



HAL
open science

Implication de la huntingtine dans les troubles de l'humeur : approche comportementale et neurogénique

Sophie Orvoen

► **To cite this version:**

Sophie Orvoen. Implication de la huntingtine dans les troubles de l'humeur : approche comportementale et neurogénique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114835 . tel-00947700

HAL Id: tel-00947700

<https://theses.hal.science/tel-00947700>

Submitted on 17 Feb 2014

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE :

Pharmacologie expérimentale et clinique

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1177

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 18/09/2012

par

Sophie ORVOËN

Implication de la huntingtine dans les troubles de l'humeur :
approche comportementale et neurogénique.

Directeur de thèse : M Denis DAVID Université Paris-Sud 11
Co-directeur de thèse : M Patrick PLA Université Paris-Sud 11

Composition du jury :

Rapporteurs : Mme Catherine BELZUNG Université de Tours
Mme Nicole DÉGLON Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne
Examineurs : M le Dr Olivier CASES Institut de la Vision, Paris
M le Pr Serge LAROCHE Université Paris-Sud 11

Remerciements

A Mesdames les Professeurs Catherine BELZUNG et Nicole DÉGLON,

Pour avoir accepté d'être rapportrices de ce mémoire, et pour vos conseils qui m'ont permis d'améliorer mon manuscrit.

A Monsieur le Docteur Olivier CASES, et à Monsieur le Professeur Serge LAROCHE,

Pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

A Messieurs les Docteurs Denis DAVID et Patrick PLA,

Pour votre encadrement durant ces trois ans. Je vous remercie tout particulièrement pour votre grande disponibilité et l'aide apportée à la rédaction du manuscrit.

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance.

A l'équipe du laboratoire de neuropharmacologie de la faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Monsieur le Professeur Alain GARDIER,

Pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Messieurs les Docteurs Jean-Philippe GUILLOUX et Bruno GUIARD,

Pour votre dynamisme, votre aide et vos conseils quotidiens.

A Christelle, Louise et Nicole.

Aux équipes de l'Institut Curie d'Orsay,

Aux Docteurs Frédéric Saudou et Sandrine Humbert,

Pour m'avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant, à l'interface des thématiques de nos laboratoires respectifs.

Karim,

Pour les nombreuses heures passées à l'animalerie.

Je te souhaite beaucoup de courage et de succès dans la suite de ta thèse.

Caroline,

Pour l'aide que tu m'as apportée dans ma « maîtrise » du génotypage des Q111, et pour ta gentillesse.

A l'équipe de l'Animalerie,

Ayma, Pauline, Valérie,

Pour votre aide précieuse à la gestion de mon élevage, votre disponibilité et votre gentillesse (et les coups de fils en panique tôt le matin)...

Aux souris !

A Guillaume, Gaël, Yannick, Flavie, Lin, Quentin, Haï, Indira,

Doctorants d'hier et de demain, vous avez été un moteur pour me faire venir certains matins, et une soupape pour m'éviter d'exploser d'autres jours. Merci d'avoir été là !

A ma famille,

Mes parents qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce cursus scolaire,

Marc qui me supporte et me soutient chaque jour.

Articles originaux

Orvoen S, Pla P, Gardier AM, Saudou F, David DJ. (2012). Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behaviour and altered neuronal maturation. *Neuroscience letters*, 2012; 507(2), 127-32. **Article 1**

Pla P, **Orvoen S**, Benstaali C, Dodier S, David DJ, Humbert S, Saudou F. Huntingtin deletion in adult brain mature neurons induces non-cell autonomous defects in hippocampal neurogenesis and anxiety-related behavioral alterations. *En préparation*. **Article 2**

Ben M'Barek K, **Orvoen S**, Pla P, Benstaali C, Godin JD, Mouthon MA, Boussin FD, Gardier AM, Saudou F, David DJ, Humbert S. Huntingtin Mediates Anxiety/Depression-related Behaviors through BDNF Transport and Hippocampal Neurogenesis. *Soumis dans Neuron*. **Article 3**

Revue de la littérature

Orvoen S, David DJ, Gardier AM, Saudou F, Pla P. Anxiodepressive behaviour and adult hippocampal neurogenesis status in mouse models of Huntington's Disease. *En préparation*

Autres

Guilloux JP, David I, Pehrson A, Guiard BP, Repérant C, **Orvoën S**, Gardier AM, Hen R, Bjørnholm B, Ebert B, Miller S, Sanchez C, David DJ. Anxiolytic and antidepressant potential of the multimodal antidepressant Lu AA21004 assessed by behavioral and neurogenesis outcomes in mice. *En cours de soumission*

Hache G, Guiard BP, Le Dantec Y, **Orvoën S**, David DJ, Gardier AM, Coudoré F. Antinociceptive effects of fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression. *Neuroreport*. 2012 Jun 20;23(9):525-9.

Communications affichées

Orvoën S, Pla P, Gardier AM, Saudou F, David DJ. Implication of huntingtin in mood disorders: a behavioral and neurogenesis study. *Young Researchers in Life Sciences Meeting* 2010, Paris, France

Orvoën S, Pla P, Gardier AM, Saudou F, David DJ. Implication of huntingtin in mood disorders: a behavioral and neurogenesis study. *European Behavioural Pharmacology Society Workshop on Drugs, Psychiatric Disorders and Neurogenesis* 2010, Tours, France

Orvoën S, Pla P, Gardier AM, Saudou F, David DJ. Huntingtin and mood disorders: a behavioral and neurogenesis study in knock-in mice. *40th annual meeting of the Society for Neuroscience* 2010, San Diego, USA

Ben M'Barek K, **Orvoën S**, Benstaali C, Godin J, Gardier AM, Saudou F, David DJ, Humbert S. Targeting Huntingtin Phosphorylations reduces anxiety and depression through increased neurogenesis. *Wiring the Brain Meeting* 2011, Wicklow, Irlande

Orvoën S, Pla P, Gardier AM, Saudou F, David DJ. Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behavior and altered neuronal maturation. *ULLA Summer School* 2011, Parma, Italie

Ben M'Barek K, **Orvoën S**, Benstaali C, Godin J, Gardier AM, Saudou F, David DJ, Humbert S. Targeting Huntingtin Phosphorylations reduces anxiety/depression and increases neurogenesis. *41st annual meeting of the Society for Neuroscience* 2011, Washington DC, USA

Schloesser RJ, Jimenez DV, **Orvoën S**, Hardy NF, Gardier AM, David DJ, Martinowich K. Electroconvulsive seizure rescues the effects of chronic corticosterone on hippocampal neurogenesis and requires new neurons to rescue corticosterone-induced anxiety/depressive behavior. *67th annual meeting of the Society of Biological Psychiatry* 2012, Philadelphia, USA

Communication orale

Ben M'Barek K, **Orvoën S**, Benstaali C, Godin J, Gardier AM, David DJ, Humbert S. Conséquences comportementales et neurogéniques des phosphorylations de la huntingtine par Cdk5. *XI^{èmes} Journées de l'Ecole doctorale Innovation thérapeutique* 2011, Châtenay-Malabry, France

La maladie de Huntington (HD) est une maladie génétique neurodégénérative qui touche environ 6000 personnes en France. Les manifestations psychiatriques sont une des composantes majeures des symptômes précoces de la pathologie. Ainsi, des épisodes dépressifs parfois associés à de l'anxiété généralisée sont communément observés au cours des stades pré-symptomatiques de la maladie. On connaît mal à l'heure actuelle les raisons de cette prévalence élevée.

L'allèle responsable de la maladie code une protéine appelée huntingtine (HTT) dont l'expansion polyglutaminique (polyQ) en N-terminal est plus longue que dans la HTT non pathogénique. La huntingtine est impliquée dans diverses fonctions cellulaires et notamment dans le transport et l'expression d'un facteur neurotrophique, le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). Celui-ci est d'ailleurs connu pour son rôle dans la régulation des troubles de l'humeur, de la neurogenèse hippocampique chez l'adulte, ainsi que dans la réponse thérapeutique aux antidépresseurs.

Nous avons émis l'hypothèse que la huntingtine, en plus de ses rôles connus dans le cortex et le striatum, puisse jouer également un rôle dans l'hippocampe. Ainsi, une altération du transport de BDNF dans l'hippocampe pourrait en partie expliquer les troubles de l'humeur observés chez les patients HD.

Par une approche *in vivo*, en utilisant différents modèles de souris, nous avons ainsi démontré que la huntingtine stimule le trafic vésiculaire et la sécrétion de BDNF dans les neurones hippocampiques et que cette action peut être modulée par la mutation polyQ ou par le statut de phosphorylation de la protéine sur les sérines 1181 et 1201. Cela aboutit à des modifications des voies de signalisation (Akt, ERK, CREB) activées par le BDNF.

Nous mettons également en évidence que la huntingtine sauvage est impliquée dans le soutien exercé par les neurones matures sur les nouveaux neurones, nécessaire à leur survie à long terme et à la formation d'une arborisation dendritique complexe. Le BDNF est l'intermédiaire idéal grâce à ses effets sur la neurogenèse hippocampique. Enfin, la huntingtine sauvage et ses formes mutées (polyQ et phosphorylation sur les sérines 1181 et 1201) sont impliquées dans le comportement anxio-dépressif des souris.

Huntington disease (HD) is a genetic neurodegenerative disorder that affects about 6,000 people in France. Psychiatric manifestations are an important component of the early symptoms of the disease. Indeed, depressive episodes sometimes associated with generalized anxiety are commonly observed during the pre-symptomatic stages of disease. Little information is available about the reasons for this high prevalence.

The allele responsible for the disease encodes a protein called huntingtin (HTT) whose polyglutamine expansion (polyQ) in the N-terminal region is longer than in the non-pathogenic HTT. Huntingtin is involved in various cellular functions including the transport and the expression of a neurotrophic factor, the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). This factor is also known for its role in the regulation of mood, adult hippocampal neurogenesis, and in the therapeutic response to antidepressants.

We hypothesized that huntingtin, in addition to its known roles in the cortex and striatum may play a role in the hippocampus. Thus, an impaired transport of BDNF in the hippocampus could partly explain the mood disorders observed in HD patients.

By an *in vivo* approach using different mouse models, we demonstrated that huntingtin stimulates vesicular trafficking and secretion of BDNF in hippocampal neurons and that this action may be modulated by the polyQ mutation or by the phosphorylation status of the protein on serines 1181 and 1201. These lead to changes in signaling pathways (Akt, ERK, CREB) activated by BDNF.

We also demonstrate that normal huntingtin is involved in the support provided by mature neurons to new neurons for their long-term survival and the formation of a complex dendritic arborization. BDNF is the ideal candidate to mediate these effects on hippocampal neurogenesis. Finally, normal huntingtin and its mutated forms (polyQ and phosphorylated on serines 1181 and 1201) are involved in anxiety and depressive-like phenotype in mice.

Sommaire

Remerciements	3
Publications.....	5
Résumé.....	7
Abstract.....	8
Sommaire	9
Liste des figures.....	12
Liste des tableaux.....	13
Liste des abréviations.....	15
Avant-propos.....	17

INTRODUCTION

1^{ère} partie : La maladie de Huntington - Observations cliniques

I. Symptomatologie	21
II. Atrophie cérébrale et altération de la neurogenèse dans la maladie de Huntington.....	22
III. Les taux de Brain-derived neurotrophic factor dans la maladie de Huntington.....	24
IV. Troubles anxio-dépressifs dans la maladie de Huntington	26
A. <i>Eléments généraux sur les troubles anxio-dépressifs.....</i>	26
B. <i>Prévalence des troubles anxio-dépressifs dans la maladie de Huntington</i>	28
V. Thérapies employées dans le traitement de la maladie de Huntington.....	31
A. <i>Prise en charge des déficits moteurs.....</i>	31
B. <i>Prise en charge des troubles de l'humeur dans la maladie de Huntington</i>	31

2^{ème} partie : Aspects moléculaires

I. La huntingtine.....	37
A. <i>A la recherche des fonctions de la huntingtine</i>	37
B. <i>La huntingtine, régulateur transcriptionnel.....</i>	40
C. <i>La huntingtine, transporteur de vésicules et d'organelles</i>	41
D. <i>La huntingtine, protéine antiapoptotique.....</i>	42
E. <i>Dysfonctionnements de la huntingtine dans la maladie de Huntington</i>	43
II. Le Brain-derived neurotrophic factor et son récepteur de haute affinité TrkB	47
A. <i>Les neurotrophines.....</i>	47
B. <i>Le BDNF et la huntingtine</i>	48
C. <i>Le BDNF, acteur majeur de la neurogenèse adulte.....</i>	50

3^{ème} partie : Modèles animaux employés pour l'étude de la maladie de Huntington

I. Description des modèles animaux	54
A. <i>Modèles transgéniques avec une huntingtine tronquée</i>	54
B. <i>Modèles transgéniques avec huntingtine pleine longueur</i>	55
C. <i>Modèles de souris « knock-in »</i>	55
II. Phénotype comportemental des animaux modèles de HD.....	58
A. <i>Comportements liés à l'anxiété.....</i>	58
B. <i>Comportement mixte d'anxiété et dépression</i>	59
C. <i>Comportements liés à la dépression</i>	60
III. Expression du BDNF dans les modèles animaux de la maladie de Huntington	65
IV. Neurogenèse adulte dans l'hippocampe des rongeurs modèles de la maladie de Huntington ..	67
A. <i>La neurogenèse dans l'hippocampe adulte.....</i>	68
B. <i>Implication de la neurogenèse hippocampique dans les troubles de l'humeur</i>	69
C. <i>Prolifération cellulaire.....</i>	69
D. <i>Survie cellulaire</i>	71
E. <i>Différentiation et maturation</i>	71
V. Effets des thérapies sur le phénotype des modèles animaux de HD.....	76
A. <i>Les médicaments antidépresseurs monoaminergiques</i>	76
B. <i>L'exercice physique et l'enrichissement de l'environnement.....</i>	79
C. <i>Autres stratégies</i>	80

TRAVAIL EXPERIMENTAL

1^{ère} partie : Matériel et méthodes

I. Animaux	89
A. <i>Souris Hdh^{Q111}</i>	89
B. <i>Souris $CaMKCre^{ERT2}; Hdh^{flox/flox}$</i>	90
C. <i>Souris $Hdh^{S1181A/S1201A}$ et $Hdh^{S1181D/1201D}$</i>	92
II. Etudes comportementales chez la souris	94
A. <i>Evaluation des capacités motrices</i>	94
B. <i>Evaluation d'un comportement anxieux</i>	94
C. <i>Evaluation d'un comportement mixte d'anxiété et de dépression.....</i>	96
D. <i>Evaluation d'un comportement dépressif.....</i>	97
III. Etude de la neurogenèse hippocampique chez la souris adulte	99
A. <i>Préparation des tissus</i>	99
B. <i>Prolifération et survie des cellules progénitrices.....</i>	100
C. <i>Etude de la maturation neuronale</i>	101

IV. Etude de l'expression, du transport, et de la fonctionnalité de BDNF	103
A. Etude de l'expression de BDNF.....	103
B. Etude du transport et de la libération du BDNF	106
C. Etude des voies de signalisation activées par le BDNF.....	108

2ème partie : Résultats expérimentaux

Article 1 : Phénotype anxieux et altération de la maturation neuronale spécifiques des mâles dans un modèle knock-in de la maladie de Huntington.....	113
---	-----

Article 2 : La délétion de la huntingtine dans les neurones matures du cerveau antérieur entraîne des déficits non cellulaires-autonomes de la neurogenèse hippocampique, et des altérations du comportement lié à l'anxiété	127
--	-----

Article 3 : La huntingtine régule les comportements d'anxiété/dépression via le transport du BDNF et la neurogenèse hippocampique.	157
---	-----

DISCUSSION

I. Bilan des résultats expérimentaux	219
A. BDNF	220
B. Neurogenèse hippocampique	222
C. Résultats de comportement.....	222
D. Aspects dépendants du sexe	223
E. Implication possible de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	225
II. Conclusions et perspectives	227

Références bibliographiques.....	233
---	------------

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique du gène IT15	17
Figure 2 : Atrophie cérébrale dans la maladie de Huntington	23
Figure 3 : Concentrations de BDNF dans le sérum de patients Huntington	25
Figure 4 : Symptômes des épisodes dépressifs majeurs	27
Figure 5 : Représentation schématique de la séquence protéique de la huntingtine	37
Figure 6 : Représentation schématique du transport vésiculaire dépendant de la huntingtine	41
Figure 7 : Illustration schématique des fonctions biologiques de la huntingtine sauvage	43
Figure 8 : Modèle de pathogenèse cellulaire de la maladie de Huntington	45
Figure 9 : Signalisation intracellulaire après activation du récepteur TrkB	48
Figure 11 : Effet de l'expression de la huntingtine sur l'activité des promoteurs du bdnf	49
Figure 10 : Mécanisme moléculaire de l'action de la Htt sur la transcription de l'exon II du bdnf	49
Figure 12 : Représentation schématique des constructions utilisées pour la génération de modèles animaux de la maladie de Huntington	53
Figure 13 : Neurogenèse dans le cerveau de rongeur adulte	67
Figure 14 : Etapes de la neurogenèse dans l'hippocampe des mammifères adultes	68
Figure 15 : Immunodétection des cellules du gyrus dentelé de souris ayant intégré le BrdU	70
Figure 16 : Immunodétection de la doublecortine dans le gyrus dentelé de l'hippocampe de souris adulte	72
Figure 17 : Vérification de la localisation de l'expression de la recombinaison Cre	91
Figure 18 : Construction des lignées Hdh ^{S1181A/S1201A} et Hdh ^{S1181D/1201D}	92
Figure 19 : Contrôle des niveaux de phosphorylation de la huntingtine	93
Figure 20 : Test du rotarod chez la souris	94
Figure 21 : Test de l'open-field chez la souris	95
Figure 22 : Test du labyrinthe en croix surélevée chez la souris	96
Figure 23 : Test du Novelty Suppressed Feeding	97
Figure 24 : Dispositif d'enregistrement du test de la nage forcée chez la souris	98
Figure 25 : Evaluation du degré de maturation neuronale	101
Figure 26 : Analyse de Sholl pour l'évaluation de la complexité de l'arborisation dendritique	102
Figure 27 : Principe de la PCR quantitative en temps réel	103
Figure 28 : Méthode de mesure des concentrations protéiques de BDNF par ELISA	106
Figure 29 : Trajectoire des vésicules contenant le BDNF-Cherry	107
Figure 30 : Kymographe pour l'analyse de la vitesse de migration des vésicules de BDNF	107
Figure 31 : La mutation Q111 de la huntingtine ralentit le transport vésiculaire du BDNF et diminue sa sécrétion par les neurones hippocampiques de souris	121
Figure 32 : Effet de la mutation Q111 sur le comportement anxio-dépressif des souris âgées.	122
Figure 33 : La forme non phosphorylée de la huntingtine sur S1181/S1201 entraîne une augmentation de la transcription de bdnf	209
Figure 34 : Altérations du phénotype comportemental chez les souris R6/1	210
Figure 35 : Effet du statut de phosphorylation de la huntingtine sur le phénotype comportemental des souris R6/1	211
Figure 36 : Effet du statut de phosphorylation de la huntingtine sur la survie neuronale et l'expression de BDNF chez les souris R6/1	212
Figure 37 : Action de la huntingtine sur l'expression, le transport et la sécrétion de BDNF	221
Figure 38 : Schéma récapitulatif des observations	228

