



HAL
open science

Facteurs cellulaires contrôlant l'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine

Erwann Rousseau

► **To cite this version:**

Erwann Rousseau. Facteurs cellulaires contrôlant l'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : 2007PA066375 . tel-00810962

HAL Id: tel-00810962

<https://theses.hal.science/tel-00810962>

Submitted on 10 Apr 2013

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.

*Ecole Doctorale
InterBio
&
UFR des Sciences de la Vie
Université Paris 6
7 quai Saint Bernard
75005 Paris*

*LMB MRC Hills Road
Cambridge UK
&
LGM-CNRS UMR8541
Ecole Normale Supérieure
46 rue d'Ulm
75230 Paris*

Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie Paris VI

Spécialité :
Biochimie et Biologie Cellulaire

Présentée par

Erwann ROUSSEAU

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Facteurs cellulaires contrôlant l'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine

Soutenue le 23 novembre 2007

Devant le jury composé de :

Mr le Professeur Philippe Denoulet

Président

Mr le Docteur Philippe Djian

Rapporteur

Mr le Docteur Olivier Coux

Rapporteur

Mr le Professeur Bertrand Friguet

Examineur

Mme le Docteur Anne Bertolotti

Directeur de thèse

*Ecole Doctorale
InterBio
&
UFR des Sciences de la Vie
Université Paris 6
7 quai Saint Bernard
75005 Paris*

*LMB MRC Hills Road
Cambridge UK
&
LGM-CNRS UMR8541
Ecole Normale Supérieure
46 rue d'Ulm
75230 Paris*

Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie Paris VI

Spécialité :
Biochimie et Biologie Cellulaire

Présentée par

Erwann ROUSSEAU

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Facteurs cellulaires contrôlant l'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine

Soutenue le 23 novembre 2007

Devant le jury composé de :

Mr le Professeur Philippe Denoulet

Président

Mr le Docteur Philippe Djian

Rapporteur

Mr le Docteur Olivier Coux

Rapporteur

Mr le Professeur Bertrand Friguet

Examineur

Mme le Docteur Anne Bertolotti

Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord je remercie Olivier Coux et Philippe Djian d'avoir accepté de lire et critiquer ma thèse ainsi que Philippe Denoulet et Bertrand Friguet d'avoir bien voulu assister et participer à mon jury de thèse.

Ensuite je tiens à te remercier Anne pour ton encadrement durant ces trois années de thèse et mon année de DEA. Ta motivation sans faille, ta disponibilité m'ont permis de mener à bien ce projet jusqu'au bout. Je tiens aussi à te remercier pour l'opportunité qui m'a été offerte de terminer ma thèse au LMB à Cambridge.

Bien sûr qu'aurait été cette thèse sans toutes les personnes que j'ai pu rencontrer dans les labos de Paris et Cambridge.

Je citerai donc pour commencer Benjamin 'Mister Levure'. Je tiens à te remercier pour ton aide, ton soutien dans les moments difficiles ainsi que nos quick lunch à l'ENS. Michel ensuite pour son accueil dans son équipe du stress, son écoute et ses conseils. Je n'oublie pas Gwenaëlle et Martino avec qui j'ai eu du plaisir à travailler.

Pour continuer je dirai merci à Vivienne pas seulement pour le chocolat mais aussi pour les bons moments que nous avons partagés au LGM. Les membres du labo de Valy : en premier lieu Valy pour tes judicieux conseils, Rachid pour ton accueil chaleureux, Diane pour ton soutien, Anne j'espère qu'on se refera des masterclass guitare par contre je ne te promets rien pour le marathon. En second lieu, Hélène, Vincent et Guillaume les voisins de la cave à xénope. Sans oublier Sophie pour le bidon d'azote, Gersende pour nos expériences de monitorat, Mitya 'May the force be with you' et tous les autres membres du LGM et LMB qui se reconnaîtront.

Enfin Brigitte et Martine pour leur formidable gestion durant ces 4 années.

In Cambridge, I want to thank particularly Rieko for her useful help in the "proteasome work". Hiro for all his advices and our often great overnight discussion in the lab or in front of a pizza during this last year. Eléna and Karine for their kindness. Aurélie for the french dinner.

Je tiens particulièrement à remercier mon camarade Wildriss pour toutes les soirées à la Défense à discuter manip, politiques sur des airs de na'essayé et toujours autour d'un bon carry.

Bien entendu, Solène et mes parents qui m'ont toujours soutenus dans les bons et moins bons moments de ma longue vie d'étudiant de la Réunion à Cambridge.

Enfin Valérie sans qui ces années n'auraient pas été aussi appréciables, je te remercie de m'avoir soutenu jusqu'au bout et d'avoir accepté de m'accompagner dans cette vie un peu folle.

Résumé

Les maladies neurodégénératives telles que les maladies de Huntington, de Parkinson et d'Alzheimer ont la caractéristique commune de présenter des agrégats de protéines spécifiques dans les neurones des patients atteints par ces pathologies. Le mécanisme par lequel ces structures se forment est encore inconnu. L'objectif de ce travail a consisté en l'étude du mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine. Nous avons découvert que l'environnement cellulaire joue un rôle critique dans la capacité à s'agréger des protéines à expansion de polyglutamine (Rousseau et al., 2004). Ce travail suggère l'existence de modulateurs de l'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine. En cherchant des modulateurs d'agrégation nous avons découvert que les sous unités chaperons du protéasome 19S, Rpt6 et Rpt4, augmentent l'agrégation de la protéine Huntingtine dans les cellules, alors que la réduction du niveau de Rpt6 par ARN interférence diminue la quantité de Huntingtine agrégée. Si la Huntingtine mutante est adressée au protéasome de manière ubiquitine indépendante, elle est très facilement dégradée. L'agrégation des protéines Huntingtine mutante n'est pas la conséquence d'une inhibition de l'activité protéolytique du protéasome mais fait suite à un découplage entre l'activité de dépliement médiée par le protéasome 19S et l'activité protéolytique du protéasome 20S. Ces travaux révèlent le rôle clef de l'environnement cellulaire et particulièrement du protéasome 19S dans le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine.

Mots clés : agrégation – polyglutamine – chaperon – protéasome – ubiquitine

Abstract

Aggregates deposition in neurons of patients is a generic feature of neurodegenerative diseases like Huntington's disease, Parkinson and Alzheimer's diseases. The mechanism of aggregates formation is unknown. The aim of this thesis is to study the mechanism of polyglutamine proteins aggregation. We have discovered that cellular environment plays a central role in the polyglutamine protein aggregation mechanism (Rousseau et al., 2004). This suggested that some factors modulate polyglutamine protein aggregation in cells. Looking for these factors, we found that two subunits of the 19S proteasome, Rpt6 and Rpt4 enhance the aggregation of the Huntingtin protein in cells. Down regulation of Rpt6 by siRNA decreases Huntingtin inclusion formation. When targeted to the proteasome by a ubiquitin independent pathway mutant Huntingtin is efficiently degraded. Aggregation of mutant Huntingtin protein is not a consequence of a proteasome proteolytic failure but is elicited when unfolding by the chaperone subunits of the 19S particle is uncoupled from proteolysis by the 20S proteasome. This work highlights the key role for cellular environment and particularly 19S proteasome in the control of polyglutamine protein aggregation.

Key words: aggregation – polyglutamine – chaperone – proteasome – ubiquitin

AAA : '*ATPase associated with various cellular activities*'
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
CAG : triplet de nucléotides codant pour la glutamine
DMEM : '*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*', milieu modifié de Dulbecco
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DUB : '*Deubiquinating enzyme*', enzyme de déubiquitinylation
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
ERAD : '*ER-Associated Degradation*', dégradation associée au réticulum endoplasmique
FBS : '*Fœtal Bovine Serum*', sérum de veau fœtal
FITC : Fluorescéine isothiocyanate
GST : Glutathione-S-Transferase
Hsp : '*Heat shock protein*', Protéine de choc thermique
Htt : Protéine Huntingtine
MTS : '*Mitochondrial targeting signal*', signal d'adressage vers les mitochondries
PAGE : '*Polyacrylamide gel electrophoresis*', gel d'électrophorèse en polyacrylamide
PBS : '*Phosphate Buffered Saline*', tampon salin phosphate
PMSF : Phénylmethanesulfonyl fluoride
polyQ : polyglutamines
Poly-ub : Chaîne de polyUb associée aux protéines
PrP : '*Prion Protein*', protéine Prion
RCC : '*Rpt containing complex*', complexe contenant une Rpt
RE : Réticulum Endoplasmique
SCA : '*Spinocerebellar ataxia*', ataxie spinocérébelleuse
SDS : '*Sodium Dodecyl Sulfate*', dodécyl sulfate de sodium
SP : '*Signal peptide*', peptide signal d'adressage au réticulum endoplasmique
Tris : Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
Ub : Ubiquitine
UPR : '*Unfolded Protein Response*'
UPS : '*Ubiquitin Proteasome System*', système ubiquitine-protéasome

Résumé	i
Abréviations	ii
Sommaire	iii
Introduction	1
1. Le repliement des protéines	1
1.1 Importance du repliement	1
1.2 Les mécanismes de contrôle qualité	2
1.2.1 Contrôle qualité cytosolique	2
1.2.2 Contrôle qualité au niveau du réticulum endoplasmique	3
Le mécanisme de l'ERAD	5
1.2.3 Le Protéasome	6
Le protéasome 20S	8
Le protéasome 19S	9
1.2.4 Dégradation des protéines par la voie ubiquitine/protéasome	12
1.2.5 Les autres voies de dégradation	15
1.3 Les corps d'inclusion ou agrégats protéiques	16
2. Les maladies causées par une accumulation de protéines mal repliées	18
2.1 Défaillance du système de contrôle qualité	18
2.2 Les maladies causées par des protéines à expansion de polyQ	21
La maladie de Huntington	22
3. Objectif et stratégie de la thèse	26
Résultats	27
<i>Publication 1</i>	27
L'adressage de protéines à expansion de polyglutamine dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries abolit leur agrégation.	
Résultats complémentaires	28
<i>Publication 2</i>	34
Les sous unités chaperons du protéasome Rpt6 et Rpt4 contrôlent le mauvais repliement des protéines à expansion de polyglutamine.	
Discussion	35
1. Influence de l'environnement cellulaire sur l'agrégation des protéines à expansion de polyQ	36
2. Les sous unités ATPase du protéasome 19S contrôlent le mauvais repliement des protéines à expansion de polyQ	37

Matériel et méthodes 42

Références Bibliographiques 46

Annexes

Introduction

1. Le repliement des protéines

1.1 Importance du repliement

Les protéines constituent la partie la plus importante de la masse sèche d'une cellule. Elles ne sont pas seulement "l'échafaudage" de la cellule mais sont à l'origine de toutes les réactions intra et extra-cellulaires. La nature, la diversité des protéines cellulaires (environ 100000 protéines pour un être humain) sont en rapport direct avec le nombre de signaux et d'activités cellulaires. La fonction d'une protéine dans la cellule et son activité seront dépendantes du repliement adopté par celle-ci. Seules les protéines correctement repliées auront une activité. Le mécanisme par lequel les protéines acquièrent leurs structures ou conformations natives n'est pas encore à l'heure actuelle entièrement résolu. Depuis qu'Anfinsen a décrit il y a 30 ans qu'une protéine pouvait acquérir sa conformation native spontanément *in vitro*, il est admis que le repliement d'une protéine se fait en fonction de sa composition en acides aminés, et en fonction des interactions non covalentes entre les résidus portés sur les chaînes latérales (Anfinsen, 1973). La séquence en acides aminés contenant en effet toute l'information nécessaire à l'acquisition de la structure tridimensionnelle.

Dans les années 60, Levinthal a calculé que le nombre de conformations possibles à adopter pour un polypeptide serait de l'ordre du nombre d'atomes dans l'univers. Le repliement d'une protéine n'est donc pas unique. Une protéine en cours de repliement n'adoptera pas toutes les conformations possibles mais seulement la structure de plus faible entropie.

In vivo, la concentration en protéines et macromolécules est de l'ordre de 300-400mg/ml. C'est dans cet environnement très encombré que les protéines doivent se replier. La découverte de protéines spécialisées, essentielles au repliement des protéines appelées les protéines chaperons, a modifié le concept du repliement spontané des protéines. En effet, les protéines chaperons sont exprimées de façon ubiquitaire et interviennent dans le mécanisme de repliement des protéines chez les eubactéries, les archéobactéries et cellules eucaryotes (Hendrick, 1993).

Il existe dans la cellule, des processus cellulaires qui contrôlent le repliement des protéines encore appelés, mécanismes de contrôle qualité du repliement des protéines.

1.2 Les mécanismes de contrôle qualité

Au niveau cellulaire, des voies de contrôle qualité interviennent dans les compartiments cellulaires où sont fabriqués des protéines.

1.2.1 Contrôle qualité cytosolique

Le contrôle qualité du repliement des protéines dans le cytosol est étroitement lié aux protéines chaperons. Les protéines chaperons vont prendre en charge les protéines en cours de traduction dès la sortie du ribosome. Elles reconnaissent des régions hydrophobes ou exposées au solvant sur les protéines en cours de synthèse et préviennent ainsi des interactions aspécifiques avec d'autres protéines et la formation d'agrégats irréversibles que les protéines néo-synthétisées pourraient réaliser (Hartl, 1996).

Différentes familles de protéines chaperons se trouvent dans le cytosol : les familles de protéines de choc thermique (Hsp : *Heat shock protein*) Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 et les petites Hsps. Les protéines chaperons ont été identifiées au départ en condition de stress thermique. Dans ces conditions elles sont produites en plus grande quantité afin de réparer les protéines dénaturées par la chaleur (Pelham, 1986). Les chaperons interagissent avec les protéines mal repliées et tentent de les replier correctement. Si les protéines ne peuvent pas être repliées correctement, elles sont adressées aux voies de dégradation protéolytiques et dégradées.

Les plus connues des protéines chaperons cytosoliques sont les familles Hsp70 et Hsp60. Ces protéines présentent des différences au niveau structural. Hsp70 est active sous une forme monomérique et assiste le repliement des protéines en interagissant avec les séquences hydrophobes des protéines dépliées. Hsp60 (famille des chaperonines) est active sous une forme oligomérique en doubles anneaux avec une cavité interne où se logent les protéines en cours de repliement.

Les protéines chaperons du cytosol sont présentes en conditions basales. Certaines de ces protéines sont inductibles en condition de stress et ainsi augmente la capacité des cellules à réparer les protéines endommagées.

1.2.2 Contrôle qualité au niveau du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est le compartiment cellulaire où les protéines adressées aux voies sécrétoires acquièrent leurs conformations et subissent des modifications post-traductionnelles, telles que des N-glycosylations et formations de ponts disulfures essentielles à l'acquisition d'une structure native correcte.

La concentration en protéines au niveau du réticulum endoplasmique (RE) est d'environ 100mg/ml et le nombre de protéines synthétisées dans des cellules sécrétrices hépatocytaires a été évalué à 13 millions de protéines par minute.

Pour réaliser dans un environnement aussi encombré un événement thermodynamiquement défavorable tel que le repliement des protéines, la cellule utilise une grande partie de son énergie. Il existe, comme au niveau du cytosol, une série de contrôles permettant aux protéines de se replier correctement. Ces mécanismes de contrôle qualité impliquent les protéines chaperons du réticulum endoplasmique (RE).

En condition normale

Une protéine en cours de repliement qui arrive dans la lumière du RE est prise en charge par la protéine BIP (Grp78) qui la maintient soluble et empêche qu'elle ressorte du RE. BIP est une des protéines chaperons les plus abondantes dans la lumière du Réticulum. Cette protéine fait partie de la famille des protéines de choc thermique Hsp70 (Munro and Pelham, 1986). Elle contient en N-terminal un peptide d'adressage (SP), qui est clivé une fois que BIP en cours de synthèse est entrée dans le RE et en C-terminal, une séquence de rétention KDEL qui lui confère sa localisation dans le RE (Munro and Pelham, 1987).

En condition non optimale

En cas de carence nutritive, stress chimique ou d'élévation de la température, les protéines ont tendance à se replier de manière incorrecte dans le RE. Cet événement déclenche dans ce compartiment un mécanisme de réponse aux protéines mal repliées ou UPR (*Unfolded Protein Response*). La réponse aux protéines mal repliées se traduit par une diminution de la synthèse des protéines dans le RE et une dissociation de BIP qui était associée aux protéines IRE-1, PERK et ATF6 en condition basale (Bertolotti et al., 2000). ATF6 transite alors par la voie sécrétoire et est clivée dans le cis-Golgi. Le fragment N-terminal ATF6 résultant est un facteur

de transcription au niveau du noyau qui s'associe avec ATF4 et XBP1. Il y a alors induction de la transcription des gènes codant pour les chaperons du RE telles que BIP/Grp78, GRP94, calréticuline, calnexine et les gènes codant pour des protéines catalysant le repliement comme les protéines disulfides isomérases PDI, ERP57 et ERP72 et activation du mécanisme de dégradation associé au réticulum endoplasmique ou ERAD (Tsai et al., 2002) et (Figure 1).

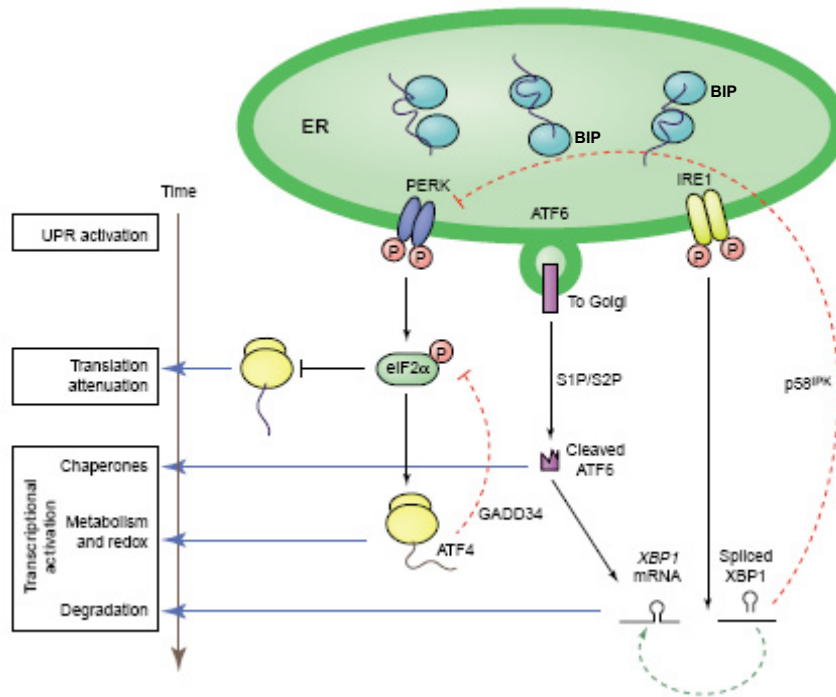


Figure 1 : Réponse au stress dans le réticulum endoplasmique. Dissociation de BIP et des protéines PERK, ATF6 et IRE1 suite à un stress dans le RE. Ces protéines induisent une cascade d'événements qui ont pour but de restaurer le repliement correct des protéines dans le RE (D'après (Rutkowski and Kaufman, 2004)).

Les protéines chaperons interviennent au niveau de ce compartiment en interagissant avec les protéines mal repliées et continuent d'interagir avec ces protéines tant qu'une conformation native correcte n'est pas adoptée.

Un mécanisme permet l'élimination des protéines mal repliées en condition basale ou en condition de stress où il est suractivé. Ce mécanisme est la dégradation associée au réticulum endoplasmique encore appelé ERAD.

Le mécanisme de dégradation associé au réticulum endoplasmique (ERAD)

L'ERAD permet l'élimination des protéines mal repliées ou non assemblées du réticulum endoplasmique. Les premières études sur des protéines du réticulum endoplasmique pouvant être dégradées proviennent d'expériences réalisées en cellules de mammifères. Ces expériences ont démontré que des récepteurs aux cellules T étaient retenus dans le réticulum puis et pour la première fois que des protéines du RE pouvaient être dégradées (Bonifacino et al., 1989).

Les protéines substrats de l'ERAD sont sélectionnées par un mécanisme de contrôle qualité dans la lumière du réticulum et sont ensuite dégradées par la voie ubiquitine-protéasome cytoplasmique. La plupart des protéines dégradées par le mécanisme de l'ERAD sont des protéines de la membrane du RE. L'ERAD nécessite un transport rétrograde ou translocation des protéines à dégrader du RE vers le cytosol. Ce transport rétrograde peut se faire par un pore protéique « translocon » et les protéines se retrouveront ainsi dans le cytoplasme où elles pourront être dégradées (Figure 2). D'autres études suggèrent que certaines protéines (les protéines de la chaîne lourde du CMH I) vont s'associer à des protéines de membrane du RE, telles que US11 (immunoévasine du cytomégalo virus humain) et Derlin-1 qui facilitent la sortie des protéines CMH I du RE vers le cytosol (Lilley and Ploegh, 2004).

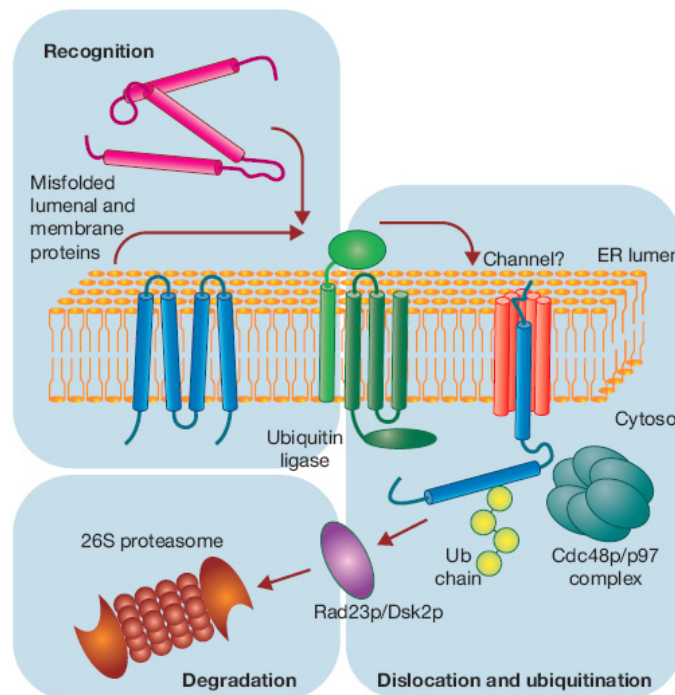


Figure 2 : Représentation du mécanisme de l'ERAD. Les protéines mal repliées ainsi que les protéines de membranes sont reconnues dans la lumière du RE par la machinerie de contrôle qualité.

Ces protéines sortent du RE par translocation, sont ubiquitinyllées et dégradées par le protéasome 26S. (D'après (Meusser et al., 2005))

Cependant, l'ERAD est aussi impliqué dans des pathologies. En effet, dans les cas de mucoviscidose, une délétion de la phénylalanine 508 de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Conductance Regulator*) entraîne une dégradation prématurée par le système de l'ERAD de la protéine CFTR_{ΔF508} mutante, provenant d'un défaut d'intégration de cette protéine dans la membrane cellulaire par rapport à la protéine sauvage. L'ERAD a aussi des implications dans la maladie de Parkinson. En effet, Parkin a été décrite comme étant une des protéines impliquées dans le mécanisme de l'ERAD (Takahashi et al., 2003). Cette protéine permet par son association avec CHIP (*carboxy terminus of Hsc70 interacting protein*) la dégradation de substrat tel que Pael-R un récepteur de membrane. Dans les cas de maladie de Parkinson héréditaire, la protéine Parkin est mutée. La dégradation via l'ERAD de Pael-R n'est plus efficace. Cette protéine s'accumule donc et forme des agrégats qui induisent une toxicité au niveau des neurones dopaminergiques (Takahashi et al., 2003).

De façon générale, L'ERAD est impliqué non seulement dans la dégradation des protéines mal repliées mais aussi dans la dégradation d'autres protéines des voies de biosynthèses.

Le mécanisme de contrôle qualité au niveau du réticulum endoplasmique prend en charge les protéines mal repliées dans le RE et tente de les replier correctement ou les adressent aux voies de dégradation.

1.2.3 Le Protéasome

Le protéasome fait partie intégrante des voies de contrôle qualité de la cellule puisqu'il permet la dégradation des protéines.

Rôle :

Dans les cellules eucaryotes, le protéasome est le site où se déroule la dégradation de la plupart des protéines cellulaires (Rock et al., 1994). Il est constitué d'environ 1% des protéines cellulaires totales (Tanaka et al., 1986). Le protéasome constitue la plus grande activité protéolytique cellulaire et est nécessaire à la viabilité des cellules. Présent dans le noyau et le cytoplasme des cellules eucaryotes, quelques particules de protéasome ont aussi été retrouvées associées à la membrane du réticulum endoplasmique ou au cytosquelette (Coux et al., 1996).

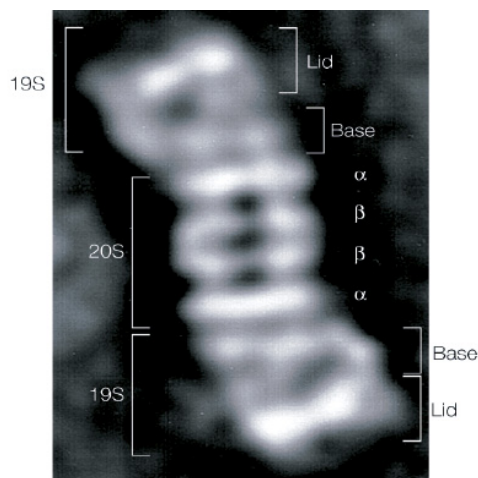
Le protéasome régule un nombre très important de voies dans la cellule en dégradant notamment les protéines impliquées dans le cycle cellulaire, l'apoptose, la transcription et le développement. Le protéasome a aussi été caractérisé pour être impliqué dans la réponse immunitaire puisqu'il génère la plupart des peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) (Goldberg and Rock, 1992).

Hautement conservé dans l'évolution des eucaryotes, des formes plus 'simples' de protéasome sont retrouvées chez les archéobactéries et eubactéries.

Structure :

Le protéasome est majoritairement sous sa forme 26S dans la cellule. C'est un complexe multiprotéique de 2500 kDa. Il est constitué de deux particules : la partie catalytique 20S (700 kDa) ou cœur catalytique portant l'activité peptidase et, la partie régulatrice 19S ou PA700 (700 kDa) qui a une activité de reconnaissance spécifique des protéines ubiquitinylées et de dépliement de ces protéines avant leur dégradation (Figure 3).

a)



b)

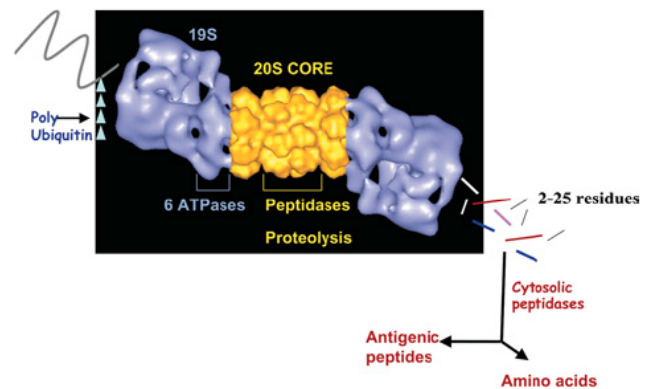


Figure 3 : Le protéasome 26S. Les protéines poly-Ub sont reconnues et dépliées par le protéasome 19S puis clivées dans le protéasome 20S par différentes peptidases. a) Cliché de microscopie électronique représentant le 26S protéasome de *Sacharomyces Cerevisiae* (Ciechanover, 2005) ; b) Représentation du protéasome 26S et de ses différentes activités (D'après (Goldberg, 2005))

Le protéasome 20S :

Les premières expériences de microscopie électronique sur du 20S protéasome purifié provenant de différents tissus ont révélé une structure cylindrique en anneaux empilés : un anneau α vers l'extérieur de chaque côté et deux anneaux β centraux formant une structure $\alpha \beta \beta \alpha$.

Les informations structurales à propos du 20S protéasome proviennent d'expériences réalisées chez les archéobactéries *Thermoplasma acidophilum* (Dahlmann et al., 1989). Ces analyses structurales ont révélé que chaque anneau est fait de sept sous unités de taille allant de 20 à 35 kDa soit au final $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$. Le protéasome 20S est la première sous unité à avoir été caractérisée, purifiée et résolue (Lowe et al., 1995). Sa masse moléculaire est comprise entre 700 et 750 kDa. Il possède un diamètre apparent de 113nm et une longueur de 148nm. Sa structure cylindrique comprend un canal central et trois chambres internes. Les deux chambres externes sont entourées des sous unités α et β . Le canal central où a lieu l'activité protéolytique est quant à lui au centre des anneaux β . L'entrée dans les chambres externes au niveau des anneaux α ne fait que 13 nm soit la largeur d'une hélice α . Ainsi, une protéine entièrement repliée ne pourra pas y pénétrer. Il est donc nécessaire que les protéines soient dépliées avant leur entrée dans la chambre externe du protéasome ce que réalise vraisemblablement la particule 19S du protéasome.

Des études récentes de la structure quaternaire du protéasome 20S eucaryote indiquent qu'il est très similaire au protéasome des archéobactéries.

Chez les eucaryotes supérieurs, la composition du protéasome 20S est sujette à une régulation très précise : elle peut varier d'une espèce à l'autre et même au sein d'une même espèce. Chez la souris par exemple, la composition en sous unités du 20S varie entre le foie et les muscles. Chez la levure le rat et l'homme, les séquences des quatorze sous unités du 20S sont connues et treize des quatorze sous unités chez la levure sont essentielles à la viabilité cellulaire.

La majorité des protéines dégradées dans le protéasome 20S suivent la voie ubiquitine/protéasome mais des protéines peuvent être également dégradées par le protéasome 20S en l'absence d'ubiquitine.

La cavité du protéasome 20S est généralement fermée. Son ouverture est induite du fait de son association de manière ATP dépendante ou indépendante aux particules régulatrices dont la plus importante est le protéasome 19S. L'association du protéasome 20S et 19S constitue le protéasome 26S.

Le protéasome 19S :

Le protéasome 19S est un complexe de 20 sous unités qui s'associe à la sous unité 20S de manière ATP dépendante, d'un seul côté ou des deux côtés du 20S protéasome. Il est constitué d'une base et d'une partie externe beaucoup plus flexible "couvercle" qui participe à la reconnaissance des protéines poly-ubiquitinylées (Figure 4). La structure du 19S n'a pas encore été résolue à l'heure actuelle mais son architecture générale a été établie par des expériences de biochimie et d'imagerie (Ferrell et al., 2000).

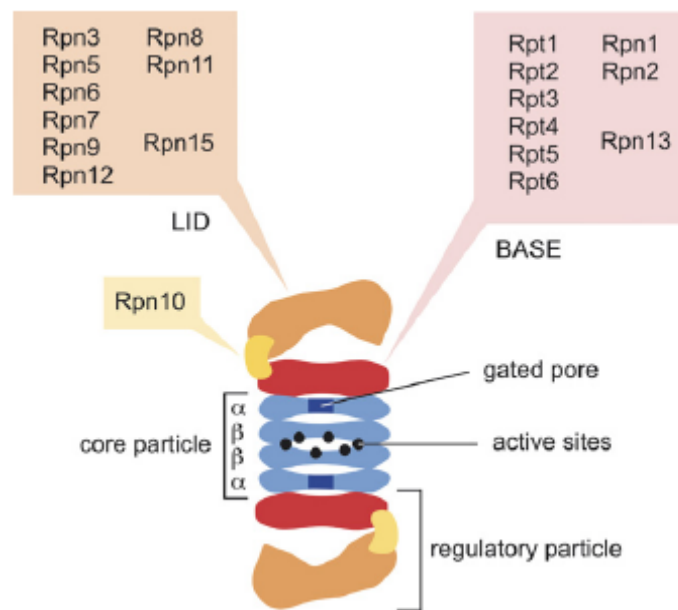


Figure 4 : Représentation du protéasome 19S. (D'après (Hanna and Finley, 2007)).

Le couvercle du protéasome 19S est constitué de sous unités non ATPase (Rpn) et est responsable de la reconnaissance des protéines polyubiquitinylées. La base du 19S protéasome porte l'activité ATPasique, déplie les protéines et permet leur translocation dans le protéasome 20S. Elle est constituée de 6 sous unités ATPase nommées Rpt1 à Rpt6 chez la levure et de 3 sous unités non ATPase Rpn1, Rpn2 et Rpn13 (Figure 4). Ces protéines forment un anneau hexamérique qui s'installent parallèlement à l'axe des sous unités α du 20S protéasome (Smith et al., 2006).

Les Rpt :

Les sous unités de la base du 19S, Rpt chez la levure, sont très conservées au cours de l'évolution avec une identité de séquence allant de 66 à 76% entre les gènes de levure et les homologues humains (Glickman, 1998).

Les Rpt (Rpt1 à Rpt6) présentent des motifs spécifiques de liaisons à l'ATP ou motif Walker (A et B). La substitution de la lysine dans le domaine Walker A par un autre acide aminé conduit à une inhibition de l'activité ATPasique de la protéine, c'est-à-dire une complète ou partielle inhibition de la liaison à l'ATP et de son hydrolyse (Sung, 1988). Les protéines Rpt font partie de la famille des AAA ATPases (ATPase associée à plusieurs activités cellulaires) et sont des protéines chaperons impliquées dans le repliement des protéines (Braun et al., 1999; Martin, 2002).

Une de ses Rpt, la protéine Rpt6 ou SUG1, a été identifiée au départ comme un activateur transcriptionnel, interagissant avec TBP1 (Swaffield et al., 1992; vom Baur et al., 1996). Cette protéine a notamment été décrite comme faisant partie du complexe de transcription de l'ARN polymérase II (Johnston, 1995). Cette activité transcriptionnelle se fait indépendamment du reste du protéasome 26S (Makino Y, 1999). Des travaux chez la levure suggèrent que Rpt6 n'est pas seulement impliquée dans la transcription mais que cette protéine est associée au reste du complexe protéasome 26S de levure (Rubin DM, 1996).

Actuellement il est donc admis que Rpt6 fait partie intégrante de la sous unité basale du protéasome 19S et qu'elle est impliquée dans la dégradation des protéines par la voie ubiquitine/protéasome. Cette protéine joue aussi un rôle dans la transcription de certains gènes indépendamment du protéasome 20S (Sulahian et al., 2006).

Les archéobactéries ne possèdent pas de Rpt mais elles possèdent une protéine, PAN (*proteasome activating nucleotidase*) qui est très similaire aux ATPase du 19S et stimule sélectivement la dégradation des protéines par le protéasome 20S (Zwickl et al., 1999).

Les Rpn et la reconnaissance des chaînes de polyubiquitine :

La reconnaissance des protéines portant des chaînes de polyubiquitine se fait par l'intermédiaire de la sous-unité S5a (Rpn10) qui interagit avec l'ubiquitine par ces deux domaines de liaison à l'ubiquitine (*ubiquitin binding domain*). Une inactivation de Rpn10 chez les levures n'est pas létale (van Nocker et al., 1996). Ce qui indique que S5a n'est pas la seule protéine à reconnaître les protéines à poly-Ub au niveau du protéasome. Les autres récepteurs de l'ubiquitine au niveau du protéasome restent donc à identifier. Cela pourrait être notamment

les autres sous unités non ATPase du 19S puisque les fonctions des autres Rpn ne sont pas encore bien connues. S5a permet le passage des protéines poly-Ub du couvercle vers la base du protéasome 19S où le dépliement ATP dépendant et la translocation dans le 20S ont lieu.

En résumé, le 19S protéasome reconnaît les protéines à dégrader, catalyse leur dépliement et permet leur entrée dans le protéasome 20S. Par ailleurs, des expériences réalisées *in vitro* suggèrent que le protéasome 19S est capable d'induire le repliement de protéines dénaturées ou partiellement dénaturées telle que la citrate synthétase (Strickland et al., 2000). C'est pourquoi, on suggère actuellement que le protéasome 19S pourrait avoir une « activité chaperon ».

Il a été montré récemment que le protéasome 19S pouvait être sous forme libre et que le protéasome 26S était en équilibre dynamique dans la cellule. Le protéasome existerait sous deux formes 26S ou 20S et 19S dissociées au cours de la dégradation des protéines (Babbitt et al., 2005). Le rôle de ce protéasome 19S libre n'a pas encore été bien identifié mais des expériences récentes ont montré que ce complexe pouvait être impliqué dans la régulation de la transcription des protéases de HIV (Lassot et al., 2007).

