001) Aberrant amplification of A(2A) receptor signaling in striatal cells expressing mutant huntingtin. *Faseb J* **15**, 1245-1247.
- Veenman L., Leschiner S., Spanier I., Weisinger G., Weizman A. and Gavish M. (2002) PK 11195 attenuates kainic acid-induced seizures and alterations in peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) protein components in the rat brain. *J Neurochem* **80**, 917-927.
- Veenstra-VanderWeele J., Kim S. J., Gonen D., Hanna G. L., Leventhal B. L. and Cook E. H., Jr. (2001) Genomic organization of the SLC1A1/EAAC1 gene and mutation screening in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry* **6**, 160-167.
- Verger A., Perdomo J. and Crossley M. (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* **4**, 137-142.
- Vis J. C., Verbeek M. M., de Waal R. M., ten Donkelaar H. J. and Kremer B. (2001) The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces differential expression patterns of apoptosis-related markers in rat striatum. *Neuropathol Appl Neurobiol* **27**, 68-76.
- Vis J. C., Schipper E., de Boer-van Huizen R. T., Verbeek M. M., de Waal R. M., Wesseling P., ten Donkelaar H. J. and Kremer B. (2005) Expression pattern of apoptosis-related markers in Huntington's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* **109**, 321-328.
- Visek W. J. (1992) Nitrogen-stimulated orotic acid synthesis and nucleotide imbalance. *Cancer Res* **52**, 2082s-2084s.
- Viswanath V., Wu Y., Boonplueang R., Chen S., Stevenson F. F., Yantiri F., Yang L., Beal M. F. and Andersen J. K. (2001) Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**, 9519-9528.
- Vollenweider F. X., Cuenod M. and Do K. Q. (1990) Effect of climbing fiber deprivation on release of endogenous aspartate, glutamate, and homocysteate in slices of rat cerebellar hemispheres and vermis. *J Neurochem* **54**, 1533-1540.
- von Horsten S., Schmitt I., Nguyen H. P., Holzmann C., Schmidt T., Walther T., Bader M., Pabst R., Kobbe P., Krotova J., Stiller D., Kask A., Vaarmann A., Rathke-Hartlieb S., Schulz J. B., Grasshoff U., Bauer I., Vieira-Saecker A. M., Paul M., Jones L., Lindenberg K. S., Landwehrmeyer B., Bauer A., Li X. J. and Riess O. (2003) Transgenic rat model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **12**, 617-624.
- Vonsattel J. P., Myers R. H., Stevens T. J., Ferrante R. J., Bird E. D. and Richardson E. P., Jr. (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **44**, 559-577.
- Votyakova T. V. and Reynolds I. J. (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* **79**, 266-277.
- Vredendaal P. J., van den Berg I. E., Malingre H. E., Stroobants A. K., Olde Weghuis D. E. and Berger R. (1996) Human short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: cloning and characterization of the coding sequence. *Biochem Biophys Res Commun* **223**, 718-723.

W

- Wade P. A., Pruss D. and Wolffe A. P. (1997) Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem Sci* **22**, 128-132.
- Waelter S., Scherzinger E., Hasenbank R., Nordhoff E., Lurz R., Goehler H., Gauss C., Sathasivam K., Bates G. P., Lehrach H. and Wanker E. E. (2001) The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. *Hum Mol Genet* **10**, 1807-1817.
- Wagey R., Krieger C. and Shaw C. A. (1997) Abnormal dephosphorylation effect on NMDA receptor regulation in ALS spinal cord. *Neurobiol Dis* **4**, 350-355.
- Wagey R., Hu J., Pelech S. L., Raymond L. A. and Krieger C. (2001) Modulation of NMDA-mediated excitotoxicity by protein kinase C. *J Neurochem* **78**, 715-726.
- Wahle S. and Stoffel W. (1996) Membrane topology of the high-affinity L-glutamate transporter (GLAST-1) of the central nervous system. *J Cell Biol* **135**, 1867-1877.
- Wakai M., Takahashi A. and Hashizume Y. (1993) A histometrical study on the globus pallidus in Huntington's disease. *J Neurol Sci* **119**, 18-27.