Liste des tableaux

Tableau 1 : Atrophie de l'hippocampe observée chez des patients Huntington	24
Tableau 2 : Critères diagnostiques du trouble anxieux généralisé selon le DSM-IV-TR.....	28
Tableau 3 : Troubles de l'humeur chez les patients Huntington.	29
Tableau 4 : Prise en charge médicamenteuse des symptômes de la maladie de Huntington.....	33
Tableau 5 : Patron d'expression de la huntingtine chez l'Homme	38
Tableau 6 : Protéines interagissant avec la huntingtine	39
Tableau 7 : Récapitulatif des différentes lignées de rongeurs construites pour l'étude de la maladie de Huntington	57
Tableau 8 : Altération des comportements de type anxio-dépressifs dans les modèles animaux de la maladie de Huntington	62
Tableau 9 : Concentrations de BDNF dans l'hippocampe des animaux modèles de la maladie de Huntington ...	66
Tableau 10 : Altérations de la neurogenèse hippocampique adulte dans les modèles animaux de la maladie de Huntington	73
Tableau 11 : Effets des traitements sur le phénotype anxio-dépressif des modèles de HD	76
Tableau 12 : Effet des traitements sur la neurogenèse dans l'hippocampe des animaux modèles de HD	81
Tableau 13 : Tampon de PCR pour le géotypage des souris Hdh ^{Q111}	89
Tableau 14 : Descriptif des amorces utilisées en PCR pour le géotypage des souris Hdh ^{Q111}	90
Tableau 15 : Amorces utilisées pour le séquençage des animaux mutants.	93
Tableau 16 : Amorces utilisées pour la qPCR	104
Tableau 17 : Composition du tampon d'extraction de protéines pour l'ELISA	105
Tableau 18 : Constructions employées dans l'étude du transport du BDNF	106
Tableau 19 : Récapitulatif des anticorps utilisés en immunohistochimie et Western blot.....	109
Tableau 20 : Comparatif des observations réalisées sur les différentes lignées de souris étudiées.....	220

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	ou protein kinase B (PKB)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BAC	Bacterial artificial chromosome
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BrdU	Bromo-déoxyuridine
Cdk5	Cyclin-dependant kinase 5
CREB	cAMP-response element binding protein
DAB	Diaminobenzidine
DCX	Doublecortine
DG	Dentate gyrus, gyrus dentelé
EDM	Episode dépressif majeur
EE	Environnement enrichi
EPM	Elevated plus maze, test du labyrinthe en croix surélevé
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FST	Forced swim test, test de nage forcée
HD	Huntington's disease, maladie de Huntington
Hdh	Huntington's disease homolog gene
HTT	Huntingtine
ISRS	Inhibiteur sélectif de recapture de la sérotonine
KI	Knock-in
KO	Knock-out
MAPK	Mitogen activated protein kinase
NeuN	Neuronal Nuclei
NGF	Nerve growth factor
NSF	Novelty-suppressed feeding, test d'hypophagie induite par la nouveauté
OF	Open field
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
polyQ	polyglutamination
SERT	Transporteur de la sérotonine
SGZ	Subgranular zone, zone sous-granulaire
SNC	Système nerveux central
SVZ	Subventricular zone, zone sous-ventriculaire
TAG	Trouble anxieux généralisé
TrkB	Tropomyosin-related kinase B
TST	Tail-suspension test, test de suspension par la queue
YAC	Yeast artificial chromosome

Avant-propos

La maladie de Huntington (HD) est une maladie neurodégénérative héréditaire rare qui affecte 3 à 15 personnes sur 100 000 en Europe occidentale (Walker, 2007). Sa transmission se fait de manière autosomique dominante par le gène IT15 codant la huntingtine (HTT). La séquence génique contient une répétition polymorphique du trinucléotide CAG dans sa région 5' (Figure 1), qui code une expansion polyglutaminique (polyQ) en position N-terminale. Chez l'Homme, la longueur de ce fragment est variable, et généralement comprise entre 11 et 36 acides glutaminiques. Lorsque la répétition dépasse les 36-40 glutamines, la protéine induit le développement de la maladie (Borrell-Pagès et al., 2006).



Figure 1: Représentation schématique du gène IT15

En conditions normales, l'expansion CAG compte 11 à 36 répétitions (en vert) ; au-delà, le gène est dans sa forme mutée (en rose).

L'expression de la protéine huntingtine mutée induit une neurodégénérescence progressive qui se produit principalement dans le striatum et s'étend à d'autres régions cérébrales incluant le cortex, l'hypothalamus et l'hippocampe (Cudkowicz & Kowall, 1990; Jackson et al., 1995; Kremer et al., 1990; Rosas et al., 2003; Sotrel et al., 1993; Spargo et al., 1993; Vonsattel et al., 1985). La maladie débute généralement vers 40 ans et conduit à la mort en 10 à 20 ans. Au cours de cette période, le contrôle moteur décline avec l'apparition de troubles comme la chorée et la bradykinésie, et finalement la survenue de troubles psychiatriques graves tels que la démence. Les manifestations psychiatriques sont une composante majeure des premiers symptômes de HD, parmi lesquels la dépression et l'anxiété sont fréquemment rapportées au cours des stades pré-symptomatiques (Duff et al., 2007; Julien et al., 2007). La prévalence de la dépression au sein de la population HD a été estimée entre 30 et 70% (Julien et al., 2007; Marshall et al., 2007; van Duijn et al., 2007). Cependant, les raisons de cette fréquente co-morbidité restent encore floues.

L'objectif de mon travail de thèse a ainsi été de clarifier le **rôle de la huntingtine dans les troubles anxio-dépressifs**. Pour cela, j'ai travaillé sur différents modèles murins, afin d'apporter des éléments sur l'implication de la huntingtine autant dans le contexte de la maladie de Huntington que dans des conditions « physiologiques ». La première partie de ce travail porte sur l'étude d'un modèle de la maladie de Huntington, les souris *Hdh*^{Q111}, et fait l'objet d'un article publié dans *Neuroscience Letters* (*Article I*, Orvoen et al., 2012). Dans un deuxième temps, nous avons étudié la fonction de la huntingtine sauvage dans un modèle d'inactivation conditionnelle de la protéine tout d'abord (*Article II*), puis dans un modèle plus précis, pour étudier l'importance de deux sites de phosphorylation de la huntingtine (sérines 1181 et 1201, *Article III*).



INTRODUCTION

La maladie de Huntington - Observations cliniques

I. Symptomatologie

Le médecin américain George Huntington (1850-1916) fait au XIX^{ème} siècle la première description complète de cette maladie qui portera par la suite son nom. Il la décrit comme étant une chorée inhabituelle et rare, de forme héréditaire, pouvant être associée à des signes de démence et de suicide et touchant les individus à l'âge adulte. La maladie de Huntington est ainsi caractérisée par une triade de symptômes : moteurs, cognitifs, et psychiatriques, qui se manifestent de manière très variable selon les patients. La survenue des symptômes est très progressive, et débute généralement vers l'âge de 40 ans, pour mener inéluctablement à la mort en 10 à 20 ans. Il existe également des formes juvéniles, au cours desquelles les symptômes apparaissent très précocement et entraînent un déclin et un décès rapides. Une corrélation inverse entre la longueur de l'expansion polyglutaminée et l'âge de survenue des symptômes a été relevée : plus la répétition est importante, plus la maladie apparaît tôt et évolue rapidement. Pour une revue complète de la symptomatologie de la maladie, voir Novak & Tabrizi 2011, Youssov & Bachoud-Lévi, 2008.

Les troubles moteurs se caractérisent par des déficits variés tels que : chorée (succession de mouvements spontanés excessifs, abrupts, imprévisibles et irréguliers), dystonie (mouvements anormaux distincts de la chorée), troubles de la coordination gestuelle, akinésie (difficulté à initier le mouvement), troubles oculomoteurs, et impersistance motrice (incapacité à maintenir une position fixe). La survenue de ces troubles entraîne des difficultés croissantes de la marche et de l'équilibre.

Les troubles cognitifs débutent discrètement, généralement 15 ans avant le diagnostic moteur (Paulsen, 2011), et sont associés à une capacité fonctionnelle réduite indépendante des troubles moteurs. Les symptômes rencontrés sont une diminution des fonctions exécutives (et notamment des difficultés de concentration, de planification, et dans la réalisation de plusieurs tâches en même temps), des troubles psychomoteurs tels que l'impulsivité, des troubles de la perception visuospatiale, des pertes de mémoire et des difficultés d'apprentissage. Ces troubles s'aggravent progressivement pour aboutir, au stade le plus avancé de la maladie, à une démence de type sous-corticale (Novak & Tabrizi 2011). On appelle ainsi la catégorie de démence qui implique des zones spécifiques du cerveau (substance blanche, ganglions de la base, thalamus et hypothalamus) et qui se retrouve également dans la maladie de Parkinson ou encore dans le syndrome de Korsakoff. Cette démence, d'installation très progressive, se manifeste essentiellement

par un ralentissement de la pensée, des troubles de la mémoire, de l'attention (surtout des fonctions exécutives impliquées dans la réalisation des tâches complexes).

Une très grande variabilité de troubles psychiatriques peut être rencontrée, la survenue de l'un ou l'autre de ces troubles et leur intensité variant considérablement d'un malade à l'autre, mais aussi en interaction étroite avec la situation dans laquelle il se trouve. Tout comme les déficits cognitifs, les troubles psychiatriques sont observables très en amont de la progression de la pathologie. C'est le cas par exemple de la dépression et de l'anxiété, qui surviennent souvent avant l'annonce de la maladie, apparaissent ensuite seulement épisodiquement, voire s'estompent dans certains cas (Craufurd et al., 2001). Les symptômes comportementaux et psychiatriques les plus fréquemment rencontrés sont la dépression, l'irritabilité (avec agressivité selon les cas) et l'apathie.

II. Atrophie cérébrale et altération de la neurogenèse dans la maladie de Huntington

La lésion neuropathologique caractéristique de la maladie de Huntington est une dégénérescence préférentielle des neurones striataux. La dégénérescence survient en premier lieu dans le striatum (Rosas et al., 2003 ; Vonsattel et al., 1985), avant de s'étendre à d'autres régions incluant le cortex (Cudkowicz & Kowall, 1990; Jackson et al., 1995 ; Rosas et al., 2003 ; Sotrel et al., 1993), le cervelet (Rosas et al., 2003), l'hippocampe (Rosas et al., 2003 ; Spargo et al., 1993) et l'hypothalamus (Kremer et al., 1990), (Figure 2). Un travail réalisé sur des coupes de cerveaux humains en post-mortem rapporte que les dommages cérébraux s'accroissent avec la sévérité de la maladie (de la Monte, et al., 1988). Ces processus dégénératifs entraînent une atrophie générale du cerveau, dont le volume et le poids sont diminués dans 90% des cas (Murgod et al., 2001). Ainsi, plusieurs travaux d'imagerie par résonance magnétique (IRM) rapportent une diminution du volume de la matière grise et de la matière blanche, et une augmentation du volume de liquide céphalo-rachidien. L'étude TRACK-HD portant sur un nombre important de patients, classés en stades pré-symptomatique et précoce de la maladie, est une étude ayant analysé les caractères morphologiques du cerveau des patients par imagerie dans le temps (Tabrizi et al., 2009, 2011). Il est ressorti de cette étude que les patients HD présentaient un volume cérébral diminué avant même l'apparition de symptômes, et que cela s'accroissait à la fois avec la maladie (plus important chez les patients d'HD déclarée que pré-symptomatique) et dans le temps (perte plus importante un an après la première évaluation). De même, une diminution du volume total du striatum, ainsi que des sous-régions noyau caudé et putamen, est mesurée chez tous les sujets HD, et plus sévère chez les sujets déclarés, tandis que le volume des ventricules latéraux est augmenté. Des anomalies dans les matières grise et blanche ont également été relevées, ainsi qu'un amincissement du cortex. Les mesures faites un an plus tard

révèlent que tous ces paramètres s'aggravent plus vite chez les porteurs de la mutation, pré-HD comme HD manifeste, que dans le groupe contrôle. Un autre travail, s'appuyant sur le projet TRACK-HD, s'est intéressé au cortex cingulaire, puisque des études précédentes avaient démontré une activation élevée de cette région en IRMf, et une connectivité réduite avec les zones préfrontales latérales. Ce travail a ainsi mis en évidence une diminution de 10% du volume du cortex cingulaire chez les patients HD précoces, et une perte intermédiaire chez les individus pré-symptomatiques (Hobbs et al., 2011). De plus, ils ont montré un lien entre un score élevé de dépression et un volume réduit du cortex cingulaire rostral. D'autres travaux rapportent également une réduction de volume d'autres sous-régions corticales, telles que le cortex préfrontal dorsolatéral, le cortex orbitofrontal, et l'insula (Ille et al., 2011).

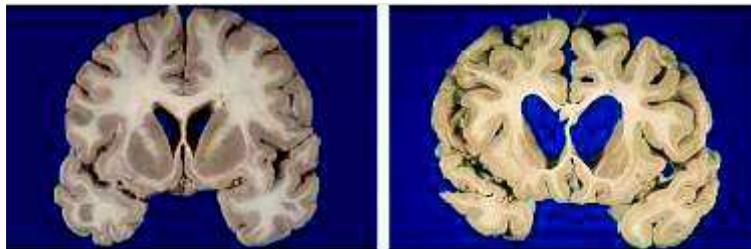


Figure 2 : Atrophie cérébrale dans la maladie de Huntington

Cerveau d'un individu sain (à gauche) et d'un patient Huntington (à droite). On observe un très net élargissement des ventricules latéraux, ainsi qu'une atrophie du striatum, du cortex, et du cervelet. On remarque également une diminution apparente de la substance blanche.

Clichés P. Rémy, URA-CEA-CNRS 2210, Orsay

Des diminutions du volume de l'hippocampe sont observées dans de nombreuses affections neuropsychiatriques ainsi que chez le sujet âgé (Geuze et al., 2005). Plusieurs études rapportent ainsi un volume hippocampal réduit chez les patients présentant un épisode dépressif majeur. Les patients Huntington présentent également une réduction du volume de l'hippocampe, qui semble apparaître précocement (Rosas et al., 2003), (Tableau 1). Deux hypothèses permettraient d'expliquer l'atrophie observée dans cette région cérébrale. La première consiste en une mortalité cellulaire accrue due à la toxicité induite par la huntingtine mutée, ou à la perte du support trophique que constitue le BDNF. La seconde serait une perte de la capacité de neurogenèse dans l'hippocampe des malades, causée par un déficit de BDNF. En effet, des changements dans les taux de BDNF ont été liés à une modification de la neurogenèse hippocampique adulte (Duman, 2004a).

Tableau 1 : Atrophie de l'hippocampe observée chez des patients Huntington

Etude clinique	Observations morphologiques	Références
Voxel-based morphométrie sur 18 patients	Atrophie de l'hippocampe	Ille et al., 2011
Voxel-based morphométrie sur 33 patients	Atrophie de l'hippocampe	Jech et al., 2007
IRM de 18 patients avec HD précoce à modérée	Atrophie de l'hippocampe	Rosas et al., 2003
Autopsie de 23 cas adultes	Pas d'atrophie	Sieradzan, Mann, & Dodge, 1997
Autopsie de 9 patients masculins	35% de perte cellulaire dans la région CA1 de l'hippocampe Pas de changement de volume du gyrus dentelé, CA3, et CA1.	Spargo et al., 1993

Toutefois, la neurogenèse a été très peu explorée chez les individus sains, comme atteints de HD. En effet, ces données ne sont accessibles que post-mortem. Curtis et ses collaborateurs ont ainsi observé une prolifération cellulaire augmentée dans la couche sous-épendymaire du cerveau de patients HD (Curtis et al., 2003), alors que dans un second travail (Low et al., 2011), ils ne révèlent pas de différence des niveaux de prolifération dans la SGZ des patients HD. La sévérité et la nature (motrice et/ou psychiatrique) des symptômes au moment du décès ne semblent pas non plus affecter la capacité proliférative des progéniteurs. Toutefois, ces observations ont été conduites aux stades tardif et terminal de la maladie : les effets précoces de la mutation polyQ sur la neurogenèse ne sont pas accessibles chez les patients. C'est pourquoi il est intéressant d'étudier ce processus dans des modèles de la maladie de Huntington, afin de vérifier si les atrophies cérébrales rapportées chez les patients sont le fruit d'une dégénérescence neuronale et/ou d'une neurogenèse diminuée. Cela permettrait également de faire le lien avec les pertes de mémoire observées dans la pathologie.