En réponse aux besoins physiologiques, la cellule adapte la fonction du protéasome, soit en altérant la quantité de protéasome (Lecker et al., 2006), soit en altérant sa composition en sous-unités (Glickman and Raveh, 2005). En cas de stress protéotoxique, la cellule augmente la quantité de protéasome ceci pour dégrader les protéines mal repliées qui s'accumulent. Ainsi, la transcription des gènes codant pour les autres sous unités du protéasome 26S est augmentée par le biais de la sous unité Rpn4, un facteur de transcription dont la demie vie est multiplié par huit en condition de stress (Glickman and Raveh, 2005).

Les autres « sous unités » du 26S protéasome :

Les particules régulatrices alternatives 11S (PA28) et COP9

Il existe d'autres complexes protéiques qui s'associent au protéasome de manière ATP indépendante dans certaines conditions cellulaires. En l'occurrence, le complexe activateur ou protéasome 11S, également appelé PA28, REG (α et β). Ce complexe inductible par l'IFN γ fait partie d'un protéasome spécialisé, l'immunoprotéasome. Cette sous unité est très représentée en cas de réponse immunitaire adaptative car elle est impliquée dans la production d'antigènes peptidiques présentés par le CMH de classe I. Les immunoprotéasomes présentent des altérations dans leurs propriétés catalytiques. Les sous unités Y, X et Z du cœur catalytique sont remplacées par les sous unités Lmp2, Lmp7 et MECL-1 qui viennent renforcer l'activité

chymotrypsine-like et trypsine-like des immunoprotéasomes, leur permettant ainsi de produire certaines catégories de peptides ayant une haute affinité pour le CMH I (Goldberg et al., 2002).

Le complexe 11S protéasome ne participe pas à la reconnaissance des chaînes de polyubiquitine mais stimule la dégradation par le 20S protéasome, de petits peptides ne nécessitant a priori pas de dépliement au préalable.

Mais le rôle de PA28 n'est pas uniquement restreint à l'activation du protéasome 20S. Il a également été décrit que la sous unité PA28 participait au repliement des protéines médié par Hsp90 en association avec Hsc70 et Hsp40 (Minami et al., 2000).

Un autre complexe vient également s'associer au protéasome 20S pour faciliter la dégradation de certains peptides, il s'agit du complexe REG γ . Ce complexe est très similaire en terme de structure à REG α . Il a été suggéré que ce complexe est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire car il régule la dégradation de protéines du cycle cellulaire telle que la protéine p21 de manière ubiquitine indépendante (Li et al., 2007).

Enfin, il existe un complexe essentiel au développement chez les plantes et les animaux qui pourrait représenter une autre particule du protéasome alternative au 19S, il s'agit du complexe COP9 ou signalosome (Chamovitz and Glickman, 2002).

1.2.4 Dégradation des protéines par la voie ubiquitine/protéasome

La dégradation des protéines est un processus régulé et dynamique, orchestré par le système ubiquitine/protéasome (UPS). L'UPS fait intervenir le complexe protéasome et l'ubiquitine, une petite protéine de 9 kDa (76 résidus) ubiquitaire très conservée. Le rôle de l'ubiquitine dans la dégradation protéolytique a été démontré en grande partie par Ciechanover et ses collaborateurs dans les années 70. Ses travaux ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 2004 (Ciechanover, Hershko et Rose, 2004).

La dégradation des protéines par le système UPS se fait en deux étapes successives. Dans une première étape, les protéines sont ubiquitynylées (liaison de molécule d'ubiquitine de manière covalente au niveau des résidus Lysine des protéines) de manière ATP dépendante et catalysées par une série d'enzymes : E1 (*ubiquitin activating enzyme*) activant l'ubiquitine, qui est ensuite transférée à E2 (*ubiquitin conjugating enzyme*). Enfin, l'addition d'ubiquitine de E2 vers la protéine substrat se fait par l'intermédiaire de E3 (*ubiquitin ligase*) qui possède une spécificité vis-à-vis du substrat. Une nouvelle classe d'enzymes appelée E4 a été décrite comme étant impliquée dans l'élongation des chaînes de poly-ubiquitine préétablies (Koegl M, 1999). Ainsi,

les protéines dirigées vers la dégradation subissent plusieurs étapes d'ubiquitylation ou élongation de la chaîne d'ubiquitine.

Dans une seconde étape, la séquence de polyubiquitine est reconnue comme un signal de dégradation par le protéasome 26S. L'interaction de la chaîne poly-Ub avec les sous unités de reconnaissance de l'ubiquitine au niveau du 19S (notamment S5a) entraîne la protéine vers sa dégradation à travers le protéasome (Figure 5).

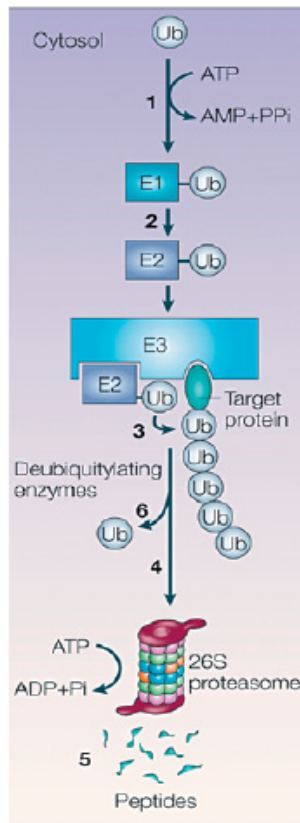


Figure 5 : Le système de dégradation Ubiquitine/Protéasome. E1, E2 et E3 permettent la fixation et l'élongation des chaînes de poly-Ub sur les protéines à dégrader. La protéine-polyUb est alors déubiquitinylée par des DUB (*Deubiquitinating enzyme*) après son assemblage avec le protéasome 19S et la protéine est dégradée dans le protéasome 20S (d'après (Ciechanover, 2005)).

La protéine est dégradée en petits peptides qui sont rapidement hydrolysés par les exopeptidases (carboxypeptidases et aminopeptidases) cellulaires car ceux-ci représentent une source d'acides aminés pour la cellule. Ces petits peptides peuvent servir également d'antigènes et être présentés par le CMH I chez les vertébrés supérieurs. La cellule recycle aussi les molécules d'ubiquitine qui se retrouvent dans le cytosol à la fin du cycle de dégradation sous forme libre et disponible pour un nouveau cycle de dégradation protéolytique.

Dans certains cas, une seule ubiquitine est ajoutée aux protéines (monoubiquitylation). La monoubiquitylation est impliquée dans la régulation des histones, de l'endocytose et dans le bourgeonnement des rétrovirus à partir de la membrane plasmique (Hicke, 2001).

La dégradation des protéines par l'UPS est un processus endogène normal. Quand le système des protéines chaperons est défaillant, les protéines présentent des conformations aberrantes, la dégradation des protéines par l'UPS est augmentée et ces protéines ubiquitinylées sont adressées au protéasome.

Recyclage et régulation de l'ubiquitinylation

Le processus d'ubiquitinylation dans la cellule est très régulé. Il existe des enzymes capables d'ajouter des chaînes de poly-ub aux protéines pour les cibler à la dégradation (E1-E3) de manière spécifique mais également des enzymes de déubiquitinylation (DUB) qui hydrolysent les chaînes de poly-Ub. Ces enzymes très actives au niveau cellulaire, reconstituent ainsi le pool d'ubiquitine intracellulaire. Actuellement, une soixantaine de ces protéines DUB ont été caractérisées. Trois d'entre elles sont associées au protéasome : les protéines UCH37, POH1 (Rpn11 chez la levure) et USP14 (Ubp6 chez la levure). Des travaux récents chez la levure suggèrent qu'au niveau du protéasome, une déubiquitinylation des protéines serait réalisée par Ubp6 et aurait lieu en même temps qu'une élongation des chaînes de poly-Ub par une ubiquitine ligase Hul5 (Bernat, 2006). Il y aurait deux mécanismes en opposition chez les levures. Selon les auteurs, ce serait un moyen pour la cellule de dégrader plus efficacement les substrats au niveau du protéasome.

Dégradation des protéines de manière ubiquitine indépendante

Il existe des protéines dégradées de manière ubiquitine indépendante dans la cellule notamment, les petites protéines du cycle cellulaire telle que la protéine p21 qui interagissent avec une autre particule alternative au protéasome 19S : la particule REG γ pour être dégradée (Chen et al., 2007). Les protéines du métabolisme cellulaire telles que l'ornithine décarboxylase (ODC) ou la tyrosine aminotransférase ont également été décrites comme étant dégradées de manière ubiquitine indépendante par le protéasome. De même, la protéine synucléine peut être dégradée *in vitro* de manière ubiquitine indépendante par du protéasome 20S purifié (Tofaris et al., 2001).

Le protéasome est donc capable de dégrader des protéines de manière ubiquitine indépendante. Mais la majeure partie des protéines sont dégradées par le système ubiquitine protéasome (UPS).

Inhibition du protéasome et déclin de son activité

La compréhension de l'importance de la voie UPS dans la dégradation des protéines a été possible grâce à l'utilisation notamment d'inhibiteurs spécifiques du protéasome 20S (Goldberg et al., 1995). Les premiers de ses composés utilisés sont des dérivés naturels tels que l'Epoxomycine et la Lactacystine. Ils s'associent de manière irréversible avec le 20S protéasome et abolissent ses activités protéolytiques. D'autres inhibiteurs ont été synthétisés, ce sont des dérivés aldéhydes de petits peptides dont le plus connu le MG132 (Carbobenzoxy-Leu-Leu-Leucinal), s'associe avec le protéasome 20S de manière réversible.

L'activité du protéasome a été suivie chez des rats vieillissants. Chez ces animaux, il a été remarqué une diminution de certaines activités protéolytiques du protéasome 20S sans diminution de la quantité de protéasome total (Conconi et al., 1996 ; Shibatani and Ward, 1996). En revanche, l'activité d'ubiquitinylation reste inchangée avec l'âge (Combaret et al., 2005). Une diminution de l'activité du protéasome et/ou une inhibition de son activité ont été proposées pour expliquer l'accumulation de protéines mal repliées avec l'âge et dans les pathologies neurodégénératives telle que la maladie de Parkinson (Zeng et al., 2005).

1.2.5 Les autres voies de dégradation

Même si le mécanisme de dégradation des protéines par le protéasome est majoritaire d'autres mécanismes ont été identifiés notamment, les mécanismes de dégradation par la voie lysosomale et les mécanismes d'autophagie (Beynon and Bond, 1986 ; Kim and Klionsky, 2000). Dans le mécanisme d'autophagie, on peut distinguer la macro- et micro-autophagie. Dans la macro-autophagie les protéines à dégrader sont internalisées dans des vésicules de type autophagosome qui fusionnent avec les lysosomes, le contenu des vésicules d'autophagosome est alors hydrolysé par les hydrolases lysosomales (Levine, 2004). La micro-autophagie est moins connue mais un type de micro-autophagie assisté par les protéines chaperons a été mis en évidence. Ce mécanisme d'autophagie est responsable de la dégradation des protéines cytosoliques portant un motif peptidique (KFERQ) reconnu par la protéine chaperon cytosolique Hsc70 (Massey et al., 2004). Une fois le complexe chaperon/substrat formé, il y a interaction avec la protéine LAMP-2a au niveau de la membrane lysosomale et la protéine substrat après dépliement est transloquée dans la lumière lysosomale où elle est dégradée (Salvador et al., 2000).

1.3 Les corps d'inclusion ou agrégats protéiques

L'élévation de la concentration d'une grande majorité de protéines induit généralement la formation d'accumulation structurée ou agrégats protéiques.

Définition d'un agrégat ou accumulation structurée de protéines mal repliées

D'un point de vue morphologique, les agrégats sont de larges structures visibles en microscopie électronique. D'un point de vue biochimique les agrégats sont définis par leur insolubilité. Aucune structure d'agrégats au niveau atomique n'a encore été déterminée mais des modèles de structures en « *cross β* » pour les fibres amyloïdes ont été proposés. Ces modèles de structures sont basés sur des résultats d'expériences de microscopie à force atomique, de diffraction de fibrilles et de RMN du solide réalisées sur des protéines *in vitro* (Nelson and Eisenberg, 2006).

A partir d'un monomère constitué d'une protéine mal repliée, différentes structures peuvent se former : des particules oligomériques globulaires de 5 à 10nm et variant de 3 à 50 monomères ; des protofibrilles sphériques qui sont de courtes fibrilles parfois sphériques ou annulaires de 5 à 25nm ; des microagrégats qui sont des accumulations de protéines agrégées. Les formes plus avancées d'agrégats comprennent les agrégats amorphes : des agrégats de protéines qui ne forment pas de fibres amyloïdes d'apparence granulaire et pourront être solubles ou insolubles aux détergents ; les fibres amyloïdes qui sont une forme structurée d'agrégats, stables, insolubles aux détergents et présentant une structure composée d'une répétition de feuillets β qui ont la propriété de fixer le Rouge Congo (colorant lipophile ayant une affinité pour les fibres amyloïdes) ; enfin les corps d'inclusion qui représentent une large accumulation d'agrégats amorphes ou de fibres amyloïdes (généralement SDS insoluble) visibles par microscopie optique (Figure 6).

Les agrégats formés dans le cadre des maladies impliquant des protéines à expansion de polyglutamines sont des corps d'inclusions insolubles dans les détergents. Ces structures déposées dans un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS) sont retenues dans le gel de concentration et ne rentrent pas dans le gel de résolution en raison de leur taille trop importante (Cooper et al., 1998). C'est cette propriété qui m'a permis de les visualiser et de les quantifier dans mes expériences.

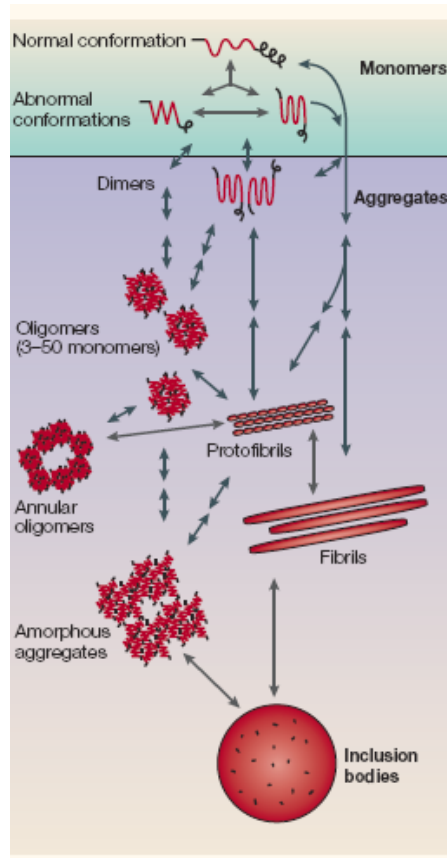


Figure 6 : Voies potentielles de formations des corps d'inclusions et des autres formes d'agrégats. Les différentes espèces moléculaires ont été classées selon leurs critères morphologiques, établis par microscopie électronique. Ainsi, on peut distinguer les monomères, les oligomères, les agrégats amorphes, les protofibrilles ou les formes de fibrilles spécifiques et enfin les corps d'inclusion (D'après (Ross and Poirier, 2005)).

Une classe particulière d'agrégats protéiques colocalise avec le centre organisateur des microtubules ou MTOC et s'accompagne d'une redistribution des filaments intermédiaires de vimentine autour du centriole. Ce type d'agrégats a été appelé *aggresome* (Johnston, 1998).

L'agrégation pourrait être vue comme un mécanisme de protection cellulaire destiné à diminuer la relative toxicité des protéines mal conformées en les regroupant dans un même endroit de la cellule sous forme d'agrégats. Des expériences contradictoires ont été publiées sur le sujet de la toxicité ou non des agrégats (Saudou et al., 1998; Yamamoto et al., 2000). Le problème étant de savoir quelle est la forme toxique pour les cellules. L'idée actuelle serait que ce sont les espèces monomériques de protéines mal repliées qui seraient les entités toxiques et non les agrégats multimériques (agrégats amorphes ou corps d'inclusion).

2. Les maladies causées par une accumulation de protéines mal repliées

Dans certaines pathologies telles que les maladies neurodégénératives, des agrégats de protéines polyubiquitinylées sont observables. L'hypothèse de leur accumulation due à une défaillance du contrôle qualité au cours du vieillissement a été émise (Friguet et al., 2000). L'augmentation de l'oxydation des protéines au cours du vieillissement et les dommages que cela induit au niveau de la cellule a aussi été proposée comme une des causes du nombre croissant de protéines mal repliées et agrégées chez les personnes âgées.

2.1 Défaillance du système de contrôle qualité

Le système de contrôle qualité suit et contrôle le repliement correct des protéines. Une défaillance de ce système pourrait être une des causes des maladies neurodégénératives (Figure 7).

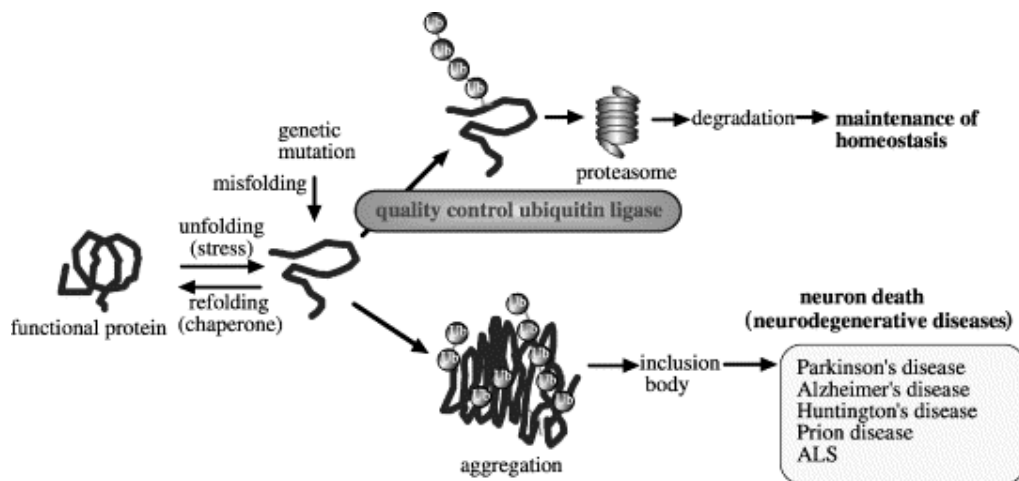


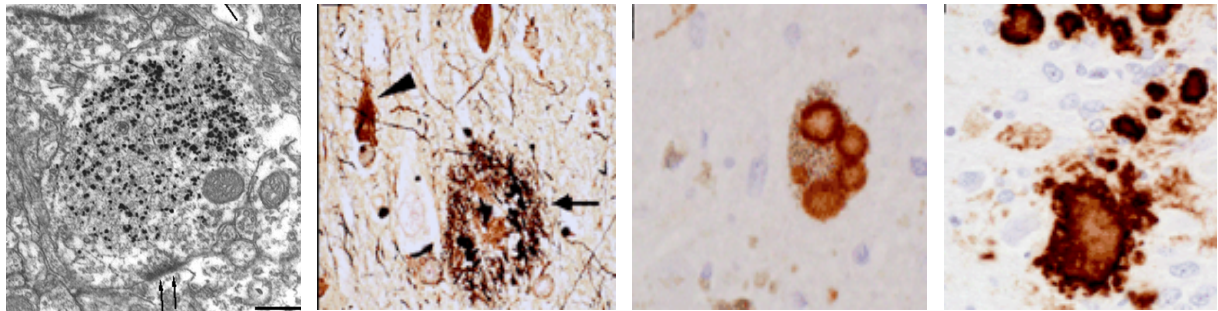
Figure 7 : Devenir d'un polypeptide en cours de repliement. Quand les mécanismes de contrôle qualité fonctionnent correctement les protéines mal repliées sont dégradées. Quand les mécanismes de contrôle qualité sont défaillants, les protéines ont tendance à former des agrégats et cela induit des pathologies telles que les maladies neurodégénératives (d'après (Murata et al., 2003)).

Accumulation de protéines à conformations aberrantes

Les maladies neurodégénératives ont comme caractéristique de présenter des inclusions protéiques dans les neurones des patients. Les protéines constituant ces inclusions ont été identifiées. Ainsi, les maladies à expansion de polyglutamines (polyQ) sont associées à la

présence d'agrégats de protéines à expansion de polyQ dans les neurones des patients (DiFiglia et al., 1997). Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent des structures spécifiques appelées « corps de Lewy » qui sont constituées de protéines synucléines agrégées (Spillantini et al., 1997). La maladie d'Alzheimer est caractérisée notamment par la présence de plaques amyloïdes extracellulaires formées à partir de peptides A β 42 agrégés (Cole and Frautschy, 2006) ou de protéine Tau intracellulaire agrégée. Enfin, les maladies à Prions présentent des accumulations de protéines Prion caractéristiques. Pour la maladie de Kreuzfeldt Jacob c'est la version mutante de la protéine Prion : PrP^{sc} qui s'accumule chez les patients atteints de ces maladies (Bertram, 2005).

Toutes ces maladies sont donc caractérisées par l'accumulation de protéines spécifiques de conformations aberrantes (Taylor et al., 2002) Figure 8.



a) *Maladie de Huntington* b) *Maladie d'Alzheimer* c) *Maladie de Parkinson* d) *Maladie à Prions*

Figure 8 : Clichés représentant les agrégats de protéines dans les pathologies neurodégénératives. a) Cliché de microscopie électronique représentant une cellule neuronale d'un patient atteint de la maladie de Huntington ; b) Coloration cellulaire représentant des fibres amyloïdes intracellulaires et des plaques séniles extracellulaires dans la maladie d'Alzheimer ; c) Cliché représentant une coloration topographique de Corps de Lewy dans un neurone de patient atteint de la maladie de Parkinson ; d) Cliché représentant des agrégats de protéines Prp^{sc} dans des neurones d'un patient atteint de la maladie de Kreuzfeldt Jacob (d'après (Taylor et al., 2002)).

Rôle de la voie Ubiquitine/Protéasome dans les pathologies neurodégénératives

Les agrégats étant ubiquitinylés il a été proposé que l'altération de la voie ubiquitine-protéasome serait une des causes des pathologies neurodégénératives et notamment de la maladie de Huntington. Les agrégats de patients atteints de la maladie de Huntington ont été analysés. Ces agrégats sont constitués de protéines Huntingtine mutante (protéine impliquée dans la chorée de Huntington) présentant une conformation aberrante, de protéines chaperons,

de sous unités du protéasome et d'ubiquitines (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997). L'inhibition de l'activité catalytique du protéasome 20S par des composés tels que le MG132 ou la Lactacystine dans des cellules exprimant la Huntingtine mutante augmente l'agrégation de la Huntingtine (Waelter et al., 2001). Des études ont également suggéré que le protéasome était inhibé dans le cas de la surexpression de Huntingtine dans des cellules de mammifères (Bence et al., 2001). L'inhibition du protéasome a été suivie dans ces expériences à l'aide d'une protéine reporter de l'activité du protéasome GFP^u, une protéine GFP à laquelle a été fusionné en C-terminal le groupement CL1 degron connu pour être chez les levures une séquence d'adressage au protéasome (Gilon et al., 1998). La surexpression de protéines Huntingtines mutantes formant des agrégats induit une augmentation de la fluorescence du reporter d'activité du protéasome GFP^u, donc une inhibition du protéasome (Bence et al., 2001).

Mais ces études sont confrontées à des expériences réalisées dans des modèles murins de la maladie de Huntington, où aucune inhibition du protéasome n'a été observée (Bett et al., 2006 ; Bowman et al., 2005). Des études *in vitro* avec du 20S et 26S purifiés ont mis en évidence que les protéines à polyQ ne peuvent pas être dégradées par le protéasome (Venkatraman et al., 2004). Ces expériences ont été réalisées *in vitro* avec des peptides de 10 à 30 polyQ et du protéasome 26S ou 20S purifié. Ces peptides ne sont pas dégradés par le protéasome 26S ou 20S et sont relargués dans le milieu de réaction. Cela laisse suggérer qu'une accumulation graduelle de polyQ pourrait avoir lieu au niveau cellulaire. Les protéines à séquence de polyQ pathologiques relarguées adopteraient alors un repliement incorrect et formeraient des agrégats au niveau des cellules. En revanche, les mêmes expériences réalisées avec un protéasome d'archéobactérie indiquent que les polyQ sont correctement dégradées par ce type de protéasome. Selon les auteurs, le protéasome d'archée serait beaucoup moins spécifique que celui des eucaryotes.

Le fait que les protéines à polyQ ne soient pas dégradées par le protéasome *in vitro* suggère qu'il manque un facteur dans la réaction pour que la dégradation des polyQ puisse se faire ou que le protéasome est réellement dans l'incapacité de dégrader les polyQ *in vivo*.

Une baisse de l'activité protéolytique du protéasome ainsi qu'une diminution de la transcription de ces sous unités ont été mis en évidence dans des rats vieillissants (Friguet et al., 2000). Ces résultats ont comme conséquence probable, une augmentation de l'altération des protéines par oxydation et glycation qui rendent les protéines plus toxiques pour la cellule (Carrard et al., 2002; Friguet et al., 2000). Les protéines mal repliées, n'étant plus dégradées, s'accumuleraient et auraient tendance à former des agrégats en plus grand nombre au cours du temps. Ceci est

particulièrement dommageable pour les cellules neuronales, cellules post-mitotiques qui sont beaucoup plus sensibles aux agrégats de protéines mal repliées car elles ne parviennent pas à les « diluer » par le biais des divisions cellulaires.

2.2 Les maladies causées par des protéines à expansion de polyglutamines

On compte parmi les maladies à expansion de polyQ dont fait partie la maladie de Huntington (MH), la maladie de Kennedy ou amyotrophie spino-bulbaire (SBMA), l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA) et 6 ataxies spinocérébelleuses dominantes (ADCA) de type 1, 2, 3, 6, 7, et 17 (Schols, 2004) (Figure 9).

Disease	Gene locus	Gene product	Normal CAG(n)	Expanded CAG(n)	Protein localization	Special features	Brain regions most affected
SBMA	Xq11-12	Androgen receptor	9-36	38-62	Nuclear and cytoplasmic		Anterior horn and bulbar neurons, dorsal root ganglia
HD	4p16.3	Huntingtin	6-34	36-121	Cytoplasmic	Intermediate alleles: 29-35	Striatum, cerebral cortex
SCA1	6p22-23	Ataxin-1	6-44	39-82	Nuclear in neurons	Normal alleles >21 repeats interrupted with 1-4 CAT units	Cerebellar Purkinje cells, dentate nucleus; brainstem
SCA2	12q23-24	Ataxin-2	15-31	36-63	Cytoplasmic	Normal alleles interrupted with 1-2 CAA units	Cerebellar Purkinje cells, brain stem, fronto-temporal lobes
SCA3	14q24.3-31	Ataxin-3	12-41	62-84	Cytoplasmic		Cerebellar dentate neurons, basal ganglia, brain stem, spinal cord
SCA6	19p13	CACNA1A	4-18	21-33	Cell membrane		Cerebellar Purkinje cells, dentate nucleus, inferior olive
SCA7	3p12-p21.1	Ataxin-7	4-35	37-306	Nuclear	Intermediate alleles: 28-35	Cerebellum, brain stem, macula, visual cortex
DRPLA	12q	Atrophin-1	6-36	49-84	Cytoplasmic		Cerebellum, cerebral cortex, basal ganglia, Luys body

Figure 9 : Caractéristiques moléculaires des maladies neurodégénératives impliquant des protéines à polyQ. (D'après (Zoghbi and Orr, 2000))

Les maladies causées par des expansions de polyglutamines sont toutes des maladies neurodégénératives progressives qui débutent à l'âge adulte, plus rarement chez l'enfant et sont à transmission autosomique dominante (sauf pour la SBMA où la transmission est récessive car liée au chromosome X). Ces maladies évoluent en 10 à 30 ans vers la mort des patients. Il n'existe pas à ce jour de traitement thérapeutique pour prévenir ou ralentir ces maladies. Le déclenchement des maladies à expansions de polyQ se fera de plus en plus tôt avec une sévérité accrue des symptômes (Ranen et al., 1995 ; Trottier et al., 1994).

2.2.1 La maladie de Huntington

Historique

La maladie de Huntington (MH) se déclare en moyenne chez des patients âgés de 35 à 42 ans (Quinn and Schrag, 1998). La prévalence de la maladie de Huntington en France est de 1/10000, soit environ 6000 personnes atteintes. Il s'agit de la plus fréquente des maladies neurodégénératives engendrées par une expansion de polyglutamines (Naarding et al., 2001). Le nom de Huntington vient de son découvreur George Huntington qui, en avril 1872, décrivit des patients atteints d'une maladie qu'il appela Chorée (danse en grec) (Huntington, 1872 ; Huntington, 2003). Cette maladie se caractérise principalement par des troubles moteurs, cognitifs et psychiatriques qui évoluent au cours du temps, conduisant les patients à une incapacité totale, à la démence et finalement à la mort 15 à 18 ans après le déclenchement des premiers symptômes.

Génétique

La maladie de Huntington est une maladie autosomique dominante monogénique. Le gène et la mutation responsables de la pathologie ont été découverts en 1993 (Group, 1993). Le gène de la maladie de Huntington (MH) fut appelé IT15 pour « *Important Transcript 15* ». Il est localisé sur le chromosome 4 et comprend 67 exons dont une région codante de 9435 nucléotides codant pour une protéine appelée « Huntingtine ». Le gène IT15 contient une expansion de CAG qui est polymorphe et instable. Cette répétition située dans l'exon 1 du gène est traduite en une répétition de glutamines dans la partie N-terminale de la protéine Huntingtine. La Huntingtine est une protéine de 348 kDa exprimée de façon ubiquitaire dans la cellule. La mutation qui apparaît chez les patients MH induit une expansion de polyglutamines (polyQ) dans la protéine Huntingtine supérieure à 36 glutamines. Cette protéine pathologique résultante aurait alors tendance à adopter une conformation aberrante et former des agrégats. La séquence de polyQ est suivie dans la partie N-terminale de la protéine d'une séquence de polyproline. Cette séquence en polyproline a récemment été décrite au laboratoire et par d'autres équipes comme étant un facteur modulant l'agrégation de la Huntingtine mutante (Bhattacharyya et al., 2006 ; Dehay, 2006 ; Duennwald et al., 2006).

Au niveau cellulaire et physiologique

Les patients atteints de cette maladie possèdent l'expansion de polyglutamines dès le début de leur vie mais la maladie ne se déclenche que tardivement. Ce qui implique que cette protéine reste bénigne pendant plusieurs années avant de devenir toxique avec l'âge des patients. Malgré de nombreuses études, la fonction de la Huntingtine normale ainsi que les mécanismes moléculaires par lesquels la Huntingtine mutante conduit à un dysfonctionnement et à la mort neuronale ne sont pas encore connus. Des hypothèses ont cependant été émises sur la fonction de la Huntingtine sauvage : La Huntingtine a des propriétés anti-apoptotiques dans différents modèles cellulaires alors que sa forme mutante n'en n'a pas (Cattaneo, 2001). La Huntingtine est enrichie dans le cerveau et est essentielle au développement embryonnaire et à la neurogénèse (White, 1997). Enfin, sa complète inactivation dans un modèle de souris KO pour huntingtine ($Hdh^{-/-}$) induit la mort embryonnaire avant 8,5 jours de développement (Duyao et al., 1995).

Les lésions neuropathologiques dans la MH entraînent le dysfonctionnement et la dégénérescence de certains neurones du cerveau en particulier les neurones du striatum, une zone du cerveau impliquée dans le contrôle du mouvement (Figure 10).

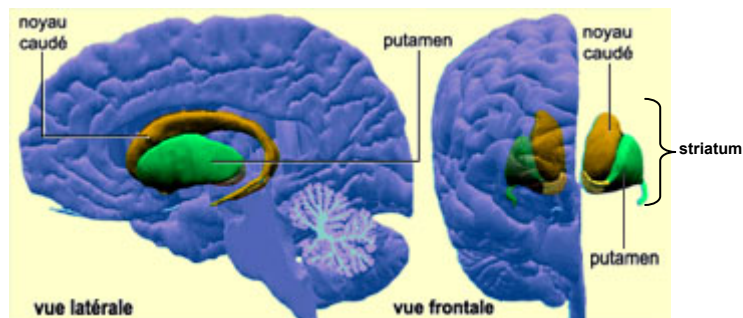


Figure 10 : Vue de la position centrale du Striatum constitué du noyau caudé et du putamen (d'après <http://www.lecerveau.mcgill.ca>).

Chez les patients et dans des modèles transgéniques murins MH une altération de l'activité des mitochondries a été mise en cause pour tenter d'expliquer la neurodégénération plus importante des neurones striataux par rapport aux autres neurones (Beal, 2000; Cui L, 2006).

Pour essayer d'éclaircir la fonction de la Huntingtine, des études sur les protéines interagissant avec la Huntingtine ont été menées. Mais le nombre toujours plus important de protéines interagissant avec celle-ci et la diversité de leur fonction ne permettent pas de tirer de

conclusions quant à la fonction de la Huntingtine dans la cellule (Cattaneo, 2001 ; Faber et al., 1998 ; Li and Li, 2004).

Chez les patients atteints de la maladie de Huntington, ce n'est pas la Huntingtine pleine longueur qui s'agrège mais sa partie N-terminale, contenant l'expansion de polyQ, issue de clivages protéolytiques impliquant différentes protéases, telles que les caspases ou la calpaïne (Gafni and Ellerby, 2002; Kim et al., 2001). Ce fragment N-terminal produit après des protéolyses successives correspond à l'exon 1 de la Huntingtine. L'exon1 de la Huntingtine exprimé chez des souris provoque les symptômes de la MH. Des modèles cellulaire et murin de la maladie de Huntington ont été établis avec le fragment N-terminal de la Huntingtine (Lunkes and Mandel, 1998 ; Yamamoto et al., 2000). Ce sont les propriétés du fragment N-terminal de la Huntingtine à former des agrégats qui m'ont permis d'étudier le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyQ au cours de ma thèse.

Les agrégats de Huntingtine

L'analyse d'agrégats de Huntingtine indique que ces agrégats contiennent le fragment N-terminal de la Huntingtine mutante associé à des protéines chaperons, des molécules d'ubiquitine et des facteurs de transcriptions (Maat-Schieman, 2007).

Au niveau structural, les agrégats de polyQ formés *in vitro* présentent une structure en fibres amyloïdes capable de lier le rouge Congo. En revanche, les agrégats de Huntingtine formés *in vivo* ne lient pas le rouge Congo et ne présentent pas de structures en fibres amyloïdes (Karpuj et al., 1999).

Le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyglutamines a été étudié *in vitro* à l'aide de peptides synthétiques. Il a été démontré qu'une chaîne de polyglutamines *in vitro* adopte une conformation en feuillet β antiparallèle appelée « zipper-polaire » (Perutz, 1994). Cette structure pourrait conduire à l'agrégation des protéines comportant des expansions de polyglutamines. Un autre travail réalisé avec des séquences de polyQ pathologiques de longueurs variant de 51 à 122 Q suggère que ces peptides ont tendance à former des agrégats de haut poids moléculaires proportionnellement au nombre de glutamines (Scherzinger, 1999). Ces données ont été confirmées chez la levure et dans des modèles de souris où l'agrégation de la Huntingtine est dépendante de la longueur en polyQ (Krobitsch and Lindquist, 2000 ; Li and Li, 1998). Cependant, l'agrégation des polyQ n'est pas seulement dépendante de la longueur en polyQ, elle est aussi dépendante de la concentration en protéines et du temps. L'agrégation de la Huntingtine *in vitro* suivrait un processus de nucléation, c'est-à-dire comme pour les fibres

amyloïdes A β une accumulation de plus en plus importante d'Huntingtine mal repliée à partir d'un monomère d'Huntingtine présentant une mauvaise conformation (Scherzinger, 1999).

Plus récemment, un travail réalisé avec des peptides synthétiques présentant une répétition proline-glycine dans une séquence de polyQ a permis de proposer un modèle de structure pour les chaînes de polyQ. Le modèle de structure serait une alternance de brin β et tournant β avec 9 ou 10 glutamines par brin β (Thakur and Wetzel, 2002). Ce modèle a ensuite été confirmé dans des cellules de mammifères et dans des neurones corticaux en culture primaire exprimant la Huntingtine mutante (Poirier et al., 2005).

Ces données et modèles *in vitro* sont des indications mais ne nous permettent pas de tirer des conclusions sur le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyQ *in vivo*.

Il a été évoqué que l'agrégation de la Huntingtine et des autres protéines à polyQ pourrait être la conséquence d'une inhibition du protéasome si bien qu'il a été ensuite évoqué que la Huntingtine non dégradée par le protéasome pourrait être dégradée par autophagie (Qin et al., 2003). Mais ces expériences se heurtent au fait que dans les cellules transfectées avec la huntingtine mutante et traitées avec des inhibiteurs d'autophagie, aucune accumulation significative de protéine Huntingtine mutante n'a été observée.

Les mécanismes de contrôle qualité représentés par les protéines chaperons et les systèmes de dégradation tel que le système ubiquitine-protéasome jouent un rôle crucial dans le contrôle des maladies neurodégénératives.