BIBLIOGRAPHIE

- Walker R. J., Woodruff G. N. and Kerkut G. A. (1971) The effect of ibotenic acid and muscimol on single neurons of the snail, *Helix aspersa*. *Comp Gen Pharmacol* **2**, 168-174.
- Wang G. H., Mitsui K., Kotliarova S., Yamashita A., Nagao Y., Tokuhira S., Iwatsubo T., Kanazawa I. and Nukina N. (1999) Caspase activation during apoptotic cell death induced by expanded polyglutamine in N2a cells. *Neuroreport* **10**, 2435-2438.
- Wang G. J. and Thayer S. A. (2002) NMDA-induced calcium loads recycle across the mitochondrial inner membrane of hippocampal neurons in culture. *J Neurophysiol* **87**, 740-749.
- Wang H., Yu S. W., Koh D. W., Lew J., Coombs C., Bowers W., Federoff H. J., Poirier G. G., Dawson T. M. and Dawson V. L. (2004) Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* **24**, 10963-10973.
- Wang K. K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* **23**, 20-26.
- Wang Y. J., Chen G. H., Hu X. Y., Lu Y. P., Zhou J. N. and Liu R. Y. (2005) The expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-alpha in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and its links with AD-related pathology. *Brain Res* **1031**, 101-108.
- Watake K., Hashimoto K., Kano M., Yamada K., Watanabe M., Inoue Y., Okuyama S., Sakagawa T., Ogawa S., Kawashima N., Hori S., Takimoto M., Wada K. and Tanaka K. (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* **10**, 976-988.
- Watkins J. C. (1972) Metabolic regulation in the release and action of excitatory and inhibitory amino acids in the central nervous system. *Biochem Soc Symp*, 33-47.
- Watkins J. C. and Evans R. H. (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **21**, 165-204.
- Watkins J. C. and Jane D. E. (2006) The glutamate story. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S100-108.
- Watkins J. C., Krosggaard-Larsen P. and Honore T. (1990) Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 25-33.
- Wechsler D. (1981) *Wechsler adult intelligence scale-revised*. The Psychological Corporation, New York.
- Weller M. and Paul S. M. (1993) 3-Nitropropionic acid is an indirect excitotoxin to cultured cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol* **248**, 223-228.
- Wellington C. L., Singaraja R., Ellerby L., Savill J., Roy S., Leavitt B., Cattaneo E., Hackam A., Sharp A., Thornberry N., Nicholson D. W., Bredesen D. E. and Hayden M. R. (2000) Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells. *J Biol Chem* **275**, 19831-19838.
- Wellington C. L., Ellerby L. M., Gutekunst C. A., Rogers D., Warby S., Graham R. K., Loubser O., van Raamsdonk J., Singaraja R., Yang Y. Z., Gafni J., Bredesen D., Hersch S. M., Leavitt B. R., Roy S., Nicholson D. W. and Hayden M. R. (2002) Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci* **22**, 7862-7872.
- Wellington C. L., Ellerby L. M., Hackam A. S., Margolis R. L., Trifiro M. A., Singaraja R., McCutcheon K., Salvesen G. S., Propp S. S., Bromm M., Rowland K. J., Zhang T., Rasper D., Roy S., Thornberry N., Pinsky L., Kakizuka A., Ross C. A., Nicholson D. W., Bredesen D. E. and Hayden M. R. (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* **273**, 9158-9167.
- Wendt A., Thompson V. F. and Goll D. E. (2004) Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol Chem* **385**, 465-472.
- Westbrook G. L., Mayer M. L., Nambodiri M. A. and Neale J. H. (1986) High concentrations of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) selectively activate NMDA receptors on mouse spinal cord neurons in cell culture. *J Neurosci* **6**, 3385-3392.
- Wheeler V. C., White J. K., Gutekunst C. A., Vrbancac V., Weaver M., Li X. J., Li S. H., Yi H., Vonsattel J. P., Gusella J. F., Hersch S., Auerbach W., Joyner A. L. and MacDonald M. E. (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**, 503-513.
- Whetsell W. O., Jr. and Schwarcz R. (1989) Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system. *Neurosci Lett* **97**, 271-275.
- White J. K., Auerbach W., Duyao M. P., Vonsattel J. P., Gusella J. F., Joyner A. L. and MacDonald M. E. (1997) Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* **17**, 404-410.
- Williamson L. C. and Neale J. H. (1988) Ultrastructural localization of N-acetylaspartylglutamate in synaptic vesicles of retinal neurons. *Brain Res* **456**, 375-381.