III. Les taux de Brain-derived neurotrophic factor dans la maladie de Huntington

Le Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) est le facteur de croissance le plus répandu dans le système nerveux central (SNC). Il est essentiel au développement du SNC et assure également des fonctions fondamentales dans le cerveau mature : il est impliqué dans la plasticité synaptique, l'apprentissage, la mémoire et l'humeur (Cunha et al., 2010; Duman, 2004b; Martinowich & Lu, 2008; Mattson et al., 2004). Parce que le BDNF joue un rôle crucial dans le développement et la plasticité du cerveau, il est largement impliqué dans les maladies psychiatriques telles que les troubles

dépressifs majeurs et l'anxiété. Il a notamment été observé que les antidépresseurs augmentent l'expression de BDNF (Conti, et al., 2002; Nibuya, et al., 1995, 1996; Wyneken et al., 2006), bien qu'un comportement dépressif ne soit pas nécessairement lié à une diminution de production de cette neurotrophine. En revanche, l'expression cérébrale de BDNF est réduite par le stress (Martinowich, et al., 2007), soulignant le fait que la dépression induite par un stress chronique et l'anxiété pourraient impliquer une baisse de la production de BDNF. La prévalence des troubles anxieux et dépressifs dans la population HD, ainsi que le caractère neurodégénératif de la maladie ont mené les cliniciens à étudier les niveaux d'expression de ce facteur.

Plusieurs observations cliniques rapportent ainsi une diminution des concentrations plasmatique et cérébrale de BDNF chez les patients HD. Ainsi, le taux sérique de BDNF est diminué de près de 45% chez les patients Huntington (Figure 3) (Ciammola et al., 2007).

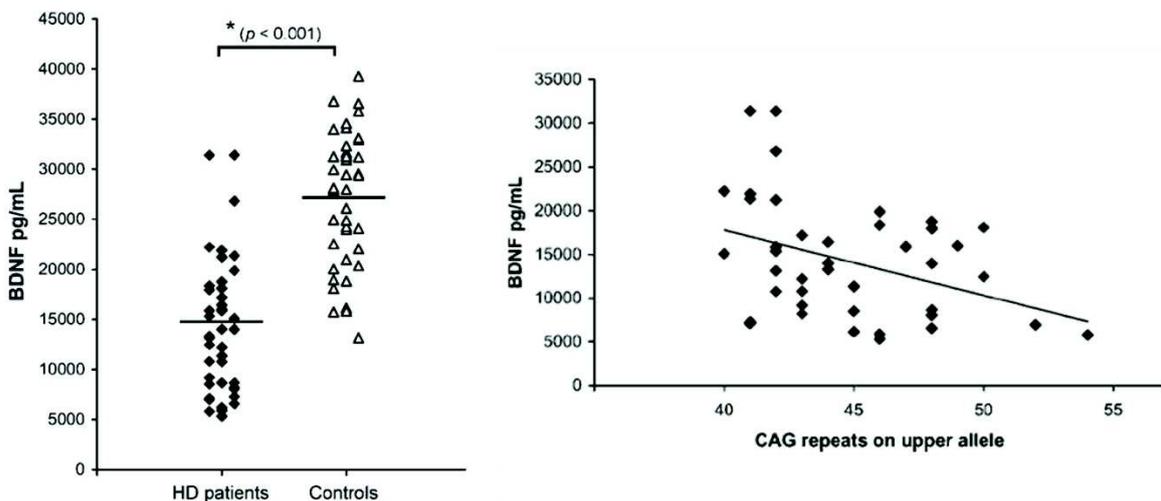


Figure 3 : Concentrations de BDNF dans le sérum de patients Huntington

Figure de gauche : Une diminution des taux sériques de BDNF de 45% est observée chez les malades (en noir) par rapport aux sujets sains (en blanc).

Figure de droite : Influence du nombre de CAG sur la concentration de BDNF. Corrélation inverse obtenue par régression linéaire entre la concentration de BDNF dans le sérum de patients HD, et le nombre de CAG portés par l'allèle muté de la huntingtine.

D'après Ciammola et al., 2007

Il est intéressant de noter que les concentrations sériques de BDNF des malades sont inversement corrélées avec la longueur de l'expansion polyglutaminique : plus la répétition est importante, plus la concentration de BDNF est faible (Figure 3) (Ciammola et al., 2007).

De même, d'importantes réductions de l'expression de BDNF ont été mesurées dans le cerveau de patients Huntington. Ces pertes vont de 50 à 80 % dans le noyau caudé et le putamen,

tandis qu'aucun changement n'est relevé dans le cortex pariétal ou temporal, ni dans l'hippocampe (Ferrer et al., 2000). Une autre étude révèle quant à elle une chute de 45% du taux de protéine et de 65% de son ARN messenger dans le cortex fronto-pariétal de patients Huntington de stades avancés (Zuccato et al., 2001). Un dernier travail a évalué les concentrations de protéine BDNF dans plusieurs structures cérébrales de patients HD, révélant une baisse dans le cortex, le striatum, le cervelet, et la substance noire (Seo, et al., 2004). Ces altérations sont déjà présentes aux stades précoces de la maladie, indiquant un déficit précoce de la régulation trophique dans le processus neurodégénératif.

Ces travaux pourraient indiquer une altération de la production de BDNF, mais aussi de sa distribution, puisque le BDNF est diminué dans le striatum tandis qu'il n'est pas produit localement, mais sécrété par les neurones corticaux. Ces données dans le contexte pathologique nous questionnent quant au rôle qu'assure la huntingtine sauvage dans la transcription et le transport du BDNF. La perte de ces fonctions pourrait en effet contribuer à la pathogenèse de la maladie de Huntington.

Une expression anormale de BDNF et de son récepteur de haute affinité TrkB ayant été observée en réponse à des lésions neuronales, l'hypothèse qu'une réduction des taux de TrkB ferait partie de la physiopathologie de HD a été émise. Conformément à cette suggestion, des quantités réduites du récepteur TrkB ont été mesurées post-mortem dans le noyau caudé et/ou le cortex de cerveaux de patients HD (Ginés et al., 2006; Zuccato et al., 2008).

IV. Troubles anxio-dépressifs dans la maladie de Huntington

Parmi les troubles psychiatriques, nous nous intéressons plus particulièrement aux troubles anxieux et dépressifs. En effet, ces deux aspects de la maladie de Huntington sont très fréquents. Cependant, ce sont également des affections courantes dans la population générale, qui ont conséquemment été longtemps considérées comme indépendantes de la pathologie. En effet on peut penser que des personnes se sachant affectées d'une maladie incurable vont développer des troubles anxio-dépressifs (van Duijn et al., 2007).

A. Éléments généraux sur les troubles anxio-dépressifs

Dans la population générale, la prévalence des épisodes dépressifs majeurs (EDM) et des troubles anxieux généralisés (TAG) est estimée respectivement à 28,8 et 12% (Kessler et al., 2008). Ces données reposent sur l'étude d'une cohorte de 5000 sujets américains (National Comorbidity Survey). Il apparaît également qu'entre 6,6 et 7,5% des personnes examinées présentaient une association des deux syndromes.

1. Les épisodes dépressifs majeurs

Le diagnostic des épisodes dépressifs majeurs (EDM) est subjectif et basé sur une combinaison de symptômes (Krishnan & Nestler, 2008) codifiés dans le Manuel Statistique et Diagnostique des Troubles Mentaux, 4^{ème} version révisée (DSM-IV-TR). Pour qu'un épisode dépressif majeur soit caractérisé, celui-ci doit durer au moins deux semaines et engendrer une souffrance significative, et requiert la présence d'au minimum 5 des symptômes décrits dans la Figure 4.

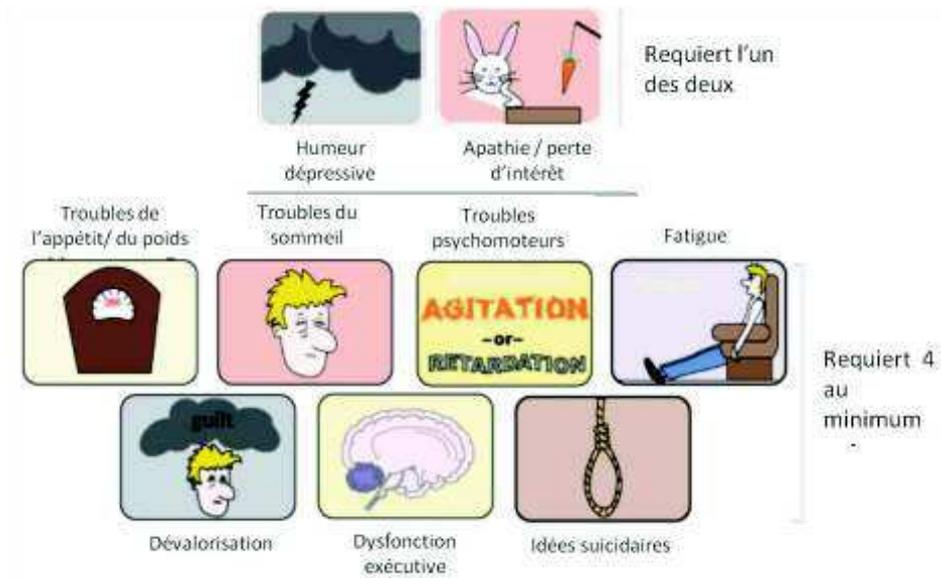


Figure 4 : Symptômes des épisodes dépressifs majeurs

D'après Stahl et al., 2008

2. L'anxiété

L'anxiété est un état psychologique et physiologique caractérisé par des composantes somatiques, émotionnelles, cognitives et comportementales. Si l'anxiété est considérée comme une réaction normale face à un facteur de stress, on parle alors de trouble anxieux lorsqu'elle devient chronique et inappropriée (DSM-IV). Les troubles anxieux peuvent être séparés en trois catégories : le trouble anxieux généralisé, la phobie, et le trouble panique, chacun ayant ses caractéristiques et symptômes propres, et exigeant un traitement différent. Le trouble anxieux généralisé (TAG) est un trouble chronique caractérisé par une anxiété irrationnelle et disproportionnée, qui n'est pas axée sur un objet particulier, et interfère avec le déroulement du quotidien (Torpy et al., 2011). Les symptômes du TAG sont décrits dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Critères diagnostiques du trouble anxieux généralisé selon le DSM-IV-TR

-
- A. Anxiété ou inquiétude excessive, survenant une majorité des jours pendant au moins 6 mois, au sujet d'événements ou activités variés (ex : travail ou performances scolaires).
 - B. La personne éprouve des difficultés à contrôler cette anxiété.
 - C. L'anxiété et l'inquiétude sont associés à trois (ou plus) des six symptômes suivants (dont au moins certains symptômes présents une majorité du temps sur les 6 derniers mois).
 1. agitation ou sensation d'être survolté
 2. fatigue
 3. Irritabilité
 4. Tension musculaire
 5. Troubles du sommeil (difficulté à s'endormir ou à rester endormi, sommeil agité)
 6. Difficultés à se concentrer, trous de mémoire
 - D. L'objet de l'anxiété et l'inquiétude ne se rapporte pas aux caractéristiques d'autres troubles (trouble obsessionnel-compulsif, stress post-traumatique, etc.)
 - E. L'anxiété, les soucis ou les symptômes physiques entraînent une souffrance cliniquement significative ou une altération du fonctionnement social, professionnel ou d'autres domaines importants.
 - F. La perturbation n'est pas due aux effets physiologiques directs d'une substance (drogue d'abus ou médicament par exemple) ou d'une affection médicale générale, et ne survient pas exclusivement au cours d'un trouble de l'humeur, trouble psychotique, ou un trouble envahissant du développement.
-

B. Prévalence des troubles anxio-dépressifs dans la maladie de Huntington

Une méta-analyse (Tableau 3) de treize études portant sur la survenue des troubles psychiatriques chez les patients Huntington amène ainsi à une évaluation des prévalences de dépression et d'anxiété respectivement à 37,5-70% et 37,5-62%, c'est-à-dire bien au-delà des taux observés dans la population générale. Ces larges intervalles proviennent probablement de la diversité des échelles employées pour évaluer les troubles mais également de la variabilité des populations de sujets dans chacune des études (âge, sexe, stade de la maladie, etc.). Il apparaît également que les porteurs de la mutation ne présentant pas encore de symptômes moteurs, voire ignorants de leur statut génétique, sont plus susceptibles de présenter de tels troubles que la population générale. La question de l'augmentation de la prévalence, ou de l'aggravation des troubles de l'humeur avec le développement de la maladie est assez peu claire dans la littérature. Certaines études rapportent des manifestations plus fréquentes ou plus importantes chez les patients à forte symptomatologie motrice, d'autres ne notent pas de différence entre les patients pré- et symptomatiques.

Dans le Tableau 3, on voit qu'il existe plusieurs échelles employées pour évaluer les troubles de l'humeur. Certaines, sont spécifiques à la maladie de Huntington, tandis que d'autres sont utilisées plus généralement en psychiatrie. La diversité des échelles employées est à double tranchant : à la fois elle rend difficile la comparaison des études entre elles, puisque ne portant pas sur les mêmes critères ; et à la fois, elle renforce les résultats obtenus.

Tableau 3 : Troubles de l'humeur chez les patients Huntington.

Etude clinique	Observations psychiatriques	Echelle diagnostique	Traitement pharmacologique	Réfs.
134 patients (47% d'hommes)	39% sont dépressifs 16% ont fait une tentative de suicide 34% ont des idées suicidaires	UHDRS PBA-HD	34% ont un traitement antidépresseur 24% ont un traitement sédatif ou anxiolytique	Craufurd et al., 2001
681 patients (46% d'hommes)	Plus de symptômes psychiatriques (dépression, anxiété, trouble obsessionnel-compulsif) que les personnes saines. Plus de symptômes psychiatriques chez les patients avec déficit moteur sévère.	UHDRS SCL-90-R	ND	Duff et al., 2007
217 patients présentant des symptômes moteurs	32.8% ont des troubles affectifs L'âge de survenue des symptômes moteurs chez les patients avec troubles affectifs est plus tardif que chez ceux sans troubles (respectivement 43,4 et 38,7 ans).	DSM-III criteria Diagnostic Interview Schedule	ND	Folstein et al., 1987
204 participants asymptomatiques ignorant leur statut génétique	20% ont eu un EDM 17% ont eu un trouble anxieux, et 11% un TAG Le taux de dépression augmente à mesure que s'approche l'âge de survenue des manifestations cliniques.	CIDI DSM-III criteria	ND	Julien et al., 2007
152 patients, incluant des pré-symptomatiques (45,5% d'hommes)	Augmentation de la prévalence de dépression chez les individus HD, pré-symptomatiques inclus. Pas d'augmentation de la prévalence avec le développement de HD	PBA-HD	ND	Kingma et al., 2008
29 patients	41% sont dépressifs 34% sont anxieux	NPI	31% ont un traitement antidépresseur (ISRS) et/ou neuroleptique	Kulisevsky et al., 2001
21 patients, stade précoce à modéré (43% d'hommes)	43% présentent des troubles de l'humeur. 28,6% ont eu un EDM, et 14,3% une dépression non majeure. 25% ont souffert d'anxiété.	DSM-IV criteria	ND	Leroi et al., 2002
254 participants à risque ou récemment diagnostiqués (29% d'hommes)	Score d'anxiété élevé chez les patients HD pré-symptomatiques et avérés. 25% des patients pré-symptomatiques et HD cliniques sont dépressifs La prévalence des symptômes augmente avec le développement de HD.	SCL-90-R CES-D	21% ont un traitement antidépresseur, anxiolytique, ou antipsychotique	Marshall et al., 2007
26 patients (65% d'hommes)	65,4% sont dépressifs 11% ont des idées suicidaires, sans qu'aucun ne soit passé à l'acte 61,5% sont anxieux	UHDRS	ND	Murgod et al., 2001
52 patients (48% d'hommes)	98% des patients présentent des symptômes psychiatriques, dont 51,9% d'anxiété	UHDRS NPI	4% sont sous traitement antidépresseur (ISRS)	Paulsen et al., 2001

Etude clinique	Observations psychiatriques	Echelle diagnostique	Traitement pharmacologique	Réfs.
2,835 patients (47,5% d'hommes)	Plus de 40% des patients présentent des symptômes dépressifs. Plus de 10% ont fait une tentative de suicide.	UHDRS	> 50% ont été traités par antidépresseur par le passé.	Paulsen et al., 2005
111 patients HD	Prévalence de symptômes neuropsychiatriques plus élevée que la moyenne. La prévalence de dépression n'augmente pas avec le temps ni au cours de HD.	PBA-HD	ND	Thompson 2012
154 patients HD (45,7% d'hommes)	Plus de troubles anxio-dépressifs chez les patients HD pré- et symptomatiques que chez les contrôles sains. 17,9 % présentent un EDM, 5% présentent un TAG, et 15,7% d'autres troubles anxieux. Les individus pré-symptomatiques présentant des troubles psychiatriques sont ceux ayant les scores moteurs les plus mauvais.	DSM-IV criteria CIDI	26,4% ont un traitement antidépresseur, 18,6% neuroleptique et 20,7% par benzodiazépine	van Duijn et al., 2008

CES-D: Center for Epidemiological Studies Depression Scale
 CIDI: Composite International Diagnostic Interview
 DSM-III/IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 3rd/4th edition
 NPI: Neuropsychiatric Inventory

PBA-HD: Problem Behaviours Assessment for Huntington Disease
 SCL-90-R: Symptom Checklist 90 Revised
 UHDRS: Unified Huntington Disease Rating Scale

V. Thérapies employées dans le traitement de la maladie de Huntington

Il n'existe aujourd'hui aucun traitement qui puisse arrêter ou même ralentir la progression de la maladie de Huntington. Les seuls traitements efficaces à l'heure actuelle visent l'amélioration des symptômes, et sont regroupés dans le Tableau 4. Les données probantes concernant l'efficacité des médicaments dans le traitement de HD sont très rares, il n'y a donc pas (exception faite de la tétrabénazine, voir ci-après) de traitement formellement approuvé. Ainsi, le choix des agents pharmacologiques est principalement fondé sur l'expérience clinique (Mestre & Ferreira, 2012; Novak & Tabrizi, 2011; Youssov & Bachoud-Lévi, 2008). Notamment, certains traitements sont prescrits bien que des (rares) études aient mis en évidence leur inefficacité à améliorer les symptômes de la maladie (Mestre & Ferreira, 2012).