Au cours de ma thèse, je me suis attaché à étudier le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyQ et l'influence de l'environnement cellulaire sur ce mécanisme.

3. Objectifs et Stratégies de la thèse

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une perte progressive de certains neurones associés à l'accumulation de protéines de conformations aberrantes dans ces neurones. Le mécanisme à l'origine de l'agrégation de protéines mal repliées n'est pas encore connu à ce jour. Pour étudier ce mécanisme, nous avons utilisé au laboratoire le modèle de l'exon1 de la Huntingtine mutante et ainsi identifié des facteurs cellulaires contrôlant l'agrégation des protéines à expansion de polyQ.

Influence de l'environnement cellulaire sur l'agrégation de la Huntingtine mutante :

Une des caractéristiques communes des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington, les pathologies à Prion, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer est la présence d'agrégats de protéines mal conformées dans les neurones des patients atteints de ces maladies. Dans la maladie de Huntington, la partie N-terminale de la protéine Huntingtine mutante, avec une expansion de glutamines supérieure à 39 glutamines, forme des agrégats dans le cytosol et le noyau. Dans la maladie de Parkinson, les agrégats de synucléine se forment au niveau du cytosol. Dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Kreuzfeld Jacob, les protéines A β 42 et Prion sont générées dans le réticulum endoplasmique mais s'agrègent dans le milieu extracellulaire. L'agrégation des protéines pourrait être modulée en fonction du compartiment cellulaire où elles se trouvent. Nous avons ainsi décidé de regarder l'influence de l'environnement cellulaire sur l'agrégation de la Huntingtine mutante. Pour cela, le fragment N-terminal de la Huntingtine mutante qui présente une localisation cytosolique a été adressé dans deux compartiments cellulaires différents : le réticulum endoplasmique et les mitochondries.

Rôle des voies de dégradation dans le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyglutamines :

Le dépôt d'agrégats ubiquitinylés de protéines mal repliées à expansion de polyglutamines est une caractéristique de la maladie de Huntington et des pathologies neurodégénératives associées. Un blocage de la dégradation des protéines par le protéasome a été proposé comme étant une cause ou une conséquence de la formation des agrégats de protéines à polyQ. Le protéasome a des implications au niveau du mécanisme d'agrégation des protéines à polyQ de longueurs pathologiques. Nous avons en effet observé que le protéasome est capable de dégrader efficacement les protéines à polyQ et de contrôler leur agrégation.

Résultats

Publication 1 :

L'adressage de protéines à expansion de polyglutamines dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries abolit leur agrégation.

Rousseau E., Dehay B., Ben-Haïem L., Trottier Y., Morange M. and Bertolotti A. (2004)
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 101
(26): 9648-53.

Les pathologies neurodégénératives ont comme caractéristiques communes de présenter des agrégats protéiques dans les neurones des patients atteints de ces maladies. Dans les maladies d'Alzheimer et Prion. Le peptide A β 42 et la protéine Prion sont synthétisés dans le Réticulum endoplasmique mais ne s'agrègent que dans le milieu extracellulaire et le cytosol respectivement. Le fragment N-terminal de la Huntingtine forme des agrégats associés à des protéines chaperons dans le cytosol et le noyau. L'agrégation des protéines semble donc restreinte à des compartiments cellulaires précis. Nous nous sommes intéressés au rôle de l'environnement cellulaire dans le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyQ. Ainsi, le fragment N-terminal de la protéine Huntingtine contenant soit une expansion de 17 ou des expansions pathologiques de 73 ou 119 glutamines a été utilisé. Ces protéines à expansion de polyQ ont été adressées au réticulum endoplasmique et aux mitochondries. Nous avons ainsi découvert que la propension à l'agrégation des protéines à expansion de polyQ pathologiques est restreinte au compartiment nucléo-cytoplasmique.

Résultats complémentaires :

Comme il est décrit dans la Publication n°1 (Rousseau et al., 2004), des protéines à 73 glutamines ne s'agrègent pas quand elles sont adressées dans le réticulum endoplasmique (RE). De plus, il n'y a pas induction des protéines chaperons du RE Grp94 et Grp78 donc pas de stress au niveau de ce compartiment, quand Htt73 y est exprimée (figure 1B Rousseau, 2004 #79 et résultats non publiés).

1. Une modification des conditions physicochimiques dans le RE n'induit pas l'agrégation de la Huntingtine mutante dans ce compartiment :

L'environnement cellulaire du réticulum endoplasmique et des mitochondries est différent du cytosol. Des travaux réalisés *in vitro* ont proposé que dans des conditions physicochimiques particulières, une grande quantité de protéines seraient capables de former des fibres amyloïdes. L'acylphosphatase, une petite protéine, placée dans une solution de trifluoroéthanol 25% (pH 5,5 et 25°C) commence à former des fibres amyloïdes après 2 à 3 heures d'incubation (Chiti et al., 1999). Les conditions physicochimiques sont donc un point essentiel dans le mécanisme d'agrégation. Elles pourraient perturber l'agrégation de la Huntingtine dans le RE et les mitochondries. En comparant le réticulum endoplasmique et les mitochondries en terme de physicochimie, il s'avère que le pH à l'intérieur de ces deux compartiments est quasiment similaire au pH du cytosol proche de la neutralité enfin le RE et les mitochondries sont deux compartiments oxydants. Nous avons voulu tester si un changement brutal des conditions physicochimiques au niveau du RE, dans des cellules exprimant SP-Htt73KDEL, pouvait provoquer l'agrégation de cette protéine dans le RE. Ces cellules ont donc été traitées avec des doses croissantes de DTT et Thapsigargine. Le DTT, agent réducteur, perturbe la formation des ponts disulfures dans le RE. La Thapsigargine agit sur les pompes à Ca^{2+} du RE et provoque un relargage du Ca^{2+} de la lumière du RE vers le cytosol. Ces deux conditions qui perturbent de manière dramatique l'environnement dans la lumière du RE, ne restaurent pas l'agrégation de la Huntingtine mutante dans ce compartiment (Figure 11). Les conditions physicochimiques dans le RE ne sont pas limitantes pour l'agrégation des protéines à polyQ pathologiques dans ce compartiment.

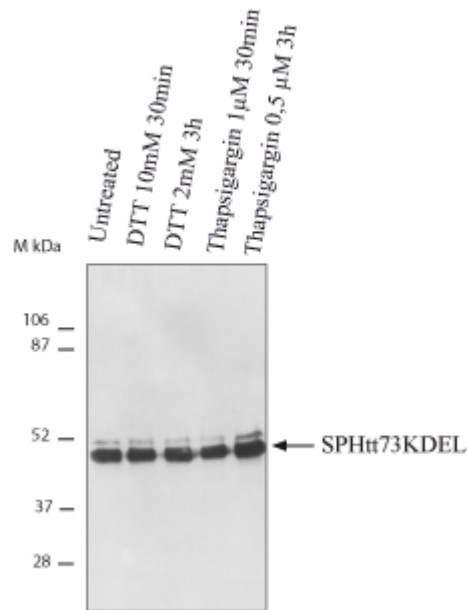


Figure 11 : Un changement des conditions physicochimiques au niveau du RE ne restaure pas l'agrégation de SPHtt73KDEL. Des doses croissantes de Thapsigargine ou de DTT ne provoquent pas l'agrégation de SPHtt73KDEL. Gel SDS/PAGE et analyse par Immunotransfert d'extraits totaux de protéines à partir de cellules 293T traitées avec des doses croissantes de Thapsigargine ou de DTT pendant 48H. Les protéines SP-Htt73KDEL sont révélées avec un anticorps anti-Huntingtine 2B4 (Dehay et al., 2007).

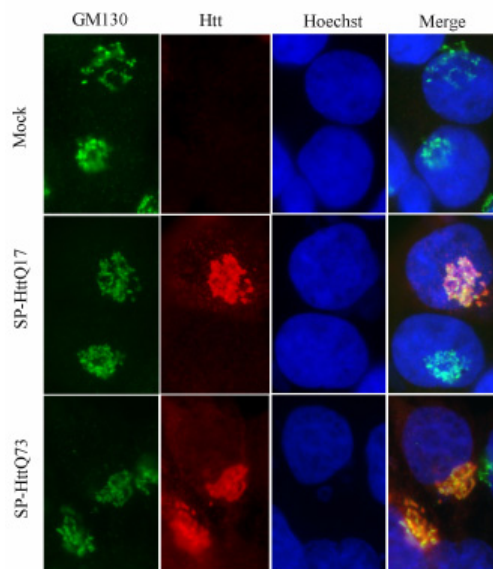
2. Les polyQ exprimées dans le RE n'induisent pas de stress dans ce compartiment

Il n'y a pas d'induction des protéines chaperons du RE quand des protéines à 73 ou 119 glutamines sont exprimées dans ce compartiment. Les protéines à polyQ ne semblent donc pas être reconnues par la machinerie de contrôle qualité du réticulum endoplasmique comme des protéines mal repliées. Une protéine au cours de son repliement est prise en charge par des protéines chaperons dans les conditions normales ou en cas de stress. La protéine mal conformée reste associée aux protéines chaperons tant qu'elle n'aura pas adopté une conformation correcte (section 1.2 de l'introduction). Sans pour autant induire un stress au niveau du RE, les protéines à polyQ pourraient être associées aux chaperons du RE ce qui maintiendrait les polyQ solubles dans ce compartiment.

Des protéines SPHtt17 et SPHtt73 ne portant pas de séquence de rétention dans le RE ont été transfectées dans les cellules 293T et leurs localisations cellulaires suivies au cours du temps.

15h post-transfection ces protéines ne se localisent plus dans le RE mais se localisent dans l'appareil de Golgi. Que ce soit pour SPHtt17 ou SPHtt73 une co-localisation avec la protéine du Golgi GM130 est observée (Figure 12a). 48h post-transfection les protéines SPHtt17 et SPHtt73 se retrouvent localisées dans des vésicules post-RE. En effet, aucun co-marquage avec la calnexine ou Grp78 (protéines chaperons du RE) n'est observé (Figure 12b et données non montrées). Les protéines SPHtt73, une fois ressorties du RE et se retrouvant en dehors de ce compartiment dans la voie sécrétoire pourraient adopter une conformation aberrante et former des agrégats. Une analyse par western-blot de ces protéines a été réalisée pour regarder l'état conformationnel de ces protéines. Les protéines SPHtt17 et SPHtt73 localisées dans des vésicules post-RE 48h post-transfection ne forment pas d'agrégats SDS insolubles visibles dans le haut du gel (Figure 12c Western Blot et Dot Blot comparer les protéines Htt au SPHtt). Ainsi la protéine Htt73 peut quitter le RE et une fois sortie de ce compartiment rester soluble.

a)



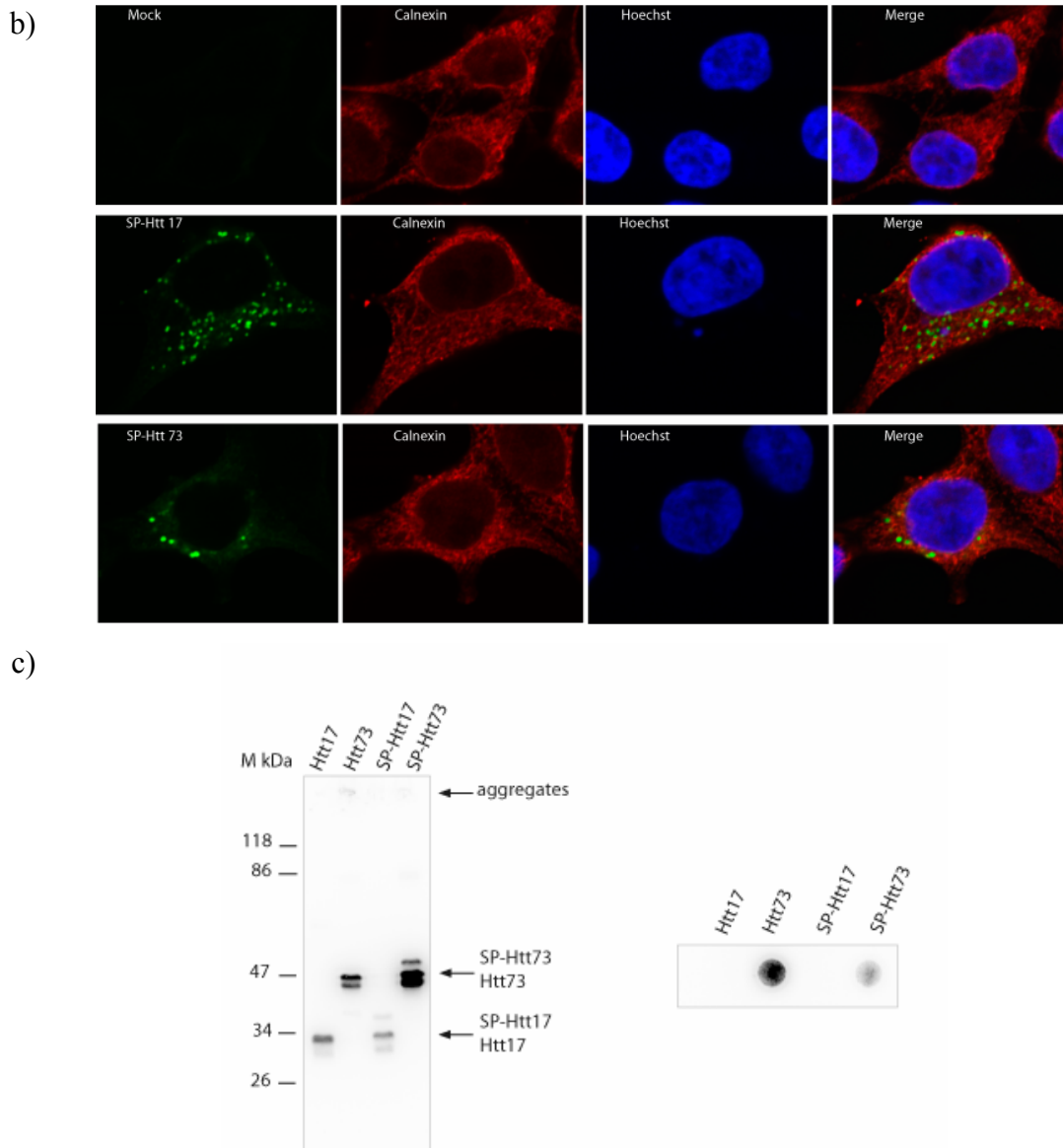


Figure 12 : Htt73 adressée à la voie de sécrétion présente une localisation Golgienne puis dans des vésicules post-RE et reste soluble. a) Détection par immunocytochimie de cellules 293T transfectées avec les constructions SP-Htt17 ou 73 et fixées 15h post-transfection. Les cellules exprimant SP-Htt ont été co-marquées avec les anticorps anti-GM130 (protéine du Golgi) et anti-Htt (2B4), les noyaux ont été marqués avec du Hoechst ; b) Détection par immunocytochimie de cellules 293T transfectées avec les mêmes constructions mais fixées 48h post-transfection ; c) Immunotransfert et Dot Blot réalisés à partir d'extraits totaux de cellules 293T 48h post-transfection avec les constructions indiquées et révélées avec un anti-Htt (2B4).

Ces résultats indiquent que les protéines Huntingtine mutantes restent solubles une fois sortie du RE. Ces protéines transitent dans le Golgi (compartiment complètement dépourvu en protéines chaperons), puis dans vésicules post-RE et restent entièrement solubles. Les protéines

à polyQ exprimées dans le RE sont entièrement solubles dans ce compartiment et ne sont pas associées à des protéines chaperons du RE.

Ces résultats indiquent qu'il existe un facteur pro-agrégant cytosolique qui provoque l'agrégation des protéines à polyQ dans le cytosol.

Nous avons montré dans ce premier travail que l'environnement cellulaire influence de manière dramatique l'agrégation des protéines à expansion de polyQ. Lors d'expériences complémentaires, j'ai éliminé la contribution des conditions physicochimiques du RE et ainsi montré qu'elles ne sont pas la cause de la solubilité des polyQ dans le RE. J'ai également montré que les polyQ n'étaient pas solubles dans le RE suite à des interactions avec des chaperons de ce compartiment. Deux hypothèses se dégagent de ces expériences : la première étant qu'il existerait au sein de la cellule des facteurs anti-agrégants dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries ; ces facteurs jouant un rôle de chaperons garderaient les protéines à expansion de polyQ solubles dans ces compartiments. La seconde hypothèse serait qu'il existe des facteurs pro-agrégants dans le cytosol et le noyau qui favorisent l'agrégation des protéines à polyQ dans ces compartiments. Au vu de mes expériences, il semble que cette dernière hypothèse soit la plus favorable.

L'idée d'un facteur pro-agrégant n'est pas nouvelle. En effet, Stanley Prusiner a proposé au cours de ses travaux sur la conversion de la protéine Prion sauvage PrP^c en protéine Prion pathologique PrP^{sc} l'hypothèse qu'une protéine X permettrait le passage de la conformation native non pathogène vers la conformation aberrante pathogène de la protéine Prion (Telling et al., 1995). Ce modèle n'a pas été invalidé mais a été au contraire renforcé par l'identification d'un site de liaison de la protéine X dans la partie C-terminale de PrP^c (Kaneko et al., 1997). Toutefois, la protéine X n'a pas encore été identifiée à ce jour.

Chez les levures, une protéine a été identifiée comme étant nécessaire à l'agrégation des polyQ. Cette protéine est une protéine chaperon de la famille Hsp100 : Hsp104. Une surexpression de Hsp104 comme d'autres protéines chaperons chez des levures exprimant des polyQ pathologiques induit une diminution de l'agrégation des polyQ. De façon plus étonnante une délétion complète de Hsp104 élimine totalement l'agrégation des polyQ chez la levure (Krobitsch and Lindquist, 2000). Le rôle de Hsp104 est apparemment de dissocier les agrégats qui ont été formés, permettant ainsi leur propagation.

Hsp104 fait partie de la famille des AAA atpases et présente dans sa structure deux sites AAA et un domaine M formant une structure en *coiled coil*.

Sur la base de cette structure, une comparaison avec les autres protéines du protéome ne donne curieusement qu'une seule famille de protéines possédant également ces motifs structuraux. Ces protéines sont cinq des six sous unités ATPases du protéasome 19S : Rpt1, Rpt2, Rpt3, Rpt4 et Rpt6. Ces cinq protéines possèdent un domaine AAA et une région en *coiled coil* de longueurs variables. La région en *coiled coil* est plus longue pour Rpt6, Rpt4 et Rpt3 ; les autres Rpt1 et Rpt2 ont une région en *coiled coil* plus courte et Rpt5 n'en possède pas.

Les ATPases du protéasome 19S ont donc été testées pour leur implication dans le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyQ. J'ai ainsi pu mettre en évidence que deux de ces ATPases, Rpt6 et Rpt4 contrôlent le repliement aberrant des protéines à expansion de polyQ. Ceci fait l'objet de la publication n° 2.

Publication 2 :

Les sous unités chaperons du protéasome Rpt6 et Rpt4 contrôlent le mauvais repliement des protéines à expansion de polyglutamine.

Rousseau, E. Kojima, R. Bertolotti, A.

Soumis

Le dépôt de protéines à expansion de polyQ mal repliées et ubiquitinylées sont des caractéristiques de pathologies impliquant les protéines à expansion de polyQ dont la maladie de Huntington. Un défaut dans l'activité protéolytique du protéasome a été proposé comme une cause ou une conséquence de l'accumulation des protéines à expansion de polyglutamine. Dans ce travail, nous montrons que la surexpression des sous unités chaperons du protéasome 19S, Rpt6 et Rpt4, augmente le mauvais repliement et l'agrégation de la protéine Huntingtine mutante alors que l'inactivation de Rpt6 par ARN interférence réduit le nombre d'inclusions dans les cellules. En interférant avec l'adressage des protéines à polyQ au protéasome, les protéines à polyQ s'accumulent sous forme soluble et non agrégée. Quand ces protéines sont adressées au protéasome par un mécanisme ubiquitine indépendant, elles sont dégradées efficacement. Ces résultats indiquent que dans les cellules, l'agrégation des protéines comportant des expansions de polyQ pathologiques est la conséquence d'un découplage entre l'activité chaperon du 19S et l'activité protéolytique du protéasome 20S.

Discussion

L'objectif de ma thèse était l'étude du mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyglutamines et l'identification des facteurs qui modulent cette agrégation. Dans un premier temps, mon travail s'est orienté vers le rôle de l'environnement cellulaire vis-à-vis du mauvais repliement des protéines et j'ai ainsi montré que l'environnement cellulaire module de manière dramatique l'agrégation des protéines à expansion de polyglutamines (Rousseau et al., 2004). En se basant sur les résultats obtenus dans la littérature et mes expériences complémentaires, mon travail s'est par la suite dirigé vers l'idée de facteurs pro-agrégeants nucléo-cytosoliques qui favoriseraient l'agrégation des protéines. J'ai ainsi identifié une série de protéines : les protéines chaperons Rpt6 et Rpt4 du protéasome 19S. Ces protéines contrôlent le mauvais repliement des protéines à expansion de polyQ.

1. Influence de l'environnement cellulaire sur l'agrégation des protéines à expansion de polyQ

Des protéines à expansion de 73 ou 119 polyglutamines pathologiques qui s'agrègent dans le cytosol et le noyau des cellules ne s'agrègent plus quand elles sont adressées dans le réticulum endoplasmique ou les mitochondries. L'environnement cellulaire module le repliement des protéines à expansion de polyQ. Il pourrait également influencer le repliement des protéines impliquées dans les autres pathologies neurodégénératives. Des expériences ont été publiées dans ce sens. En effet, des souris transgéniques exprimant le peptide A β 42 au niveau cytosolique présentent une neurodégénération dans les zones affectées. Si A β 42 est adressé au réticulum sous forme SP-A β 42, aucune neurodégénération n'est observée chez ces souris (LaFerla et al., 1995). Cela suggère que A β 42 doit être exprimé dans un compartiment précis pour induire de la neurotoxicité. Des travaux réalisés avec une protéine PrP délétée de son peptide d'adressage au réticulum (SP) montrent que cette protéine s'agrège dans le cytosol quand le protéasome est inhibé (Ma and Lindquist, 1999). L'agrégation de PrP serait médiée par sa localisation cellulaire. Ces données confirment que l'environnement cellulaire joue donc un rôle critique dans le mécanisme d'agrégation des protéines ayant une propension à l'agrégation.

Récemment, des données concernant le mécanisme d'agrégation des protéines à polyQ ont été publiées. Il a été montré que les séquences poly-Pro suivant la région polyQ sont des modulateurs de l'agrégation des protéines à expansion de polyQ (Bhattacharyya et al., 2006 ; Dehay, 2006 ; Duennwald et al., 2006). Les séquences d'adressages précédant la séquence en polyQ pourraient également influencer l'agrégation des protéines adressées dans les

mitochondries ou le RE. On sait par ailleurs que le peptide signal SP d'adressage au RE ou la séquence mt d'adressage aux mitochondries sont clivés pendant l'entrée des protéines dans leurs compartiments respectifs. De plus, si les protéines GST-SPHtt73KDEL et GST-mtHtt sont produites *in vitro*, un clivage de la GST induit une agrégation de ces protéines *in vitro* (données non présentées). Ainsi, ces peptides ne bloquent pas l'agrégation des protéines dans les compartiments.

Ces résultats mettent en avant l'hypothèse de facteurs qui contrôleraient dans les cellules l'agrégation des protéines à polyQ (Figure 13).

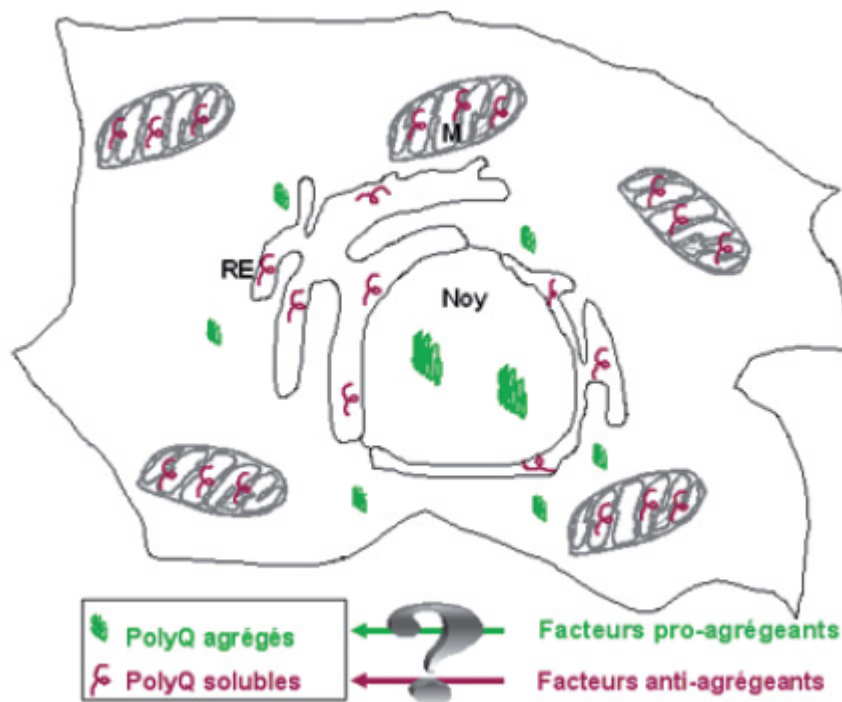


Figure 13 : Existence de facteurs modulant l'agrégation des protéines à expansion de polyglutamines pathologiques. Facteurs anti-agrégants dans les mitochondries, le RE et la voie de sécrétion ou Facteurs pro-agrégants dans le cytosol et le noyau. M : Mitochondrie ; RE : Réticulum endoplasmique ; Noy : Noyau.

Mes expériences indiquent que les protéines à polyQ ne sont pas reconnues par la machinerie de contrôle qualité du RE comme des protéines mal repliées. Elles ne déclenchent pas de réaction UPR et ne sont pas retenues dans le RE. Si un facteur anti-agrégant est responsable de la solubilité des protéines à polyQ, il devrait être exprimé de manière basale dans les différents compartiments cellulaires où les polyQ ne s'agrègent pas. Le fait que les protéines à polyQ

puissent ressortir du RE et rester solubles indique que ce ne sont pas les chaperons du RE qui les maintiennent solubles. En revanche, l'idée d'un facteur pro-agrégant serait en accord avec les observations faites sur la protéine Prion. En effet, il a été proposé que la transition de la protéine Prion normale (PrP^c) en Prion mutante (PrP^{sc}) se faisait dans le cytosol (Ma and Lindquist, 1999 ; Ma and Lindquist, 2002). Le facteur pro-agrégant responsable du mauvais repliement de la Huntingtine pourrait être également le facteur responsable de la transition de PrP^c en PrP^{sc}. La Huntingtine possède dans sa partie N-terminale juste après la séquence en polyQ une séquence de poly-Pro qui inhibe fortement son agrégation (Dehay, 2006). Un facteur pro-agrégant serait capable de lever cette inhibition. C'est dans l'idée qu'un tel facteur existe que s'est articulé le reste de mon travail de thèse. Chez les levures la protéine Hsp104 est nécessaire à l'agrégation. Une délétion de la protéine Hsp104 guérit les prions de levure et abolit l'agrégation d'une protéine exogène dérivée de la Huntingtine mutante humaine à 103 glutamines (Krobitsch and Lindquist, 2000). La protéine Hsp104 ne possède pas d'orthologue humain connu à ce jour mais c'est dans l'hypothèse que des analogues fonctionnels d'Hsp104 existent chez les mammifères et jouent un rôle similaire vis-à-vis des polyQ que s'est orienté la seconde partie de mon travail de thèse.

2. Les sous unités ATPases du protéasome 19S contrôlent le mauvais repliement des protéines à expansion de polyQ

Cinq des six sous unités du protéasome 19S (Rpt) sont les seules protéines identifiées possédant les mêmes motifs structuraux (domaine M et AAA) que la protéine Hsp104. De manière surprenante quand deux de ces sous unités Rpt6 et Rpt4 sont surexprimées avec la protéine Huntingtine ou SCA3 dans les cellules de mammifères, ces sous unités du protéasome induisent une augmentation de la proportion de protéines Huntingtine (ou SCA3) pathologique insolubles aux détergents dans la cellule et non une meilleure efficacité de leur dégradation.

La première hypothèse que nous avons testée est de savoir si l'augmentation d'une sous unité du protéasome inhibe le protéasome 26S. La surexpression des sous unités du 19S Rpt6 et Rpt4 n'entraîne pas d'accumulation des protéines poly-ubiquitinylées. Il n'y a donc pas inhibition de l'activité protéolytique du protéasome 20S quand les sous unités du 19S sont surexprimées. L'action des sous unités ATPases du 19S vis-à-vis du mécanisme d'agrégation de la Huntingtine mutante est spécifique. Ces protéines interagissent avec la Huntingtine *in vivo* et *in vitro*. Une inactivation de la sous unité Rpt6 par une approche d'ARN interférence, dans des neurones en culture primaire, abolit l'agrégation de la protéine Huntingtine mutante et

augmente la solubilité de cette protéine. Ce résultat démontre que Rpt6 endogène participe à l'agrégation de la Huntingtine dans les neurones.

La surexpression des sous unités Rpt6 ou Rpt4 augmente la proportion d'un complexe libre contenant les Rpt dans la cellule (RCC : Rpt containing complex) mimant le protéasome 19S. On peut supposer que c'est le RCC qui prend en charge les protéines polyUb, les déplie sans les adresser au site catalytique. Les protéines à polyQ ainsi dépliées pourraient s'agréger dans le cytosol. Le protéasome 19S a déjà été décrit comme ayant un rôle chaperon *in vitro* (Braun et al., 1999; Martin, 2002).

Une surexpression d'une des sous unités de reconnaissance des chaînes de poly-Ub au niveau du protéasome induit une accumulation de protéines à polyQ solubles sans augmentation d'agrégats de polyQ. L'adressage des protéines à polyQ polyubiquitinylées au protéasome 19S est donc nécessaire à l'agrégation de ces protéines. Pour démontrer l'importance et la nécessité de la voie ubiquitine dans le mécanisme de mauvais repliement par le protéasome 19S, la voie ubiquitine a été détournée en fusionnant la partie C-terminale de l'ODC à la protéine Huntingtine, la protéine ODC ayant un mécanisme de dégradation ubiquitine indépendante (Hoyt et al., 2005). La protéine Huntingtine-ODC résultante ne forme pas d'agrégats et de plus, est dégradée très efficacement par le protéasome. Il a pourtant récemment été proposé que le protéasome ne pouvait pas dégrader des séquences supérieures à 9 polyglutamines *in vitro* (Venkatraman et al., 2004). Le résultat de ces expériences, extrapolé au niveau cellulaire suggère que les séquences d'acides aminés entourant le polyQ seraient dégradées mais pas la partie polyQ qui serait relarguée dans le cytosol et pourrait s'agréger. Si tel était le cas, l'addition d'une séquence ODC à la protéine huntingtine mutante ne changerait rien à la capacité de dégradation des polyQ par le protéasome et les polyQ-ODC s'accumuleraient du fait de leur non dégradation. Mais la protéine Htt73ODC est dégradée de manière tout à fait efficace. Les protéines Huntingtine mutante même avec une séquence de 73Q semblent donc être correctement dégradées par le protéasome 26S dans les cellules. Ce résultat implique que c'est le chemin par lequel est adressée une protéine à polyQ au niveau du protéasome et plus particulièrement du 19S qui décide si cette protéine s'agrége ou pas.

Le modèle qui se dégage de mes observations est le suivant : les protéines à expansion de polyglutamine qui portent des séquences de poly-ub sont adressées au protéasome 19S. Elles sont dépliées par l'activité chaperon du protéasome 19S et si le dépliement n'est pas couplé à la dégradation dans le protéasome 20S, les protéines à polyQ de longueurs pathologiques auront tendance à former des agrégats.

Ces expériences sont novatrices dans le sens où elles illustrent une fonction chaperon du protéasome 19S dans les cellules. Le protéasome est donc une machinerie de dégradation mais également une protéine chaperon qui prend en charge les protéines adressées à la dégradation. Si la particule 19S est couplée avec le 20S alors la dégradation se fait correctement. En revanche, si la particule 19S est découplée du protéasome 20S alors les protéines sont dépliées et s'accumulent sous forme d'intermédiaires dépliés qui ont tendance à s'agréger dans le cas des protéines à polyQ (Figure 14).

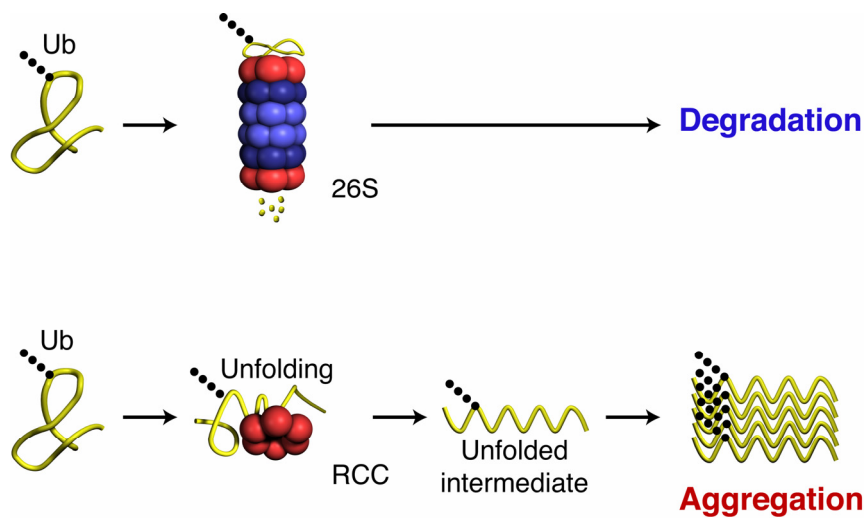


Figure 14 : Un découplage entre l'activité chaperon du 19S et l'activité protéolytique du 20S est à l'origine de l'agrégation des protéine à polyQ.

Récemment il a été découvert que dans les cellules, le protéasome n'existe pas seulement sous sa forme 26S mais aussi sous une forme dissociée 19S et 20S au cours de la dégradation des protéines (Babbitt et al., 2005). Une grande partie des pathologies neurodégénératives sont des maladies liées au vieillissement. L'hypothèse que le découplage entre le protéasome 19S et 20S augmente avec le temps pourrait expliquer le fait que la pathologie de Huntington ne se déclare que vers l'âge de 50 ans alors que les patients possèdent déjà la protéine mutante dès leur naissance. Des analyses de cerveaux post-mortem réalisées sur des patients atteints d'ataxie spinocérébelleuse de type 3 appuient cette hypothèse. Elles révèlent que les agrégats de protéines SCA3 retrouvés dans les cerveaux des patients sont associés à des sous unités du protéasome 19S et non des sous unités du 20S (Schmidt et al., 2002). Un découplage du protéasome 26S pourrait donc avoir eu lieu chez ces patients et serait probablement la raison de l'agrégation de la protéine SCA3. Ces expériences confortent également les résultats que j'ai

obtenus sur les neurones en culture primaire dans lesquels, les agrégats de Huntingtine sont entourés essentiellement par les sous unités du 19S Rpt4 et Rpt6 et non par les sous unités du 20S. Il serait intéressant de réaliser ces expériences sur des agrégats provenant de cerveaux de patients MH et voir s'ils colocalisent avec les sous unités du protéasome 19S.

L'inhibition du protéasome a été proposée comme une des causes des pathologies neurodégénératives. En suivant mon modèle, l'inhibition du protéasome pourrait être la conséquence d'un découplage accrue du protéasome 26S dans les pathologies neurodégénératives. Les protéines α -synucléine, Prion ou le peptide A β 42 seraient dépliées de façon plus importante par le 19S et ces protéines n'étant pas adressées dans le 20S auraient tendance à s'agréger. L'observation de l'intégrité du protéasome 26S dans des modèles de Parkinson ou d'Alzheimer serait une des expériences à réaliser pour infirmer ou confirmer cette hypothèse.

Il a également été décrit que l'activité du protéasome diminuait avec l'âge dans différents tissus (Conconi et al., 1996) et (Bulteau et al., 2002). Ceci a été proposé comme une des causes de l'accumulation des protéines mal repliées dans les neurones des patients âgés ou atteints de pathologies neurodégénératives (Bulteau and Friguet, 2004). Au regard de mes résultats, la diminution de l'activité du protéasome au cours du temps pourrait être due à une plus grande plasticité du protéasome 26S qui se dissocierait de manière plus importante chez les personnes âgées. L'activité du protéasome 26S dissocié se traduirait alors par une augmentation d'intermédiaires de dépliement et une inhibition de la dégradation des protéines.

D'un point de vue thérapeutique, il serait intéressant d'inhiber directement le mécanisme de découplage du protéasome. Mais cela semble difficilement réalisable surtout au vu du rôle crucial du protéasome au niveau cellulaire et du rôle du découplage au cours du cycle catalytique (Babbitt et al., 2005 ; Lassot et al., 2007).