BIBLIOGRAPHIE

- Wingrove D. E. and Gunter T. E. (1986a) Kinetics of mitochondrial calcium transport. II. A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium. *J Biol Chem* **261**, 15166-15171.
- Wingrove D. E. and Gunter T. E. (1986b) Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria. *J Biol Chem* **261**, 15159-15165.
- Winterthun S., Ferrari G., He L., Taylor R. W., Zeviani M., Turnbull D. M., Engelsens B. A., Moen G. and Bindoff L. A. (2005) Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology* **64**, 1204-1208.
- Wojcik S. M., Rhee J. S., Herzog E., Sigler A., Jahn R., Takamori S., Brose N. and Rosenmund C. (2004) An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7158-7163.
- Wolf H. (1974) Studies on tryptophan metabolism in man. *Scand. J. Clin. Invest.* **136**, 1-186.
- Wolfensberger M., Amsler U., Cuenod M., Foster A. C., Whetsell W. O., Jr. and Schwarcz R. (1983) Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett* **41**, 247-252.
- Wolkowicz P. E., Michael L. H., Lewis R. M. and McMillin-Wood J. (1983) Sodium-calcium exchange in dog heart mitochondria: effects of ischemia and verapamil. *Am J Physiol* **244**, H644-651.
- Wong L. A., Mayer M. L., Jane D. E. and Watkins J. C. (1994) Willardiines differentiate agonist binding sites for kainate- versus AMPA-preferring glutamate receptors in DRG and hippocampal neurons. *J Neurosci* **14**, 3881-3897.
- Wood D. E. and Newcomb E. W. (1999) Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 8309-8315.
- Wright H. H., Still C. N. and Abramson R. K. (1981) Huntington's disease in black kindreds in South Carolina. *Arch Neurol* **38**, 412-414.
- Wroblewska B., Santi M. R. and Neale J. H. (1998) N-acetylaspartylglutamate activates cyclic AMP-coupled metabotropic glutamate receptors in cerebellar astrocytes. *Glia* **24**, 172-179.
- Wroblewska B., Wroblewski J. T., Pshenichkin S., Surin A., Sullivan S. E. and Neale J. H. (1997) N-acetylaspartylglutamate selectively activates mGluR3 receptors in transfected cells. *J Neurochem* **69**, 174-181.
- Wu Y., Dong M., Toepfer N. J., Fan Y., Xu M. and Zhang J. (2004) Role of endonuclease G in neuronal excitotoxicity in mice. *Neurosci Lett* **364**, 203-207.
- Wytenbach A., Swartz J., Kita H., Thykjaer T., Carmichael J., Bradley J., Brown R., Maxwell M., Schapira A., Orntoft T. F., Kato K. and Rubinsztein D. C. (2001) Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **10**, 1829-1845.

X

- Xu W., Liu Y., Wang S., McDonald T., Van Eyk J. E., Sidor A. and O'Rourke B. (2002) Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* **298**, 1029-1033.

Y

- Yakovlev A. G., Knoblach S. M., Fan L., Fox G. B., Goodnight R. and Faden A. I. (1997) Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* **17**, 7415-7424.
- Yamada S., Isojima Y., Yamatodani A. and Nagai K. (2003) Uncoupling protein 2 influences dopamine secretion in PC12h cells. *J Neurochem* **87**, 461-469.
- Yamada T., Akiyama H. and McGeer P. L. (1990) Complement-activated oligodendroglia: a new pathogenic entity identified by immunostaining with antibodies to human complement proteins C3d and C4d. *Neurosci Lett* **112**, 161-166.
- Yamamoto A., Lucas J. J. and Hen R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* **101**, 57-66.
- Yamamoto A., Cremona M. L. and Rothman J. E. (2006) Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J Cell Biol* **172**, 719-731.