A. Prise en charge des déficits moteurs

Différentes molécules sont utilisées dans le traitement des troubles moteurs, tels que les neuroleptiques et la tétrabénazine (un agent de déplétion de la dopamine inhibant le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2) contre la chorée et la dyskinésie. Malheureusement, ces traitements ne sont pas sans effets secondaires. A titre d'exemple, la tétrabénazine qui montre la meilleure efficacité dans la maladie et est donc le traitement de première intention, induit dépression et sédation chez les patients (Frank, 2010; Mestre & Ferreira, 2012) ainsi que dans un modèle murin de HD (Wang et al., 2010). La nabilone, un agoniste synthétique des récepteurs cannabinoïdes, représente une piste thérapeutique intéressante. En effet, cette molécule structurellement proche du delta-9-tétrahydrocannabinol (THC), montre des effets sur les symptômes moteurs, une bonne tolérance, et améliorerait même les scores aux tests neuropsychiatriques (Curtis et al., 2009). Malheureusement, elle n'est pas commercialisée en France à l'heure actuelle.

B. Prise en charge des troubles de l'humeur dans la maladie de Huntington

Comme le stress, l'anxiété et la dépression peuvent aggraver les chorées, des mesures afin de traiter ceux-ci sont souvent utiles. Les troubles de l'humeur sont traités par des médicaments antidépresseurs et/ou anxiolytiques, de manière comparable à la prise en charge en dehors du contexte de HD (voir Tableau 4). Il n'y a pas de données établies concernant le traitement de la dépression dans HD, mais l'expérience montre que les antidépresseurs sont souvent efficaces (Holl et al., 2010; Mestre & Ferreira, 2012; Novak & Tabrizi, 2010). Si un inhibiteur sélectif de recapture de la

sérotonine (ISRS) comme le citalopram est généralement utilisé en traitement de première intention, les ISRS stimulants comme la fluoxétine doivent être évités car ils peuvent causer une hyperstimulation et exacerber l'anxiété, tous deux fréquents dans Huntington (Novak & Tabrizi, 2011). Des mesures non pharmacologiques sont également utilisées pour la gestion des symptômes, et sont souvent plus utiles que les mesures pharmacologiques (Novak & Tabrizi, 2011); une fois de plus, les preuves sont limitées, mais les recommandations sont fondées sur une vaste expérience clinique. De manière générale, il apparaît que le traitement de la maladie de Huntington nécessite une approche multidisciplinaire.

Tableau 4 : Prise en charge médicamenteuse des symptômes de la maladie de Huntington

Symptômes	Classe de traitement	DCI	Spécialité	Principaux effets indésirables du traitement
<i>Troubles moteurs</i>				
Chorée	Neuroleptique atypique	Olanzapine	Zyprexa®	Sédation, parkinsonisme, dyskinésie tardive, prise de poids. Risque en cas de diabète. Utile en cas d'anxiété, agitation, irritabilité
		Rispéridone	Rispéridal®	Comme ci-dessus, mais moins d'effets sur l'appétit.
		Quietapine	Xéroquel®	Comme ci-dessus, moins d'effets sur les sucres et lipides.
		Clozapine	Leponex®	Troubles gastro-intestinaux, tachycardie, altération de l'électroencéphalogramme, avec risque convulsif, incontinence, hypersalivation, prise de poids, agranulocytose
		Tiapride	Tiapridal®	Fatigue, troubles du sommeil, agitation, prise de poids, troubles de la sexualité, troubles endocriniens, troubles cardiaques, hypotension orthostatique
	Autres neuroleptiques	Sulpiride	Dogmatil®	Agitation, dystonie, akathisie, sédation, hypotension, constipation.
		Halopéridol	Haldol®	Comme ci-dessus, plus parkinsonisme, prise de poids, risque important de syndrome malin des neuroleptiques.
	Inhibiteur du transporteur VMAT2	Tétrabénazine	Xénazine®	Aggravation des déficits cognitifs, dépression, anxiété, sédation, akathisie, troubles du sommeil.
		Antagoniste des récepteurs NMDA	Amantadine	Mantadix®
			Riluzole	Rilutek®
Myoclonie, chorée, dystonie, rigidité	Anticonvulsivants/Myorelaxants	Clonazépam	Rivotril®	Sédation, ataxie, apathie, aggravation des déficiences cognitives, crises de sevrage à l'arrêt brutal du traitement
Myoclonie	Anticonvulsivants	Valproate de sodium	Dépakine®	Troubles gastro-intestinaux (TGI), prise de poids, dyscrasie, hyperammoniémie
		Lévétiracétam	Keppra®	TGI, rash, troubles de l'humeur, myalgies
Rigidité	Précurseur de la dopamine	Lévodopa	Modopar®*	TGI, hypotension orthostatique, insomnie, agitation, dépression, symptômes psychiatriques
Rigidité, spasticité, bruxisme, dystonie	Myorelaxant	Baclofène, Tizanidine	Liorésal®, Sirdalud®	Sédation, somnolence, confusion, TGI, hypotension
	Inhibiteur de la libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire	Toxine botulique	Botox®	Paralysie des muscles attenants au site d'injection

Symptômes	Classe de traitement	DCI	Spécialité	Principaux effets indésirables du traitement
<i>Troubles psychiatriques</i>				
Psychose	Neuroleptiques atypiques	Olanzapine, Rispéridone, Quétiapine	Zyprexa [®] , Rispérdal [®] , Xéroquel [®]	Voir ci-dessus. Chez les personnes âgées, risque d'attaque avec olanzapine et rispéridone
Psychose résistante	Neuroleptiques	Clozapine	Leponex [®]	Comme pour les autres neuroleptiques, plus agranulocytose, myocardite et cardiomyopathie. Nécessite des contrôles sanguins
Psychose avec symptômes négatifs importants	Neuroleptiques	Aripiprazole	Abilify [®]	Parkinsonisme, akathisie, somnolence, troubles gastro-intestinaux (TGI), tremblements, troubles de la vision
Dépression, anxiété, TOC, irritabilité, agressivité	Inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS)	Citalopram	Séropram [®]	TGI, réactions d'hypersensibilité, somnolence, syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique (SIADH), hypotension orthostatique
		Fluoxétine	Prozac [®]	Comme pour le citalopram, plus troubles du sommeil
		Paroxétine	Deroxat [®]	Comme pour les autres ISRS, et élévation du cholestérol
		Sertraline	Zoloft [®]	Comme pour les autres ISRS
	Antagoniste des récepteurs α_2 de la noradrénaline	Mirtazapine	Norset [®]	Prise de poids, œdème, sédation, céphalées, étourdissements, tremblements. Utile quand l'insomnie est un problème car sédatif.
Irritabilité, agressivité	Inhibiteur sélectif de recapture mixte de la sérotonine et de la noradrénaline (ISRSN)	Venlafaxine	Effexor [®]	Hypertension, TGI, réactions d'hypersensibilité, somnolence, agitation, SIADH, palpitations
		Neuroleptiques atypiques	Olanzapine, Rispéridone, Quétiapine	Zyprexa [®] , Rispérdal [®] , Xéroquel [®]
Altérations du cycle veille-sommeil	Hypnotiques	Zopiclone, Zolpidem	Imovane [®] , Stilnox [®]	Somnolence, confusion, troubles de la mémoire, TGI
Stabilisateurs de l'humeur	Anticonvulsivants	Valproate de sodium	Dépakine [®]	Voir plus haut
		Lamotrigine	Lamictal [®]	Réactions d'hypersensibilité, dyscrasie sanguine, vertiges, TGI dépression
		Carbamazépine	Tégrétol [®]	Réactions d'hypersensibilité, somnolence, dyscrasie sanguine, hépatite, hyponatrémie, étourdissements, TGI

* Il n'existe pas de spécialité contenant la lévodopa seule, trop instable. Dans le cas du Modopar, elle est associée à un inhibiteur de la dopa-décarboxylase (DDC), la bensérazide.

D'après : Mestre & Ferreira, 2012; Novak & Tabrizi, 2011

Aspects moléculaires

I. La huntingtine

A. A la recherche des fonctions de la huntingtine

1. La structure de la huntingtine ne révèle pas sa fonction biologique

La huntingtine humaine est une grosse protéine de 348 kDa composée de 3144 acides aminés (en comptant 23 répétitions de glutamines, Figure 5). Malgré sa grande taille, peu de motifs connus constituent la séquence protéique de HTT, rendant difficile l'identification de ses fonctions biologiques. La caractéristique structurale la mieux décrite est le domaine à répétition de glutamines (polyQ), qui commence à partir du 18^{ème} acide aminé et contient généralement 11 à 36 résidus glutamines chez les individus sains. Un domaine riche en prolines (polyP) est adjacent au domaine polyQ. Ces répétitions polyQ et polyP ne sont pas conservées entre les espèces. En effet, celles du rat et de la souris ne possèdent que 8 et 7 glutamines respectivement, et la huntingtine exprimée par la drosophile est dépourvue de répétition (Harjes & Wanker, 2003). Il apparaît que les vertébrés ont tous au moins 4 glutamines, et que l'expansion s'accroît dans les espèces « évoluées », la plus forte répétition étant retrouvée chez l'Homme (Tartari et al., 2008). Puisque cette répétition n'est pas conservée, cela suggère que la séquence polyQ n'est pas déterminante pour la fonction de HTT. La huntingtine possède également des séquences HEAT (Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), protein phosphatase 2A (PP2A), PI3-kinase TOR1) dont les fonctions ne sont pas clairement identifiées, mais qui semblent impliquées dans le transport intracellulaire et la dynamique des chromosomes (Neuwalder & Hirano, 2000). Ces régions HEAT sont fortement conservées entre les espèces.

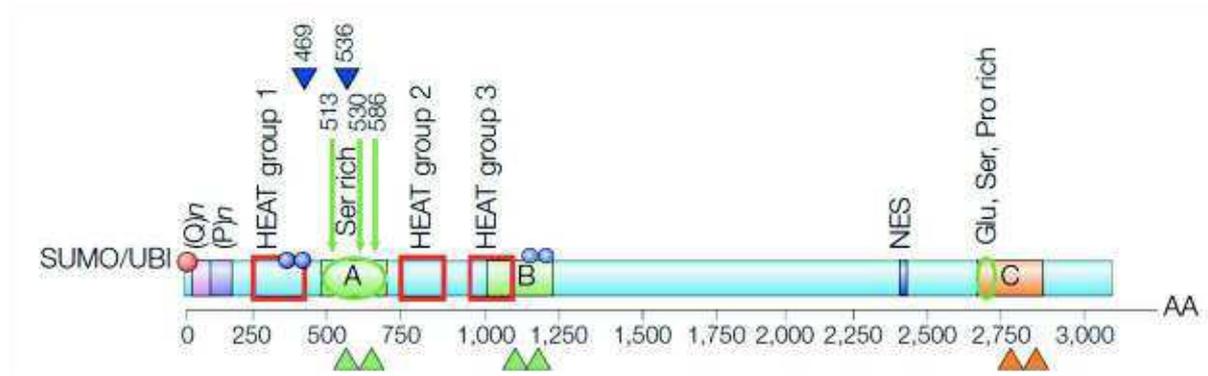


Figure 5 : Représentation schématique de la séquence protéique de la huntingtine

La huntingtine contient des régions riches en glutamines ((Q)n, en rose) et en prolines ((P)n, en violet), et 10 séquences HEAT d'interaction protéine-protéine, réparties en clusters (carrés rouges). La huntingtine comporte de nombreux sites de clivage par les caspases (flèches vertes), la calpaïne (triangles bleus), et protéases (triangles verts et orange). Le site de clivage diffère en fonction des régions cérébrales : la région B est préférentiellement clivée dans le cortex cérébral, la C dans le striatum, et la A est clivée dans les deux structures.

NES représente la séquence signal d'export nucléaire (nuclear export signal).

Les points bleus et rouges indiquent les sites subissant des modifications post-transcriptionnelles : phosphorylations en bleu, et en rouge ubiquitinylation (UBI) ou sumoylation (SUMO).

Les cercles verts représentent les régions riches en acide glutamique (Glu), sérine (Ser) et proline (Pro).

D'après Cattaneo et al., 2005

2. Le profil d'expression de la huntingtine ne laisse pas entrevoir sa fonction

La huntingtine est une protéine ubiquitaire majoritairement présente dans le cerveau et les testicules, et dans une moindre mesure dans le cœur, le foie, et les poumons (Li et al., 1993; Strong et al., 1993; Trottier et al., 1995). Dans le système nerveux central, des niveaux élevés de HTT ont été mesurés dans le cortex, le striatum et l'hippocampe. Dans le cerveau, la huntingtine est essentiellement exprimée dans les neurones, et plus faiblement dans les cellules gliales. La localisation subcellulaire de la HTT est essentiellement cytoplasmique, bien qu'on la retrouve également dans le noyau, les neurites et les terminaisons synaptiques des neurones.

Tableau 5 : Patron d'expression de la huntingtine chez l'Homme

Région	Niveau d'expression
Cerveau	
Cervelet	Elevé
Cortex	Elevé
Substantia nigra pars compacta	Elevé
Hippocampe	Moyen (très élevé dans le gyrus dentelé)
Putamen	Faible
Noyau caudé	Faible
Thalamus	Faible
Tissus périphériques	
Testicules	Elevé (surtout spermatogonies immatures)
Colon	Faible
Foie	Faible
Pancréas	Faible

D'après : Li et al., 1993; Strong et al., 1993; Trottier et al., 1995

3. La huntingtine joue un rôle dans la survie cellulaire

Afin de comprendre la fonction physiologique de la huntingtine, plusieurs équipes ont créé des modèles murins knock-out pour l'homologue du gène codant la huntingtine. Dans tous ces modèles, l'absence de huntingtine entraîne une anomalie de la gastrulation, et une mort embryonnaire entre les jours E8,5 et E10,5 du développement (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Ces données indiquent que la HTT joue un rôle vital au cours du développement embryonnaire. Pour contourner cette létalité embryonnaire précoce, un modèle murin de KO conditionnel a été créé en utilisant le système Cre/LoxP (Dragatsis et al., 2000). L'inactivation du gène au stade périnatal dans le cerveau et les testicules des animaux engendre un phénotype neurodégénératif et une stérilité.

Ainsi, la huntingtine semble jouer un rôle essentiel dans la survie cellulaire, que ce soit au cours du développement embryonnaire ou à l'âge adulte.

4. La huntingtine a de nombreux partenaires protéiques impliqués dans des fonctions cellulaires multiples

Bien que le rôle biologique de la huntingtine ne soit toujours pas identifié avec précision, la liste des protéines avec lesquelles elle interagit ne cesse de s'allonger, et 200 ont été identifiées à ce jour. Ces partenaires peuvent être regroupés en plusieurs familles fonctionnelles : protéines intervenant dans la régulation de la transcription, le transport, ou la signalisation intracellulaire, et nous donnent un aperçu des fonctions de la huntingtine. Une partie de ces différents partenaires protéiques est regroupée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Protéines interagissant avec la huntingtine

Protéine	Fonction	Effet de la polyQ
Transcription		
CA150	Activateur	Aucun
CBP	Co-activateur	↗
CtBP	Facteur de transcription	↘
EIF2AK2	Inhibiteur	Non déterminé
HYP-A,B	Facteurs d'épissage de l'ARN	↗
HYP-C	Facteur de transcription	↗
N-CoR	Co-répresseur	↗
NF-κB	Facteur de transcription	Non déterminé
p53	Facteur de transcription	Aucun
PIAS4	Co-régulateur	Non déterminé
PQBP1	Activateur	↘
REST-NRSE	Répresseur	↘
Sin3A	Répresseur	↗
SETD2	Activateur	Non déterminé
Sp1	Facteur de transcription	↗
Symplekine	Polyadénylation de l'ARNm	Non déterminé
TAF4	Co-activateur	Aucun
Transport intracellulaire et endocytose		
α-adaptine C/HYPJ	Endocytose	↘
β-tubuline	Cytosquelette, transport	Aucun
CIP4/ TRIP10	Endocytose	↗
Endophiline 1	Transport	Non déterminé
GIT1	Transport	Non déterminé
HAP1	Transport, endocytose	↗
HAP40	Transport, endocytose	↘
HIP1	Endocytose, pro-apoptotique	↘
HIP14/HYP-H/ZDH17	Transport, endocytose	↘
Optineurine	Transport, exocytose	↗
PACSIN1	Endocytose, cytosquelette d'actine	↗
Profiline 1	Cytosquelette	Non déterminé
PSD-95	Morphologie synaptique	↘
SH3GL3	Endocytose, recyclage vésiculaire	↗
Signalisation cellulaire		
Akt/PKB	Kinase	Aucun
Calpaïnes	Clivage protéique	↗
Caspases (1, 2, 3, 6, 7, 8)	Clivage protéique	↗Casp2, ↘Casp3
Cdk5	Kinase	Aucun
CIP4/TRIP10	Voie de signalisation de cdc42/insuline	↗

Protéine	Fonction	Effet de la polyQ
EIF2AK2	Kinase	Non déterminé
FIP2/HYP-L	Partenaire de la GTPase Rab8	Non déterminé
GIT1	Activateur de la GTPase Arf	Non déterminé
GRb2	Voie de signalisation de l'EGF	Non déterminé
MAP3K10	Kinase de la voie Jnk	↘
Pak2	Kinase - voie apoptose	↘
RasGAP	Activateur de la GTPase Ras	Non déterminé
SUMO-1	Modification post-traductionnelle	Non déterminé
Métabolisme		
CBS	Enzyme	Aucun
HIP2	Dégradation des protéines	Aucun
SYVN1	Ubiquitinylation et dégradation des protéines	Non déterminé

Sélection de partenaires protéiques de la huntingtine, et effet de la polyQ sur leur interaction : l'expansion glutaminique renforce (↗) ou affaiblit (↘) l'interaction protéine-protéine.