Une autre idée serait de cibler précisément les E3 ligases mises en jeu dans le processus d'ubiquitylation des protéines ayant une propension à l'agrégation. Les E3 ligases de ces protéines n'ont pas encore été clairement identifiées. Cette stratégie est déjà utilisée en vue du traitement de certains cancers. En effet dans certains types de tumeurs les E3 ligases Mdm2 et Skp2 sont surexprimées (Lundgren et al., 1997). Ces E3 ligases sont responsables de la dégradation de la protéine p53 (protéine suppresseur de tumeur). L'inhibition de ces E3 permettrait la stabilisation de la protéine p53 et donc des thérapies anti-cancer. Plus généralement, la perturbation de l'adressage des protéines au 19S, en ciblant les E3 spécifiques,

induirait une inhibition de l'agrégation. Il reste à savoir si la perturbation de l'ubiquitylation de manière spécifique aurait un effet bénéfique chez les patients.

Les protéines chaperons du protéasome 19S, Rpt4 et Rpt6 déplient les protéines à polyQ et ces protéines s'agrègent dans le cytosol. Un adressage de Rpt6 dans le RE déclenche une réponse UPR (Unfolded protein response), induction des chaperons Grp78 et Grp94, dans la cellule. Rpt6 déplie les protéines du RE, ces protéines sont alors reconnues par le système chaperon de contrôle qualité qui déclenche la réponse UPR (données non montrées). La protéine chaperon du protéasome 19S Rpt6 est donc capable à elle seule de déplier un grand nombre de protéines substrats.

En conclusion, mon travail de thèse a permis de démontrer le rôle crucial joué par l'environnement cellulaire sur l'agrégation des protéines à expansion de polyQ. Les protéines à expansion de polyQ pathologiques ne s'agrègent que dans le cytosol. Dans ce compartiment elles sont adressées à la dégradation. Si les protéines à polyQ sont adressées au protéasome par une voie ubiquitine indépendante, elles sont très efficacement dégradées. L'agrégation des protéines à polyQ ne semble donc pas être la conséquence d'une activité catalytique limitante du protéasome 20S. Mais l'agrégation des protéines à polyQ est favorisée quand l'activité chaperon de dépliement du protéasome 19S est découplée de l'activité catalytique du protéasome 20S. Les protéines dépliées s'accumulent dans le cytosol et ont tendance à former des agrégats. Les travaux futurs du laboratoire permettront de comprendre ce qui régule la plasticité du protéasome 26S.

Matériel et méthodes

Biologie Moléculaire

Constructions plasmidiques

Les plasmides Htt17, Htt73 et Htt119 correspondent aux 171 premiers acides aminés de la Huntingtine sauvage avec des expansions de polyglutamines variant de 17, 73 à 119 glutamines. Ces séquences sont suivies de l'épitope de l'hémagglutinine et clonées dans le vecteur pCDNA1/Amp (*Invitrogen*). Les 19 premiers acides aminés de la protéine BIP humaine correspondant au peptide signal (SP) ont été fusionnés aux constructions Htt17, Htt73 et Htt119 pour générer les séquences SP-Htt17, SP-Htt73 et SP-Htt119. La séquence de rétention dans le Réticulum endoplasmique KDEL a été ajoutée en C-terminal pour générer SP-HttKDEL. La séquence d'adressage dans les mitochondries de l'aconitase 2 a été fusionnée aux constructions Htt17, Htt73 et Htt119 pour générer les séquences MTHtt17, MTHtt73 et MTHtt119.

Htt73 a été clonée dans le vecteur pEGFP-N2 (*Clontech*) dans les sites EcoRI/XhoI pour générer la construction Htt73-GFP.

Les ADNc de Rpt6_{wt} et Rpt6_{K196H} ont été gracieusement fournis par R.Losson et sous-clonés HindIII/XhoI dans le vecteur pXJ41 (Xiao 1991).

Les ADNc codant pour Rpt4, Rpt3, Rpt5, Rpt2, Rpt1, S5a ont été amplifiés par transcription inverse et PCR à partir d'ARN total de cellule Hela, ces séquences ont été flanquées des sites EcoRI/XhoI et clonées dans le vecteur pXJ41.

Les mutants de Rpt6 : Rpt6₁₅₀₋₄₀₆, Rpt6₁₋₁₄₉, Rpt6₈₀₋₄₀₆ ont été générés par PCR à l'aide d'oligonucléotides appropriés et clonés en HindIII/XhoI dans le vecteur pXJ41.

L'ADNc codant pour les 52 acides aminés de l'ornithine décarboxylase a été amplifié par PCR à l'aide d'oligonucléotides appropriés à partir du vecteur pZS proteasome sensor (*Clontech*) et cloné ensuite dans les sites XhoI/XbaI de pCDNA1/Amp contenant la séquence de Htt73 pour générer la construction Htt73ODC.

Biologie Cellulaire

1. Culture cellulaire et réactifs

Les cellules 293T, Hela et TS85 ont été maintenues dans un milieu DMEM (*Invitrogen*) complété avec du sérum de veau fœtal 10%, de la pénicilline, streptomycine (100u/ml) et glutamine 2mM. Les transfections ont été réalisées dans des plaques 6, 12 puits ou boîte 10cm en utilisant la méthode de phosphate de calcium qui conduit en routine à une efficacité de transfection supérieure à 70% ou en utilisant la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) le jour de

l'étalement pour les cellules TS85. Les traitements avec des inhibiteurs de protéasome MG132, Lactacystine et Epoxomycine (*CalBiochem*) ont été réalisés selon les temps et les concentrations indiquées.

Des neurones hippocampaux en culture primaire (200000 cellules par lamelle) ont été préparés à partir de cerveau de rat embryonnaire E18 et étalés sur des lamelles dans des plaques 6 puits, ces cellules ont été maintenues dans du milieu Neurobasal (*Gibco*) supplémenté de B-27 (*Gibco*) sans antibiotique. Les transfections ont été réalisées 8 jours après étalement en utilisant la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) et les neurones ont ensuite été fixés 24h post-transfection pour les expériences d'immunocytochimie.

2. Expérience d'ARN interférence

80pmol d'un oligonucléotide double brin dirigé contre Rpt6 (ggauugacaggaaaauugatt) et un siRNA Silencer Negative Control #1 (*Ambion*) comme contrôle négatif ont été utilisés. Les transfections des neurones ont été réalisées 8 jours après étalement avec de la Lipofectamine 2000 ou avec GeneSilencer (*Genlantis*) afin de réaliser des extraits protéiques. Les extraits protéiques ont été réalisés 72h post-transfection avec du tampon Laemmli SDS1X.

3. Immunocytochimie et microscopie à fluorescence

Les cellules étalées sur des lamelles sont lavées une fois avec du PBS 1X. Elles sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde 4%/PBS pendant 8 minutes. Elles sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS. Le milieu est aspiré et les cellules sont perméabilisées au Triton 0,2%/PBS pendant 8 minutes, enfin lavées au PBS 3 fois. 40 à 50µl de sérum de chèvre 5%/PBS sont rajoutés sur les cellules pendant 30 minutes. Ce milieu est aspiré et remplacé par l'anticorps primaire correspondant pendant une heure. Le milieu est ensuite aspiré et les cellules lavées trois fois avec du PBS. L'anticorps secondaire (*Alexa Invitrogen*) est rajouté pendant 45 minutes à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS, les noyaux cellulaires sont marqués avec du colorant de Hoechst (1/1000 dans du PBS) pendant 1 minute. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS. Enfin les lamelles sont montées sur lame dans du liquide de montage *Mowiol* et observées au microscope à épifluorescence Leica DMRB Fluorescence microscope ou pour la microscopie confocale Leica TCS SP2AOBS confocal microscope. Les images de microscopie à fluorescence ont été réalisées à l'aide du programme LeicaFW4000 et les images de confocal avec le programme Laser Sharp 2000 software (*BioRad*).

Biochimie des protéines

1. ImmunoBlot et Dot Blot

48 heures post-transfection les cellules sont centrifugées à 800g et le culot cellulaire repris dans 140 µl de tampon de Laemmli SDS1X (Bleu de bromophénol 0,05%, SDS 1%, DTT 250mM, Tris 25mM pH6,8, Glycérol 7,5%) en vortexant, la solution est ensuite placée à 100°C pendant 5 minutes. 15 µl d'extrait sont déposés sur un gel SDS/PAGE avec gel de concentration 4,5% et gel de résolution 10% et une électrophorèse est effectuée (30 mA/gel) dans un tampon de migration (25mM Tris Base, 200mM glycine, SDS 1%). Le gel est ensuite placé sur une membrane de nitrocellulose 0,2µm (Optitran BA-S 83 *Schleicher & Schuell*) et transféré dans un tampon de transfert (Tris Base 5mM, Glycine 40mM) à 150V durant 45 minutes. La membrane est ensuite saturée dans du PBS/Lait 5 % pendant 30 minutes. La membrane est ensuite hybridée avec les anticorps correspondant pendant 1 heure ou sur la nuit. Une fois l'hybridation terminée la membrane est rincée une fois avec du PBS/Tween 0,05%, puis lavée 2 fois avec du PBS/Tween 0,05%. La membrane est ensuite hybridée avec un anticorps secondaire pendant 45 minutes. La membrane est finalement rincée et lavée une fois avec du PBS/Tween 0,05% et reprise dans du PBS1X. Pour la révélation, une solution (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate PIERCE) exploitant le phénomène de chimioluminescence est rajoutée sur la membrane. Le signal est mesuré à l'aide de l'appareil ChemiStart de VilberLourmat.

2. Purification et solubilisation des agrégats de Huntingtine

60µl d'extrait protéique en tampon Laemmli SDS 1% sont centrifugés à 435292g pendant 20 minutes à 20°C. Le surnageant est récupéré et le culot lavé avec 500µl de tampon de migration SDS1%. Les culots sont centrifugés une seconde fois à 435292g pendant 20 minutes à 20°C. Le tampon est enlevé et le culot repris dans 130µl d'acide formique 100%. Les extraits sont incubés pendant 1 heure à 37°C et agités toutes les 10 minutes. L'acide formique est ensuite évaporé au SpeedVac pendant 30 minutes. Les culots sont finalement repris dans du tampon de Laemmli SDS 2%.

3. Fractionnement des protéines en fraction soluble et insoluble

Les cellules sont lysées 48h post transfection dans 140µl de tampon NP40 1% (25mM Tris-Hcl pH7,5, 1% NP40, 300mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 5µg/ml Pepstatine,

leupestine et Aprotinine). Le mélange est incubé sur glace pendant 10 minutes puis centrifugé à 16000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et le culot repris dans du tampon de Laemmli SDS 1%.

Références

bibliographiques

-A ; B-

- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- Babbitt, S.E., Kiss, A., Deffenbaugh, A.E., Chang, Y.H., Bailly, E., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Buranda, T., Sklar, L.A., Baumler, J., Gogol, E. and Skowyra, D. (2005) ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle. *Cell*, **121**, 553-565.
- Beal, M.F. (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, **23**, 298-304.
- Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, **292**, 1552-1555.
- Bernat, C.J., Hanna ; Donald, S. Kirkpatrick ; Dan, Phoebe Zhang ; Yoshiko, Tone ; Nathaniel, A. Hathaway ; Christa, Buecker ; David, S. Leggett ; Marion, Schmidt ; Randall, W. King ; Steven, P. Gygi ; and Daniel, Finley. . (2006) Ubiquitin chains are remodeled at the Proteasome by Opposing Ubiquitin Ligase and Deubiquitinating Activities *Cell* **127**, 1401–1413.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P. and Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, **2**, 326-332.
- Bertram, L., Tanzi, R. E. (2005) The genetic epidemiology of neurodegenerative diseases. *Journal Of Clin Invest*, **115**, 1449-1457.
- Bett, J.S., Goellner, G.M., Woodman, B., Pratt, G., Rechsteiner, M. and Bates, G.P. (2006) Proteasome impairment does not contribute to pathogenesis in R6/2 Huntington's disease mice: exclusion of proteasome activator REGgamma as a therapeutic target. *Hum Mol Genet*, **15**, 33-44.
- Beynon, R.J. and Bond, J.S. (1986) Catabolism of intracellular protein: molecular aspects. *Am J Physiol*, **251**, C141-152.
- Bhattacharyya, A., Thakur, A.K., Chellgren, V.M., Thiagarajan, G., Williams, A.D., Chellgren, B.W., Creamer, T.P. and Wetzel, R. (2006) Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *J Mol Biol*, **355**, 524-535.
- Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A.M. and Klausner, R.D. (1989) Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly. *J Cell Biol*, **109**, 73-83.
- Bowman, A.B., Yoo, S.Y., Dantuma, N.P. and Zoghbi, H.Y. (2005) Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet*, **14**, 679-691.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*, **1**, 221-226.
- Bulteau, A.L. and Friguet, B. (2004) Are expanded polyglutamine proteins a proteasome substrate? *Rejuvenation Res*, **7**, 239-242.
- Bulteau, A.L., Szweda, L.I. and Friguet, B. (2002) Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Arch Biochem Biophys*, **397**, 298-304.

-C-

- Carrard, G., Bulteau, A.L., Petropoulos, I. and Friguët, B. (2002) Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1461-1474.
- Cattaneo, E.e.a. (2001) Loss of normal Huntingtin function : New developments in Huntington's disease research. *Trends Neuroscience*, **24**, 182-188.
- Chamovitz, D.A. and Glickman, M. (2002) The COP9 signalosome. *Curr Biol*, **12**, R232.
- Chen, X., Barton, L.F., Chi, Y., Clurman, B.E. and Roberts, J.M. (2007) Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome. *Mol Cell*, **26**, 843-852.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. and Dobson, C.M. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3590-3594.
- Ciechanover, A. (2005) Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 5944-5967.
- Cole, G.M. and Frautschy, S.A. (2006) Alzheimer's amyloid story finds its star. *Trends Mol Med*, **12**, 395-396.
- Combaret, L., Dardevet, D., Rieu, I., Pouch, M.N., Bechet, D., Taillandier, D., Grizard, J. and Attaix, D. (2005) A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol*, **569**, 489-499.
- Conconi, M., Szweda, L.I., Levine, R.L., Stadtman, E.R. and Friguët, B. (1996) Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. *Arch Biochem Biophys*, **331**, 232-240.
- Cooper, J.K., Schilling, G., Peters, M.F., Herring, W.J., Sharp, A.H., Kaminsky, Z., Masone, J., Khan, F.A., Delanoy, M., Borchelt, D.R., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (1998) Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet*, **7**, 783-790.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, **65**, 801-847.
- Cui L, J.H., Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. . . (2006) Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, **127**, 59-69.

-D-

- Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Niedel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R. and Baumeister, W. (1989) The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria. *FEBS Lett*, **251**, 125-131.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L. and Bates, G.P. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, **90**, 537-548.
- Dehay, B., Weber, C., Trottier, Y. and Bertolotti, A. (2007) Mapping of the epitope of monoclonal antibody 2B4 to the proline-rich region of human Huntingtin, a region critical for aggregation and toxicity. *Biotechnol J*, **2**, 559-564.
- Dehay, B.B., A. (2006) Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J Biol Chem*, **281**, 35608-35615.

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

-F ; G-

- 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.
- Ferrell, K., Wilkinson, C.R., Dubiel, W. and Gordon, C. (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci*, **25**, 83-88.
- Friguet, B., Bulteau, A.L., Chondrogianni, N., Conconi, M. and Petropoulos, I. (2000) Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann N Y Acad Sci*, **908**, 143-154.
- Gafni, J. and Ellerby, L.M. (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci*, **22**, 4842-4849.
- Gilon, T., Chomsky, O. and Kulka, R.G. (1998) Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **17**, 2759-2766.
- Glickman, M.H. and Raveh, D. (2005) Proteasome plasticity. *FEBS Lett*, **579**, 3214-3223.
- Glickman, M.H.R., D. M; Fried, V.A.; Finley, D. (1998) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome *Mol Cell Biol*, **18**, 3149-3162.
- Goldberg, A.L. (2005) Nobel committee tags ubiquitin for distinction. *Neuron*, **45**, 339-344.
- Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T. and Rock, K.L. (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol*, **39**, 147-164.
- Goldberg, A.L. and Rock, K.L. (1992) Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*, **357**, 375-379.
- Goldberg, A.L., Stein, R. and Adams, J. (1995) New insights into proteasome function: from archaeobacteria to drug development. *Chem Biol*, **2**, 503-508.
- Group, T.H.s.D.C.R. (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. . *Cell*, **72**, 971-983.

-H-

- Hanna, J. and Finley, D. (2007) A proteasome for all occasions. *FEBS Lett*, **581**, 2854-2861.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-580.
- Hendrick, J.P., Hartl, F.U. (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual review Biochemistry*, **62**, 349-384.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 195-201.
- Hoyt, M.A., Zhang, M. and Coffino, P. (2005) Probing the ubiquitin/proteasome system with ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *Methods Enzymol*, **398**, 399-413.

- Huntington, G. (1872) On Chorea. *Medical and Surgical Reporter of Philadelphia* **26**, 317–321.
- Huntington, G. (2003) On chorea. George Huntington, M.D. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **15**, 109-112.

-J ; K-

- Johnston, J.A., Ward, C. W., Kopito, R. R. . (1998) Aggresome: A cellular response to misfolded proteins. *Journal of Cell Biology*, **143**, 1883-1898.
- Johnston, K.M.a.S.A. (1995) GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol Cell Biol*, **15**, 2839–2848.
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M., Wallace, A.C., James, T.L., Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1997) Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10069-10074.
- Karpuj, M.V., Garren, H., Slunt, H., Price, D.L., Gusella, J., Becher, M.W. and Steinman, L. (1999) Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7388-7393.
- Kim, J. and Klionsky, D.J. (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, **69**, 303-342.
- Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2001) Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12784-12789.
- Koegl M, H.T., Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.
- Krobitsch, S. and Lindquist, S. (2000) Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1589-1594.

-L-

- LaFerla, F.M., Tinkle, B.T., Bieberich, C.J., Haudenschild, C.C. and Jay, G. (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet*, **9**, 21-30.
- Lassot, I., Latreille, D., Rousset, E., Sourisseau, M., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Coux, O., Benkirane, M. and Kiernan, R.E. (2007) The proteasome regulates HIV-1 transcription by both proteolytic and nonproteolytic mechanisms. *Mol Cell*, **25**, 369-383.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L. and Mitch, W.E. (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*, **17**, 1807-1819.
- Levine, B.a.K., D. J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*, **6**, 463-477.
- Li, S.H. and Li, X.J. (1998) Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. *Hum Mol Genet*, **7**, 777-782.
- Li, S.H. and Li, X.J. (2004) Huntingtin and its role in neuronal degeneration. *Neuroscientist*, **10**, 467-475.

- Li, X., Amazit, L., Long, W., Lonard, D.M., Monaco, J.J. and O'Malley, B.W. (2007) Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol Cell*, **26**, 831-842.
- Lilley, B.N. and Ploegh, H.L. (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*, **429**, 834-840.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, **268**, 533-539.
- Lundgren, K., Montes de Oca Luna, R., McNeill, Y.B., Emerick, E.P., Spencer, B., Barfield, C.R., Lozano, G., Rosenberg, M.P. and Finlay, C.A. (1997) Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes Dev*, **11**, 714-725.
- Lunkes, A. and Mandel, J.L. (1998) A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **7**, 1355-1361.

-M-

- Ma, J. and Lindquist, S. (1999) De novo generation of a PrPSc-like conformation in living cells. *Nat Cell Biol*, **1**, 358-361.
- Ma, J. and Lindquist, S. (2002) Conversion of PrP to a self-perpetuating PrPSc-like conformation in the cytosol. *Science*, **298**, 1785-1788.
- Maat-Schieman, M., Roos, R., Losekoot, M., Dorsman, J., Welling-Graafland, C., Hegeman-Kleinn, I., Broeyer, F., Breuning, M., and van Duinen, S. (.) . (2007) Neuronal intranuclear and neuropil inclusions for pathological assessment of Huntington's disease. *Brain Pathology* **17**, 31-37.
- Makino Y, Y.T., Yogosawa S, Tanaka K, Muramatsu M, Tamura TA. (1999) Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes Cells*, **4**, 529-539.
- Martin, A.N.L.a.J. (2002) AAA proteins *Current Opinion in Structural Biology*, **12**, 746-753.
- Massey, A., Kiffin, R. and Cuervo, A.M. (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 2420-2434.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, **7**, 766-772.
- Minami, Y., Kawasaki, H., Minami, M., Tanahashi, N., Tanaka, K. and Yahara, I. (2000) A critical role for the proteasome activator PA28 in the Hsp90-dependent protein refolding. *J Biol Chem*, **275**, 9055-9061.
- Munro, S. and Pelham, H.R. (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell*, **46**, 291-300.
- Munro, S. and Pelham, H.R. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, **48**, 899-907.
- Murata, S., Chiba, T. and Tanaka, K. (2003) CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 572-578.

-N ; P-

- Naarding, P., Kremer, H.P. and Zitman, F.G. (2001) Huntington's disease: a review of the literature on prevalence and treatment of neuropsychiatric phenomena. *Eur Psychiatry*, **16**, 439-445.

- Nelson, R. and Eisenberg, D. (2006) Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 260-265.
- Pelham, H.R. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*, **46**, 959-961.
- Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M., Finch, J.T. . (1994) Glutamine repeats as polar zippers : their possible role in inherited neurodegeneratives diseases. . *Proc. Natl. Acad. Sci*, **91**, 5355-5358.
- Poirier, M.A., Jiang, H. and Ross, C.A. (2005) A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure. *Hum Mol Genet*, **14**, 765-774.

-Q ; R-

- 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.
- Quinn, N. and Schrag, A. (1998) Huntington's disease and other choreas. *J Neurol*, **245**, 709-716.
- Ranen, N.G., Stine, O.C., Abbott, M.H., Sherr, M., Codori, A.M., Franz, M.L., Chao, N.I., Chung, A.S., Pleasant, N., Callahan, C. and et al. (1995) Anticipation and instability of IT-15 (CAG)_n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet*, **57**, 593-602.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. and Goldberg, A.L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, **78**, 761-771.
- Ross, C.A. and Poirier, M.A. (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 891-898.
- Rousseau, E., Dehay, B., Ben-Haiem, L., Trottier, Y., Morange, M. and Bertolotti, A. (2004) Targeting expression of expanded polyglutamine proteins to the endoplasmic reticulum or mitochondria prevents their aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9648-9653.
- Rubin DM, C.O., Wefes I, Hengartner C, Young RA, Goldberg AL, Finley D. (1996) Identification of the gal4 suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature*, **379**, 655-657.
- Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, **14**, 20-28.

-S-

- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M. and Knecht, E. (2000) Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem*, **275**, 27447-27456.
- 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.
- Scherzinger, E.S., A., Schweiger, K. Heiser, V. Lurz, R. Hasenbank, R. Bates, G. P. Lehrach, H. Wanker, E. E. (1999) Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4604-4609.

- Schmidt, T., Lindenberg, K.S., Krebs, A., Schols, L., Laccone, F., Herms, J., Rechsteiner, M., Riess, O. and Landwehrmeyer, G.B. (2002) Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol*, **51**, 302-310.
- Schols. (2004) autosomal dominants cerebellar ataxia. *Lancet neurol*.
- Shibatani, T. and Ward, W.F. (1996) Effect of age and food restriction on alkaline protease activity in rat liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **51**, B175-178.
- Smith, D.M., Benaroudj, N. and Goldberg, A. (2006) Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. *J Struct Biol*, **156**, 72-83.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R. and Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839-840.
- Strickland, E., Hakala, K., Thomas, P.J. and DeMartino, G.N. (2000) Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem*, **275**, 5565-5572.
- Sulahian, R., Sikder, D., Johnston, S.A. and Kodadek, T. (2006) The proteasomal ATPase complex is required for stress-induced transcription in yeast. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1351-1357.
- Sung, P.H., D.;Prakash,L.;Prakash,S. (1988) Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP. *EMBO Journal*, **7**, 3263–3269.
- Swaffield, J.C., Bromberg, J.F. and Johnston, S.A. (1992) Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature*, **357**, 698-700.

-T ; V-

- Takahashi, R., Imai, Y., Hattori, N. and Mizuno, Y. (2003) Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann N Y Acad Sci*, **991**, 101-106.
- Tanaka, K., Ii, K., Ichihara, A., Waxman, L. and Goldberg, A.L. (1986) A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem*, **261**, 15197-15203.
- Taylor, J.P., Hardy, J. and Fischbeck, K.H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, **296**, 1991-1995.
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. and Prusiner, S.B. (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, **83**, 79-90.
- Thakur, A.K. and Wetzel, R. (2002) Mutational analysis of the structural organization of polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 17014-17019.
- Tofaris, G.K., Layfield, R. and Spillantini, M.G. (2001) alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett*, **509**, 22-26.
- Trottier, Y., Biancalana, V. and Mandel, J.L. (1994) Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet*, **31**, 377-382.
- Tsai, B., Ye, Y. and Rapoport, T.A. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 246-255.
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. and Vierstra, R.D. (1996) The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a

- component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol*, **16**, 6020-6028.
- Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N. and Goldberg, A.L. (2004) Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell*, **14**, 95-104.
- vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M.J., Garnier, J.M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P. and Losson, R. (1996) Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *Embo J*, **15**, 110-124.

-W ; Y ; Z-

- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (2001) Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell*, **12**, 1393-1407.
- White, J.K. (1997) Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nature Genetics*, **17**, 404-410.
- 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.
- Zeng, B.Y., Medhurst, A.D., Jackson, M., Rose, S. and Jenner, P. (2005) Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. *Mech Ageing Dev*, **126**, 760-766.
- Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*, **23**, 217-247.
- Zwickl, P., Ng, D., Woo, K.M., Klenk, H.P. and Goldberg, A.L. (1999) An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes. *J Biol Chem*, **274**, 26008-26014.

Annexes

NOMENCLATURE				GENE		1 ^o Acc. # (human)	Seq. length (amino acids)	MW (Da)
Finley <i>et al.</i> ⁸	Dubiel <i>et al.</i> ⁹	Miscellaneous	UniProtKB ⁴	Human	Yeast (<i>S.c.</i>)			
19S (PA700) regulator ATPase subunits								
Rpt1	S7	p48, Mss1, Yta3, Cim5	Subunit 7	PSMC2	CIM5	P35998	432	48503
Rpt2	S4	p56, Yhs4, Yta5, Mts2	Subunit 4	PSMC1	YTA5	P62191	440	49185
Rpt3	S6b	S6, p48, Tbp7, Yta2, Yrt1, MS73	Subunit 6b	PSMC4	YTA2	P43686	418	47336
Rpt4	S10b	p42, Sug2, Pcs1, Cr113, CADp44	Subunit 10b	PSMC6	SUG2	P62333	389	44173
Rpt5	S6a	S6', p50, Tbp1, Yta1	Subunit 6a	PSMC3	YTA1	P17980	439	49204
Rpt6	S8	p45, Trip1, Sug1, Cim3, Cri3, Tby1, Tbp10, m56	Subunit 8	PSMC5	SUG1	P62195	406	45626
19S (PA700) regulator non-ATPase subunits								
Rpn1	S2	p97, Trap2, Nas1, Hrd2, Rpd1, Mts4	Subunit 2	PSMD2	HRD2	Q13200	908	100200
Rpn2	S1	p112, Sen3	Subunit 1	PSMD1	SEN3	Q99460	953	105636
Rpn3	S3	p68, Sun2	Subunit 3	PSMD3	SUN2	Q43242	534	60976
Rpn4		Son1, Ufd5			RPN4	Q03465(Sc)	531	60153
Rpn5		p55, Nas5	Subunit 12	PSMD12	YDL147W	Q00232	455	52773
Rpn6	S9	p44.5, Nas4/6?	Subunit 11	PSMD11	YDL097C	Q00231	421	47333
Rpn7	S10a	p44, HUMORF07	Subunit 6	PSMD6		Q15008	389	45631
Rpn8	S12	p40, Mov-34h, Nas3	Subunit 7	PSMD7	YOR261C	P51685	324	37025

Les sous unités du 19S protéasome de levure *S.cerevisiae* (D'après BIOMOL^R)

Article 1

‘Targeting expression of expanded polyglutamine proteins to the endoplasmic reticulum or mitochondria prevents their aggregation’.

Rousseau, E., Dehay, B., Ben-Haiem, L., Trottier, Y., Morange, M. and Bertolotti, A. (2004)

Proc Natl Acad Sci U S A, **101**, 9648-9653.

Targeting expression of expanded polyglutamine proteins to the endoplasmic reticulum or mitochondria prevents their aggregation

Erwann Rousseau*, Benjamin Dehay*, Léa Ben-Haïem†, Yvon Trottier†, Michel Morange*, and Anne Bertolotti**

*Laboratoire de Génétique Moléculaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8541, Ecole Normale Supérieure, 46 Rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France; and †Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Louis Pasteur, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France

Communicated by François Jacob, Institut Pasteur, Paris, France, April 29, 2004 (received for review January 21, 2004)

Aggregation of misfolded proteins is a characteristic of several neurodegenerative diseases. The huntingtin amino-terminal fragment with extended polyglutamine repeat forms aggregates closely associated with chaperones both in the cytoplasm and the nucleus. Because each cellular compartment contains distinct chaperones and because the molecular mechanisms controlling polyglutamine aggregation are largely unknown, we decided to investigate the influence of different cellular environments on the aggregation of this pathological protein. Here, we show that aggregation of a protein containing a polyglutamine stretch of pathological length is abolished when its expression is targeted to the endoplasmic reticulum. Once retrogradely transported outside the endoplasmic reticulum, the aggregation-prone polyglutamine-containing protein recovers its ability to aggregate. When expressed in the mitochondria, a protein containing 73 glutamines is entirely soluble, whereas the nucleocytoplasmic equivalent has an extremely high tendency to aggregate. Our data imply that polyglutamine aggregation is a property restricted to the nucleocytoplasmic compartment and suggest the existence of compartment-specific cofactors promoting or preventing aggregation of pathological proteins.

Several neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's diseases (and related polyglutamine disorders), amyotrophic lateral sclerosis, and prion disorders share striking common features despite diverse clinical symptoms and transmission mode (1, 2). The hallmark of these disorders is the progressive neuronal loss associated with deposition of aggregated protein of aberrant conformation (1–6). Despite considerable differences in primary sequence, the pathological conformers of the disease-specific proteins share similar important structural features (5, 7). Numerous genetic, cell biology, and biochemical data support the model whereby neurodegeneration is caused by a toxic gain of function of the mutated protein. The molecular mechanisms controlling the initiation of the conformational transition from a soluble, functional conformation to an aggregated pathological one are so far unknown. Quality control pathways have evolved to protect cells from the deleterious effect of misfolded proteins. Molecular chaperones refold abnormally folded polypeptides or direct them to degradation machinery (8). Failure to refold or to degrade aberrant proteins leads to their aggregation. Neurons, as postmitotic cells, are particularly sensitive to misfolding injury. In addition, the accumulation of aberrant proteins increases with age, when quality control might become less efficient, as illustrated by a decreased activity of the proteasome degradation machinery (9). Together, these observations may provide a rationale for the late onset of neurodegenerative diseases.

One of the paradigmatic misfolding diseases is Huntington's disease, an autosomal dominant disease caused by a CAG repeat expansion in the first exon of the huntingtin gene, which translates into polyglutamine and causes aggregation of the

mutated protein in patient brains (10), transgenic mice (11), and cellular models of Huntington's disease (12–14). Polyglutamine repeat (polyQ)-containing polypeptides of a pathological length were proposed to adopt an aberrant structure causing their aggregation and subsequent cellular dysfunction (15). This model received support from numerous investigators and is reinforced with the conditional expression of the amino-terminal region of huntingtin in transgenic mice showing that aggregate formation and appearance of pathological symptoms are closely linked (16). More recently, polyQ aggregation was shown to directly contribute to cellular dysfunction (17, 18). Pathological polyQ-containing proteins form aggregates closely associated with chaperones both in the cytosol and in the nucleus. Because each cellular compartment contains distinct chaperones and because the mechanism controlling polyQ aggregation is unknown, we addressed the expression of huntingtin amino-terminal fragment to the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria and found that polyQ aggregation is dramatically influenced by the subcellular environment. Our results suggest the existence of cellular factors dramatically modulating pathological protein aggregation.

Materials and Methods

Expression Plasmids, Cell Culture, and Transfections. Htt17 and Htt73 are, respectively, 171–17 and 171–73 from ref. 19. Htt17 encodes the first 163 aa of wild-type huntingtin followed by a hemagglutinin epitope in pcDNA1/Amp vector (Invitrogen), and Htt73 is the mutant version with 73 CAG. The first 19 amino acids of hBIP (signal peptide, SP) were fused to Htt17 or Htt73 to generate SP-Htt17 and SP-Htt73 (20). A KDEL sequence was added carboxyl-terminally to generate SP-HttKDEL. 293T cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and transfected in six-well plates with 1 μ g of the indicated expression plasmids by using the calcium phosphate method, leading routinely to >70% transfection efficiency. NG108-15 cells were cultured as described in ref. 13 and transfected with FuGENE (Roche Molecular Biochemicals). Protein extracts were prepared 48 h later by boiling in 180 μ l of Laemmli buffer, 20 μ l of which was analyzed by huntingtin immunoblot as described below; 5 μ l of such extracts was analyzed on GRP94 immunoblot.

Antibodies, Filter Retardation Assay, and Immunoblotting. Monoclonal 2B4 is described in ref. 21. Calnexin polyclonal serum and GRP94 antibody were purchased from Stressgen, and ubiquitin rabbit antiserum was from Sigma. For filter retardation assay performed as described in ref. 22, 5–20 and 30–50 μ l of protein extracts were loaded on cellulose acetate for 2B4 and ubiquitin immunoblots, respectively. Duplicates loaded on nitrocellulose

Abbreviations: SP, signal peptide; ER, endoplasmic reticulum; polyQ, polyglutamine repeat.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: aberto@wotan.ens.fr.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

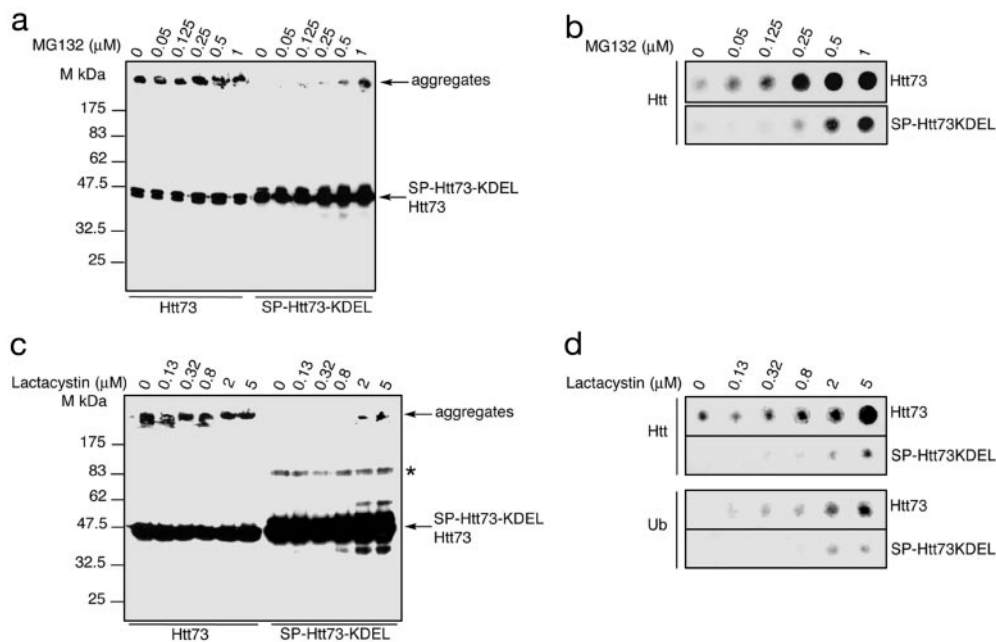


Fig. 3. Proteasome inhibition induces SP-Htt73KDEL aggregation. Increasing doses of MG-132 (a) or lactacystin (c) augment Htt73 aggregation and induce SP-Htt73KDEL aggregation. Immunoblots with the 2B4 antibody of lysates from 293T cells transfected with the indicated expression vectors and either left untreated or treated with 0.05, 0.125, 0.25, 0.5, and 1 μ M MG-132 or 0.13, 0.32, 0.8, 2, and 5 μ M lactacystin 16 h posttransfection and for 16 h. A band of \approx 90 kDa is revealed on the Htt73 and SP-Htt73KDEL immunoblots either after long exposure (data not shown) or with high Htt proteins amount (*). (b and d) Cell extracts presented in a and c were analyzed by filter retardation assay and revealed by immunoblot with huntingtin or ubiquitin antibody.

containing expanded polyQ is not recognized as misfolded. We next examined whether aggregation of SP-Htt73KDEL could be hindered by means of an increased turnover. 293T cells were transfected with the indicated constructs and collected at various times after blockade of new protein synthesis by using cycloheximide. Immunoblots were performed on total cellular extracts (Fig. 1d). The measured half-life of both Htt17 and Htt73 is \approx 45 min (Fig. 1d). Because SP-HttKDEL proteins are noticeably more stable than the Htt proteins, it seems unlikely that SP-Htt73KDEL aggregation is reduced by means of an increased turnover (Fig. 1d). Because the ER environment is different from the cytosol regarding redox conditions and ions, SP-HttKDEL expressing cells were challenged with Thapsigargin treatment, provoking a calcium release from this reservoir and thereby a dramatic change in the ER milieu (26). This treatment did not alter SP-Htt73KDEL solubility (data not shown).