BIBLIOGRAPHIE

- Yamashima T., Tonchev A. B., Tsukada T., Saido T. C., Imajoh-Ohmi S., Momoi T. and Kominami E. (2003) Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* **13**, 791-800.
- Yan S. D., Fu J., Soto C., Chen X., Zhu H., Al-Mohanna F., Collison K., Zhu A., Stern E., Saido T., Tohyama M., Ogawa S., Roher A. and Stern D. (1997) An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **389**, 689-695.
- Yang D. D., Kuan C. Y., Whitmarsh A. J., Rincon M., Zheng T. S., Davis R. J., Rakic P. and Flavell R. A. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**, 865-870.
- Yang L., Sugama S., Mischak R. P., Kiaei M., Bizat N., Brouillet E., Joh T. H. and Beal M. F. (2004) A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol Dis* **17**, 250-259.
- Yang S. Y., He X. Y. and Schulz H. (2005) 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease. *Febs J* **272**, 4874-4883.
- Yin K. J., Lee J. M., Chen S. D., Xu J. and Hsu C. Y. (2002) Amyloid-beta induces Smac release via AP-1/Bim activation in cerebral endothelial cells. *J Neurosci* **22**, 9764-9770.
- Yokoi M., Kobayashi K., Manabe T., Takahashi T., Sakaguchi I., Katsuura G., Shigemoto R., Ohishi H., Nomura S., Nakamura K., Nakao K., Katsuki M. and Nakanishi S. (1996) Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2. *Science* **273**, 645-647.
- Young A. B., Greenamyre J. T., Hollingsworth Z., Albin R., D'Amato C., Shoulson I. and Penney J. B. (1988a) NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* **241**, 981-983.
- Young A. B., Shoulson I., Penney J. B., Starosta-Rubinstein S., Gomez F., Travers H., Ramos-Arroyo M. A., Snodgrass S. R., Bonilla E., Moreno H. and et al. (1986) Huntington's disease in Venezuela: neurologic features and functional decline. *Neurology* **36**, 244-249.
- Young A. M., Crowder J. M. and Bradford H. F. (1988b) Potentiation by kainate of excitatory amino acid release in striatum: complementary in vivo and in vitro experiments. *J Neurochem* **50**, 337-345.
- Yu A. C., Drejer J., Hertz L. and Schousboe A. (1983) Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem* **41**, 1484-1487.
- Yu Z. X., Li S. H., Evans J., Pillarsetti A., Li H. and Li X. J. (2003) Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci* **23**, 2193-2202.

Z

- Zaczek R., Koller K., Cotter R., Heller D. and Coyle J. T. (1983) N-acetylaspartylglutamate: an endogenous peptide with high affinity for a brain "glutamate" receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1116-1119.
- Zatz M. and Starling A. (2005) Calpains and disease. *N Engl J Med* **352**, 2413-2423.
- Zeevalk G. D. and Nicklas W. J. (1989) Acute excitotoxicity in chick retina caused by the unusual amino acids BOAA and BMAA: effects of MK-801 and kynurenate. *Neurosci Lett* **102**, 284-290.
- Zeevalk G. D. and Nicklas W. J. (1990) Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 1285-1292.
- Zeevalk G. D., Derr-Yellin E. and Nicklas W. J. (1995) NMDA receptor involvement in toxicity to dopamine neurons in vitro caused by the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* **64**, 455-458.
- Zeitlin S., Liu J. P., Chapman D. L., Papaioannou V. E. and Efstratiadis A. (1995) Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nat Genet* **11**, 155-163.
- Zerangue N., Arriza J. L., Amara S. G. and Kavanaugh M. P. (1995) Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J Biol Chem* **270**, 6433-6435.
- Zeron M. M., Chen N., Moshaver A., Lee A. T., Wellington C. L., Hayden M. R. and Raymond L. A. (2001) Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. *Mol Cell Neurosci* **17**, 41-53.
- Zeron M. M., Hansson O., Chen N., Wellington C. L., Leavitt B. R., Brundin P., Hayden M. R. and Raymond L. A. (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* **33**, 849-860.