D'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064>; <http://www.genecards.org> ; Harjes & Wanker, 2003; Schulte & Littleton, 2011

Ainsi, il apparaît que la HTT de type sauvage est principalement cytoplasmique et est impliquée dans des fonctions aussi diverses que le transport vésiculaire, l'endocytose clathrine-dépendante, la transcription génique ou la signalisation post-synaptique.

B. La huntingtine, régulateur transcriptionnel

La huntingtine interagit avec de nombreux régulateurs de la transcription, néanmoins son rôle dans la transcription n'est pas connu avec précision. Sa séquence ne comporte pas de site de liaison à l'ADN ; toutefois l'extension de polyglutamination est connue pour réguler les interactions entre facteurs de transcription et régulateurs transcriptionnels. La huntingtine pourrait ainsi intervenir en tant que régulatrice de la transcription. Notamment, un nombre important de gènes présentent des dysrégulations d'expression dans les cerveaux de patients (Cha, 2007) et des modèles animaux de HD (Cha, 2007; Crook & Housman, 2011; Thomas et al., 2011; Zabel et al., 2009).

Il semble que la huntingtine active la transcription de certains gènes, tandis qu'elle réprime l'expression d'autres gènes (Schulte & Littleton, 2011). Ainsi, la huntingtine se lie aux régulateurs transcriptionnels REST/NRSF (Repressor Element-1 Transcription Factor/Neuron Restrictive Factor) et CBP (cAMP Response Element Binding Protein, ou CREB-binding protein). CBP est un co-activateur transcriptionnel qui contrôle l'acétylation/désacétylation des histones, régulant ainsi l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. REST/NRSF est un co-répresseur transcriptionnel, séquestré par la huntingtine sauvage dans le cytoplasme des cellules, où il ne peut exercer son action inhibitrice de la transcription.

Bien que sa localisation soit initialement cytoplasmique, il a aussi été démontré que la huntingtine pouvait interagir avec des récepteurs nucléaires. Elle se lie notamment aux récepteurs de

la vitamine D (VDR) et de l'hormone thyroïdienne (TR α 1), ainsi qu'aux régulateurs du métabolisme cholestérique LXR α et LXR β . Des expériences *in vitro* ont ainsi mis en évidence que la huntingtine agit comme cofacteur de la transcription des gènes induite par LXR (Futter et al., 2009).

C. La huntingtine, transporteur de vésicules et d'organelles

Un grand nombre de protéines interagissant avec la huntingtine est impliqué dans le trafic axonal. La huntingtin-associated protein 1 (HAP1) participe à la régulation de l'interaction entre la HTT, les moteurs moléculaires des microtubules, notamment la kinésine, la dynactine, et la dynéine, et leurs cofacteurs. La kinésine et la dynéine sont des moteurs moléculaires impliqués dans le transport axonal antéro- et rétrograde, respectivement, ce qui suggère que la HTT intervient dans le transport bidirectionnel de vésicules (Figure 6). Dans des modèles murins, comme dans des cultures neuronales, le knock-out de la huntingtine entraîne une altération du trafic dans les deux directions.



Figure 6 : Représentation schématique du transport vésiculaire dépendant de la huntingtine

En conditions normales (à gauche) la huntingtine s'associe à HAP1 et à la dynactine, permettant ainsi la liaison vésicule/microtubule. Le système est fonctionnel et les vésicules sont acheminées correctement.

La mutation polyQ de la huntingtine (à droite) altère l'interaction du complexe huntingtine/HAP1/p150^{Glued} avec le microtubule, et la vésicule se décroche plus fréquemment.

D'après Gauthier et al., 2004

Il est également suspecté que la huntingtine régule le transport de courte distance le long du cytosquelette d'actine dans le cadre des mécanismes d'endocytose (pour revue, voir Schulte & Littleton, 2011). La huntingtine interagit avec les protéines d'endocytose clathrine et dynamine, ainsi qu'avec des protéines de transport d'organelles comme l'endophiline 3, l' α -adaptine C, la HIP-14, et les HAP1 et 40 (Borrell-Pagès et al., 2006; Harjes & Wanker, 2003; Li & Li, 2004; Smith et al., 2005). La liaison entre les endosomes associés à HTT et le cytosquelette d'actine est favorisée par HAP40.

L'optineurine se lie au complexe HTT-HAP40, cette interaction étant supposée permettre aux vésicules d'endocytose de se déplacer le long des filaments d'actine (Caviston & Holzbaur, 2009). Il semble que la huntingtine module l'assemblage de l' α -adaptine et de HIP1, et modifie son recrutement à la membrane, régulant ainsi la formation des vésicules de clathrine. Elle influencerait également l'association des vésicules aux filaments d'actine via HIP1 et HIP2.

La huntingtine participe également au transport des mitochondries le long des neurites (Schulte & Littleton, 2011). Chez des souris sous-exprimant la huntingtine *via* un knock-out conditionnel, on observe une diminution du transport mitochondrial (Dragatsis et al., 2000). Des observations similaires ont été réalisées dans des cultures primaires de neurones, et dans des modèles animaux exprimant une HTT polyglutaminée (Shirendeb et al., 2012; Trushina et al., 2004).

Ces observations ont mené à l'hypothèse que la huntingtine pourrait jouer le rôle de plateforme, reliant les moteurs moléculaires et les organelles à transporter. En outre, elle contrôlerait les facteurs qui coordonnent le transport sur les microtubules et l'actine, et entre les deux réseaux, et ce de manière bidirectionnelle, autant sur de courtes que de longues distances.

D. La huntingtine, protéine antiapoptotique

La huntingtine sauvage a des fonctions neuroprotectrices dans de nombreux processus pro-apoptotiques. Un knock-out conditionnel de *htt*, conduit à la mort cellulaire par apoptose dans le striatum, le cortex et l'hippocampe des animaux (Dragatsis et al., 2000). En revanche, l'expression ectopique de la huntingtine sauvage protège de manière dose-dépendante contre l'ischémie et l'excitotoxicité. Des mécanismes neuroprotecteurs spécifiques de HTT sont liés aux voies de signalisation de l'apoptose. La huntingtine interagit physiquement avec la caspase-3 en inhibant son activité (Zhang et al., 2006). Ainsi, le knock-out de *htt* chez le poisson-zèbre induit une forte activation de la caspase-3 et la mort cellulaire. De plus, la HTT séquestre la protéine pro-apoptotique HIP-1 (Huntingtin interacting protein 1) et son partenaire HIPPI (HIP1 Protein Interactor), qui contrôlent la voie apoptotique dépendante de la caspase 8. La kinase PAK2 (p21-activated serine-threonine kinase) est exprimée de manière ubiquitaire dans le cerveau et liée à l'apoptose. Le clivage de PAK2 par des caspases génère un fragment (Pak2p34) qui intervient dans la mort cellulaire médiée par Fas. HTT interagit *in vitro* avec PAK2 pour empêcher son clivage par les caspases 3 et 8, protégeant ainsi les neurones du signal d'apoptose induit par Fas (Luo & Rubinsztein, 2009a). Ainsi, il a été démontré que la huntingtine sauvage possède des propriétés anti-apoptotiques dans des modèles cellulaires et animaux de HD (Leavitt et al., 2001), confirmant son importance dans la survie cellulaire.

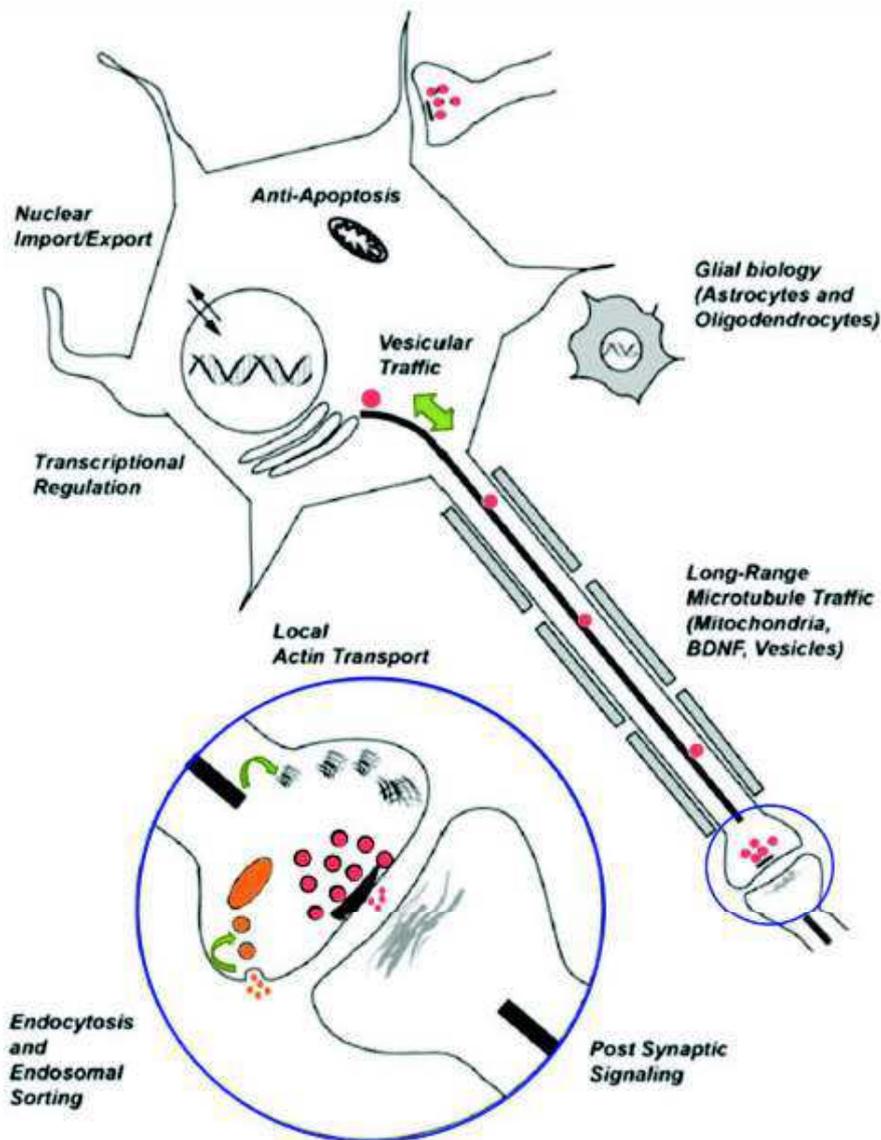


Figure 7 : Illustration schématique des fonctions biologiques de la huntingtine sauvage

L'illustration montre un neurone avec un axone (les rectangles gris représentent la gaine de myéline) et un astrocyte. Le cercle montre la vue agrandie d'une synapse. Il a été suggéré que la protéine HTT régule à la fois des fonctions gliales et neuronales. Dans les neurones, HTT est impliquée dans l'import nucléaire et la régulation transcriptionnelle. En outre, la huntingtine régule la signalisation apoptotique et le transport axonal. A la synapse, HTT aurait des rôles pré et post-synaptiques.

D'après Schulte & Littleton, 2011

E. Dysfonctionnements de la huntingtine dans la maladie de Huntington

La HTT polyQ cytoplasmique est soumise à protéolyse, ce qui conduit à la translocation du fragment N-terminal vers le noyau. Elle y induit la formation d'inclusions intranucléaires neuronales (NIIs) (Ross, 2002). Ces inclusions ne sont pas directement responsables de la toxicité : la toxicité nucléaire serait due à une dérégulation de la machinerie cellulaire conduisant à la mort des neurones du

striatum comme représenté Figure 8. L'expression de la polyQ induit une perte des propriétés anti-apoptotiques de la huntingtine sauvage. Ainsi, l'interaction inhibitrice de HTT avec la caspase-3 est réduite, tout comme la séquestration de HIP1. Cela entraîne l'activation des caspases 3 et 8, et une apoptose accrue qui peut contribuer à la perte neuronale dans le cerveau des patients (Bhattacharyya, et al., 2008; Zhang et al., 2006). La polyQ réduit également l'interaction avec PAK2, qui peut donc être clivée par les caspases 3 et 8, perdant ainsi son effet protecteur vis-à-vis de la mort cellulaire via Fas (Luo & Rubinsztein, 2009b).

De nombreux travaux soulignent également l'importance de dysfonctionnements cytoplasmiques précoces qui participeraient au développement de la maladie. Puisque la huntingtine intervient dans le transport de composants cellulaires le long des axones, les processus biologiques associés à ces transports pourraient être affectés par la perte de fonction de la protéine dans le contexte de HD. Ainsi, puisque les neurones requièrent des quantités élevées d'ATP pour maintenir la polarisation membranaire, un déficit d'apport en mitochondries peut induire un stress cellulaire au cours de stimuli nécessitant un apport important d'énergie. Quant à la fonction mitochondriale, elle serait réduite dans la maladie de Huntington. Notamment, la synthèse d'ATP décroît avec l'augmentation de taille de la polyQ (Seong et al., 2005).

En outre, il apparaît que le processus transcriptionnel est également affecté par la forme mutée de la protéine. Il a ainsi été mis en évidence que la région polyQ-polyP de la huntingtine mutante se lie à CBP et le séquestre dans le cytoplasme, interférant ainsi avec son activité acétyltransférase (Steffan et al., 2001). Au contraire, la polyQ affaiblit l'interaction de HTT avec REST/NRSF qui peut alors entrer dans le noyau (Zuccato et al., 2003). L'expression de plusieurs gènes se trouve modifiée en conséquence.

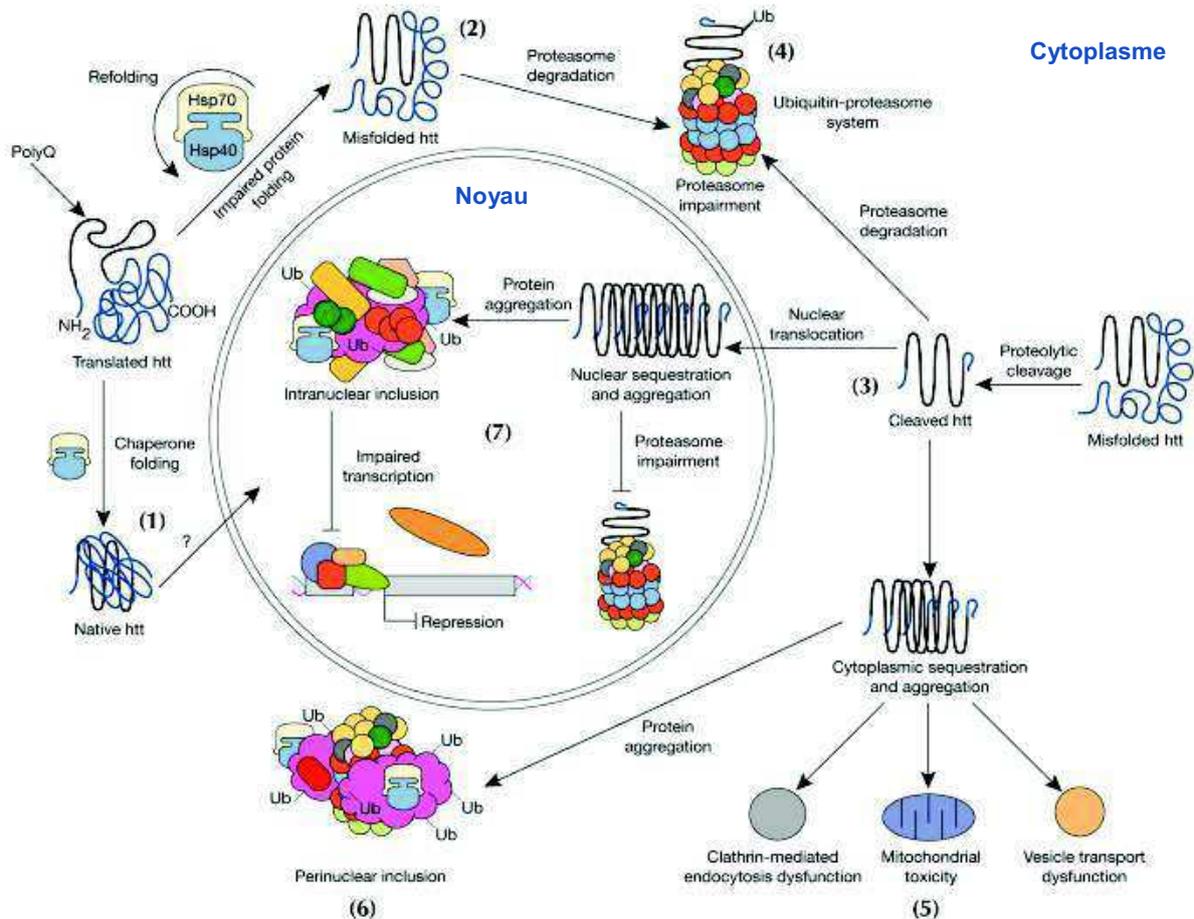


Figure 8 : Modèle de pathogenèse cellulaire de la maladie de Huntington

(1) Les protéines chaperonnes Hsp70 et Hsp40 induisent le repliement de la huntingtine nouvellement synthétisée dans une structure « native ». La HTT peut être transloquée dans le noyau et y jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle.

(2) Les protéines chaperonnes peuvent faciliter la reconnaissance des protéines anormales, induire leur repliement ou ubiquitinylation (Ub) et la dégradation conséquente par le protéasome. La polyQ induit des changements conformationnels et est susceptible de causer le repliement anormal de HTT, qui, s'il n'est pas corrigé par les protéines chaperonnes, conduit à l'accumulation de HTT mal repliées dans le cytoplasme.