Htt73 Expressed in the Mitochondria Is Entirely Soluble. Because the ER is a peculiar environment, we next examined Htt73 aggregation properties when targeted to another cellular compartment, the mitochondria. mt-Htt17 and mt-Htt73 chimeras were generated by fusing the first 35 aa of human aconitase 2 to Htt17 or Htt73. Aconitase 2 mitochondrial targeting sequence was chosen because aconitase 2 mRNA has been found in the vicinity of mitochondria, a property that could favor the rapidity of protein import in this organelle (27). This caveat was important because we aimed to import polyQ-containing proteins of pathological length in the mitochondria before their aggregation in the cytosol. Subcellular location of the mt-Htt constructs was analyzed by immunocytochemistry performed on 293T transfected cells (Fig. 2a). In mt-Htt17- or mt-Htt73-transfected cells, the huntingtin antibody labels a compartment that is colabeled with the mitochondrion-selective probe MitoTracker. Immunoblot analysis of total cellular extracts reveals that in contrast to Htt73, which gives rise to two bands corresponding to the soluble protein migrating at an estimated molecular mass of 47 kDa, with

the aggregated one incapable of penetrating the gel, Htt17, mt-Htt17, and mt-Htt73 are exclusively soluble and migrate, respectively, at \approx 32 and 47 kDa (Fig. 2b). In mitochondria, a protein containing a 73 polyQ is entirely SDS-soluble in contrast to Htt73. This observation is confirmed by sedimentation experiments. Whereas Htt73 is present both in the SDS-soluble fraction (Fig. 2b, lane 7) and in the formic acid-solubilized pellet (Fig. 2b, lane 11), Htt17, mt-Htt17, and mt-Htt73 are exclusively detected in the soluble fractions (Fig. 2b, lanes 6 and 10, 8 and 12, and 9 and 13, respectively). Htt73 aggregates are retained by filtration on cellulose acetate membrane, as revealed by the immunoblot of the membrane (Fig. 2c), whereas Htt17, mt-Htt17, and mt-Htt73 flow through, confirming their solubility. The stability of mt-Htt derivatives was evaluated by inhibiting new protein synthesis with cycloheximide. Similarly to the SP-HttKDEL derivatives, the half-life of mt-Htt proteins is extended compared to their Htt counterparts (Figs. 1d and 2d). Note that in untreated cells mt-Htt17 and mt-Htt73 are both revealed as two bands corresponding most likely to the precursor protein (p) containing the uncleaved mitochondrial targeting sequence and the mature protein (m) of faster mobility. In the course of protein synthesis inhibition, we observed disappearance of the precursor (Fig. 2d), further confirming that mt-Htt proteins are addressed to the mitochondria. Because mt-Htt proteins are expressed at a higher level than Htt proteins and because the cytosol is a compartment of a greater volume than the mitochondrial matrix, the concentration of mt-Htt73 seems, therefore, higher in the mitochondria than the concentration of Htt73 in the nucleocytoplasmic compartment. Targeting Htt73 to mitochondria hinders its aggregation.

Proteasome Inhibition Provokes Aggregation of SP-Htt73KDEL. In light of these findings, we reexamined the meaning of the trace of aggregation observed by overexpressing the SP-Htt73KDEL chimera (Fig. 1b and c). When ER proteins have to be degraded, they are subjected to retrograde transport into the cytosol, where

they are ubiquitinated and subsequently degraded by the proteasome, a process referred to ER-associated degradation, or ERAD (28, 29). We speculated that SP-Htt73KDEL aggregates might arise not in the ER, where the protein would be soluble, but in the cytosol, if and when the protein would be retrogradely transported out of the ER. Despite the obvious stability of the SP-HttKDEL derivatives (Fig. 1*d*), we hypothesized that some of these derivatives might return in the cytosol and be targeted to proteasomal degradation. Compromising proteasome activity would then increase the likelihood of the occurrence of SP-Htt73KDEL aggregates. 293T cells expressing either Htt73 or SP-Htt73KDEL were treated with MG-132 or lactacystin. In agreement with previous reports, proteasome inhibition increases the amount of Htt73 aggregation (30, 31) (Fig. 3). This effect is more obvious in the quantitative filter retardation assay (Fig. 3*b* and *d*). Both MG-132 and lactacystin induce SP-Htt73KDEL aggregation in a concentration-dependent manner (Fig. 3). The trace amount of SP-Htt73KDEL aggregation in untreated cells (Fig. 1*b* and *c*) is thereby likely due to the retrograde transport of the protein in the cytosol. Immunoblotting a cellulose acetate membrane on which Htt73 and SP-Htt73KDEL aggregates were retained with an antibody reacting with ubiquitin reveals that they are ubiquitinated (Fig. 3*d*). This result suggests that both Htt73 and SP-Htt73KDEL aggregates form in a cellular compartment where the ubiquitin-proteasome system is found, namely in the cytosol or in the nucleus (32). Abrogation of SP-Htt73KDEL aggregation in the ER is reversible, indicating that the protein has only transiently lost its aggregation propensity because of its mislocation.

Because huntingtin aggregation increases with the length of the polyQ, we tested the aggregation extent of Htt derivatives containing 119Q in different compartments. SP-Htt119KDEL and mt-Htt119 chimeras were constructed. Immunocytochemical analysis reveals that Htt119 aggregates are observable as early as 16 h posttransfection. SP-Htt119KDEL and mt-Htt119 locate in the expected compartments, the ER and the mitochondria, respectively (Fig. 4*a*). Htt119 aggregates are retained at the top of the gel, whereas the soluble Htt119 protein migrates similarly to a 62-kDa protein (Fig. 4*b*). SP-Htt119KDEL is highly expressed but has a reduced propensity to aggregate when compared with Htt119. mt-Htt119 seems completely soluble. Filter retardation assay analysis confirms that aggregation of SP-Htt119KDEL is markedly reduced compared with Htt119, and mt-Htt119 is mostly soluble (Fig. 4*c*). Aggregation of SP-Htt119KDEL is augmented by treatment with the proteasome inhibitor lactacystin (Fig. 4*d*), and both aggregated Htt119 and SP-Htt119KDEL proteins are ubiquitinated (Fig. 4*d*). The trace of mt-Htt119 aggregate might arise in the cytosol prior to the import of the protein. We next analyzed the aggregation of Htt119, mt-Htt119, and SP-Htt119KDEL in a well characterized cellular model of Huntington's disease, the neuronal-like NG108-15 cells (13). The observations made by using 293T cells are fully recapitulated in NG108-15 cells (Fig. 4*c*) (data not shown). The results shown here indicate that polyQs of pathological length lose their aggregation ability when targeted to the ER or the mitochondria.

Discussion

Targeting mutant huntingtin polypeptide to the ER and mitochondria led us to discover that aggregation of polyQ-containing proteins of pathological length depends on cellular environment. The cellular system used in our study composed of the amino-terminal polyQ-containing region of huntingtin expressed in 293T cells is a very robust one because the expression levels of the various Htt derivatives is extremely high. Preventing aggregation of a polyQ-containing protein of pathological length while achieving high expression levels is thus a remarkable finding. In addition, the compartmentalized polyglutamine propensity to

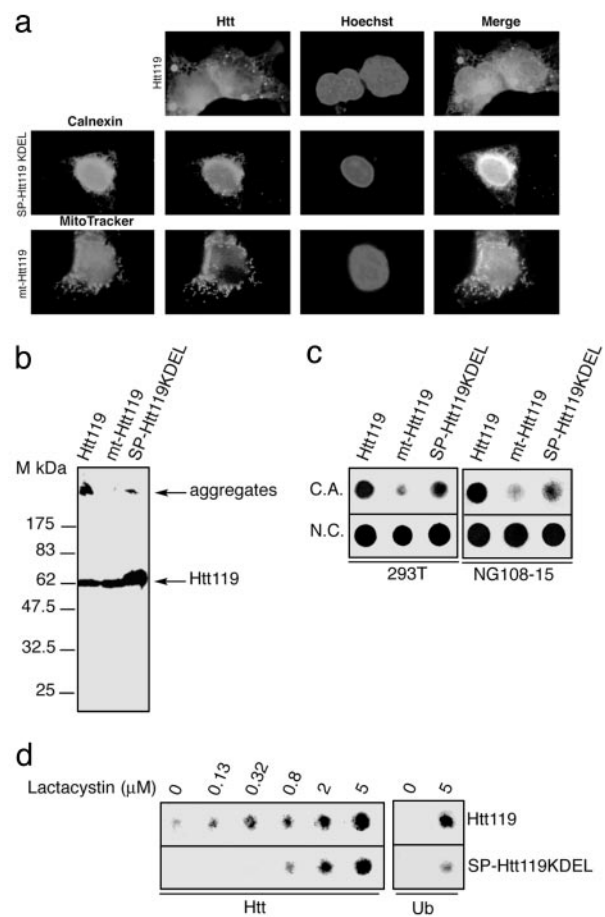


Fig. 4. Targeting of Htt119 to the ER or mitochondria markedly reduces its ability to aggregate. (a) Immunocytochemical detection of Htt derivatives in 293T cells transfected with the indicated constructs, 16 h posttransfection. Cells expressing SP-Htt73KDEL were costained with an anti-calnexin antibody. Cells transfected with mt-Htt119 construct were labeled with MitoTracker. Nuclei are stained with Hoechst. (b) Immunoblots with the 2B4 antibody of lysates from 293T cells 48 h posttransfection with the indicated constructs. (c) Filter retardation assay on cellulose acetate membrane (C.A.) of lysates from 293T or neuronal-like NG108-15 cells transfected with the indicated constructs. (Lower) Samples were spotted in duplicate on a nitrocellulose (N.C.) membrane, 0.2- μ m pore size, as loading control. (d) Filter retardation assay with cells extracts of 293T cells transfected with Htt119 and SP-Htt119KDEL either left untreated or treated with or 0.13, 0.32, 0.8, 2, and 5 μ M lactacystin 16 h and revealed by immunoblot with huntingtin or ubiquitin antibody.

aggregate is not restricted to 293T cells, because our findings are fully reproduced in neuronal-like NG108-15 cells. Because both SP and mitochondrial targeting sequence presequences are cleaved upon import in the ER and mitochondria, respectively (20, 33) (Fig. 2*d*), it is unlikely that their addition is responsible for the solubility of the polyQ-containing proteins of pathological length in the ER and mitochondria. More importantly, the ER-targeted SP-Htt73KDEL and SP-Htt119KDEL-derived proteins aggregate when they are retrotranslocated to the cytosol, indicating that these artificially created proteins are fully aggregation-competent.

Our findings imply the existence of cellular factors dramatically modulating polyQ aggregation. Antiaggregation factors might prevent polyQ aggregation in the ER and the mitochondria. Such factors would be present under basal conditions because expression of SP-HttKDEL proteins does not lead to a detectable ER stress induction (Fig. 1*b*). Alternatively, cytosolic

cofactors might be required to assist or even catalyze expanded polyQ aggregation. Identification of factors modulating polyQ aggregation becomes of first importance in the comprehension of the heretofore mysterious origin of this process and because such factors will serve as therapeutic targets. Whether protein sequestered within polyQ aggregates, such as chaperones or transcription factors (4), participates in aggregate formation is one path to explore. Remarkably, in yeast, deletion of the chaperone-encoding gene *Hsp104* completely prevents aggregation of a protein containing as many as 103 glutamines (34). In addition, deletion of *HSP104* irreversibly cures all three yeast prions (35). Alteration of other chaperone expressions modulates polyQ aggregation and prion conversion and propagation to a more subtle extent (35). Whereas no *HSP104* orthologue (36) has been identified so far in mammals, our results prompt us to suggest the existence of a functional analogue.

The behavior of the SP-HttKDEL derivatives strikingly resembles the one of the mammalian prion protein PrP, which conversion into an aberrant conformation occurs in the cytosol (37–41). PrP is a protein that naturally traffics through the secretory route and that appears in the cytosol by retrograde translocation out of the ER (38, 39). The striking common properties of the extended polyQ-containing SP-HttKDEL pro-

teins and PrP protein further underscore common mechanistic features in aggregate formation of pathological polyQ-containing proteins and PrP conversion into pathogenic conformation. A protein X, yet to be identified, was proposed to assist PrP conversion to the *scrapie* conformation (42). The results presented here might, therefore, apply to other misfolding diseases such as prion disorders and Alzheimer's and Parkinson's diseases, and an aggregation cofactor might be common to the aforementioned misfolding diseases. As recently suggested, an RNA might also participate in the aggregation of proteins involved in neurodegenerative diseases (43). This work provides a robust and simple experimental system for identification of pathological protein aggregation modulators.

We thank Bruno Goud and Franck Perez (Institut Curie, Paris) for insightful discussions and reagents, Frédéric Saudou (Institut Curie, Orsay, France) for 171-17 and 171-73 constructs, Didier Devys (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire) for pTL-Flag125 construct, Liliana Paslaru for help with antibodies, Elisabeth Scheer for advice with the transfections, Anne Levesque for excellent technical assistance, and Xavier Jacq for valuable comments on the manuscript. This work was supported by Groupement d'Intérêt Scientifique Infections à Prions, and B.D. is a recipient of an MRT fellowship. L.B.-H. and Y.T. are supported by the Hereditary Disease Foundation.

- Taylor, J. P., Hardy, J. & Fischbeck, K. H. (2002) *Science* **296**, 1991–1995.
- Sherman, M. Y. & Goldberg, A. L. (2001) *Neuron* **29**, 15–32.
- Orr, H. T. (2001) *Genes Dev.* **15**, 925–932.
- Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, M. K. & Hartl, F. U. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, Suppl. 4, 16412–16418.
- Soto, C. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 49–60.
- Selkoe, D. J. (2003) *Nature* **426**, 900–904.
- Temussi, P. A., Masino, L. & Pastore, A. (2003) *EMBO J.* **22**, 355–361.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. (1999) *Science* **286**, 1888–1893.
- Carrard, G., Bulteau, A. L., Petropoulos, I. & Friguet, B. (2002) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1461–1474.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P. & Aronin, N. (1997) *Science* **277**, 1990–1993.
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Scherzinger, E., Wanker, E. E., Mangiarini, L. & Bates, G. P. (1997) *Cell* **90**, 537–548.
- Cooper, J. K., Schilling, G., Peters, M. F., Herring, W. J., Sharp, A. H., Kaminsky, Z., Masone, J., Khan, F. A., Delanoy, M., Borchelt, D. R., et al. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 783–790.
- Lunkes, A. & Mandel, J. L. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1355–1361.
- Martindale, D., Hackam, A., Wiczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi-Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S. U., et al. (1998) *Nat. Genet.* **18**, 150–154.
- Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M. & Finch, J. T. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5355–5358.
- Yamamoto, A., Lucas, J. J. & Hen, R. (2000) *Cell* **101**, 57–66.
- Yang, W., Dunlap, J. R., Andrews, R. B. & Wetzel, R. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2905–2917.
- Sanchez, I., Mahlke, C. & Yuan, J. (2003) *Nature* **421**, 373–379.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. & Greenberg, M. E. (1998) *Cell* **95**, 55–66.
- Munro, S. & Pelham, H. R. (1986) *Cell* **46**, 291–300.
- Lunkes, A., Lindenberg, K. S., Ben-Haiem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G. B., Mandel, J. L. & Trottier, Y. (2002) *Mol. Cell* **10**, 259–269.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrach, H. & Wanker, E. E. (1997) *Cell* **90**, 549–558.
- Munro, S. & Pelham, H. R. (1987) *Cell* **48**, 899–907.
- Hazeki, N., Tukamoto, T., Goto, J. & Kanazawa, I. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 386–393.
- Mori, K. (2000) *Cell* **101**, 451–454.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. & Dawson, A. P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2466–2470.
- Sylvestre, J., Margeot, A., Jacq, C., Dujardin, G. & Corral-Debrinski, M. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 3848–3856.
- Kopito, R. R. (1997) *Cell* **88**, 427–430.
- Tsai, B., Ye, Y. & Rapoport, T. A. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 246–255.
- Waelter, S., Boeddrich, A., Lurz, R., Scherzinger, E., Lueder, G., Lehrach, H. & Wanker, E. E. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 1393–1407.
- Jana, N. R., Zemskov, E. A., Wang, G. & Nukina, N. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1049–1059.
- Ciechanover, A. & Brundin, P. (2003) *Neuron* **40**, 427–446.
- Pfanner, N. & Geissler, A. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 339–349.
- Krobitsch, S. & Lindquist, S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1589–1594.
- Uptain, S. M. & Lindquist, S. (2002) *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 703–741.
- Parsell, D. A., Sanchez, Y., Stitzel, J. D. & Lindquist, S. (1991) *Nature* **353**, 270–273.
- Ma, J. & Lindquist, S. (1999) *Nat. Cell Biol.* **1**, 358–361.
- Yedidia, Y., Horonchik, L., Tzaban, S., Yanai, A. & Taraboulos, A. (2001) *EMBO J.* **20**, 5383–5391.
- Ma, J. & Lindquist, S. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14955–14960.
- Ma, J., Wollmann, R. & Lindquist, S. (2002) *Science* **298**, 1781–1785.
- Ma, J. & Lindquist, S. (2002) *Science* **298**, 1785–1788.
- Kaneko, K., Zuilianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10069–10074.
- Deleault, N. R., Lucassen, R. W. & Supattapone, S. (2003) *Nature* **425**, 717–720.

Article 2

‘The proteasomal chaperones Rpt6 and Rpt4 control misfolding of proteins with a polyglutamine expansion’.

Rousseau, E., Kojima, R. and Bertolotti, A.
Submitted to Nature Cell Biology

The proteasomal chaperones Rpt6 and Rpt4 control misfolding of proteins with a polyglutamine expansion

Erwann Rousseau, Rieko Kojima and Anne Bertolotti

The MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 0QH, UK

Contact: aberto@mrc-lmb.cam.ac.uk. Phone : 44 (0)1223 402203, Fax: 44 (0)1223 402310

Deposition of misfolded and ubiquitinated proteins with expanded polyglutamine is a hallmark of Huntington's disease and other neurodegenerative disorders. Impairment of the proteolytic function of the proteasome has been reported to be both a cause and a consequence of polyglutamine accumulation. Here we report the finding that overexpression of the chaperone subunits of the proteasome, Rpt6 and Rpt4, increases mutant Huntingtin misfolding and aggregation, while reducing Rpt6 levels decreases inclusion formation. Interfering with the delivery of polyglutamine-containing proteins to the proteasome promotes accumulation of the soluble, but not the aggregated, protein. When fused to the ornithine decarboxylase destabilizing sequence, proteins with expanded polyglutamine are efficiently degraded. These findings reveal, that aggregation of proteins with expanded polyglutamine is not a consequence of a catalytic failure of the 20S proteasome. Rather, aggregation is elicited when chaperone subunits of the 19S particle are uncoupled from the proteolytic 20S proteasome.

Deposition of proteins of aberrant conformation is the generic feature of several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), prion disorders and polyglutamine expansion disorders ¹. In affected neurons, the disease-specific proteins accumulate in an amyloid or amyloid-like state characterized by a common cross- β structure in which β -strands run perpendicular to the axis of the fibril. The common structure of the pathogenic conformer of the disease-related proteins is in sharp contrast to the fact that the amyloidogenic proteins do not exhibit any sequence similarities or common structural motifs in their native state ². Thus, a structural transition must occur to convert the different native structures into the common cross- β -sheet structure ³.

HD is caused by the expansion of the polyglutamine stretch in the amino-terminal region of Huntingtin (Htt), which acquires neurotoxic properties over time ⁴. HD provides a powerful model to study pathological protein misfolding because it is an autosomal dominant inherited disease. HD patients possess the polyQ expansion in Htt throughout their life while the disease is mostly late onset. Proteolysis of Htt is the earliest event in the pathogenesis of HD by generating amino-terminal products encompassing the polyQ

expansion that accumulate in neurons where they form nuclear and cytoplasmic aggregates and somehow cause neurodegeneration⁵⁻⁷. However, it has not been addressed whether proteolysis of Htt is sufficient to convert a benign protein into a pathogenic one. The aggregation process of polyQ has been well described in vitro using small synthetic peptides^{5,8}. However, in inclusions of HD patients, Htt amino-terminal fragments contain additional sequences⁹. The polyQ expansion in Htt is immediately followed by a proline-rich region, which strongly antagonizes aggregation¹⁰⁻¹². Thus, in the context of the amino-terminal fragment of Htt, some trigger ought to be required to convert the soluble protein into an aggregation-prone one.

Because amyloid formation occurs in vitro in the absence of catalysts, it has been largely assumed that amyloidogenesis will occur spontaneously in cells, as long as a critical concentration is reached. The fact that protein inclusions are often ubiquitinated in neurodegenerative diseases has suggested that deficient clearance of amyloidogenic proteins by the proteasome causes the formation of these inclusions¹³. In support of this idea, inhibitors of the proteolytic activity of the proteasome augment aggregation of proteins with a polyQ expansion¹⁴⁻¹⁶. Yet, conflicting studies question whether or not the proteasome degrades extended polyQ stretches¹⁷⁻²⁰. In turn, accumulation of expanded polyQ further impairs proteasomal degradation^{21,22}.

Here we report that ATPase subunits of the proteasome, Rpt6 and Rpt4, control misfolding and aggregation of Htt amino-terminal fragments with a pathological polyQ expansion in mammalian cells. These findings suggest that these proteins are responsible for eliciting unfolding of mutant Htt fragments and thereby trigger aggregation when unfolding is not tightly coupled to degradation. Fusion of Htt to the destabilizing sequence of ornithine decarboxylase, an evanescent protein, promotes efficient degradation of Htt with expanded polyQ. These results indicate that the route by which an aggregation prone-protein is targeted to the proteasome is critical in determining its fate.

RESULTS

A search for functional analogues of the yeast chaperone Hsp104

Aggregation of peptides with a long polyQ stretch can occur spontaneously in

vitro but in yeast, requires the presence of the chaperone Hsp104²³. While chaperones are widely conserved throughout evolution, there is no mammalian orthologue of Hsp104. The typical feature of Hsp104 and the bacterial ATPase ClpB proteins is the presence of 2 AAA domains and a middle region or M-domain, resulting in a coiled-coil structure, which is essential for the Hsp104/ClpB protein remodeling function^{24,25}. AAA ATPases in available databases were examined aiming to identify human proteins containing both a coiled-coil and an AAA domain. We found that only the ATPase subunits of the 19S proteasome, Rpt6 (SUG1), Rpt4 (SUG2), Rpt3, Rpt2 and Rpt1, exhibit these specific features, prompting us to investigate whether Hsp104 and 19S ATPases are functionally related in modulating aggregation of mutant Htt fragments.

Overexpressed Rpt6 and Rpt4 form an oligomeric complex that dramatically enhance expanded polyQ accumulation

As a first attempt to determine whether 19S ATPases are involved in aggregation of Htt with expanded polyQ, we overexpressed each individual subunit together with Htt73. Increasing the levels of Rpt6 or Rpt4 led to a remarkable and dose-dependent increase of both the SDS-soluble and SDS-insoluble forms of Htt73, as revealed by immunoblots and filter retardation assays (Fig. 1a). Overexpression of Rpt3 modestly enhanced accumulation of SDS-soluble and aggregated Htt73, in contrast to Rpt2, Rpt1 and Rpt5, which had no significant effect (Fig. 1a). Northern blot analyses were carried out with cells co-expressing Rpt6 with Htt73 and revealed that the effects of Rpt6 overexpression on Htt accumulation were not due to changes at the level of Htt mRNA (data not shown). Because polyQ expansion affects several proteins involved in distinct neurodegenerative diseases, we tested whether Rpt6 levels affected accumulation of ataxin-3, a protein unrelated to Htt, which contains a polyQ expansion in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA-3). Rpt6 overexpression dramatically enhanced mutant ataxin-3 aggregation but had no effect on wild-type ataxin (Fig. 1b). Rpt6 overexpression also increased the steady state level of wild-type Htt but did not convert this soluble protein into an aggregated one (Fig. 1c).

It has been previously reported that proteasome inhibition increases accumulation of Htt¹⁴⁻¹⁶. Therefore, it was important to determine whether Rpt6 or Rpt4

overexpression generally impairs proteasomal degradation, thereby enhancing accumulation of expanded polyQ. Epoxomycin, which blocks the catalytic activity of the 20S proteasome, provoked accumulation of both soluble and aggregated Htt73, or aggregated mutant ataxin-3 (Fig. 1b and d), together with total cellular polyubiquitinated proteins (Figure 1e). While Rpt6 or Rpt4 overexpression had an effect on Htt73 accumulation similar to Epoxomycin treatment (Fig. 1d), we found that overexpressing these 19S subunits did not substantially impair degradation of total cellular polyubiquitinated proteins (Fig. 1e). This result suggests that Rpt6 or Rpt4 overexpression does not globally impair proteasomal degradation. To confirm this observation, we analyzed whether the catalytic activity and the structural integrity of the proteasome were affected upon overexpression of 19S ATPases. Native gels were used to resolve proteasome complexes in cells that were either mock transfected or transfected with constructs encoding subunits of the 19S proteasome. In agreement with the finding that overexpression of Rpt6 or Rpt4 did not promote massive accumulation of polyubiquitinated proteins, we found that the proteolytic activity of the proteasome revealed by in-gel peptidase assays (Fig. 2a and b) and its integrity, revealed by immunoblots performed on native gels (Fig. 2c-e), were unaltered. These analyses indicate that overexpression of 19S ATPases does not interfere with the assembly, the integrity or the activity of the proteasome. Overexpressed Rpt6 or Rpt4 migrated in the middle of the 4% native gel, slightly below the 20S core proteasome complex (Fig. 2c-e) suggesting that they form oligomeric complexes, a typical feature of AAA ATPases²⁶. To further characterize the state of overexpressed Rpt4 and Rpt6, we analyzed the distribution of proteasome complexes by glycerol gradient fractionation. To allow distinction between the endogenous and overexpressed Rpt6 and Rpt4, we used a Flag-tagged version of these proteins. This modification did not perturb the function of the protein, since Rpt6-Flag could rescue the conditional lethality of yeast cells bearing a mutation in this essential gene (Fig. S1). 19S and 20S subunits as well as the proteolytic activity of the proteasome were localized in the high molecular weight fractions 8 and 9 indicating that these fractions are likely to contain the 26S proteasome (Fig. 2f). Overexpression of Rpt4 or Rpt6 did not alter the sedimentation of the proteasome or its proteolytic activity (Fig. 2f). Altogether, these observations indicate that overexpressed

Rpt6 and Rpt4 enhance polyQ accumulation by a mechanism other than proteasome inhibition. In addition to the 26S proteasome, 19S subunits were also found in lower molecular weight fractions devoid of 20S subunits and proteolytic activity (Fig. 2f, fractions 2-4). This sedimentation profile is reminiscent of the gel filtration profile of the free 19S complex²⁷. Overexpressed Rpt6 and Rpt4 sedimented similarly to the free 19S complex. This indicates that in mammalian cells 19S proteasome subunits are engaged in 2 complexes: the 26S proteasome and free 19S complexes. Overexpressed Rpt6 or Rpt4 form a complex with sedimentation properties similar to those of the free 19S proteasome. This Rpt Containing Complex (RCC) enhances accumulation of Htt73.

Rpt6 and Rpt4 enhance misfolding and aggregation of mutant Htt

Because AAA proteins are chaperones involved in protein remodelling, we next tested whether Rpt6 and 4 alter the characteristics of Htt²⁶. Biochemical fractionation studies revealed that nearly all the SDS-soluble Htt73 that accumulated upon Rpt6 or Rpt4 overexpression was NP40-insoluble, suggesting that it was in a pre-aggregated misfolded state (Fig. 3a-c and Fig. S2a and b). Because polyQ aggregation is concentration-dependent, we next asked whether the cellular capacity for soluble Htt73 was saturated when Htt73 accumulation was augmented as a consequence of Rpt6 or Rpt4 overexpression. To address this question, we expressed large amounts of Htt73 alone and found that a 10- and 20-fold increase in the SDS-soluble protein only leads to a modest increase of aggregated Htt73 (Fig. 3a-c and Fig. S2a and b). Thus, 293T cells can accumulate a large amount of NP40-soluble Htt73 suggesting that aggregation requires not only a high protein concentration, but also an active process. Rpt6 or Rpt4 overexpression enhances Htt73 accumulation in a misfolded (SDS-soluble, NP40-insoluble) or aggregated (SDS- and NP40-insoluble) state, indicating that Rpt6 and Rpt4 convert soluble Htt into misfolded species. To further characterize the effect of Rpt6 and Rpt4 on Htt73, Htt73 tagged with GFP was overexpressed either alone or together with Rpt6 or Rpt4 (Fig. 3d and Fig. S2c). While cells expressing Htt73-GFP alone contained either diffuse fluorescence or small fluorescent foci, cells co-expressing Htt73-GFP and Rpt6 or Rpt4 contained large inclusions (Fig. 3d). This was also observed in primary neuronal cells expressing Htt73-GFP alone or together with Rpt6, indicating that Rpt6

enhances misfolding and aggregation of Htt with a polyQ expansion, regardless of cell type (Fig. 3e). Having shown that increasing the abundance of RCC promotes mutant Htt misfolding, we next tested whether we could interfere with the endogenous complex. Because Rpt6 and Rpt4 are highly homologous proteins, we focused on Rpt6. Two specific siRNA targeted against Rpt6 were designed and they significantly reduced the levels of Rpt6 as well as the levels of Htt inclusions in primary neurons, when compared to control siRNA (Fig. 4). This result shows that endogenous Rpt6 controls Htt inclusion formation.

Domains important for Rpt6 aggregation enhancer activity

We next sought to determine which domains were important for the activity of Rpts. Deletion mutants were generated and analyzed in co-transfection experiments for their ability to enhance Htt73 aggregation. Deletion of the amino-terminal 149 amino acids of Rpt6, generated a protein fragment, Rpt6₁₅₀₋₄₀₆ which retained the AAA domain and was an even more active aggregation enhancer than the full-length protein, considering that it was expressed at a much lower level (Fig. 5b and c). In contrast, expressing the first 149 amino acids of Rpt6 had no effect on Htt73 aggregation, despite the fact that this protein fragment was expressed at a similar level as Rpt6₁₅₀₋₄₀₆ (Fig. 5b and c). This result suggests that the AAA domain of Rpt6 is sufficient on its own to promote aggregation of Htt73. However, while ATP binding and hydrolysis are important for AAA function, lysine 196 in the ATP-binding domain was not essential for the activity of overexpressed Rpt6 (Fig. 5d and e). It is possible however, that the RCC formed upon overexpression of Rpt6 contains ATPase activity contributed by endogenous Rpts.

Amongst the six 19S ATPases, three function as aggregation enhancers of Htt73 (Fig. 1a). When the domain composition of these related proteins was carefully examined, we found that the three ATPases enhancing polyQ aggregation Rpt6, Rpt4 and Rpt3, possess a coiled-coil domain of nearly 50 amino acids. In contrast, the 19S ATPases unable to enhance polyQ aggregation have either no coiled-coil region (Rpt5) or only a short one (Rpt1, Rpt2), according to domain predictions with the web-based tool, *SMART*. The importance of the equivalent M-region of the bacterial ATPase ClpB and the yeast Hsp104 suggested that this finding might not be fortuitous. We thus

deleted the coiled-coil region in Rpt6 and found that while Rpt6₈₀₋₄₀₆ was expressed at levels similar to the full-length protein, this mutant lacking the coiled-coil domain was inactive towards polyQ aggregation (Fig. 5d and e). This result is somewhat surprising since the AAA domain of Rpt6 alone was sufficient for enhancing Htt73 aggregation and suggests that the region between the coiled-coil and the AAA domain might inhibit the AAA function. The coiled-coil domain might alleviate this inhibition.

Rpt6 interacts with Htt

The results presented so far indicate that Rpt6 and Rpt4 remodel the Htt amino-terminal fragment with a polyQ expansion, thereby triggering their misfolding and aggregation. We next tested whether a direct interaction between Rpt6 and Htt73 could mediate this effect. Co-immunoprecipitation experiments were carried out from cells expressing empty vector, Htt73 and Htt73 together with Rpt6. Htt immunoprecipitated with the monoclonal antibody 2b4 co-precipitated overexpressed Rpt6, while control antibody did not (Fig. 6a). Because the amount of complex recovered by immunoprecipitation was rather low, we pursued this interaction study by two other approaches. To determine whether Rpt6 and Htt73 interact directly, recombinant Rpt6 and mutant derivatives were produced in *E. coli* as fusion proteins with GST and immobilized on glutathione beads. NP40 lysates containing Htt73 produced in 293T cells were then perfused on GST, GST-Rpt6, GST-Rpt6_{K196H}, GST-Rpt6₁₅₀₋₄₀₆, and GST-Rpt6₁₋₁₄₉. Htt73 was selectively retained on GST-Rpt6, GST-Rpt6_{K196H} and GST-Rpt6₁₅₀₋₄₀₆ (Fig. 6b and c). These interaction data are in good agreement with the co-expression experiments and indicate that the effect of Rpt6 on Htt aggregation is mediated by a direct interaction. We next sought to determine whether the interacting Rpt6 and Htt73 co-localize in nerve cells. Remarkably, Rpt6 staining was extremely intense around polyQ aggregates, in contrast to its diffuse and mostly nuclear localization in untransfected cells (Fig. 6d). Similarly, Rpt4 and Rpt3 were massively redistributed around polyQ aggregates, in contrast to the other 19S ATPases, inactive towards mutant Htt aggregation (Fig. S3 and data not shown). The 20S proteasome was mostly not enriched around the polyQ aggregates, illustrating the existence of free 19S complex in neuronal cells (Fig. 6d).

Interfering with Htt73 recognition by the proteasome reduces aggregation

So far, our observations indicate a RCC lacking 20S subunits, binds and subsequently triggers misfolding and aggregation of Htt73, suggesting that Htt aggregation may arise as a consequence of polyQ targeting to the 19S proteasome or some sub-complexes containing Rpt6 or Rpt4. We thus attempted to prevent delivering Htt to the proteasome. Because nearly all inclusions are ubiquitinated in HD patients, it is likely that ubiquitination is involved in targeting Htt to the proteasome²⁸. Aiming to compete with the targeting of polyubiquitinated polyQ to the proteasome, we increased the level of the proteasome subunit S5a, responsible for binding polyubiquitinated substrates²⁹. Overexpression of S5a in cells led to a massive increase of soluble Htt73, indicating that degradation of Htt73 was efficiently blocked when the ubiquitin-recognition component of the proteasome was in vast excess (Fig. 7a). Despite the massive augmentation of soluble Htt73 observed upon S5a overexpression, there was only a slight increase of misfolded (SDS-soluble, NP40-insoluble) or aggregated (NP40- and SDS-insoluble) Htt (Fig. 7a and b). To determine the mechanism by which S5a stabilized Htt73 in a soluble state, we purified ubiquitinated proteins. While ubiquitin conjugates (Fig. 1e) and ubiquitinated polyQ aggregates (Fig. 8c) are readily detectable, we could not detect or purify ubiquitinated Htt73 to an appreciable level, unless S5a was overexpressed (Fig. 7c and data not shown). This indicates that polyubiquitinated Htt73 is an evanescent intermediate that is stabilized upon S5a overexpression. Observations by fluorescence microscopy revealed that S5a overexpression augmented the number of Htt73 expressing cells containing diffuse fluorescence or small foci, as opposed to cells containing large fluorescent foci when Htt73 was expressed alone (Fig. 7d). The structural integrity and the catalytic activity of the proteasome evaluated by in-gel peptidase assays and fractionation of cell lysates followed by immunoblots and peptidase assays revealed that overexpressing S5a did not disrupt the proteasome complexes or blocked proteasomal function (Fig. S4). In light of the other findings reported in this manuscript indicating that Htt misfolding is initiated at the level of the 19S proteasome, we conclude that overexpression of S5a stabilizes Htt by masking the proteasome targeting signal. Consequently, Htt73 accumulates but is largely

unaggregated.