BIBLIOGRAPHIE

- Zeron M. M., Fernandes H. B., Krebs C., Shehadeh J., Wellington C. L., Leavitt B. R., Baimbridge K. G., Hayden M. R. and Raymond L. A. (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**, 469-479.
- Zhang X., Wu J., Lei Y., Fang L. and Willis W. D. (2005) Protein phosphatase modulates the phosphorylation of spinal cord NMDA receptors in rats following intradermal injection of capsaicin. *Brain Res Mol Brain Res* **138**, 264-272.
- Zhang Y., Ona V. O., Li M., Drozda M., Dubois-Dauphin M., Przedborski S., Ferrante R. J. and Friedlander R. M. (2003) Sequential activation of individual caspases, and of alterations in Bcl-2 proapoptotic signals in a mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* **87**, 1184-1192.
- Zhou H., Li S. H. and Li X. J. (2001) Chaperone suppression of cellular toxicity of huntingtin is independent of polyglutamine aggregation. *J Biol Chem* **276**, 48417-48424.
- Zhu S., Stavrovskaya I. G., Drozda M., Kim B. Y., Ona V., Li M., Sarang S., Liu A. S., Hartley D. M., Wu du C., Gullans S., Ferrante R. J., Przedborski S., Kristal B. S. and Friedlander R. M. (2002) Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature* **417**, 74-78.
- Ziegler M., Dubiel W., Pimenov A. M., Tikhonov Yu V., Toguzov R. T., Henke W. and Gerber G. (1989) Purine compounds in mitochondria: a quantitative evaluation. *Biomed Biochim Acta* **48**, 57-61.
- Zollinger M., Amsler U., Do K. Q., Streit P. and Cuenod M. (1988) Release of N-acetylaspartylglutamate on depolarization of rat brain slices. *J Neurochem* **51**, 1919-1923.
- Zorumski C. F., Thio L. L. and Clifford D. B. (1991) Effects of bromowillardiine and willardiine on non-N-methyl-D-aspartate receptors in postnatal rat hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* **40**, 45-51.
- Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A. and Wang X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413.
- Zuccato C., Tartari M., Crotti A., Goffredo D., Valenza M., Conti L., Cataudella T., Leavitt B. R., Hayden M. R., 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**, 76-83.
- Zuccato C., Ciammola A., Rigamonti D., Leavitt B. R., Goffredo D., Conti L., MacDonald M. E., Friedlander R. M., Silani V., Hayden M. R., Timmusk T., Sipione S. and Cattaneo E. (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* **293**, 493-498.

ABSTRACT

Mitochondrial defects and abnormal glutamatergic transmission (excitotoxicity) are the main mechanisms potentially involved in chronic neurodegenerative disorders, like Alzheimers' disease, Huntington's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis and acute neurological diseases, like ischemia. Huntington's disease is characterised by a striatal neurodegenerescence associated with a decrease in mitochondrial complex II activity. Mechanisms of cell death induced by the inhibition of the complex II are unknown *in vivo* and we have characterised them in rat model with toxic admistration of 3-nitropropionic acid (3-NP). Calpain is the major protease responsible for the neurodegenerescence in the striatum in parallel to an activation of caspases. Moreover, transgenic mouse models of Huntington's disease present hyperactivity of NMDA receptors. Mitochondrial defects could potentiate the toxicity of NMDA-R activation but the mechanisms of this potentiation are unknown *in vivo*.

The aim of the present study was to investigate the mechanisms underlying the potentiation of NMDA-R mediated neurodegeneration by chronic mitochondrial dysfunction. We determined how the toxicity of the NMDA-R agonist, quinolinate was amplified by chronic administration of 3-NP. Potentiation of cell death by the 3-NP occurs for inhibition of complex II higher than 35%. 3-NP alone produced striatal lesion for inhibition of complex II higher than 50%. Between 35 and 50%, cell death in the striatum is potentiated by a factor 10. This potentiation implies calcium deregulation seen by the cytosolic activation of calpain. The calcium deregulation is not consecutive from a hyperactivation of NMDA-R because striatal glucosis uptake induced by quinolinate is not modified by 3-NP. In complement, calcium entry in primary striatal cells induced by quinolinate is not increased by 3-NP although cytosolic calcium is increased, as seen by calcium imaging.

These results show that potentiation implies calcium deregulation, leading to calpain activation in absence of NMDA-R hypersensitivity. These *in vivo* results provide support for the view that mitochondrial defects and NMDA-R activation may have synergistic effects in neurodegenerative disorders, like Huntington's disease and that calcium homeostasis constitute a therapeutic target.

Key words : Huntington's disease – mitochondria – excitotoxicity – calcium - calpain