(3) La HTT mutante peut également être clivée par des caspases, donnant lieu à des fragments amino-terminaux qui forment des structures en feuillets. En fin de compte, la toxicité peut être entraînée par la HTT mutante pleine longueur ou par les fragments clivés, qui peuvent former des monomères solubles, des oligomères ou de grands agrégats insolubles.

(4) Dans le cytoplasme, les formes mutantes de HTT peuvent altérer le système ubiquitine-protéasome (UPS), conduisant à l'accumulation des protéines mal repliées.

(5) Ces protéines toxiques peuvent également entraver le transport vésiculaire et l'endocytose via la clathrine. En outre, la présence de HTT mutante pourrait activer des protéines pro-apoptotiques directement ou indirectement suite à des dommages mitochondriaux, conduisant à une plus grande toxicité cellulaire et à d'autres effets délétères.

(6) Dans un effort de protection, la cellule accumule des fragments toxiques sous forme d'agrégats cytoplasmiques ubiquitinylés.

(7) De plus, la HTT mutante peut être transportée dans le noyau pour former des inclusions nucléaires, qui peuvent perturber la transcription et le complexe ubiquitine-protéasome.

D'après Landles & Bates, 2004

La HTT a des fonctions physiologiques multiples. Elle interagit avec de nombreux partenaires protéiques impliqués dans des mécanismes cellulaires très divers. Cependant, les processus

impliqués dans la maladie de Huntington restent mal connus. Ils pourraient impliquer à la fois la perte des fonctions bénéfiques de la HTT sauvage et le gain d'une fonction toxique (Cattaneo et al., 2001; Ross, 2002). En effet, si la transmission dominante de la maladie suggère que l'effet de la huntingtine mutante est au moins partiellement un gain de fonction, une perte concomitante de la fonction est également possible. Cette question souligne indirectement le rôle possible de la huntingtine normale dans tous les processus cellulaires liés au contrôle moteur et à la régulation de l'humeur.

II. Le Brain-derived neurotrophic factor et son récepteur de haute affinité TrkB

A. Les neurotrophines

Les neurotrophines sont des substances capables de stimuler la croissance et la survie des neurones pendant le développement, et de maintenir ces propriétés à l'âge adulte. Elles sont aussi capables d'accroître la survie de neurones endommagés et de relancer la croissance des axones et des dendrites (Zhao et al., 2008). Pendant les périodes embryonnaire et adulte de la neurogenèse, le soutien neurotrophique est un élément essentiel de la signalisation qui contrôle la création de nouveaux neurones à partir des cellules progénitrices. Nous étudierons ce processus de neurogenèse en détail, dans la partie IV.A.

La famille des neurotrophines est constituée du Nerve growth factor (NGF), du Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), de NT-3 et de NT-4/5. Les neurotrophines sont impliquées dans le développement et le maintien d'une variété de types neuronaux à travers un large spectre de mécanismes. Classiquement, les neurotrophines sont libérées par les structures cibles, agissant comme des molécules attractrices des neurites (Lewin & Barde, 1996). Les neurones deviennent rapidement dépendants des neurotrophines pour leur survie. Dans le cadre de l'étude de HTT et des troubles anxio-dépressifs, le BDNF est le facteur neurotrophique le plus pertinent. Aussi, nous nous sommes focalisés sur cette neurotrophine en particulier.

La structure génique du BDNF est très complexe, puisque constituée de 9 exons, contrôlés par 8 promoteurs alternatifs au minimum. L'activation de ces promoteurs est finement régulée tant au niveau spatial que temporel (Lyons & West, 2011). Ainsi, tous les exons sont exprimés dans le cerveau, mais seuls les exons IV, V et VI le sont également dans les tissus périphériques, non nerveux. Dans le cerveau, le BDNF est fortement exprimé dans le cortex et dans l'hippocampe, mais pas dans le striatum, où il est transporté depuis le cortex (Canals et al., 2004; Pineda et al., 2005). Le BDNF est synthétisé sous la forme d'un précurseur, le pré-proBDNF, clivé en proBDNF, puis excisé pour donner le BDNF mature. Il est suspecté que ces deux dernières formes aient des effets biologiques opposés (Martinowich et al., 2007). Si le BDNF, comme les autres neurotrophines, peut se fixer sur le récepteur p75, ses effets biologiques passent par son récepteur de haute affinité TrkB. Différentes isoformes de ce récepteur existent, cependant seule la forme pleine longueur est connue pour être en mesure d'activer la voie de signalisation dépendante du BDNF. Dans un premier temps, la fixation du BDNF sur le récepteur TrkB déclenche sa dimérisation puis l'activation et la phosphorylation croisée de résidus tyrosine. Les voies de signalisation entraînées sont celles des « mitogen activated

protein kinase » (MAPK) et de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), (Figure 9). Des protéines impliquées dans la survie cellulaire interviennent en aval de ces deux voies de signalisation.

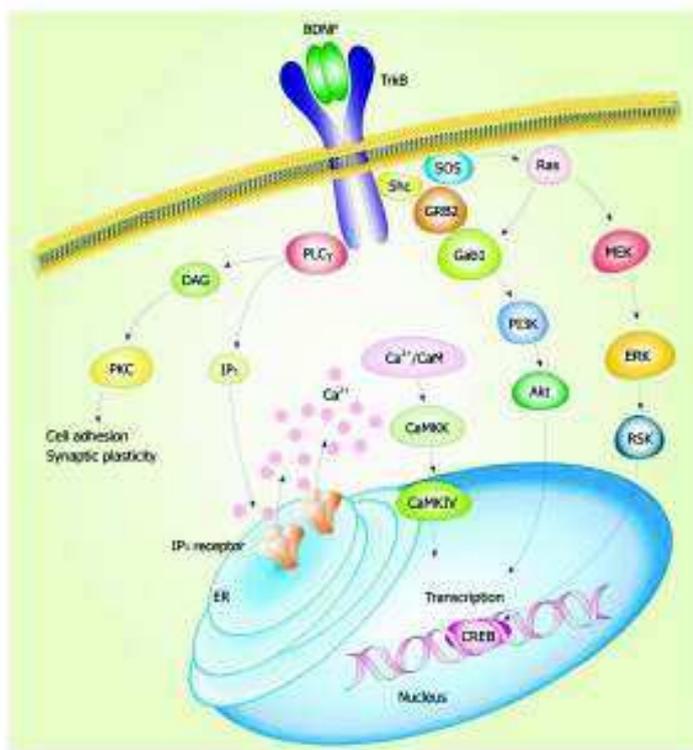


Figure 9 : Signalisation intracellulaire après activation du récepteur TrkB

La fixation de BDNF sur TrkB entraîne la dimérisation du récepteur et sa phosphorylation sur des résidus tyrosine. Ensuite, TrkB activé stimule trois voies de signalisation principales : les voies des mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK); de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), et de la phospholipase Cy (PLC γ).

La voie des MAPK joue un rôle dans la différenciation et la prolifération neuronales. La signalisation PI3K favorise la survie neuronale *via* Ras ou Gab1 (GRB-associated binder 1). Après activation de PLC γ , l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) sont produits. DAG active la protéine kinase C (PKC), impliquée dans la régulation de la plasticité synaptique. En outre, IP3 augmente le Ca²⁺ intracellulaire via les récepteurs IP3 situés sur le réticulum endoplasmique (ER), résultant en une activation des kinases dépendantes de calmoduline/Ca²⁺ (CaM). Ces voies MAPK/ERK, PI3K, et PLC γ peuvent réguler la transcription génique en activant le facteur de transcription CREB.

D'après Numakawa et al., 2010

B. Le BDNF et la huntingtine

1. La huntingtine contrôle la transcription du BDNF

La huntingtine sauvage exerce une régulation positive sur la transcription du *bdnf* (pour revue, voir Cattaneo et al., 2005). Zuccato et ses collègues ont montré que NRSE (neuron restrictive silencer element) est la cible indirecte de l'activité de la huntingtine sauvage sur le promoteur II du BDNF (Zuccato et al., 2003). La huntingtine sauvage inhibe l'activité de répresseur du NRSE en séquestrant son facteur de transcription (REST/NRSF) dans le cytoplasme, ce qui conduit à une augmentation de la transcription de *bdnf* (Figure 10). En revanche, dans la maladie de Huntington, une accumulation aberrante de REST/NRSF est observée dans le noyau. Cette étude met en évidence que la huntingtine sauvage agit dans le cytoplasme des neurones en régulant la disponibilité de REST/NRSF dans le noyau : ce contrôle serait perdu dans la maladie de Huntington. Par conséquent, l'une des fonctions indirectes de la HTT normale est de garantir un niveau de production suffisant de BDNF par la séquestration de REST/NRSF.

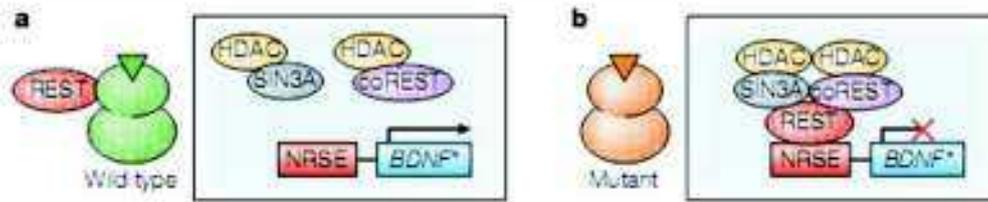


Figure 10 : Mécanisme moléculaire de l'action de la Htt sur la transcription de l'exon II du *bdnf*

En conditions normales (a) la huntingtine sauvage (en vert) séquestre le repressor element 1 (RE1)-silencing transcription factor (REST, aussi appelé neuronal restrictive silencing factor, NRSF) dans le cytoplasme. Le complexe co-répresseur ne peut pas se fixer sur le site RE1/NRSE (repressor element 1/ neuron-restrictive silencer element). La transcription du gène du BDNF a lieu.

En conditions pathologiques (b) la huntingtine mutante n'est pas capable de retenir REST/NRSF dans le cytoplasme. Il rentre alors dans le noyau (rectangle bleuté), permettant ainsi la formation du complexe répresseur. La transcription du gène est alors réduite.

D'après Cattaneo et al., 2005

Cependant, tous les promoteurs du BDNF ne sont pas affectés ainsi par la huntingtine (Figure 11), puisqu'une diminution de l'expression de cette dernière est sans effet sur l'expression des exons IV et VI. En revanche, l'activité des promoteurs II, IV et VI du BDNF est réduite dans le contexte de HD (Zuccato & Cattaneo, 2007). Il semble ainsi que le défaut de transcription de ces exons soit dû à une perte de l'activité normale de la huntingtine dans le cas du promoteur II ; et à une toxicité induite par la HTT mutante dans le cas des promoteurs IV et VI (Zuccato & Cattaneo, 2007).

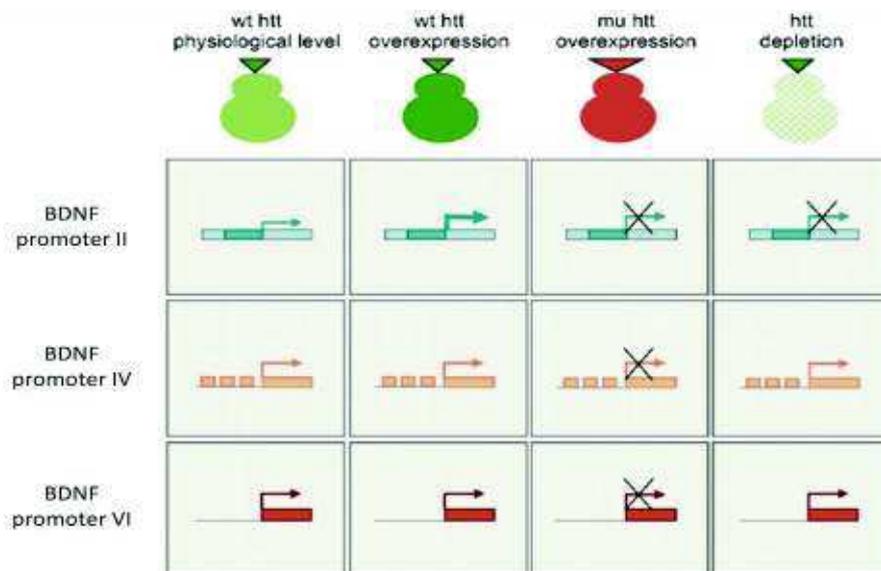


Figure 11 : Effet de l'expression de la huntingtine sur l'activité des promoteurs du *bdnf*

L'activité du promoteur II du BDNF est augmentée par la surexpression de la huntingtine sauvage, tandis que les promoteurs IV et VI ne sont pas affectés. La surexpression de la huntingtine mutante réduit la transcription du BDNF sous le contrôle des promoteurs II, IV, VI. La baisse d'expression de la huntingtine sauvage entraîne une chute de l'activité transcriptionnelle du promoteur II tandis que l'activité des promoteurs IV et VI reste inchangée.

D'après Zuccato et al., 2007

2. La huntingtine facilite le transport vésiculaire et la libération de BDNF

D'autres études se sont concentrées sur le trafic du BDNF et suggèrent que, en plus de contrôler la production d'ARN messager, la huntingtine sauvage peut également réguler le transport du BDNF sur les afférences cortico-striatales, et que la HTT mutée affecte la capacité du BDNF à atteindre ses cibles striatales. En effet, le BDNF est transporté de manière antérograde du cortex vers le striatum, ce qui suggère une interaction fonctionnelle entre ces deux régions du cerveau (Canals et al., 2004; Pineda et al., 2005). Gauthier et ses collaborateurs ont observé que le transport de BDNF le long des microtubules était renforcé par la huntingtine sauvage (Gauthier et al., 2004). Au contraire, le transport du BDNF est ralenti par la réduction des taux de HTT sauvage ou l'expression de huntingtine mutée (Gauthier et al., 2004). Cela conduit à une diminution de la libération de BDNF par les neurones. Le transport régulé par la huntingtine implique la huntingtin-associated protein-1 (HAP1) et la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine, composant essentiel des moteurs moléculaires (Figure 6). L'altération du complexe huntingtine/HAP1/p150^{Glued} favorise le décrochement des vésicules de transport des microtubules. Ainsi, le déficit de transport induit par la huntingtine-polyQ entraîne la perte du soutien neurotrophique dans le striatum.

En résumé, la HTT stimule la transcription du facteur neurotrophique BDNF, essentiel à la différenciation et à la survie des neurones du striatum (Zuccato et al., 2001). Enfin, la HTT agit comme un facteur de processivité du transport intracellulaire de BDNF (Gauthier et al., 2004).

C. Le BDNF, acteur majeur de la neurogenèse adulte

Nous avons vu que les neurotrophines sont essentielles au développement cérébral. Ces facteurs neurotrophiques sont également nécessaires au maintien de la neurogenèse chez l'adulte. La plupart des travaux se focalisant sur le BDNF, nous nous attacherons essentiellement à l'étude de ce facteur neurotrophique dans la suite du manuscrit. Le rôle du BDNF dans ce processus a été caractérisé chez les souris hétérozygotes pour le *bdnf* (*bdnf +/-*), (Lee et al., 2002). Les souris *bdnf +/-* présentent une diminution de la prolifération cellulaire dans l'hippocampe, associée à une diminution de la survie des cellules néoformées. Une étude a également permis de caractériser l'expression temporelle du récepteur TrkB au cours du phénomène de neurogenèse (Donovan et al., 2008). Le récepteur TrkB est fortement exprimé par les cellules matures et en revanche peu exprimé par les cellules progénitrices, ce qui suggère un rôle du BDNF dans la différenciation et la survie plutôt que dans la prolifération cellulaire. En outre, un autre travail (Bergami et al., 2008) met en évidence l'importance de la signalisation TrkB/BDNF dans la survie et la maturation neuronales. En effet, la délétion de TrkB

à l'âge adulte dans les cellules progénitrices entraîne une réduction de la survie des neurones ainsi qu'une faible complexité de l'arborisation dendritique et une réduction du nombre d'épines dendritiques. Des injections intra-hippocampiques de BDNF induisent une augmentation du nombre de cellules positives à la fois au BrdU et à l'antigène Neuronal Nuclei (NeuN) (Scharfman et al., 2005). Ces résultats indiquent que le BDNF a une action positive sur le phénomène de neurogenèse dans sa globalité. Contrairement à l'étude de Lee et collaborateurs (2002), Sairanen et collègues ont rapporté en 2005 que la prolifération cellulaire ne variait pas chez les souris *bdnf +/-* ou surexprimant la forme tronquée du récepteur TrkB, par rapport aux souris contrôles. Cette étude rapporte en revanche que la survie des neurones est diminuée à la fois chez les souris *bdnf +/-* et chez les souris surexprimant la forme tronquée du récepteur TrkB comparée à leurs contrôles respectifs (Sairanen et al., 2005).

De l'ensemble de ces études, il ressort clairement que le BDNF joue un rôle direct sur le processus de neurogenèse dans l'hippocampe chez l'adulte. Si l'implication du BDNF sur l'étape de prolifération cellulaire reste controversée, il semble plus clair que le BDNF agisse sur les étapes de différenciation et de survie (Rossi et al., 2006; Scharfman et al., 2005).

A noter cependant que le BDNF n'est pas le seul facteur neurotrophique en jeu dans la neurogenèse. En effet, il a été montré que la NT-3 était impliquée dans la neurogenèse chez la souris, puisque des animaux déficients pour cette neurotrophine présentent une diminution de la différenciation des cellules granulaires dans le gyrus dentelé de l'hippocampe en dépit d'une prolifération normale (Shimazu et al., 2006). En outre, le NGF augmenterait la survie des nouveaux neurones hippocampiques (Frielingsdorf et al., 2007).