Fusing mutant Htt to the ornithine decarboxylase destabilizing sequence allows efficient degradation and prevents aggregation

Since Htt is addressed to the proteasome by a ubiquitin-dependent pathway, we investigated what would be its fate if targeted to the proteasome by the degradation pathway utilized by the evanescent protein ornithine decarboxylase (ODC)³⁰. The 37 carboxy-terminal amino acids of ODC have been found to be an efficient and autonomous destabilizing sequence when fused to heterologous proteins³⁰. We tested whether fusing ODC destabilizing sequence to Htt73 could enhance its degradation. Htt73 and Htt73ODC were expressed in 293T cells. While both soluble and aggregated Htt73 were readily detected by immunoblots and filter retardation assays, Htt73ODC was hardly detectable, even when large amounts of DNA encoding this protein were transfected, suggesting that the protein was very rapidly and efficiently degraded (Fig. 8a). We confirmed that, Htt73ODC was fully degraded and did not escape our detection (Fig. S5). When the proteolytic capacity of the proteasome was compromised, Htt73ODC was stabilized, confirming that Htt73ODC is a proteasome substrate (Fig. 8b, right panel). However, Rpt6 overexpression had virtually no effect on Htt73ODC (Fig. 8b, right panel). The fact that Htt73ODC is insensitive to Rpt6 overexpression, but is stabilized by inhibition of the catalytic activity of the proteasome, further supports the conclusion that Rpt6 overexpression does not perturb proteasomal degradation. When the ability of the proteasome to degrade proteins is compromised, small but detectable amounts of Htt73ODC aggregates were found by means of their retention on a cellulose acetate filter and these aggregates stained positive for ubiquitin (Fig. 8c). These observations suggest that, when the catalytic activity of the proteasome is compromised, a small amount of Htt73ODC is re-oriented to the ubiquitin-dependent pathway and recovers its ability to aggregate. The finding that the ODC destabilizing sequence converts Htt73 into an evanescent protein indicates that the proteolytic capacity of the proteasome is not the limiting factor for mutant Htt degradation.

DISCUSSION

This study reveals that aggregation of mutant Htt fragments is controlled, in cells, by chaperone subunits of the 19S proteasome. When tightly coupled to the 20S proteasome, the unfolding activity of the 19S chaperone subunits delivers degradation competent substrates to the catalytic chamber of the proteasome and thereby enhances degradation. However, our findings shows that if the unfolding activity of the proteasomal chaperones is not tightly coupled to degradation, unfolded intermediates accumulate and these are aggregation-prone.

The function of the proteasome in protein degradation is well recognized, but there is also growing evidence indicating that 19S ATPases, in particular Rpt6, function beyond degradation^{31,32}. In HD patients, inclusions are often found in the nucleus, where a non-proteolytic function of the 19S proteasome has been extensively reported^{27,33-35}. A remodeling activity of Rpts independently of degradation provides a unifying mechanism to reconcile their diverse functions. Consistent with the aggregation-enhancing activity, Rpt6 activity has been mapped to its AAA ATPase domain. The fact that Rpt6 lacking the whole amino-terminal region strongly promotes Htt misfolding when expressed at much lower level than the full-length protein argues against the model whereby Rpt6 overexpression increases Htt aggregation as a result of a global overwhelming of cellular quality control. Furthermore, we found that increasing the levels of Rpt6 has no effect on the levels of cellular proteins such as Rpt4 (Fig. 1d, 3a), Vimentin (Fig.1, 5, 8), or the modified version of mutant Htt, Htt73ODC (Fig. 8b), and does not provoke massive accumulation of polyubiquitinated proteins (Fig. 1e). More importantly, reducing the levels of Rpt6 in primary neurons decreases inclusion formation. Together, these results indicate that Rpt6 has an active role in Htt misfolding. Strikingly, amongst the 19S ATPases, those enhancing aggregation of mutant Htt have the longest predicted coiled-coil domain, while the 19S ATPases inactive towards aggregation of Htt derivatives have either no coiled-coil or a much shorter one, further underscoring the importance of coiled-coil domains in AAA ATPase function. Further studies will be required to understand the requirement for ATP in this process, since overexpressed Rpt6 lacking a functional ATP-binding site enhances aggregation of Htt derivatives with a polyQ expansion. It is conceivable that ATP is not required for the

remodeling activity of Rpt6, since an earlier study on the folding activity of the 19S proteasome revealed that ATP had no effect on its ability to promote conformational change ³⁶. Alternatively, overexpressed Rpt6 may form oligomeric complexes with the endogenous protein, the latter contributing the ATPase function to the complex.

Overexpressing Rpt6 or Rpt4 provokes an imbalance between unfolding and degradation thereby promoting protein misfolding and subsequent aggregation of aggregation-prone proteins such as Htt and SCA3 (Fig. 8d). The natural occurrence of such an imbalance between unfolding and degradation activity of the proteasome is underscored by the observations that the 19S regulatory particle disassembles during the catalytic cycle ³⁷ and that free 19S complex exist in different cells ^{27,34}. This suggests that in the disease process, misfolded aggregation-prone and presumably toxic species form when there is an imbalance between unfolding and degradation by the proteasome. Unfolding and degradation by the proteasome are clearly uncoupled in neurons where Rpts, but not 20S subunits, surround polyQ inclusions. Indeed, Rpt6 consistently surrounds Htt73 aggregates in primary neurons to such an extent that polyQ aggregates can be identified based on Rpt6 staining alone. This was also seen for Rpt4 and Rpt3, but not the other 19S ATPases. These results are remarkably consistent with overexpression experiments where we found that Rpt6, Rpt4 and to a lesser extent Rpt3, enhanced mutant Htt aggregation, while the other ATPases had no effect. In contrast, 20S proteasome was rarely found around polyQ aggregates in primary neurons, illustrating that 19S subunits also exist independently of 26S proteasome in neurons. It is noteworthy that immunocytochemical analyses in post-mortem brains of patients affected by spinocerebellar ataxia type 3, have revealed that polyQ inclusions were often stained with antibodies directed against 19S, but not 20S subunits ³⁸. These observations, together with the data presented here, indicate that misfolding of proteins with polyQ expansion and inclusion formation, is initiated by an unfolding event at the level of Rpt proteins, when unfolding is not tightly coupled to degradation. This phenomenon is more pronounced in neurons thereby increasing the risk for accumulation of unfolded aggregation-prone intermediates.

Although the three-dimensional structure of a protein is determined by its primary sequence, protein folding requires, the assistance of chaperones. Aggregation of

proteins causing neurodegenerative diseases can be viewed as a pathological folding reaction that involves a transition from a variety of different structures into a common cross- β -sheet structure. Studies of how polyQ rearrange from an unstructured into an amyloid-like conformation in vitro have generated valuable information^{5,8}. In addition, recapitulating amyloidogenesis in the test tube provides robust assays for the testing of novel therapies³⁹. While proteolysis is a pre-requisite for aggregation of Htt with the polyQ expansion, the findings reported here indicate that an unfolding event is also required to convert soluble mutant Htt amino-terminal fragment with a pathogenic polyQ stretch into an aggregated one. Although pure polyQ peptides are aggregation prone in vitro⁵, the polyQ stretch in Huntingtin is flanked by a proline-rich region, which profoundly antagonizes aggregation, underscoring the need for a remodeling event to elicit aggregation¹⁰⁻¹².

Because inhibition of the proteolytic activity of the proteasome increases Htt aggregation¹⁴⁻¹⁶, it has been proposed that aggregates form following accumulation of proteins with expanded polyQ. We found, however, that the cellular concentration of Htt fragment with expanded polyQ can be massively augmented without a significant increase in aggregates when Htt73 was co-expressed with the polyubiquitin receptor S5a. This implies that aggregation is not just a consequence of an increase in concentration but requires, in the cellular milieu, an active process. We propose that chaperone components of the proteasome participate in remodeling proteins with a polyQ expansion and when these unfolding intermediates are released rather than degraded, they form aggregates. Interestingly, chaperone activities have been reported for the 19S proteasome^{36,40}. When the proteolytic activity of the proteasome is compromised, ubiquitinated Htt derivatives may still be addressed to the 19S proteasome, which continues to unfold its substrates. As a consequence, unfolded, aggregation-prone proteins are released. Preventing mutant Htt delivery to the proteasome increases their concentration, but not their aggregation because the conformational transition required to initiate aggregation does not occur. We found that addition of ODC destabilizing sequence to mutant Htt profoundly destabilizes this aggregation-prone protein, by a molecular mechanism that remains to be elucidated. However, the fact that addition of the ODC destabilizing sequence converts mutant Htt

into an evanescent protein, shows unambiguously that the proteolytic capacity of the 20S proteasome is not a factor limiting mutant Htt degradation. Rather, misfolding and aggregation of proteins with polyQ expansion arise as a consequence of an uncoupling event between the unfolding activity of 19S chaperones and proteolysis by 20S proteasome.

In conclusion, the data presented here reveal that aggregation of proteins with polyQ expansion requires a transition from a benign to an aggregation-prone conformation, a process, which in cells, is dependent on 19S proteasome chaperones. Aggregation of proteins with a polyQ expansion is thus reminiscent of a typical folding reaction, requiring the assistance of chaperones.

METHODS

Each experiment was performed at least 3 times.

Cell culture and reagents

293T cells and HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and transfected in 6 or 12 wells plates by using the calcium phosphate method leading usually to >70% transfection efficiency. Routinely, 45 000 cells/ml were plated prior to transfection. For analytical experiments 0.25 µg of Htt73 encoding plasmid were transfected together with 0.125; 0.25; 0.5 µg of plasmid encoding 19S subunits except when indicated otherwise. For native gels, immunoprecipitation and interaction studies, transfection conditions were scaled up accordingly. Where indicated, cells were treated with Epoxomycin (CalBiochem).

Primary cultures of rat hippocampal neurons were prepared from E18 rats. Transfections were performed after 8 days of culture in 6 well plates with 0.5 µg of Htt73-GFP plasmid with or without 0.5 µg of Rpt6 plasmid and Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Plasmid constructs

Htt17 and Htt73 correspond to the first 171 amino acids of Htt, based on a protein containing 23Q, with either 17 or 73Q.

Rpt6_{wt} and Rpt6_{K196H} cDNAs were kindly provided by R. Losson and sub-cloned in the Hind III and Xho I restriction sites of pXJ41⁴¹.

The cDNAs encoding Rpt4, Rpt3, Rpt5, Rpt2, Rpt1 and S5a were amplified by RT-PCR from HeLa cells total RNA, flanked with EcoR I and Xho I sites and cloned into pXJ41 or pXJ41-HA (S5a).

Rpt6 mutants Rpt6₁₅₀₋₄₀₆, Rpt6₁₋₁₄₉, Rpt6₈₀₋₄₀₆ were generated by PCR flanked with Hind III and Xho I restriction sites and cloned in pXJ41. In Fig. 8a, Rpt6_{wt} or Rpt6_{K196H} tagged with a FLAG in their carboxy-terminus were used and thus migrate

slower than endogenous Rpt6 in SDS-PAGE.

To generate GFP fusion, Htt73 was PCR amplified, flanked with BamH I and Kpn I sites and cloned in the Bgl II and Kpn I sites of pEGFP-N2 (BD Biosciences).

To produce GST fusions, Rpt6 wild type or mutant cDNAs were cloned into the BamH I and Xho I restriction sites of pGEX-4T-3 vector in frame with GST (Amersham Biosciences).

The cDNA sequence coding for the last 52 amino acids of ornithine decarboxylase (ODC) was PCR amplified using pZS Proteasome Sensor (Clontech) as a template, flanked with Xho I and Xba I restriction sites and cloned in pCDNA 1/Amp vector (Invitrogen) containing Htt73 in order to produce Htt73ODC.

All the constructs were verified by DNA sequencing.

Small interfering RNAs

80pmol of double stranded RNA oligonucleotides directed against target sequence in rat Rpt6 (Rpt6 siRNA_1: ggattgacaggaaaattga, Rpt6 siRNA_2: ggagatcaaagaagtgatt) or control siRNA *Silencer* Negative Control #1 (Ambion) were transfected in primary hippocampal neurons 8 days after their plating in a 6 well plate using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Neurons were fixed 24h after transfection.

Knockdown of endogenous Rpt6 was verified by immunoblots and normalized to Vimentin protein.

Immunocytochemistry and Fluorescence microscopy

Transfected cells were fixed with 4% paraformaldehyde and labeled with indicated antibodies. Micrographs were taken at 100X magnification on a Leica TCS SP2AOBS confocal microscope or Leica DMRB Fluorescence microscope.

Immunoblotting and Filter Retardation Assay

Routinely, 70% confluent cells from a well of a 12 well plate were lysed in 140µl boiling Laemmli Buffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 25 mM DTT, 7.5% Glycerol, 0.05% Bromophenol blue) for immunoblot analysis or 140 µl ice-cold NP40 buffer (25

mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP40, 300mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 µg/ml Pepstatin, Leupeptin and Aprotinin) for fractionation experiments. 18 µl of protein extracts were loaded on 10% SDS-PAGE and transferred to Optitran BA-S 83 reinforced Nitrocellulose membrane (Whatman, Schleicher & Schuell). For ubiquitin immunoblots, protein samples were separated on Tricine-SDS-PAGE as described in ⁴² and transferred to Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA).

Equal loading of protein extracts analyzed by immunoblot was controlled by Ponceau Red staining.

Filter retardation assays were performed as described in ⁴³. Membranes were saturated in 5% dried skimmed milk in PBS and probed with Htt 2b4 antibody unless specified. The appropriate secondary antibody coupled to peroxidase was revealed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent kit (Pierce, Rockford, IL).

Chemiluminescent images were acquired using the Chemi-Smart 5000 (Vilber-Lourmat) allowing quantitative detection of chemiluminescence. Signals of interest were quantified using Bio-1d software (Vilber-Lourmat).

Antibodies

For immunocytochemistry, primary antibodies were diluted as follows: 1:1000 dilution for Tau-1 antibody (Chemicon), α7 (PW8110 BIOMOL) and 1:5000 dilution for Rpt6 antibody (SUG-1b8, Euromedex).

For immunoblots, antibodies were used as follows: 1:5000 for Htt 2b4 antibody and 1:1000 for antibodies against proteasome subunits. In Fig. 8b and D, Rpt6 polyclonal serum (PW8320 BIOMOL) was used. Rpt4 (ab22639), Rpt3 (ab22634), Rpt5 (ab22635), Rpt2 (ab3317) and Rpt1 (ab3322) antibodies were from Abcam. Ubiquitin was revealed with a polyclonal serum (U5379, Sigma) used at a 1:1000 dilution except in Fig. 8 where a 1:200 dilution of FK2 (MBL, Woburn, MA) was used. Vimentin antibody V 6630 (Sigma) was used at a 1:500 dilution.

GFP antiserum (BD Biosciences) was used as a control antibody (Fig. 8a).

Immunoprecipitation

293T cells were plated 24h prior to transfection in 10 cm dishes at a density of

80000 cells/ml. Transfection were performed with 2.5 µg of Htt73 alone or with 5 µg of Rpt6-Flag or Rpt6_{K196H}-Flag encoding plasmids. 48h post-transfection, cells were washed with ice-cold PBS, lysed in 1 ml 0.2% NP40 buffer (0.2% NP40, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 µg/ml Pepstatin, Leupeptin and Aprotitin), left 10 minutes on ice and clarified by centrifugation at 16000g for 10 min. Soluble proteins were immunoprecipitated with 2 µl of the anti-Rpt6, anti-GFP or anti-Htt monoclonal antibodies together with 100 µl of protein G Sepharose overnight at 4°C. Beads were then washed three times in 0.2% NP40 buffer and 20 µl were resolved by 10% SDS-PAGE under reducing conditions, transferred to nitrocellulose membranes and revealed with corresponding antibodies.

GST pull down assay

GST and GST fusion proteins were expressed in E. coli strain BL21 (DE3) pLysS and purified by glutathione Sepharose chromatography. For each pull down experiment, about 0.1 µg of GST or GST-Rpt6 fusion protein was incubated with Htt73 produced in 293T cells and extracted in 1% NP40 buffer. After 3 hours incubation at room temperature, beads were washed 3 times for 5 minutes in 1% NP40 buffer and complexes were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblot.

Purification of ubiquitinated proteins

One 10 cm dish containing cells expressing hexahistidine-tagged ubiquitin (H6-Ub) alone or together with Htt73 and S5a were lysed in 1 ml of 6 M Urea buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazole and 6M Urea) and sonicated. Extracts were incubated with 20 µl of Ni-NTA Agarose beads (QIAGEN) for 2 h at room temperature. Beads were washed twice with buffer containing 5 mM Imidazole and twice with the same buffer containing 40 mM Imidazole. Bound proteins were then analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblot.

Native gels

One day before transfection, 45 000 cells (293T) were plated in 6 cm dish. 48h after transfection, cells were collected in 200 µl of proteasome lysis buffer (50 mM Tris-

HCl pH 8.0, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 1mM DTT and 5mM ATP). Lysates were clarified by centrifugation and 12 µl were analyzed on native gels as described in ⁴⁴. Suc-LLVY-AMC and Z-LLE-MCA were from BIOMOL.

Glycerol-gradient sedimentation.

225 000 cells were plated in a 5 cm dish and transfected with empty vector or indicated constructs 24h after plating. Cells were lysed 40h post-transfection in 200 µl proteasome lysis buffer. Extracts were clarified by centrifugation and were fractionated through linear 20–40% glycerol gradients in polyallomer tubes of 11X60 mm for 13 h at 40 000 rpm in a SW60 rotor (Beckman Coulter). Each 4-ml gradient was collected into 14 equal fractions of 300 µl. Aliquots of each fraction were subjected to immunoblots and peptidase assay.

Proteasome activity.

Assays for proteasome activity were performed using the substrate Suc-LLVY-AMC as described in ⁴⁵.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are extremely grateful to Aude Derevier for preparing neuronal hippocampal cells, to Harm Kampinga for the SCA22 and SCA82 constructs, to Olivier Coux and Xavier Jacq for stimulating discussions and to Michel Goedert and Nigel Unwin for inspiring comments on the manuscript. This work was initiated with support from the *Fondation pour La Recherche sur le Cerveau* and the *Fondation NRJ-Institut de France*. AB is a recipient of the EMBO Young Investigator Programme award and ER is supported by a fellowship from the French *Ministère de la Recherche et de la Technologie* and the Medical Research Council.

REFERENCES

1. Soto, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **4**, 49-60. (2003).

2. Temussi, P. A., Masino, L. & Pastore, A. From Alzheimer to Huntington: why is a structural understanding so difficult? *Embo J* **22**, 355-61. (2003).
3. Uversky, V. N. & Fink, A. L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta* **1698**, 131-53 (2004).
4. Zoghbi, H. Y. & Orr, H. T. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* **23**, 217-47 (2000).
5. Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M. & Finch, J. T. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5355-8. (1994).
6. Davies, S. W. et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* **90**, 537-48. (1997).
7. DiFiglia, M. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-3. (1997).
8. Chen, S., Ferrone, F. A. & Wetzel, R. Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11884-9 (2002).
9. Lunke, A. et al. Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Mol Cell* **10**, 259-69. (2002).
10. Bhattacharyya, A. et al. Oligoproline effects on polyglutamine conformation and aggregation. *J Mol Biol* **355**, 524-35 (2006).
11. Dehay, B. & Bertolotti, A. Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J Biol Chem* **281**, 35608-15 (2006).
12. Duennwald, M. L., Jagadish, S., Muchowski, P. J. & Lindquist, S. Flanking sequences profoundly alter polyglutamine toxicity in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11045-50 (2006).
13. Ciechanover, A. & Brundin, P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases. Sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* **40**, 427-46. (2003).
14. Wyttenbach, A. et al. Effects of heat shock, heat shock protein 40 (HDJ-2), and proteasome inhibition on protein aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2898-903 (2000).
15. Jana, N. R., Zemskov, E. A., Wang, G. & Nukina, N. 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**, 1049-59. (2001).
16. Waelder, S. et al. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* **12**, 1393-407. (2001).
17. Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N. & Goldberg, A. L. Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell* **14**, 95-104 (2004).
18. Holmberg, C. I., Staniszewski, K. E., Mensah, K. N., Matouschek, A. & Morimoto, R. I. Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the

- proteasome. *Embo J* **23**, 4307-18 (2004).
19. Michalik, A. & Van Broeckhoven, C. Proteasome degrades soluble expanded polyglutamine completely and efficiently. *Neurobiol Dis* **16**, 202-11 (2004).
 20. Kaytor, M. D., Wilkinson, K. D. & Warren, S. T. Modulating huntingtin half-life alters polyglutamine-dependent aggregate formation and cell toxicity. *J Neurochem* **89**, 962-73 (2004).
 21. Bence, N. F., Sampat, R. M. & Kopito, R. R. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* **292**, 1552-5 (2001).
 22. Bennett, E. J. et al. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* **448**, 704-8 (2007).
 23. Krobitsch, S. & Lindquist, S. Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1589-94. (2000).
 24. Martin, J., Gruber, M. & Lupas, A. N. Coiled coils meet the chaperone world. *Trends Biochem Sci* **29**, 455-8 (2004).
 25. Schirmer, E. C., Homann, O. R., Kowal, A. S. & Lindquist, S. Dominant gain-of-function mutations in Hsp104p reveal crucial roles for the middle region. *Mol Biol Cell* **15**, 2061-72 (2004).
 26. Lupas, A. N. & Martin, J. AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 746-53 (2002).
 27. Lassot, I. et al. The proteasome regulates HIV-1 transcription by both proteolytic and nonproteolytic mechanisms. *Mol Cell* **25**, 369-83 (2007).
 28. Maat-Schieman, M. et al. Neuronal intranuclear and neuropil inclusions for pathological assessment of Huntington's disease. *Brain Pathology* **17**, 31-37 (2007).
 29. Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. & Rechsteiner, M. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **269**, 7059-61 (1994).
 30. Hoyt, M. A., Zhang, M. & Coffino, P. Probing the ubiquitin/proteasome system with ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *Methods Enzymol* **398**, 399-413 (2005).
 31. Baker, S. P. & Grant, P. A. The proteasome: not just degrading anymore. *Cell* **123**, 361-3 (2005).
 32. Ferdous, A. et al. The role of the proteasomal ATPases and activator monoubiquitylation in regulating Gal4 binding to promoters. *Genes Dev* **21**, 112-23 (2007).
 33. Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T. & Johnston, S. A. The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **7**, 981-91 (2001).
 34. Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T. & Johnston, S. A. Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* **296**, 548-50 (2002).
 35. Sikder, D., Johnston, S. A. & Kodadek, T. Widespread, but non-identical, association of proteasomal 19 and 20 S proteins with yeast chromatin. *J Biol Chem* **281**, 27346-55 (2006).
 36. Strickland, E., Hakala, K., Thomas, P. J. & DeMartino, G. N. Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* **275**, 5565-72 (2000).
 37. Babbitt, S. E. et al. ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S

- proteasome is part of the catalytic cycle. *Cell* **121**, 553-65 (2005).
38. Schmidt, T. et al. Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* **51**, 302-10 (2002).
 39. Heiser, V. et al. Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6739-44 (2000).
 40. Braun, B. C. et al. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* **1**, 221-6 (1999).
 41. Xiao, J. H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J. M. & Chambon, P. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* **65**, 551-68 (1991).
 42. Schagger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79 (1987).
 43. Wanker, E. E. et al. Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates. *Methods Enzymol* **309**, 375-86 (1999).
 44. Elsasser, S., Schmidt, M. & Finley, D. Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **398**, 353-63 (2005).
 45. Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol* **398**, 364-78 (2005).

Figure 1 19S ATPases enhance accumulation of polyQ containing proteins

(a) Lysates from 293T cells transfected with increasing amounts of plasmid encoding the ATPase subunits of the 19S proteasome together with Htt73 revealed by immunoblots and filter retardation assays. (b) Immunoblots and filter retardation assays of cells overexpressing SCA3 22Q or 82Q alone or together with Rpt6 and either left untreated, or treated with 1 μ M Epoxomycin (Epoxo) for 14h. (c) Lysates from 293T cells transfected with increasing amounts of plasmid encoding the Rpt6 together with Htt17 and either left untreated, or treated with 1 μ M Epoxomycin (Epoxo) for 14h, analyzed by immunoblots and filter retardation assays. (d) Cells were transfected with Htt73 alone or together with Rpt6 and Rpt4 encoding plasmids and either left untreated or treated with 0.5 or 1 μ M Epoxomycin (Epoxo) for 14h and analyzed by immunoblots and filter retardation assays. (e) Immunoblot with ubiquitin antibody with same lysates as in (d).

(Ub)ⁿ: polyubiquitinated proteins.

Figure 2 Overexpressed Rpt6 and Rpt4 form a oligomeric complex (a) Extracts of 293T cells transfected with empty vector (mock) or Rpt6, Rpt4, Rpt1 or Rpt3 encoding plasmids either untreated or treated with 1 μ M MG132 for 14h were resolved on 4% native gels and revealed by in-gel peptidase assay with Suc-LLVY-AMC. (b) In-gel peptidase assay with Z-LLE-MCA with the same extracts as in (a). (c) Immunoblot of similar gel as in (a) revealed with antibodies against the subunit α 7 of the 20S CP, (d) Rpt6 and (e) Rpt4. RP: regulatory particle. CP: core particle according to ⁴⁴. (f) Overexpressed Rpt6 and Rpt4 form an oligomeric complex. Lysates of mock transfected cells or cells overexpressing Rpt6-Flag or Rpt4-Flag were analyzed by glycerol gradients sedimentation. An aliquot of each fraction was analyzed by immunoblot and for peptidase activity with Suc-LLVY-AMC as indicated below.

Figure 3 Rpt6 and Rpt4 enhance misfolding and aggregation of Htt73 (a) Lysates of cells expressing Htt73 alone or together with Rpt6 or Rpt4 and either left untreated or treated with 1 μ M Epoxomycin (Epoxo) for 14h, analyzed by immunoblots with Rpt6, Rpt4 and Htt antibodies. (b, c) NP40 lysates shown in (a) were separated by centrifugation in supernatant and pellet and analyzed by immunoblots with Htt antibody. (d) Confocal micrographs of cells expressing Htt73-GFP either alone or together with Rpt6 or Rpt4. Nuclei were stained with Hoechst. (e) Micrographs of primary neurons expressing Htt17-GFP, Htt73-GFP alone or together with Rpt6. Neuronal identity was confirmed by staining with TAU-1 antibody and nuclei revealed with Hoechst.

Figure 4 Endogenous Rpt6 is required for inclusion formation. (a) Ratio of Rpt6 protein normalized to Vimentin in protein extracts of primary neurons transfected with control or Rpt6 siRNAs. (b) Primary neurons were transfected with control or Rpt6 siRNA_1 together with Htt73-GFP, fixed 24h post-transfection and labeled with TAU-1 antibody. Micrographs of neurons containing diffuse fluorescence or inclusions. (c) Ratio of primary neurons transfected with control, Rpt6 siRNA_1 or Rpt6 siRNA_2 together with Htt73-GFP expressed as percentage of transfected cells. Data were scored from 6

independent experiments corresponding to more than 2000 cells in total. ** P<0.01; *P<0.02.

Figure 5 Domains important for Rpt6 aggregation enhancer activity (a) Schematic representation of Rpt6 domain organization and mutants analyzed in this study. (b, d) Lysates of cells expressing Htt73 alone or together with Rpt6 wild type (wt), deletion mutants or a point mutant in the ATP-binding site (Rpt6_{K196H}) were analyzed by immunoblots with Htt or Rpt6 antibodies. (c, e) Filter retardation assays of extracts analyzed in (b) and (d) respectively.

Figure 6 Rpt6 binds to Htt73

(a) Lysates of cells transfected with empty vector, Htt73 alone or together with Rpt6 wild type (wt) or Rpt6 ATPase mutant (Rpt6_{K196H}) analyzed by immunoblot (left panel) or immunoprecipitated with Htt or GFP antibody followed by Rpt6 immunoblot. (b) GST and GST-Rpt6 fusion proteins were expressed in *E. coli*, purified on glutathione Sepharose beads, separated by SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose and stained with Ponceau red. (c) Htt73 containing cell lysates (input) were incubated on beads containing GST or GST-Rpt6 derivatives, washed and complexes bound to beads were analyzed by immunoblot revealed with Htt antibody. (d) Micrographs of primary neurons either mock transfected or transfected with Htt73-GFP and labeled with Rpt6 or 20S subunit $\alpha 7$ antibody and Hoechst.

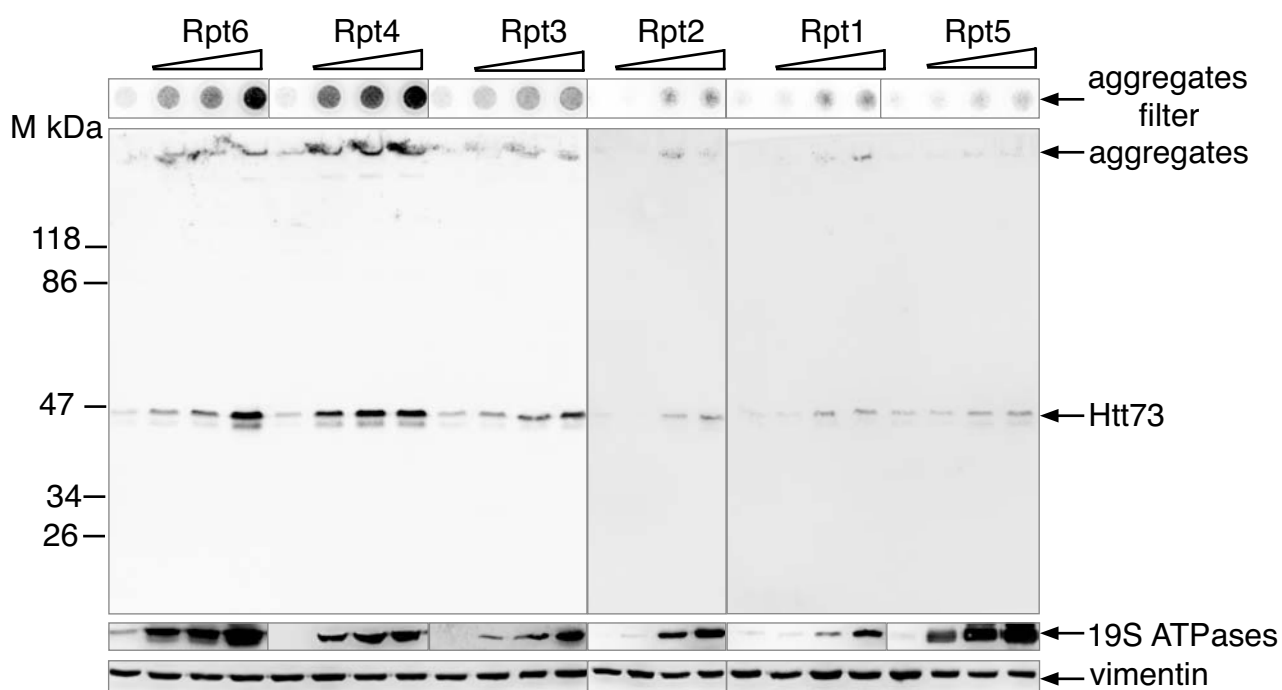
Figure 7 Overexpression of S5a increases accumulation of soluble Htt73

(a) Lysates of cells transfected with Htt73 alone or increasing amounts of S5a encoding plasmids analyzed by immunoblots (lower panel) and filter retardation assays (upper panel). (b) NP40 lysates of cells transfected with Htt73 alone or increasing amounts of S5a were separated by centrifugation in supernatant and pellet and analyzed by immunoblots with Htt antibody. (c) Purification of ubiquitinated proteins on Ni-NTA. Proteins marked with hexahistidine-tagged ubiquitin (H6-Ub) were purified from cells expressing the indicating proteins, analyzed by immunoblot and revealed with Htt or

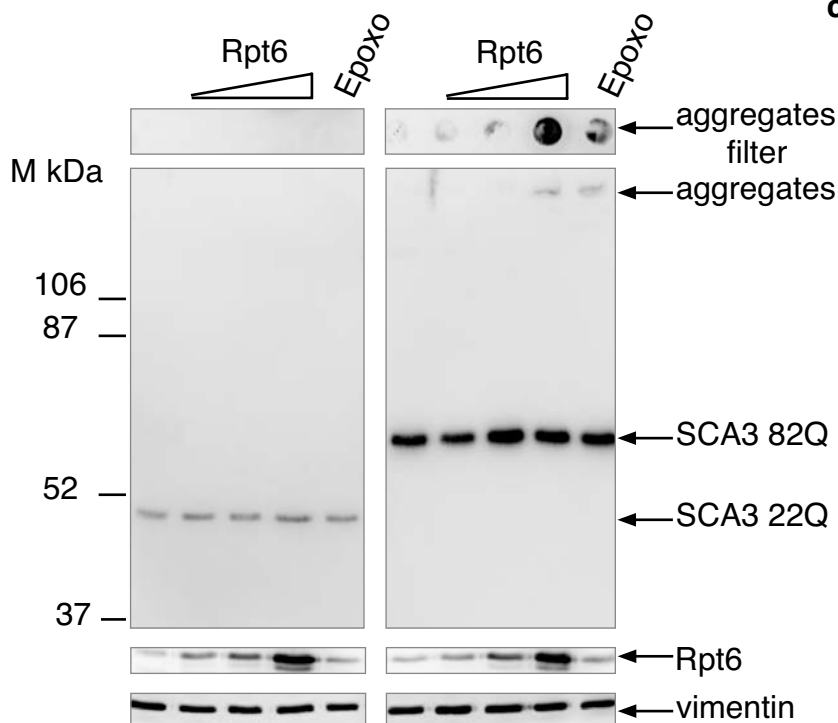
ubiquitin antibody. **(d)** Micrographs of cells expressing Htt73-GFP alone or together with S5a.

Figure 8 The degradation signal of ODC converts Htt73 into a highly unstable protein
(a) Lysates of cells transfected with increasing amounts of Htt73 or Htt73ODC encoding plasmids analyzed by immunoblot. **(b)** Cells were transfected with Htt73 or Htt73ODC alone or together with increasing amounts of Rpt6 encoding plasmid and left untreated or treated with 0.25, 0.5 and 1 μ M Epoxomycin (Epoxo) for 14h. Lysates were analyzed by immunoblots. **(c)** The same lysates as in **(b)** were analyzed by filter retardation assays revealed with Ubiquitin (α -Ub) or Htt (α -Htt) antibody. **(d)** Models depicting Htt misfolding and aggregation. Uncoupling chaperone subunits from the proteolytic 20S proteasome provokes accumulation of misfolded, aggregation-prone intermediates, initiating the aggregation process. Ub: Ubiquitin. RCC: Rpt containing complex. For the sake of clarity, the lid of the 19S proteasome is not represented.

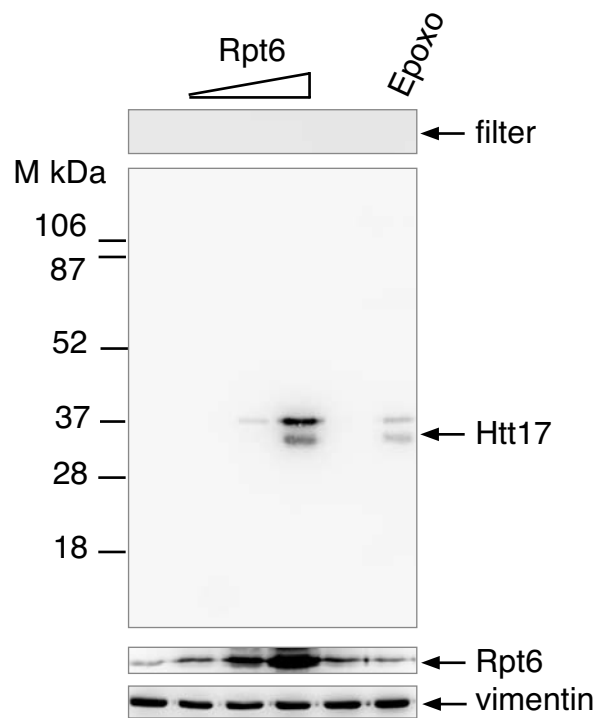
a



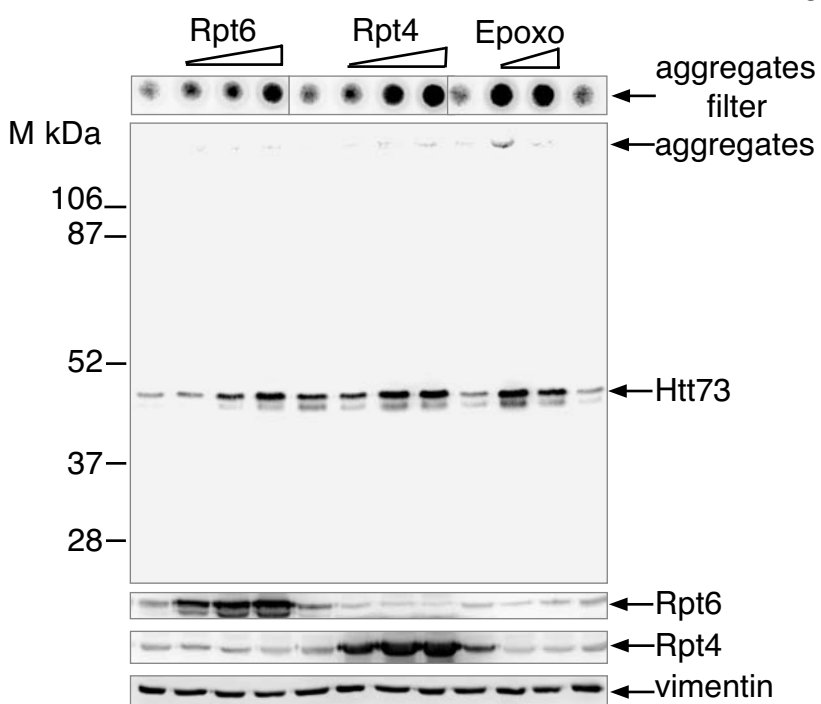
b



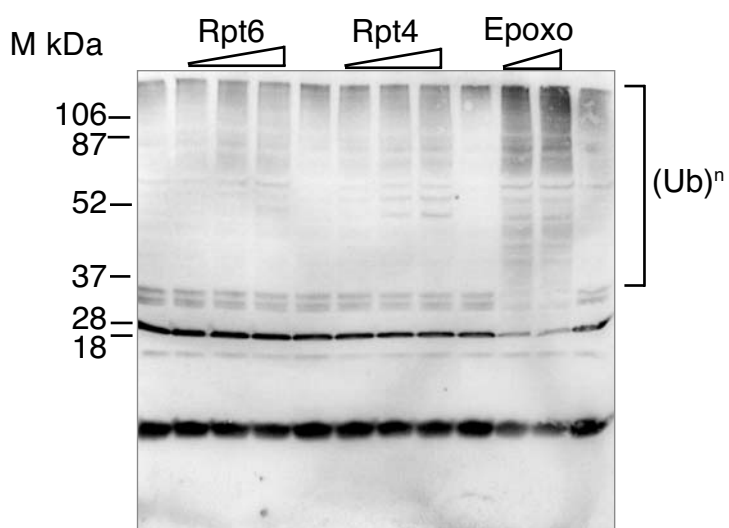
c



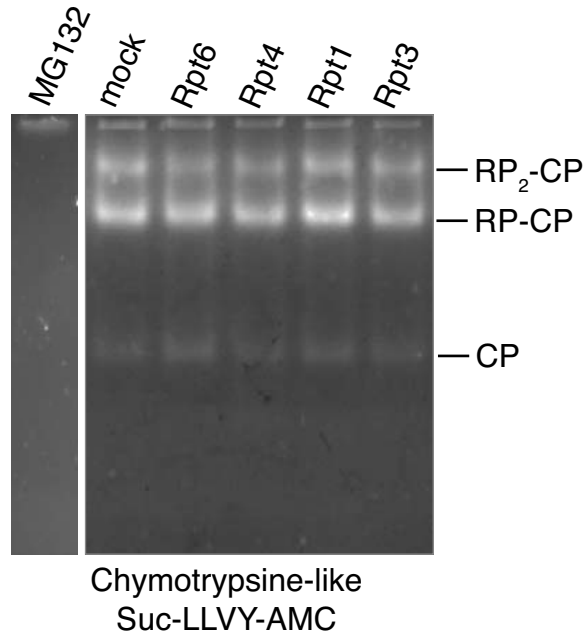
d



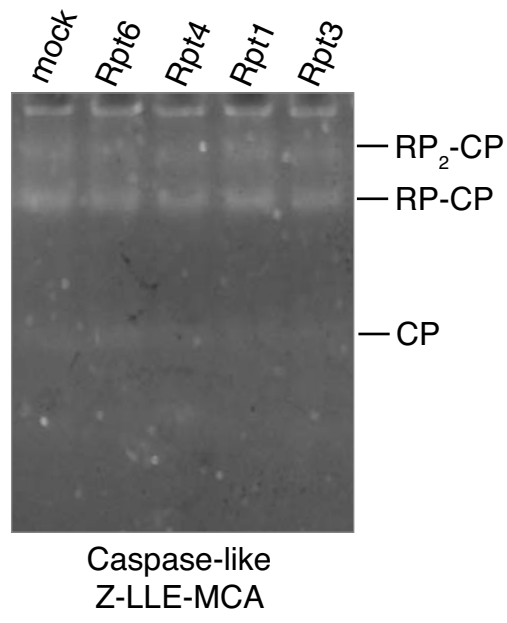
e



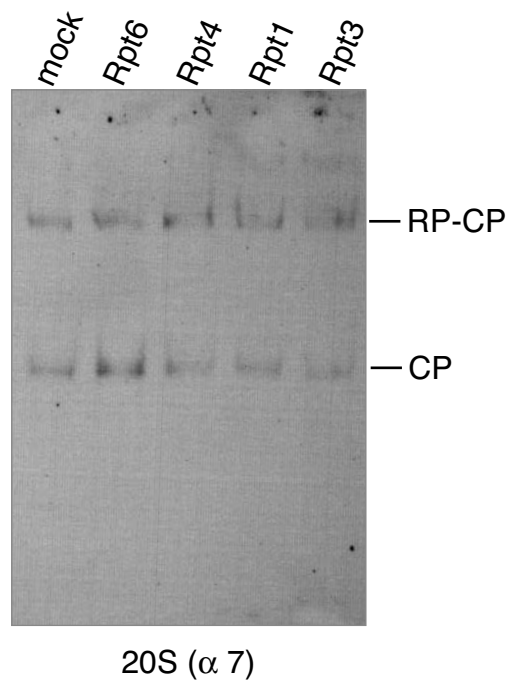
a



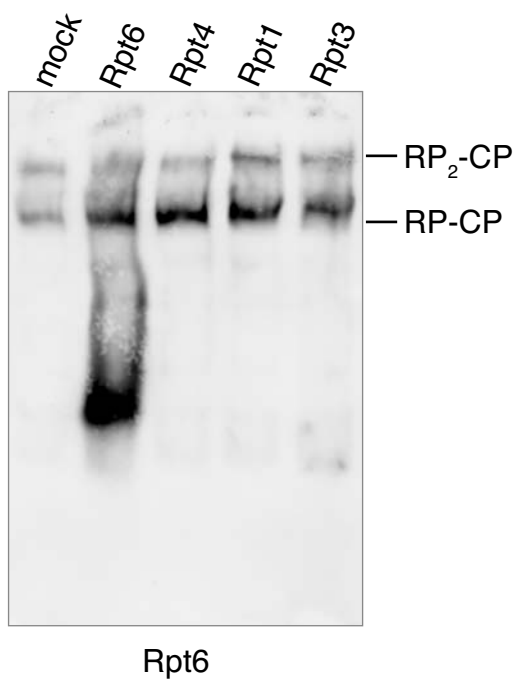
b



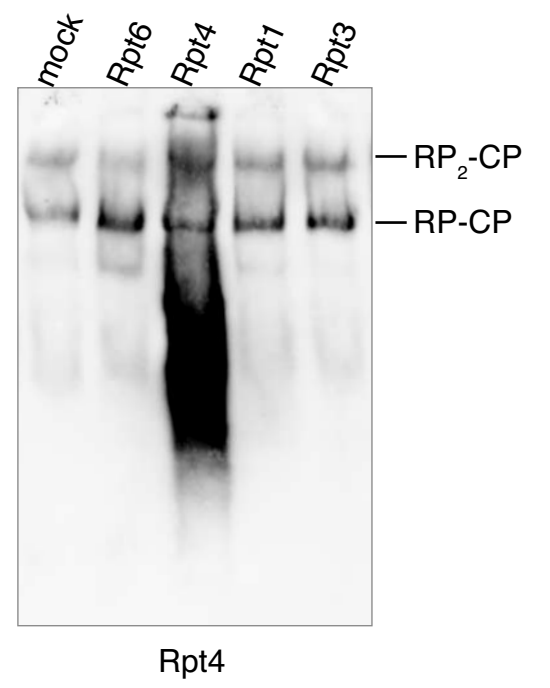
c



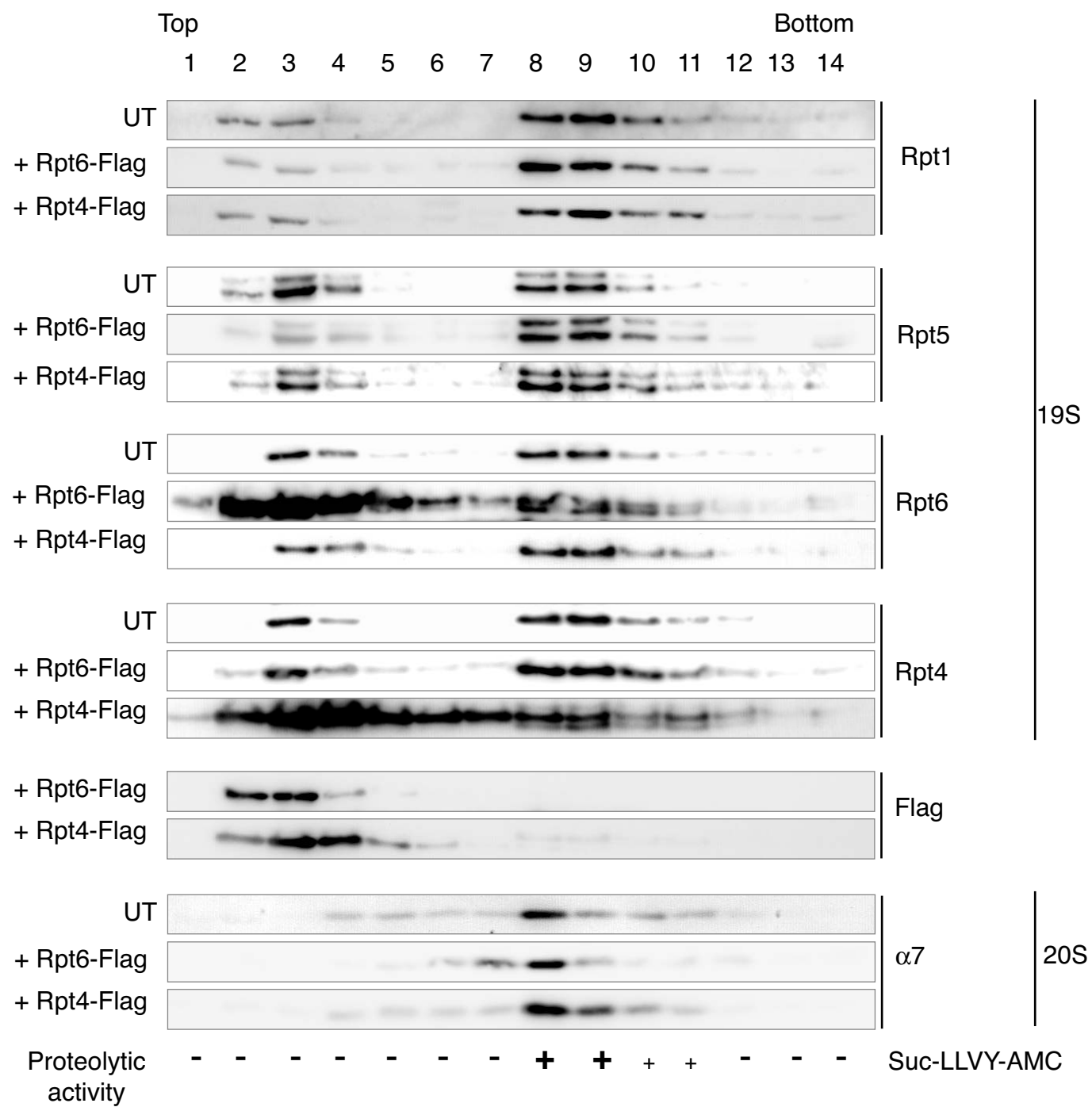
d

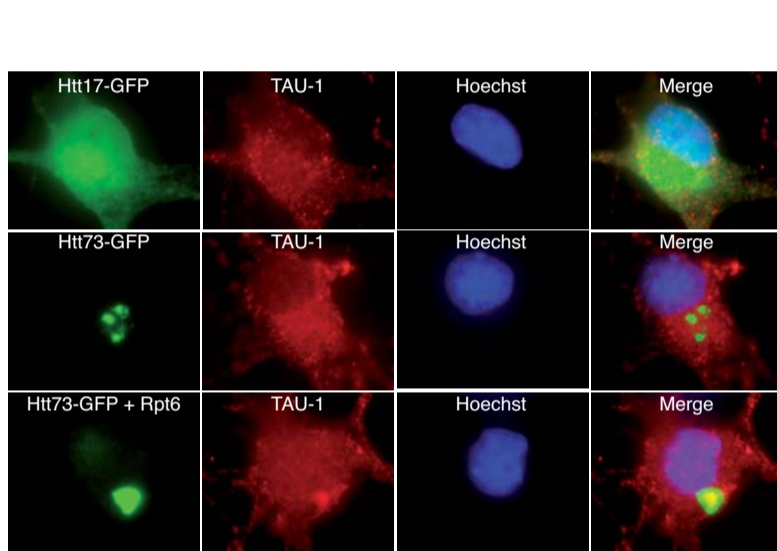
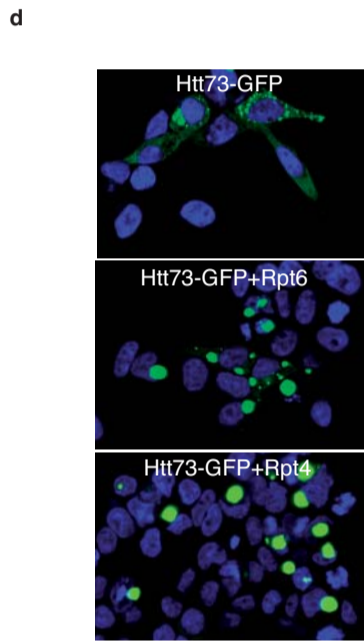
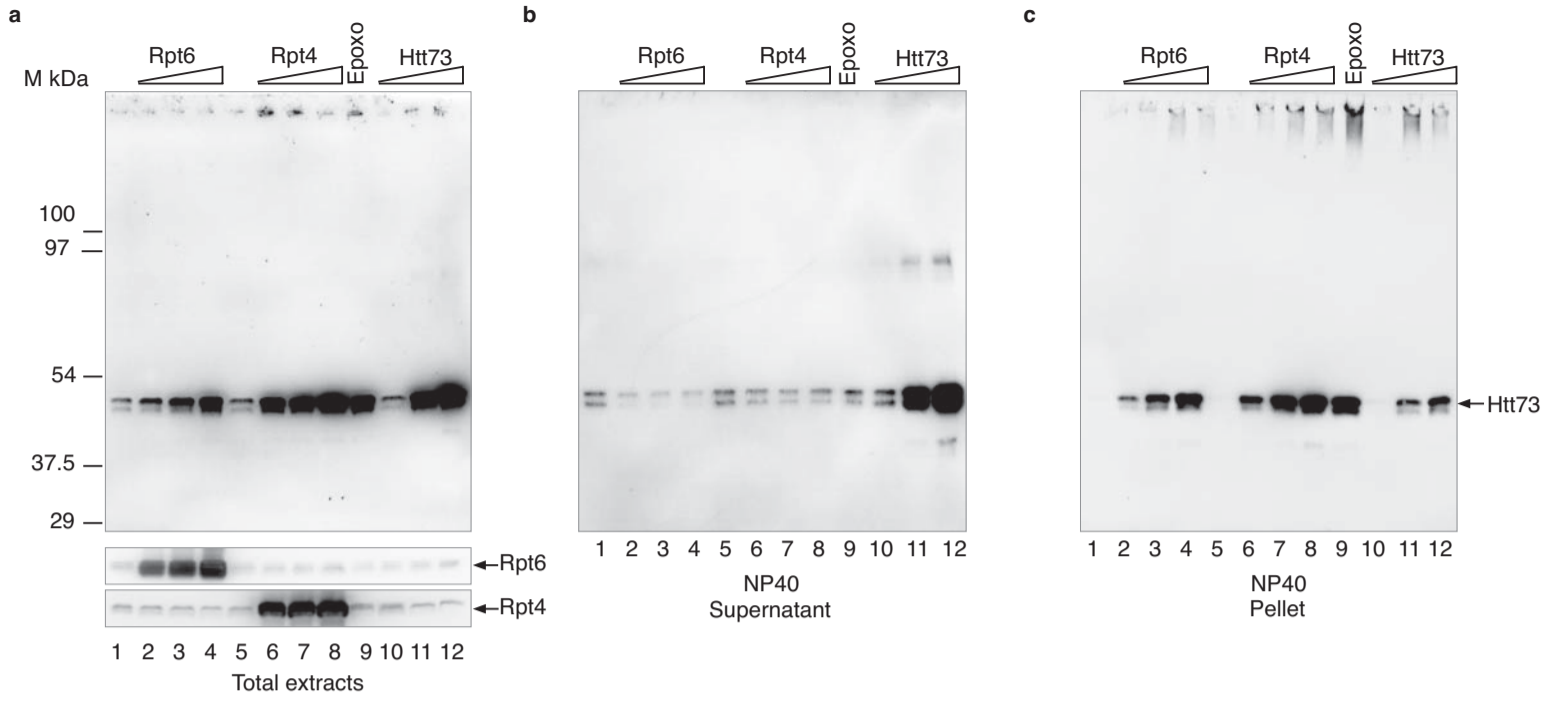


e

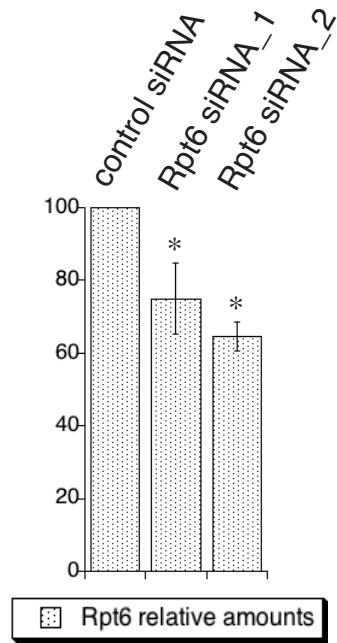


f

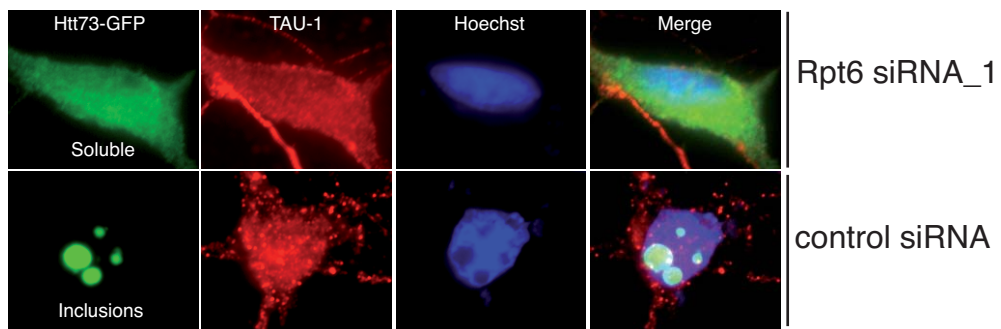




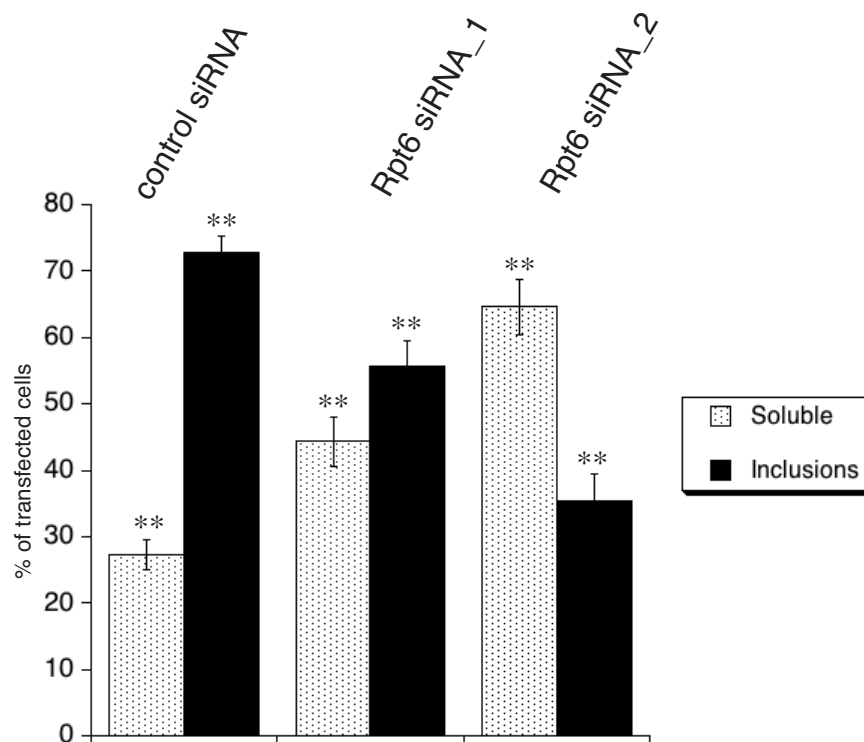
a

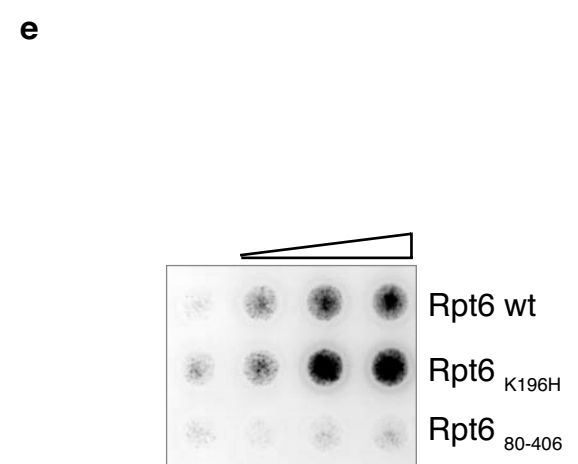
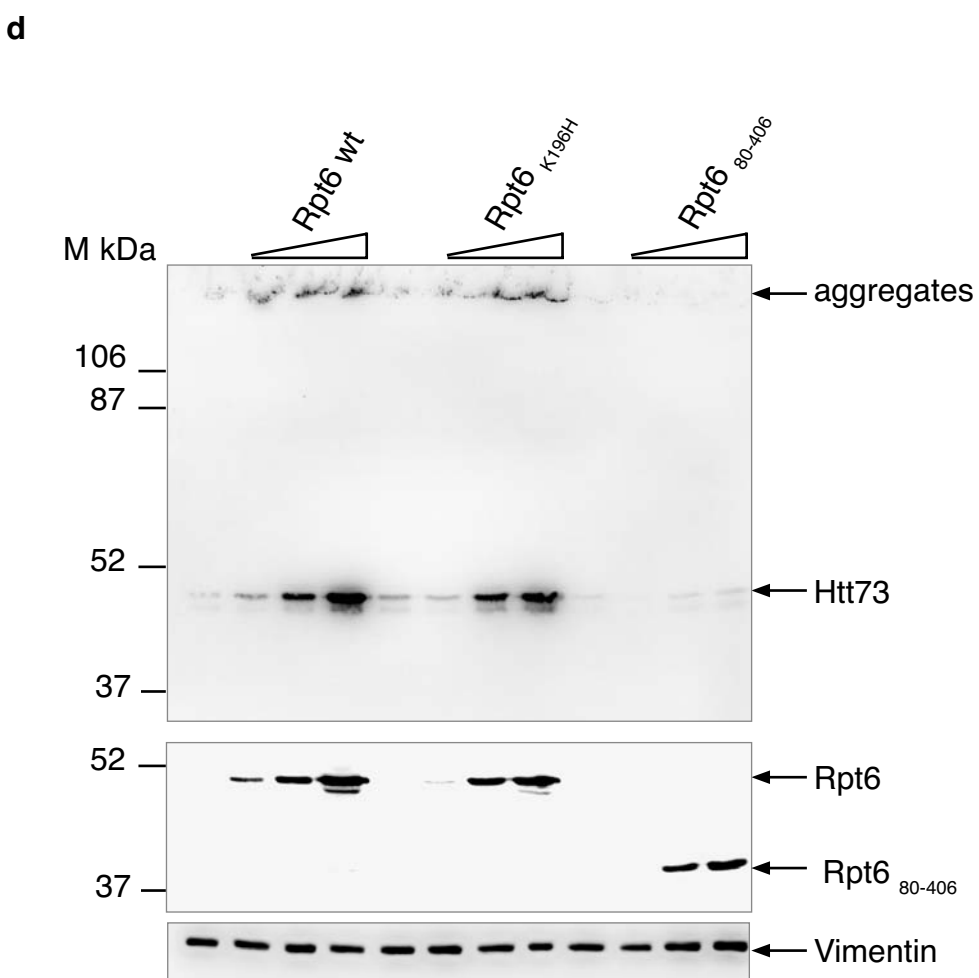
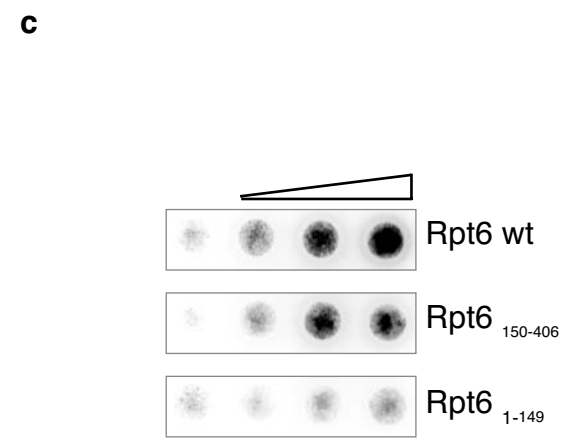
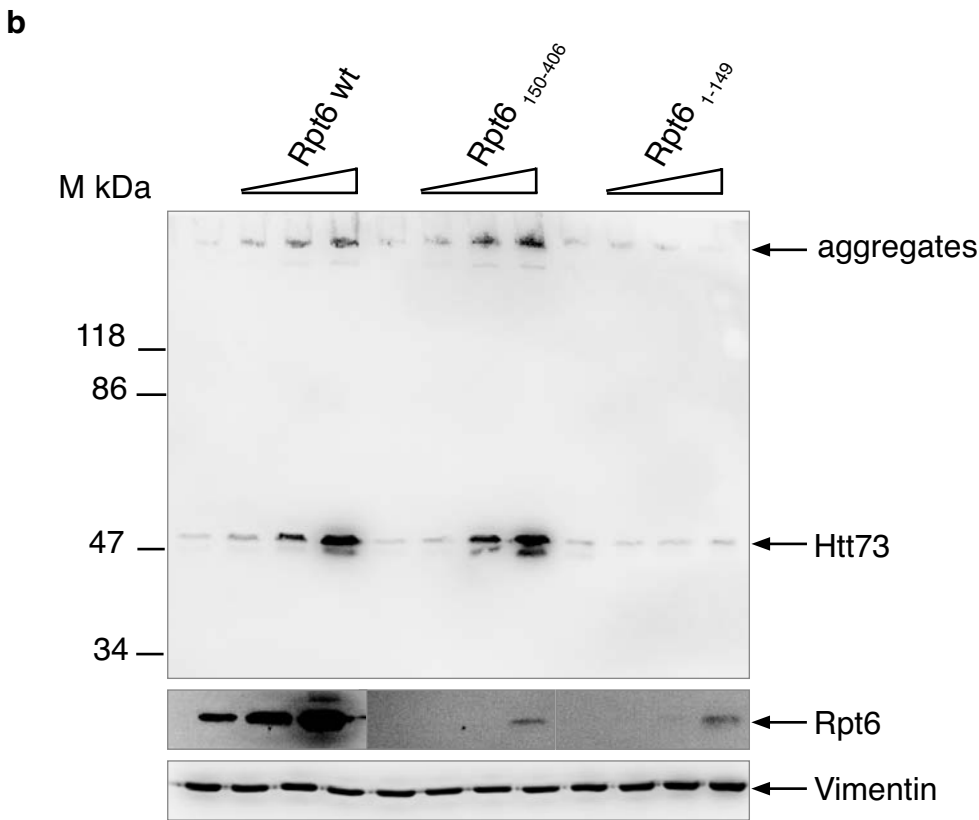
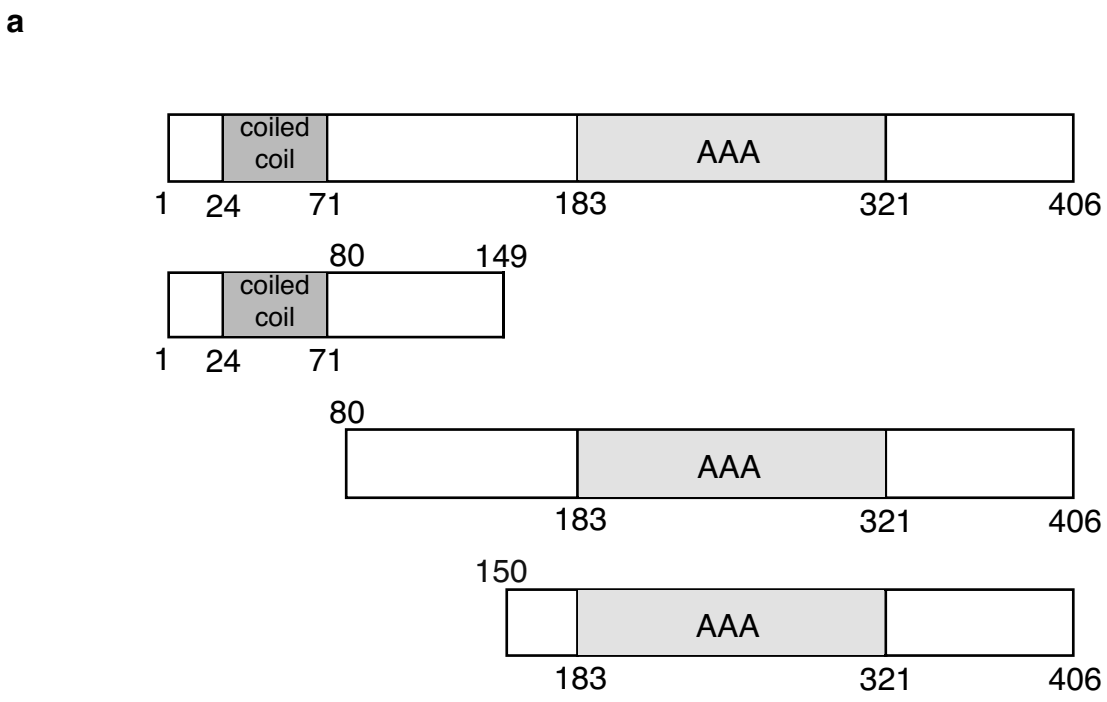