Modèles animaux employés pour l'étude de la maladie de Huntington

Divers modèles de rongeurs sont utilisés pour étudier l'effet de l'expansion CAG dans le gène de la huntingtine. Ces modèles se distinguent par le nombre de répétitions de CAG, la taille du fragment de huntingtine exprimé, et le promoteur génique utilisé. Ainsi, le niveau d'expression de la huntingtine varie selon les modèles. Le fond génétique des souches de souris ou de rats utilisées pour concevoir les modèles est également à prendre en considération, d'autant plus qu'il influe sur la performance dans les tests de comportement (Miller et al., 2010; Mozhui et al., 2010). Ces modèles peuvent être regroupés en fonction de leur mode d'expression de la huntingtine mutante : modèles transgéniques exprimant un fragment de la huntingtine humaine, modèles transgéniques exprimant la huntingtine pleine longueur, et modèles knock-in. Le schéma présenté en Figure 12 représente les différents types de constructions utilisées dans les modèles animaux de HD. Les caractéristiques phénotypiques des lignées les plus étudiées sont résumées dans le Tableau 7.

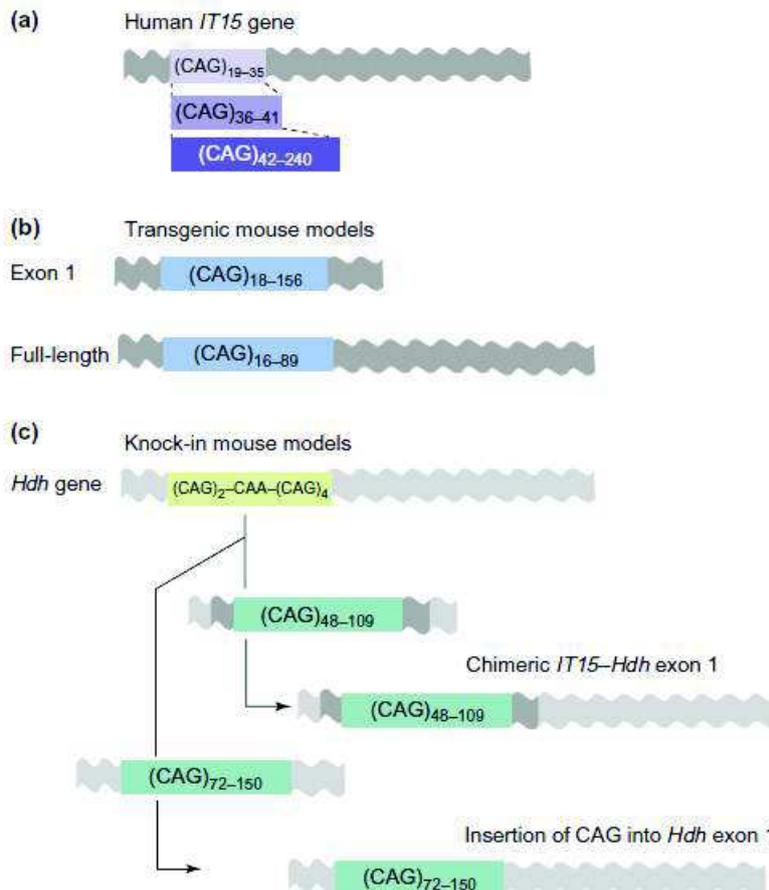


Figure 12 : Représentation schématique des constructions utilisées pour la génération de modèles animaux de la maladie de Huntington

(a) Gène codant la huntingtine chez l'homme (*IT15*). Les répétitions CAG sont situées dans l'exon 1 d'*IT15*. La longueur normale est de 19-35 répétitions (mauve), la longueur pathogène est de 42 à 240 répétitions (violet foncé) et la longueur de faible pénétrance est de 36 à 41 répétitions (violet clair).

(b) Dans les modèles d'animaux transgéniques, soit un fragment, soit toute la longueur, d'*IT15* avec une région CAG élargie, est insérée de façon aléatoire dans le génome.

(c) Des modèles de souris Knock-in ont été générés par ciblage du gène endogène de la souris *Hdh* (homologue murin du gène *IT15* humain). La construction génique consiste soit en un exon 1 chimérique *IT15-Hdh* avec une expansion CAG, soit en l'insertion d'une expansion CAG dans l'exon 1 de *Hdh*.

D'après Menalled & Chesselet 2002

I. Description des modèles animaux

A. Modèles transgéniques avec une huntingtine tronquée

La huntingtine est une protéine de 348 kDa, ce qui correspond chez la souris à environ 150 kpb de séquence codante. De par sa taille, l'expression de la HTT transgénique en pleine longueur est donc très difficile. Par conséquent, certains modèles ont limité la protéine exogène à sa partie N-terminale, contenant la polyQ, en supposant que l'expression de cette seule portion pourrait reproduire les différents aspects de la maladie. Le premier modèle de rongeur Huntington a été développé par Mangiarini et ses collègues en introduisant un fragment du gène d'un patient HD dans le génome de la souris (Mangiarini et al., 1996). Les lignées R6/1 et R6/2 expriment ainsi l'exon 1 du gène, contenant environ 115 et 150 CAG, respectivement. Les souris N171-82Q expriment quant à elles les 171 premiers acides aminés avec 82 glutamines (Schilling et al., 1999). Un modèle de rat HD a également été conçu par l'équipe de von Hörsten en insérant un fragment 1962 pb de la séquence N-terminale d'un patient HD avec 51 CAG (von Hörsten et al., 2003).

Ces modèles transgéniques expriment une forme tronquée de la huntingtine, qui serait plus toxique que la protéine pleine longueur dans des études *in vitro* (Hackam et al., 1998), et s'accumulerait dans différentes régions de la cellule pour induire toxicité et mort cellulaire (Lunkes et al., 2002). Cela peut expliquer pourquoi ces modèles HD développent des phénotypes très agressifs : ils présentent tous des dysfonctionnements moteurs graves dès les premiers mois de vie [4-5 semaines pour les R6/2, environ 11 à 13 semaines pour les N171-82Q, et 6-10 mois pour le modèle de rat (Crook & Housman, 2011; Hodges et al., 2008; Klivenyi et al., 2006; Nguyen et al., 2006; Schilling et al., 1999; von Hörsten et al., 2003)]. Les souris R6/2 semblent être hyperactives dans un premier temps, puis hypoactives. Dans la lignée R6/1 cependant, le déficit moteur apparaît plus graduellement, à partir de 18-22 semaines (Carter et al., 1999; Menalled et al., 2009).

Cependant, ces modèles continuent d'exprimer la huntingtine endogène de type sauvage. Par conséquent, leur phénotype est vraisemblablement causé par un gain de fonction toxique lié à la présence de la HTT mutée, mais on ne peut pas exclure que la HTT mutée induise une perte de fonction partielle de la HTT sauvage (selon un mode dominant-négatif).

Les lignées transgéniques exprimant un petit fragment N-terminal de HTT développent des phénotypes plus progressifs que celles exprimant un fragment N-terminal plus long (Davies et al., 1997; Hodgson et al., 1999; Laforet et al., 2001; Reddy et al., 1998; Schilling et al., 1999). Bien que ces souris présentent de symptômes importants et une mort très précoce, habituellement dès l'âge de 3-6 mois, elles ne présentent pas - ou très tard - de dégénérescence neuronale majeure,

contestant l'idée que la perte cellulaire est la seule cause des symptômes et de la mort. En effet, seules deux études ont montré une perte cellulaire nette dans le striatum de souris R6/2 et N171-82Q (Stack et al., 2005; Yu et al., 2003). Les autres ont révélé des altérations tardives de la morphologie neuronale, sans observer les caractéristiques typiques de la mort cellulaire (c'est-à-dire coloration TUNEL positive, fragmentation nucléaire, corps apoptotiques), (Iannicola et al., 2002; Turmaine et al., 2000; Yu et al., 2003; von Hörsten et al., 2003). En conséquence, ces études suggèrent que la mort neuronale observée dans le cerveau HD serait un processus morphologiquement et biochimiquement distinct de l'apoptose.

B. Modèles transgéniques avec huntingtine pleine longueur

Les modèles transgéniques exprimant la huntingtine mutante sur toute sa longueur comportent des insertions aléatoires du gène humain *IT15* avec une expansion CAG. L'insertion dans le génome de la souris se fait *via* un chromosome artificiel de levure (Yeast artificial chromosome, YAC) ou un chromosome artificiel de bactérie (Bacterial artificial chromosome, BAC). Les modèles à YAC expriment une huntingtine contenant respectivement 72 ou 128 glutamines (YAC 72 et YAC 128, Hodgson et al., 1999), tandis que la huntingtine des souris BACHD contient 97 glutamines (Gray et al., 2008). Dans les deux cas, l'expression de *htt* est sous le contrôle du promoteur humain. Comme dans les modèles exprimant une forme tronquée de la protéine, la huntingtine endogène sauvage est encore exprimée. De manière intéressante, les modèles murins à YAC développent des déficits moteurs plus tardivement que les modèles transgéniques avec HTT tronquée, ce qui laisse plus de temps pour étudier les comportements anxio-dépressifs sans risque d'interférence due à une déficience motrice. Cependant, cette altération motrice tardive ne semble pas être liée à la présence de la protéine pleine longueur, puisque le modèle BAC développe un déficit moteur aussi précocement que les souris R6/2. D'autres paramètres tels que le niveau d'expression de la protéine HTT sont également à prendre en considération. Dans ces modèles, la perte neuronale se produit tardivement (9 mois chez les BACHD et 12 mois chez les YAC 72 et 128), et reste essentiellement limitée au striatum (Hodgson et al., 1999; Slow et al., 2003; Van Raamsdonk et al., 2005).

C. Modèles de souris « knock-in »

Ces modèles sont construits en remplaçant l'exon 1 de la protéine murine par une séquence chimérique humain/souris, incluant un tronçon polyQ de longueur variable, et sont donc appelés modèles « knock-in » (KI). Une liste détaillée de ces modèles est fournie dans le Tableau 7. Les souris knock-in sont considérées comme des modèles génétique précis de la maladie de Huntington parce

qu'elles expriment le gène muté sous le contrôle du promoteur murin endogène. Ainsi, la mHTT est exprimée à un niveau endogène, et non pas surexprimée comme c'est le cas dans les modèles transgéniques.

Cela pourrait expliquer le phénotype modéré des souris KI par rapport au phénotype plus agressif observé dans les modèles transgéniques. En effet, exception faite des souris HdhQ140 chez qui la survenue de déficits moteurs est relativement précoce, les autres souches présentent très peu ou pas de dysfonctionnement moteur observable, et aucune réduction de la durée de vie. Ces modèles reproduisent fidèlement le début tardif de la maladie humaine, mais ne répliquent pas les altérations de la fonction motrice. Ainsi, la perte de cellules striatales est inexistante ou très limitée dans ces modèles (Lin et al., 2001; Shelbourne et al., 1999; Wheeler et al., 2002; Yu et al., 2003) exception faite des HdhQ140 qui présentent une neurodégénérescence tardive dans le striatum (Hickey et al., 2008). Par conséquent, les modèles knock-in peuvent être particulièrement utiles pour étudier les premiers symptômes de la maladie parmi lesquels les troubles anxio-dépressifs, et ce, indépendamment de déficiences motrices.

Les souris KI sont les seuls modèles qui n'expriment pas la forme sauvage de la huntingtine, permettant ainsi une observation des effets de la perte de fonction potentielle de la protéine normale.

Modèle	Nombre de CAG	Fond génétique d'origine*	Référence originale	Age d'apparition du déficit moteur	Références	Age d'apparition du comportement anxio-dépressif	Références	Age d'apparition du déficit neurogénique	Références
<i>Modèles transgéniques avec huntingtine tronquée</i>									
Souris R6/1	115	CBA × C57Bl/6J	Mangiarini et al., 1996	4-5	Crook & Housman, 2011; Hodges et al., 2008	♂ 4 ♀ 1,8	Grote et al. 2005; Renoir et al. 2011	2,3	Lazic et al. 2006
Souris R6/2	150	CBA × C57Bl/6J	Mangiarini et al., 1996	1	Carter et al. 1999; Menalled et al. 2009	2,8 ♀ 1,8	Carter et al. 1999; Menalled et al. 2009	0,8	Gil et al. 2005
Souris N171-82Q	82	C3H/HEJ × C57Bl/6J	Schilling et al., 1999	3	Duan et al., 2008; Klivenyi et al., 2006; Schilling et al., 1999	Pas observé aux âges testés	Klivenyi et al. 2006	3,7	Duan et al. 2008; Potter et al. 2010
Rat HD	51	Sprague-Dawley	von Hörsten et al., 2003	6-10	Nguyen et al., 2006; von Hörsten et al., 2003	Pas observé aux âges testés		8	Kandasamy et al. 2010
<i>Modèles transgéniques avec huntingtine pleine longueur</i>									
Souris YAC 72	72	FVB/N	Hodgson et al., 1999	16	Seo et al. 2008	-	-	-	-
Souris YAC 128	128	FVB/N	Hodgson et al., 1999	6	Slow et al. 2003; Van Raamsdonk et al. 2005	3	Pouladi et al. 2009	9	Simpson et al. 2011
Souris BACHD	97	FVB/NJ	Gray et al., 2008	1-1,8	Gray et al., 2008; Menalled et al., 2009	2,8	Menalled et al., 2009	-	-
<i>Modèles Knock-in</i>									
Souris Hdh6Q72 / Hdh4Q80	72/80	129Sv × C57Bl/6J, 129 Sv × FVB/N	Shelbourne et al., 1999	4	Kennedy et al. 2003	-	-	-	-
Souris HdhQ92	92	129Sv × CD1	Wheeler et al., 1999	24	Trueman et al. 2009	Pas observé aux âges testés	Trueman et al. 2009	-	-
Souris HdhQ111	109	129Sv × CD1	Wheeler et al., 1999	22	Wheeler et al. 2002; Menalled et al. 2009	Pas observé aux âges testés	Menalled et al. 2009	-	-
Souris HdhQ140	140	129Sv × C57Bl/6	Menalled et al., 2003	4-6	Hickey et al. 2008; Dorner et al. 2007	Pas observé à 4,6-6 ou 8 Anxiété à 1.5 ?	Hickey et al. 2008	-	-
Souris HdhQ150	150	129/Ola × C57Bl/6J	Lin et al., 2001	16-23	Heng et al., 2007	-	-	-	-

Tableau 7 : Récapitulatif des différentes lignées de rongeurs construites pour l'étude de la maladie de Huntington

* Plusieurs lignées ont été back-crossées sur un fond génétique différent de celui d'origine. Les âges sont indiqués en mois (m).

NB : Peu d'études longitudinales ayant été menées, les âges de déficits comportementaux et neurogéniques indiqués sont les premiers auxquels ont été décrites ces altérations.

II. Phénotype comportemental des animaux modèles de HD

Bien que la plupart des études comportementales visent à évaluer les capacités motrices des différents modèles de HD, les équipes ont récemment mis l'accent sur le phénotype anxio-dépressif des animaux. En effet, puisqu'une grande partie des patients HD expérimente des troubles de l'humeur tels que la dépression ou l'anxiété durant les stades pré-symptomatiques de la maladie, il est apparu pertinent d'examiner cet aspect dans des modèles animaux. Il est important de noter que la plupart des paradigmes impliquent des comportements qui pourraient être affectés par la présence d'un déficit moteur, d'où l'importance d'effectuer ces tests sur les animaux avant que leurs capacités motrices soient altérées. Ce dernier point peut être problématique pour les modèles d'évolution très rapide. Les résultats obtenus dans diverses études évaluant les comportements dépressifs et anxieux sont résumés et présentés dans le Tableau 8.

A. Comportements liés à l'anxiété

1. Open Field (OF)

Bien que ce test soit fréquemment utilisé pour évaluer l'activité motrice, je me concentrerai ici sur les mesures liées à l'anxiété, révélée par une diminution du temps et/ou du nombre d'entrées dans le centre de la zone et/ou du rapport « distance ambulatoire dans le centre/distance ambulatoire totale ». Il est cependant nécessaire de vérifier que les différences obtenues dans ces comportements ne sont pas dues à la motilité altérée des animaux, en vérifiant que la distance totale parcourue dans l'appareil reste inchangée. Dans le test de l'OF, une diminution du temps passé dans le centre de la zone a été observée pour les souris R6/2, YAC 128 (Chiu et al., 2011; Ciamei & Morton, 2008). Toutefois, cela doit être modulé dans le cas des souris YAC 128, car elles se déplacent aussi sur une distance globalement plus courte. Les souris N171-82Q et les rats tgHD semblent ne pas être anxieux, voire même moins anxieux que les contrôles sauvages dans ce paradigme (Chiu et al., 2011; Klivenyi et al., 2006; Zeef et al., 2012). En effet, les souris N171-82Q présentent un nombre accru d'entrées dans le centre tandis que la durée dans le centre est inchangée. Les rats affichent un comportement de type anxiolytique entre 1 et 7 mois, qui est ensuite perdu.

2. Labyrinthe en croix surélevée (EPM) / Labyrinthe circulaire

Ces tests, largement utilisés dans l'étude des comportements anxieux, sont fondés sur l'aversion de la souris envers les espaces ouverts et la hauteur (Pellow & File, 1986). Chez les souris R6/1, le phénotype semble apparaître progressivement : on n'observe aucun effet du génotype chez les animaux âgés de 12 semaines (mâles et femelles mélangés), tandis qu'un comportement de type

anxieux est observé chez les femelles âgées de 24 semaines. Cependant, cet effet peut aussi résulter d'une réduction de l'activité locomotrice puisque le nombre total d'entrées dans les bras (ouverts et fermés) est plus faible chez les souris R6/1 (Naver et al., 2003; Nithianantharajah et al., 2008). Ce phénotype est également observé chez les YAC 128 qui passent moins de temps dans les parties ouvertes du labyrinthe circulaire (Chiu et al., 2011). Chez les souris R6/2 et les rats TgHD, on observe au contraire un effet de type anxiolytique de la mutation (File et al., 1998; Nguyen et al., 2006). Un phénotype intermédiaire est probablement présenté par les souris N171-82Q qui, selon les études, ne seraient pas anxieuses, ou même moins anxieuses que les animaux témoins (Chiu et al., 2011; Klivenyi et al., 2006).