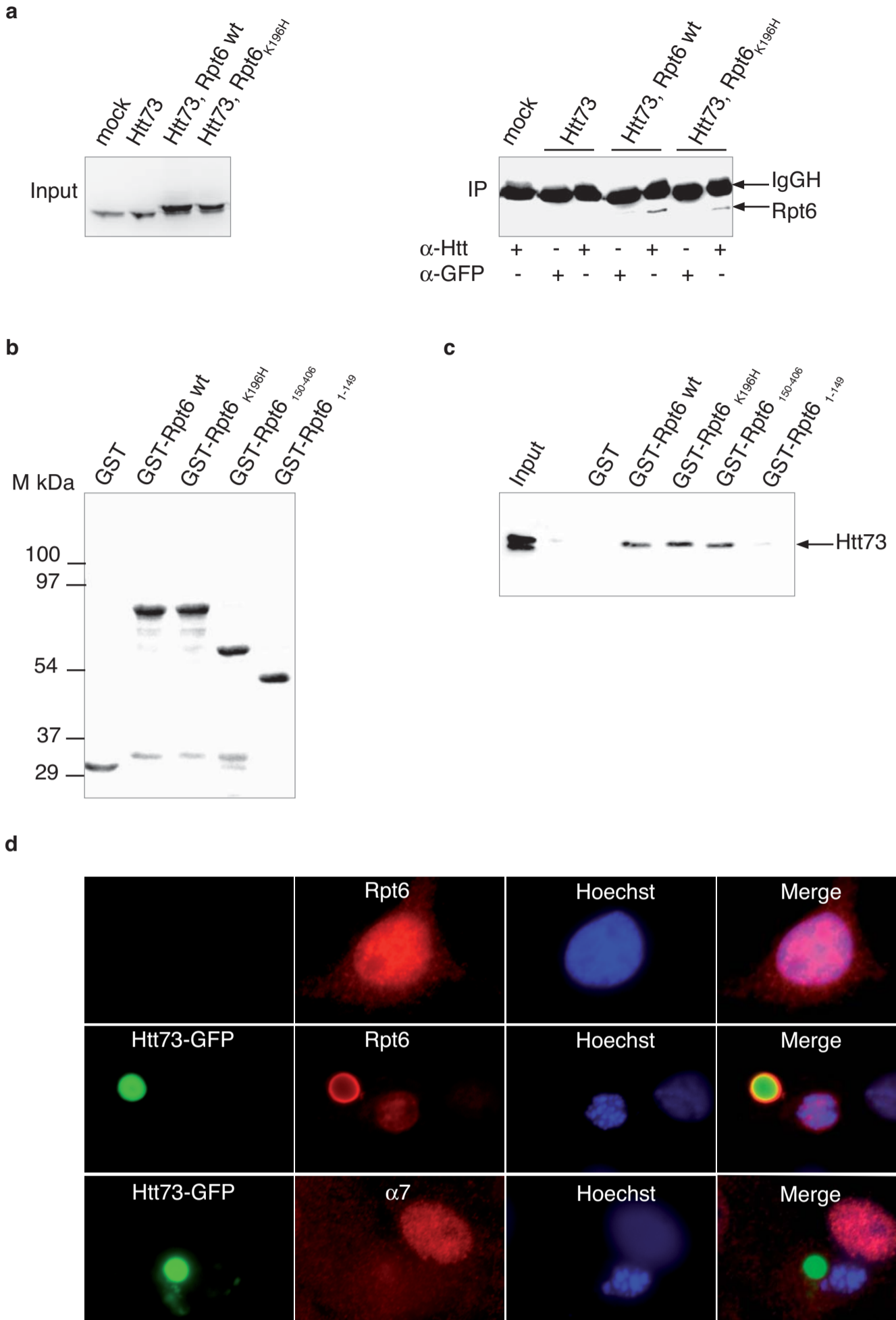
b

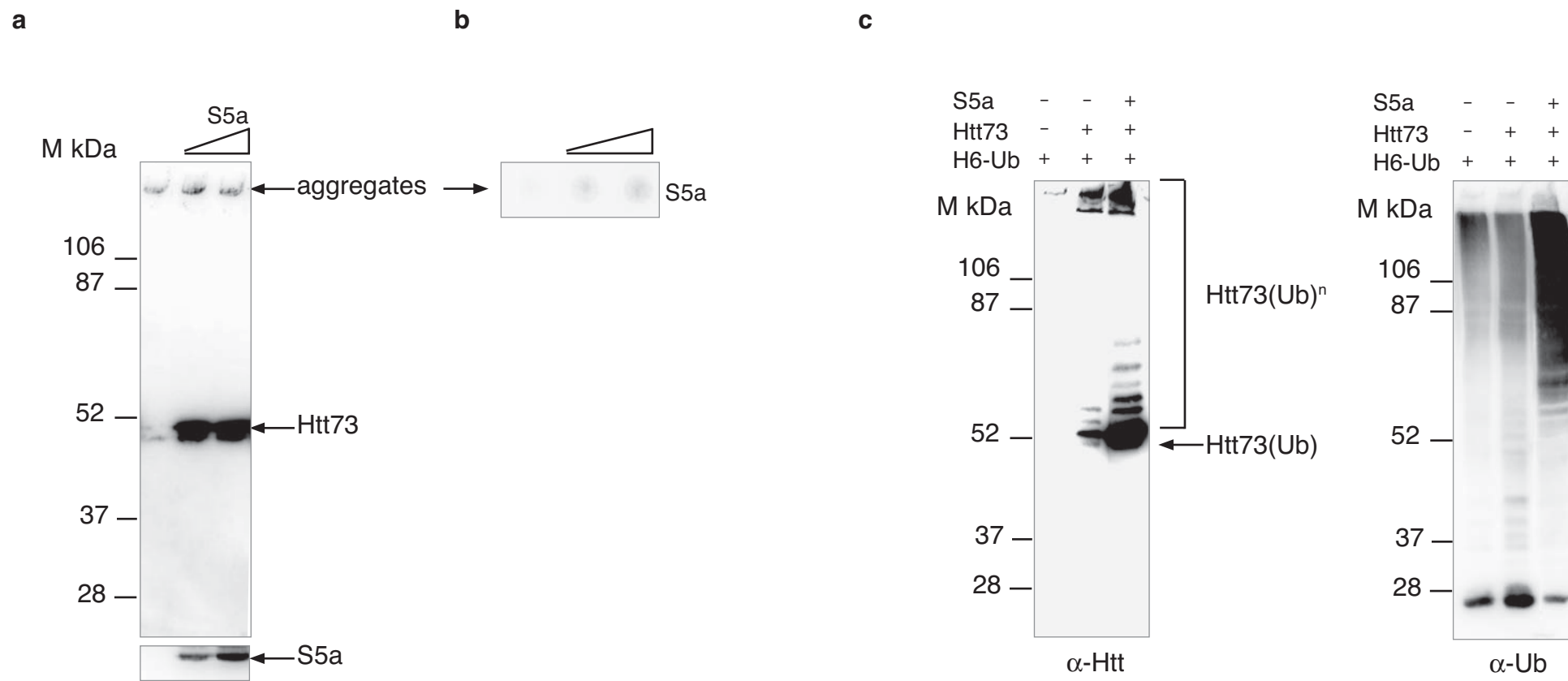


c

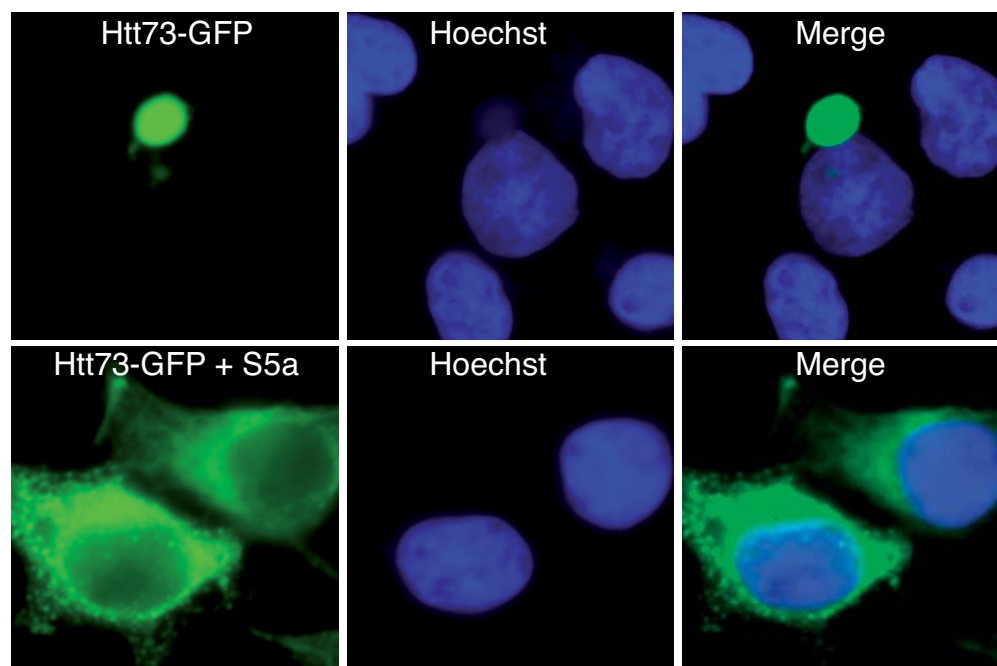


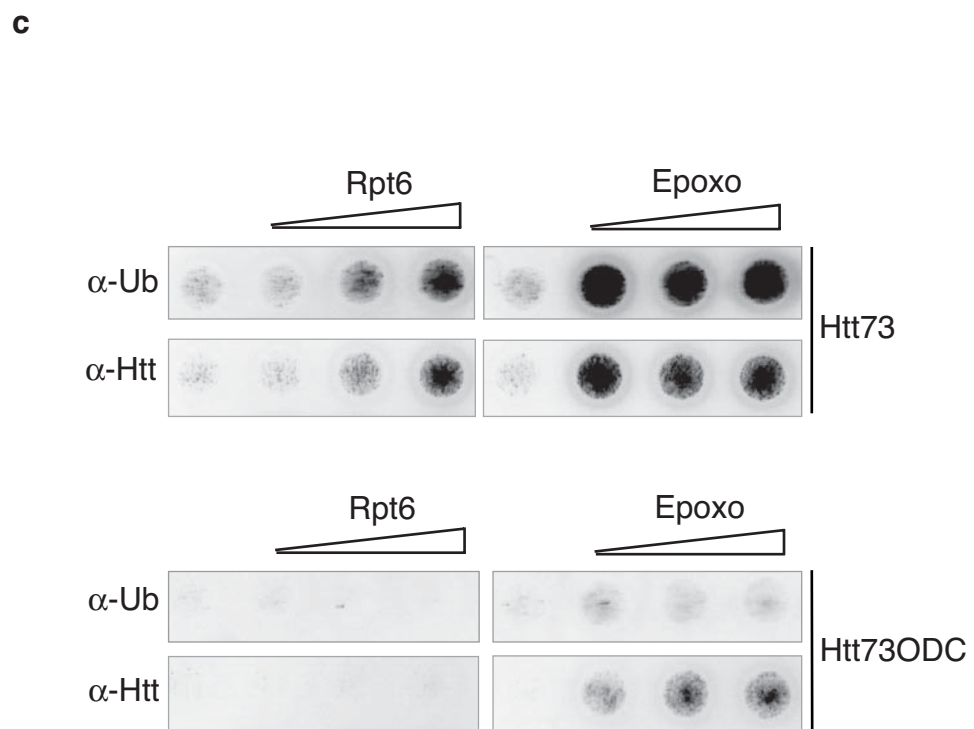
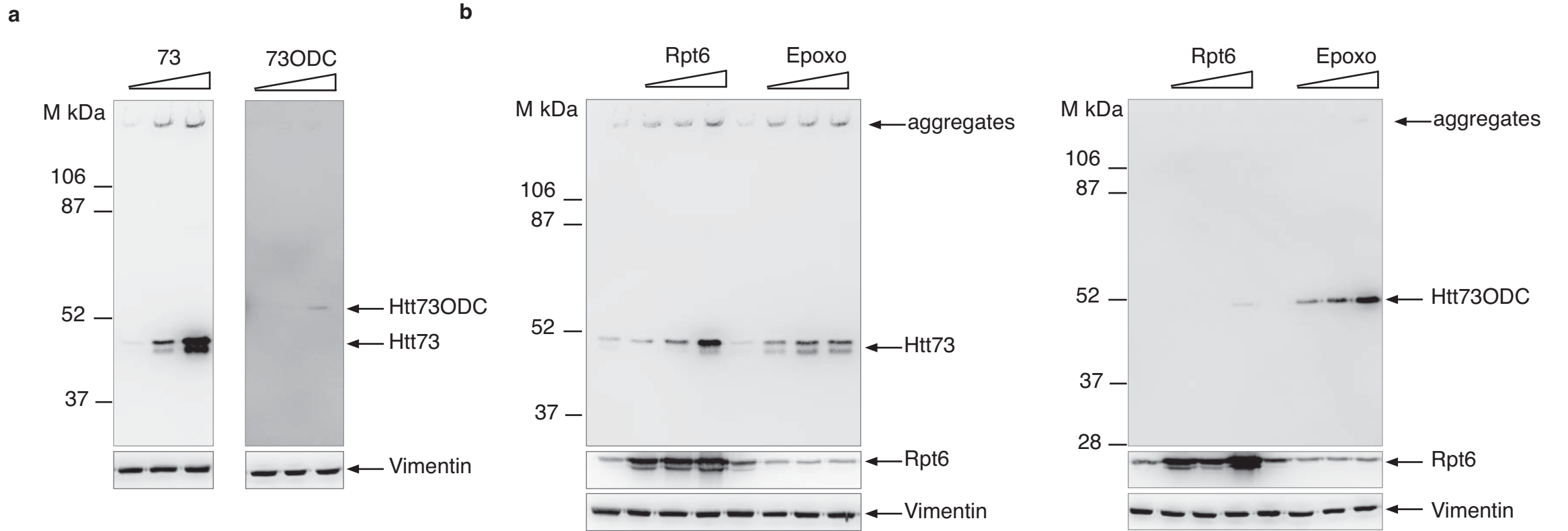






d





Legend to supplementary Figures.

Supplementary Figure 1. Rpt6 and Rpt6-Flag rescue the conditional lethality of a Rpt6 temperature sensitive mutant

Isogenic yeast strains carrying the wild-type (wt) Rpt6 allele or the mutant *rpt6/cim3-1* allele were transformed with empty vector or vector containing the indicated Rpt6 derivatives and grown at 30°C. Transformants were streaked in duplicates on agar medium and allowed to grow for 2.5 days at 30 or 37°C.

Supplementary Figure 2. Rpt6 and Rpt4 enhance misfolding and aggregation of Htt73

(a) Fold increase of Htt73 in lysates of cells expressing Htt73 alone or together with Rpt6 or Rpt4 and either left untreated or treated with 1 μ M Epoxomycin (Epoxo) for 14h. (b) Ratio of NP40-soluble and -insoluble Htt73 in cells expressing Htt73 alone or together with Rpt6 or Rpt4 and either left untreated or treated with 1 μ M Epoxomycin (Epoxo) for 14h. (c) Ratio of diffused fluorescence, small or large inclusions in cells expressing Htt73-GFP alone or together with Rpt6 or Rpt4.

Quantitative data were collected from 2 independent experiments in each panel.

Supplementary Figure 3. Relocalization of Rpt4 and Rpt3 around mutant Htt aggregates

Micrographs of primary neurons transfected with Htt73-GFP and labeled with indicated antibodies and Hoechst.

Supplementary Figure 4. Overexpression of S5a does not perturb the proteasome integrity or catalytic activity

(a) Extracts of 293T cells transfected with empty vector (mock) or S5a were resolved on 4% native gels and revealed by in gel peptidase assay with Suc-LLVY-AMC.

(b) Lysates of mock transfected cells or cells overexpressing S5aHA were analyzed by glycerol gradients sedimentation. An aliquot of each fraction was analyzed by immunoblots and for peptidase activity with Suc-LLVY-AMC as

indicated below.

Supplementary Figure 5. The ODC carboxy-terminus converts Htt73 in an evanescent protein

(a) Cells were transfected with Htt73 or Htt73ODC alone or together with increasing amounts of RPT6 encoding plasmid and left untreated or treated with 0.25, 0.5 and 1 μ M Epoxomycin (Epoxo) for 14h. SDS-lysates were analyzed on a 15% SDS-PAGE followed by immunoblot with Htt 1C2 antibody.

(b) Lysates analyzed in (a) were fractionated by centrifugation into soluble and insoluble fraction. SDS-insoluble pellet were dissolved in formic acid (FA) and both the solubilized pellet and the supernatant were analyzed on a 15% SDS-PAGE followed by immunoblot with Htt 1C2 antibody.

Experimental procedure accompanying Supplementary Figure 1

Rpt6 and Rpt6-Flag were cloned in Hind III and Xho I sites of the p416GDP.

Experimental procedure accompanying Figure 2.

Antibodies were used as follows: 1:5000 for Rpt4 (ab22639), 1:1000 for Rpt3 (ab22634), Rpt5 (ab22635), and Rpt1 (ab3322).

Text accompanying Supplementary Figure 5.

Fusing ODC to Htt73 had such a dramatic effect on the protein that we thought it was crucial to determine whether Htt73ODC was fully degraded or escaped our ability to detect it. The epitope of the 2B4 antibody used in most of experiments to detect aggregated and soluble Htt maps to the proline-rich region adjacent to the polyQ stretch ¹. It seemed therefore possible that the proteasome digests Htt73ODC from the C-terminus, as determined for ODC ², and releases aggregation-prone polyQ peptides as previously reported for purified proteasome and synthetic polyQ peptides ³. To test this possibility, we analyzed cell extracts on

15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with antibody 1C2, which recognizes the polyQ stretch. This analysis did not reveal products smaller than the full-length proteins (Supplementary Figure 5A). Yet, if Htt73ODC was partially digested by the proteasome and released, aggregation-prone Q73 peptides would still escape our detection because antibody 1C2 does not react with aggregated polyQ. PolyQ aggregates are dissociated by treatment with formic acid ⁴. We reasoned that solubilized polyQ proteins should be detectable by 1C2. We thus purified polyQ aggregates by ultracentrifugation, dissolved them in formic acid and analyzed their solubilized components on a 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with 1C2. While Htt73 solubilized aggregates are readily detectable by this method, we were unable to reveal any signal for Htt73ODC (Supplementary Figure 5B). These results confirm that expanded polyQ tagged with ODC can be efficiently degraded by the proteasome.

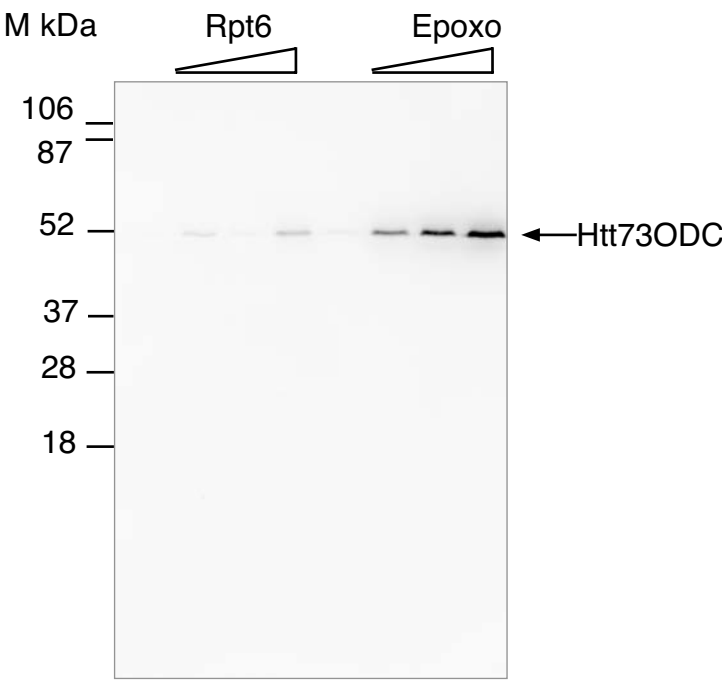
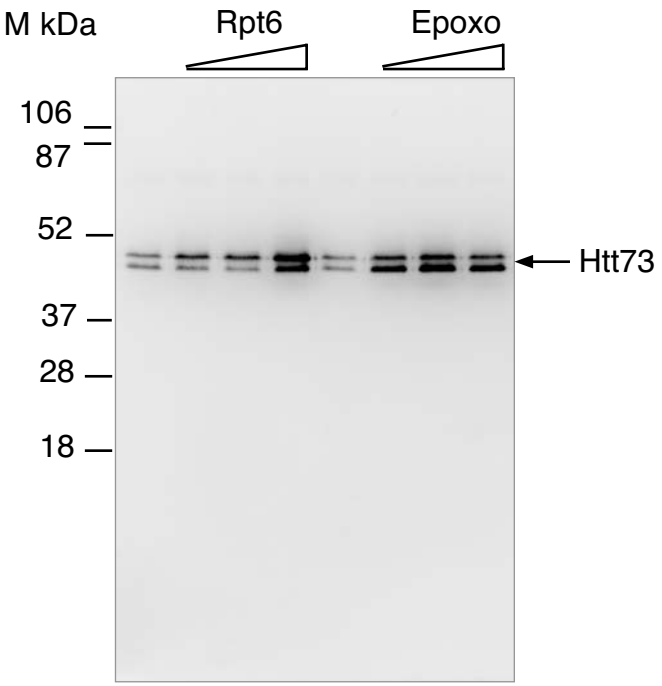
Supplementary acknowledgements

We are grateful to C.Mann for the generous gift of the yeast strain cim3-1.

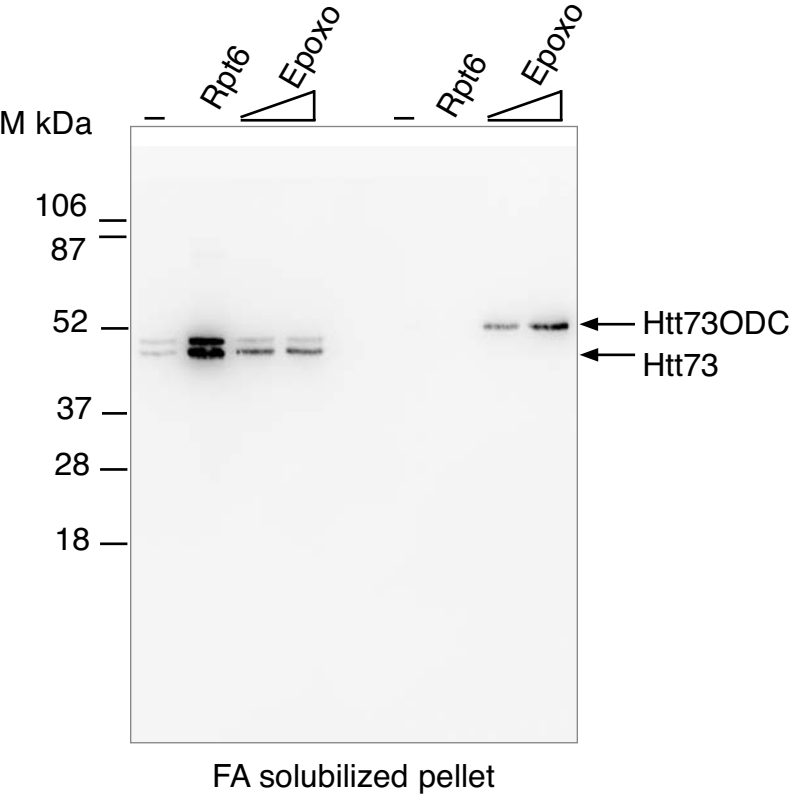
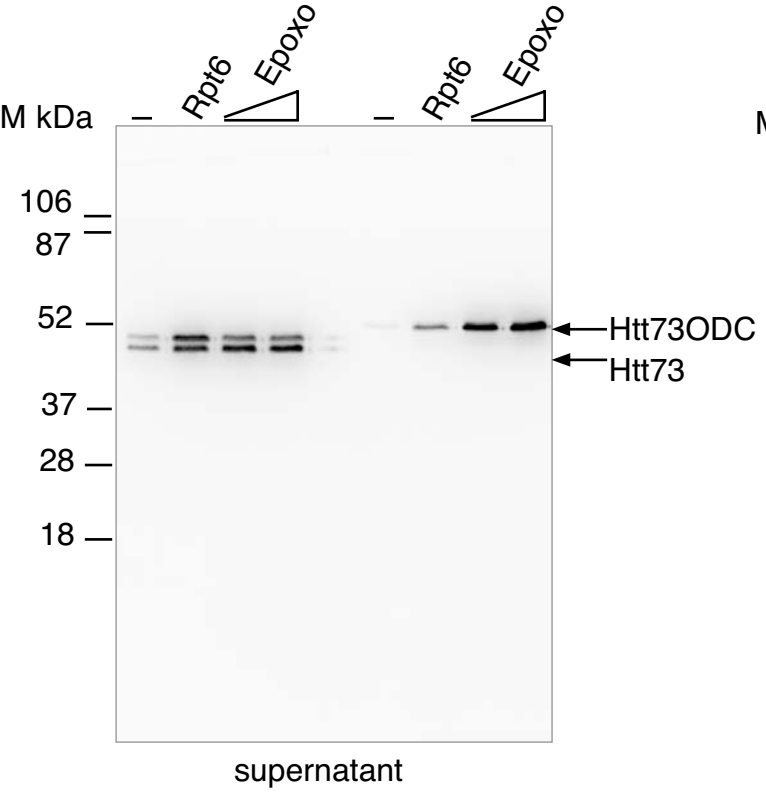
Supplementary references

1. Dehay, B. & Bertolotti, A. Critical role of the proline-rich region in Huntingtin for aggregation and cytotoxicity in yeast. *J Biol Chem* **281**, 35608-15 (2006).
2. Hoyt, M. A., Zhang, M. & Coffino, P. Probing the ubiquitin/proteasome system with ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *Methods Enzymol* **398**, 399-413 (2005).
3. Venkatraman, P., Wetzel, R., Tanaka, M., Nukina, N. & Goldberg, A. L. Eukaryotic proteasomes cannot digest polyglutamine sequences and release them during degradation of polyglutamine-containing proteins. *Mol Cell* **14**, 95-104 (2004).
4. Hazeki, N., Tukamoto, T., Goto, J. & Kanazawa, I. Formic acid dissolves aggregates of an N-terminal huntingtin fragment containing an expanded polyglutamine tract: applying to quantification of protein components of the aggregates. *Biochem Biophys Res Commun* **277**, 386-93. (2000).

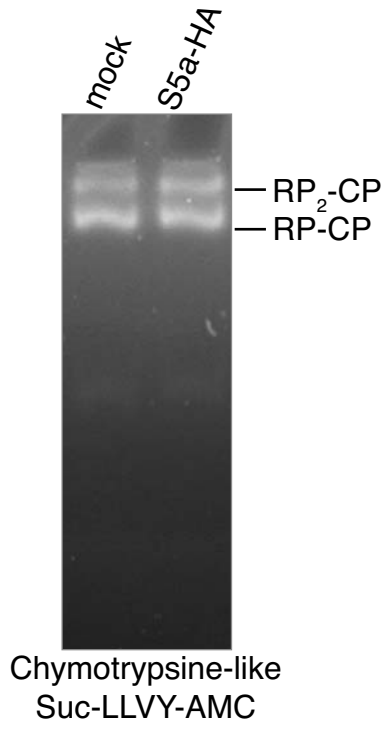
a



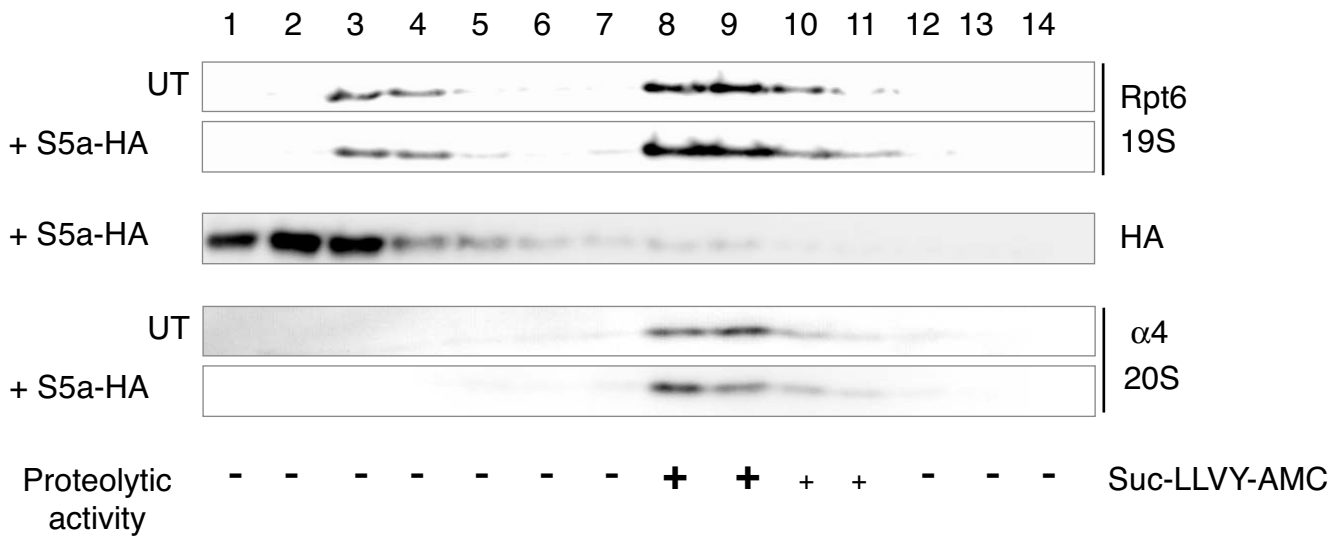
b

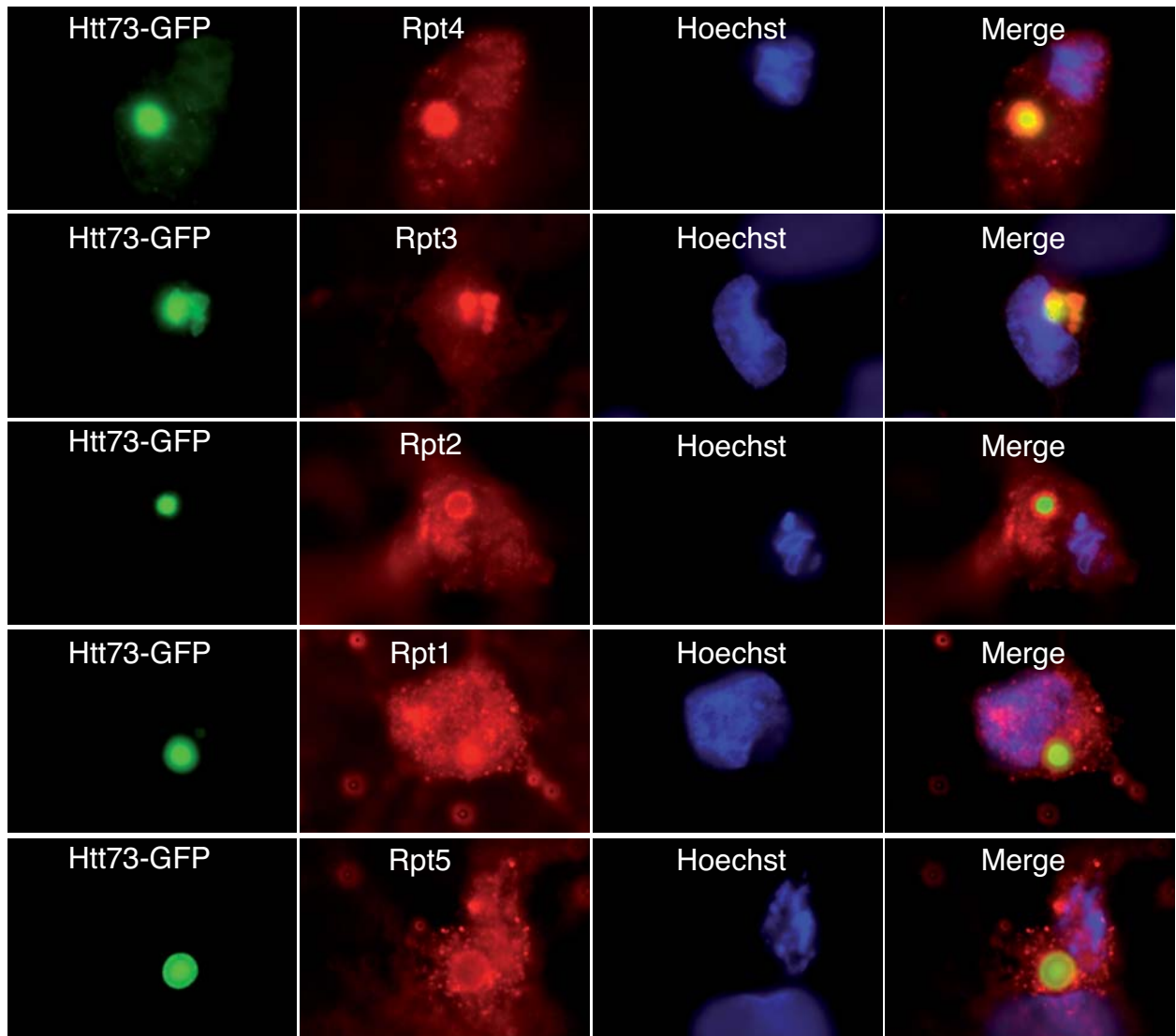


a

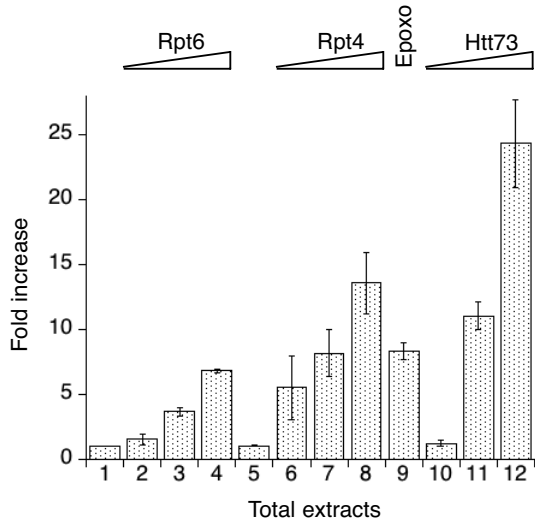


b

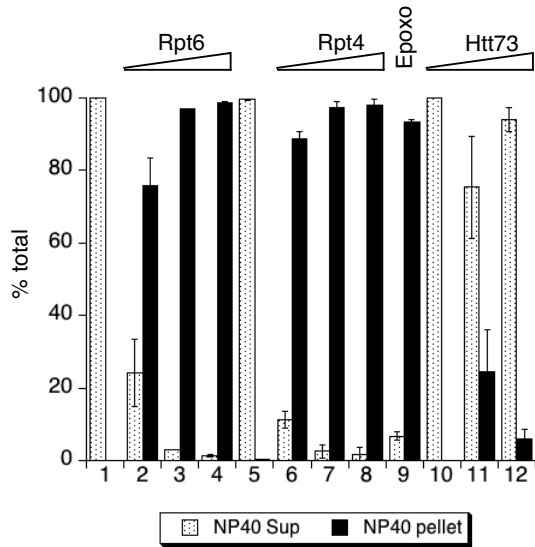




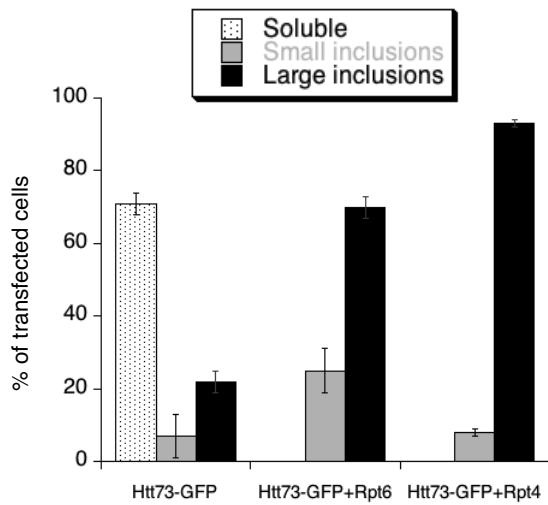
a



b

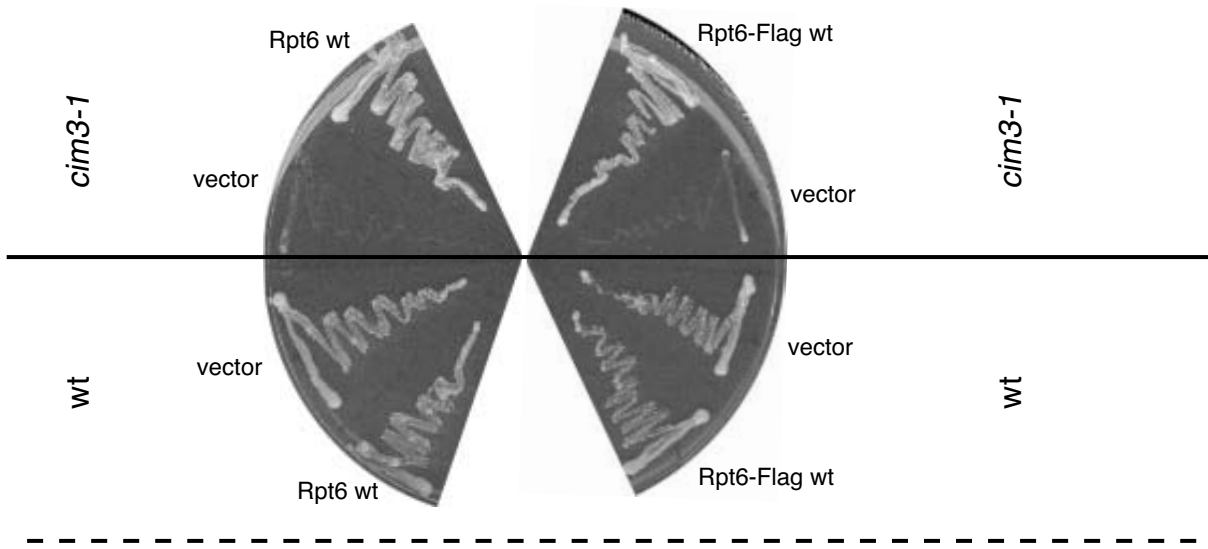


c

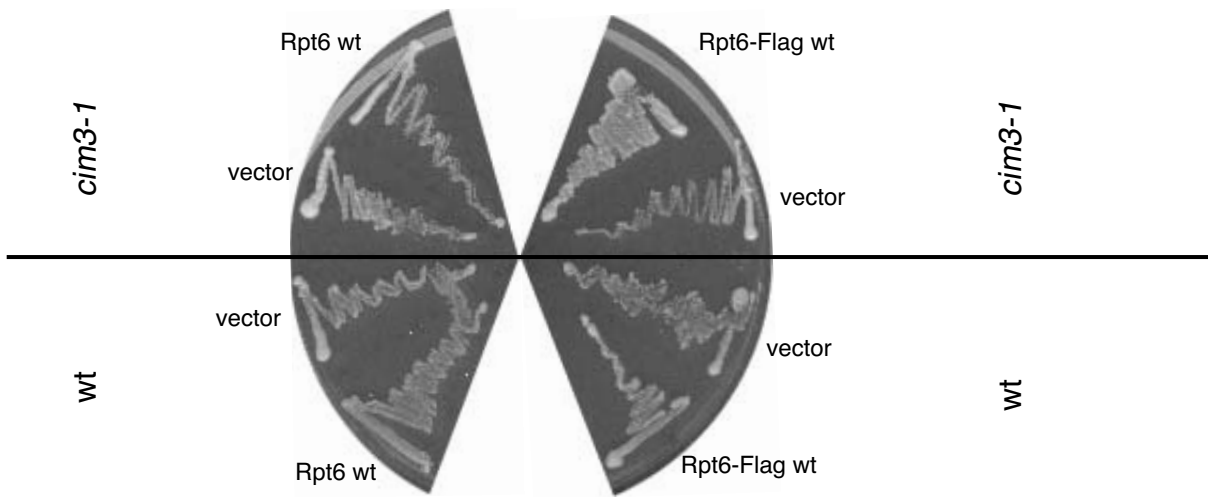


37°C

Bertolotti Supplementary Figure 1



30°C



Résumé

Les maladies neurodégénératives telles que les maladies de Huntington, de Parkinson et d'Alzheimer ont la caractéristique commune de présenter des agrégats de protéines spécifiques dans les neurones des patients atteints par ces pathologies. Le mécanisme par lequel ces structures se forment est encore inconnu. L'objectif de ce travail a consisté en l'étude du mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine. Nous avons découvert que l'environnement cellulaire joue un rôle critique dans la capacité à s'agréger des protéines à expansion de polyglutamine (Rousseau et al., 2004). Ce travail suggère l'existence de modulateurs de l'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine. En cherchant des modulateurs d'agrégation nous avons découvert que les sous unités chaperons du protéasome 19S, Rpt6 et Rpt4, augmentent l'agrégation de la protéine Huntingtine dans les cellules, alors que la réduction du niveau de Rpt6 par ARN interférence diminue la quantité de Huntingtine agrégée. Si la Huntingtine mutante est adressée au protéasome de manière ubiquitine indépendante, elle est très facilement dégradée. L'agrégation des protéines Huntingtine mutante n'est pas la conséquence d'une inhibition de l'activité protéolytique du protéasome mais fait suite à un découplage entre l'activité de dépliement médiée par le protéasome 19S et l'activité protéolytique du protéasome 20S. Ces travaux révèlent le rôle clef de l'environnement cellulaire et particulièrement du protéasome 19S dans le mécanisme d'agrégation des protéines à expansion de polyglutamine.

Mots clés : agrégation – polyglutamine – chaperon – protéasome – ubiquitine

Abstract

Aggregates deposition in neurons of patients is a generic feature of neurodegenerative diseases like Huntington's disease, Parkinson and Alzheimer's diseases. The mechanism of aggregates formation is unknown. The aim of this thesis is to study the mechanism of polyglutamine proteins aggregation. We have discovered that cellular environment plays a central role in the polyglutamine protein aggregation mechanism (Rousseau et al., 2004). This suggested that some factors modulate polyglutamine protein aggregation in cells. Looking for these factors, we found that two subunits of the 19S proteasome, Rpt6 and Rpt4 enhance the aggregation of the Huntingtin protein in cells. Down regulation of Rpt6 by siRNA decreases Huntingtin inclusion formation. When targeted to the proteasome by a ubiquitin independent pathway mutant Huntingtin is efficiently degraded. Aggregation of mutant Huntingtin protein is not a consequence of a proteasome proteolytic failure but is elicited when unfolding by the chaperone subunits of the 19S particle is uncoupled from proteolysis by the 20S proteasome. This work highlights the key role for cellular environment and particularly 19S proteasome in the control of polyglutamine protein aggregation.

Key words: aggregation – polyglutamine – chaperone – proteasome – ubiquitin