3. Double enceinte éclairée (Light/dark box)

Ce paradigme est utilisé pour évaluer les comportements liés à l'anxiété et se fonde sur l'aversion des souris pour la lumière. Les paramètres mesurés sont la latence pour entrer dans le compartiment éclairé, et le temps passé dans chacun des deux compartiments. Les souris mâles et femelles R6/2 présentent un comportement de type anxieux dès 12-14 semaines, qui peut même survenir plus tôt chez les mâles (Hickey et al., 2005; Menalled et al., 2009). Menalled et collaborateurs ont également observé une augmentation du temps passé dans le compartiment sombre chez les souris BACHD âgées de 12 semaines, indiquant là encore un phénotype anxieux (Menalled et al., 2009). Chez les souris *Hdh*^{Q140}, il semble que ce phénotype anxieux soit perdu avec l'âge. En effet, la latence pour pénétrer dans le compartiment éclairé est accrue chez les souris âgées de 1,5 mois, mais inchangée à 8 mois (Hickey et al., 2008). Aucun effet du génotype n'a été observé chez les *Hdh*^{Q111}, ni les YAC 128 (Menalled et al., 2009).

Les résultats obtenus dans les tests évaluant l'anxiété des animaux sont assez inconstants. Il semblerait que les souris R6/1, YAC 128 et BACHD présentent un comportement de type anxieux, tandis que l'effet de la mutation est inverse dans les lignées N171-82Q et de Rat HD.

B. Comportement mixte d'anxiété et dépression

Novelty-suppressed feeding test

Le NSF est un test reposant sur des motivations conflictuelles : la faim (les animaux sont mis à jeun 24 heures avant le test), et la peur de s'aventurer dans une enceinte nouvelle et fortement éclairée (David et al., 2009; Santarelli et al., 2003). Ce paradigme fournit une mesure d'anxiété-dépression et serait sensible à la fois aux anxiolytiques et aux antidépresseurs, lorsqu'ils sont administrés de façon chronique (Dulawa & Hen, 2005). Il est également décrit comme un test «neurogenèse-dépendant», puisque l'ablation de la neurogenèse par irradiation X ou γ de l'hippocampe des animaux adultes

prévient l'action des antidépresseurs (David et al., 2009). Les femelles R6/1 montrent une augmentation de la latence pour aller se nourrir dans le test (Pang et al., 2009; Renoir et al., 2011a), indiquant un comportement de type anxio-dépressif de ces souris. Aucun effet du génotype n'a été rapporté chez les animaux mâles.

C. Comportements liés à la dépression

1. Préférence de sucrose

Ce test est utilisé pour révéler l'anhédonie, une composante du comportement dépressif à la fois chez l'homme et la souris. Des études ont montré une diminution de la consommation et de la préférence de saccharose chez la souris HD, mettant en évidence un comportement de type dépressif (Pouladi et al., 2009; Renoir, et al., 2011b, 2012). Ce comportement apparaît indépendant du sexe dans la lignée YAC128, tandis que seules les femelles R6/1 montrent une réduction de la préférence de saccharose par rapport aux mâles et aux contrôles. Cependant, dans une étude similaire utilisant du lait aromatisé à la fraise, aucun comportement anhédonique n'a été observé chez les souris *Hdh^{Q92}* âgées de 24 mois (Trueman et al., 2009). Un autre test consiste en l'étude des expressions oro-faciales hédoniques suscitées par l'absorption de saccharose. Ce travail a été mené chez le rat TgHD mâle et n'a montré aucun effet significatif sur le nombre de fois où les animaux vont boire, mais un clair impact du génotype sur le taux de réponses hédoniques au saccharose, qui apparaît réduit chez les rats TgHD (Faure et al., 2011).

2. Test de nage forcée

Le test de la nage forcée (FST) est largement utilisé en pharmacologie pour le criblage de molécules potentiellement antidépressives (Petit-Demouliere et al., 2005 ; Porsolt et al., 1977). Inversement, il est également utilisé pour mettre en évidence un comportement de type dépressif chez les rongeurs. Exceptées les souris *Hdh^{Q140}*, tous les modèles de Huntington testés affichaient une durée d'immobilité augmentée, indiquant un comportement de type dépressif (Chiu et al., 2011; Grote et al., 2005; Hickey et al., 2008; Peng et al., 2008; Pouladi et al., 2009, 2012; Renoir, et al., 2011b, 2012). Les données obtenues ont tendance à mettre en évidence un dimorphisme sexuel dans le phénotype dépressif. En effet, lorsque les études séparent les animaux mâles des femelles, l'effet de la mutation est observé chez les femelles uniquement, ou pour le modèle R6/1, plus précocement chez les femelles, confirmant les résultats de la préférence de saccharose (Grote et al., 2005; Pang et al., 2009; Renoir, et al., 2011b).

3. Test de suspension caudale

Le test de suspension caudale (TST) est un autre test fréquemment employé pour le criblage de médicaments antidépresseurs, également utilisé pour mettre en évidence un comportement dépressif, qui est ici encore une fonction du temps d'immobilité de l'animal (Steru et al., 1985). La lignée de souris YAC 128 présente une immobilité accrue dans le TST, confirmant les données obtenues dans le FST (Chiu et al., 2011). Un résultat obtenu chez la souris R6/1 contredit ceux obtenus dans le FST : la diminution de la durée d'immobilité observée chez les femelles âgées de 12 semaines reflète un effet "antidépresseur" de la mutation de la huntingtine dans ce test (Pang et al., 2009), tandis que dans une autre étude, la mutation n'affecte pas la performance des R6/1 de 8 semaines (Renoir et al., 2011b). Aucun effet n'a été observé chez les *Hdh*^{Q140} mâles et femelles, ce qui est cohérent avec les résultats du FST (Hickey et al., 2008).

Globalement, les résultats observés dans les différentes lignées et dans les différents paradigmes montrent que les modèles rongeurs de la maladie de Huntington tendent à présenter un comportement de type dépressif. Il apparaît également que les femelles sont plus susceptibles de développer ce phénotype, ou tout au moins plus précocement que les mâles. Toutefois, cette affirmation doit être modulée dans le cas des R6/1, puisque plusieurs études ont rapporté des effets variables ou même opposés dans les tests de nage forcée et de suspension caudale. Ces résultats sont néanmoins cohérents avec l'idée que des voies neurochimiques distinctes régulent les réponses dans le FST et le TST (Bai et al., 2001; Renoir et al., 2008). En outre, il apparaît que les modèles knock-in ont été très peu évalués, puisque seule une étude s'attache à décrire le comportement des *Hdh*^{Q140} (Hickey et al., 2008). C'est également le cas des lignées R6/2, N171-82Q et TgHD, chez qui la dépression a été peu ou pas évaluée. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de confirmer ces résultats.

Test	Mesure	R6/1		R6/2		N171-Q82		Tg HD Rat		YAC 128		BACHD		<i>Hdh</i> ^{Q140}		
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
Tests prédictifs d'un phénotype anxieux et/ou d'un effet anxiolytique	Open Field	Temps dans le centre	-	-	Tendance ↓ 8	-	∅ 6,8,10,12,14,18,22	∅ 6,10,14,18,22	↓ 9 ou ↑ 4,9,26,30 ∅ 35,43	-	∅ 13 ↓ 23, 39, 52	∅ 13 ↓ 23, 39, 52	-	-	-	-
		Entrées dans le centre	-	-	-	-	↑ 8,12,14	?	-	-	-	-	-	-	-	-
	Labyrinthe en croix surélevée	Temps bras ouverts	∅ 12	∅ 12	-	↑ 8-12	∅ 9, 12, 14, 22	∅ 22	∅ 26 ↑ 9, 13, 26-52	-	↓ 23	↓ 23	-	-	-	-
		Entrées bras ouverts	∅ 12	∅ 12	-	↑ 6-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Labyrinthe circulaire	Temps bras fermés	-	↓ 24	-	-	∅ 9, 12, 14	?	∅ 26 ↓ 30-43	-	-	-	-	-	-	-
		Entrées bras fermés	-	↓ 24	-	↓ 10,12	↓ 9,12 ∅ 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Light-dark box	Latence/Temps dans le noir	∅ 12	∅ 12	∅ 4-8.5 ↑ 4.5,12,14	∅ 4-8, ↑ 12,14	-	-	-	-	∅ 4-36 ↑ 52	-	↑ 4, 12-26	↑ 12-26	↑ 6 ∅ 35	↑ 6 ∅ 35
Interaction sociale	Durée d'interaction	-	-	-	-	-	-	↑ 4,9,17, 26-61	↑ 17, 26-61	-	-	-	-	-	-	
Anx / Dep *	Novelty-Suppressed Feeding	Latence pour aller manger	∅ 8,12	↑ 8,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tests de dépression **	Suspension caudale	Immobilité	∅ 8,12	∅ 8 ↓ 12	-	-	-	-	-	↑ 13-52	↑ 13-52	-	-	∅ 20-26	∅ 20-26	
	Test de nage forcée	Immobilité	∅ 8,12	↑ 8,12	-	-	∅ 6, 10 ↑ 14-22	∅ 6, 10 ↑ 14-22	-	-	↑ 13-52	↑ 13-52	↑ 52	↑ 52	∅ 20-26	∅ 20-26
	Préférence de sucrose	Préférence (%)	∅ 8	↓ 8, 12	-	-	-	-	∅ 43,56	-	↓ 13-17	↓ 13-17	-	-	-	-

Tableau 8 : Altération des comportements de type anxio-dépressifs dans les modèles animaux de la maladie de Huntington

* Test prédictif d'un phénotype anxio-dépressif et/ou d'un effet anxiolytique/antidépresseur ; ** Tests prédictifs d'un phénotype dépressif et/ou d'un effet antidépresseur.
↓ : diminution; ↑ : augmentation; ∅ : pas de différence par rapport au groupe sauvage; - : non décrit. Les âges sont indiqués en semaines.

Ci-dessous, un bref résumé des résultats de comportement obtenus pour chacune des lignées testées.

Souris R6/1

Les résultats obtenus dans différents tests révèlent un comportement de type anxio-dépressif dépendant du sexe chez les souris R6/1. Ce phénotype est marqué chez les femelles où il apparaît entre 8 (préférence de saccharose, NSF), 12 (FST) et 24 (EPM) semaines, selon le test utilisé. La mesure de la température corporelle après un stress aigu (hyperthermie induite par le stress) montre également une augmentation de la réponse des femelles R6/1 par rapport aux WT (Renoir et al., 2012). Il apparaît donc que seules les souris femelles R6/1 présentent un phénotype d'anxiété et de dépression, et ce avant l'apparition des troubles moteurs.

Souris R6/2

Seuls des tests permettant l'évaluation de comportements liés à l'anxiété ont été utilisés chez les souris R6/2, et les résultats sont assez conflictuels. Les données obtenues en EPM indiquent plutôt un effet de type anxiolytique de la mutation à partir de 6 à 12 semaines, tandis que ceux obtenus dans d'autres tests tendent à révéler un comportement de type anxieux (4,5 à 14 semaines). Des explications possibles à ces résultats ont été discutées précédemment, indiquant notamment que l'hyperactivité des souris R6/2 compromettrait l'interprétation des résultats de ces tests. En effet, quels que soient les comportements observés, ils sont postérieurs à l'apparition des troubles moteurs, très précoces dans cette lignée murine (4-5 semaines). Il est ainsi particulièrement délicat d'évaluer grâce à ces tests le comportement anxio-dépressif des animaux tout en s'affranchissant des déficits moteurs. En outre, comme peu de travaux ont utilisé des souris mâles, il est difficile de se prononcer sur un effet du genre.

Souris N171-82Q

Cette lignée a été largement étudiée pour des comportements liés à l'anxiété, qui n'indiquent aucun effet, ou un effet de type anxiolytique de la mutation. En effet, les souris N171-82Q montrent une augmentation ou pas de changement du nombre d'entrées dans le centre de l'open field, ainsi que dans les bras ouverts de l'EPM, et ce à tous les âges étudiés à partir de 8 semaines, et aucun effet sur le temps passé dans le centre de l'OF (Chiu et al., 2011; Klivenyi et al., 2006). Cependant, l'augmentation des épisodes de « freezing » dans l'open field, réaction de peur caractéristique des rongeurs, pourrait indiquer une anxiété accrue. Néanmoins, il semble qu'une diminution de l'activité locomotrice soit observée dans cette lignée murine, ce qui pourrait affecter le phénotype observé. Le test de nage forcée met en évidence un phénotype de type dépressif chez les souris âgées de 14 semaines. Comme le sexe des animaux n'est pas mentionné dans l'une des études, et qu'ils sont

regroupés dans l'autre, nous ne pouvons pas conclure sur un potentiel effet du genre. Les résultats présentés ici sont observés juste avant l'apparition du déficit moteur, c'est-à-dire avant 14 semaines.

Rats TgHD

Les résultats obtenus dans les tests d'anxiété (OF, EPM) tendent à indiquer un effet de type anxiolytique de la huntingtine mutée, même s'ils diffèrent selon les études. Globalement, cet effet est observé à partir d'un mois dans l'OF, et de 3 mois dans l'EPM. En outre, l'étude des interactions sociales a montré une augmentation des comportements socio-positifs chez les rats mâles comme femelles à tous les âges testés (de 1 à 14 mois), ce qui est également considéré comme une réponse de type anxiolytique (Bode et al., 2008). Cependant, comme les rats présentaient un phénotype d'hyperactivité dans leur cage pendant cette période, les comportements observés sont susceptibles d'être affectés par cette activité locomotrice accrue. En outre, des troubles moteurs sont observés à partir de l'âge de 26-35 semaines, et vont donc de pair avec les modifications de l'humeur.

Souris YAC 128

Les souris mâles et femelles présentent un comportement dépressif avant la survenue des déficits moteurs. En effet, dès l'âge de 13 semaines, on observe une diminution de la préférence de saccharose et une augmentation de la durée d'immobilité dans les tests de nage forcée et de suspension caudale. L'anxiété a été évaluée dans les tests de l'open field, du labyrinthe circulaire et de light/dark box, qui ont révélé un comportement de type anxieux à partir de 6 mois. Un test d'hyperthermie induite par le stress a également été réalisé, ne révélant aucun effet du génotype (Pouladi et al., 2009). Selon ces études, le phénotype de type dépressif des animaux YAC128 semble apparaître beaucoup plus précocement que l'anxiété.

Souris BACHD

La lignée de souris BACHD a été peu évaluée concernant les phénotypes d'anxiété et dépression. Toutefois, deux études semblent révéler un comportement anxio-dépressif. L'anxiété mesurée dans le test de light/dark box est augmentée dès l'âge de 12 semaines (Menalled et al., 2009). De plus, le test de nage forcée a mis en évidence un comportement de type dépressif chez les animaux âgés de 12 mois (Pouladi et al., 2012). Il est cependant possible que les altérations motrices aient une influence sur ces résultats : un déficit moteur est mis en évidence dans le rotarod, et une hypoactivité dans l'open field dès 28 semaines. D'autres expériences sont requises pour confirmer ces résultats et notamment vérifier l'ordre d'apparition des déficits moteurs et comportementaux.

Souris Hdh^{Q140}

Les résultats obtenus dans cette lignée murine knock-in sont contradictoires car un phénotype de type anxieux a été observé à l'âge de 6 semaines et perdu à 35 semaines. Aucun comportement lié à la dépression n'a été reporté, que ce soit dans le TST ou dans le FST, et il n'y a aucun effet du genre.

III. Expression du BDNF dans les modèles animaux de la maladie de Huntington

Des diminutions du taux de protéine BDNF ont été observées dans plusieurs régions du cerveau de patients HD, incluant le cortex frontal, le striatum, la substance noire et le cervelet (Seo et al., 2004; Zuccato et al., 2001). Des observations similaires ont été faites dans différents modèles de rongeurs HD, et sont résumées dans le Tableau 9. Zuccato et ses collaborateurs ont montré que les concentrations d'ARNm de BDNF sont réduites dans le cortex cérébral des souris R6/2 entre 6 et 12 semaines (Zuccato et al., 2005), indiquant une altération de la machinerie transcriptionnelle. Cependant, une autre équipe n'a observé aucune différence des niveaux protéiques de BDNF dans le cortex frontal, le striatum et le cervelet de souris R6/2 d'âge voisin (Seo et al., 2008). De façon similaire, des résultats contradictoires sont rapportés sur les niveaux protéiques de BDNF dans le striatum et l'hippocampe chez la souris R6/1, qui sont soit réduits, soit inchangés (Pang et al., 2006; Spires et al., 2004), tandis que les niveaux d'ARN messager sont diminués dans l'hippocampe (Zajac et al., 2010). Les concentrations striatale et corticale de BDNF sont plus faibles chez la souris N171-82Q que chez le groupe contrôle (Duan et al., 2003, 2008; Saydoff et al., 2006), tandis que seul le taux de BDNF striatal est affecté chez les souris YAC 128 (Xie et al., 2010). Chez les YAC 72, les niveaux protéiques de BDNF sont diminués dans le cortex, l'hippocampe et le striatum (Zuccato et al., 2001), tandis qu'une autre étude révèle une surprenante augmentation dans le striatum, mais pas le cortex (Seo et al., 2008). Une diminution des concentrations de BDNF a également été relevée dans l'hippocampe, le striatum et le cortex de souris *Hdh^{Q111}* (Ginés et al., 2003; Lynch et al., 2007).

Pour résumer, ces données suggèrent une altération de la synthèse de BDNF, mais aussi de sa distribution, puisque le BDNF n'est pas produit localement dans le striatum, mais sécrété par les neurones corticaux.

Tableau 9 : Concentrations de BDNF dans l'hippocampe des animaux modèles de la maladie de Huntington

Modèle	Niveau d'ARNm	Niveau protéique	Références
<i>Modèles transgéniques exprimant une huntingtine tronquée</i>			
Souris R6/1	↓ à 5 mois ↓ chez les mâles et les femelles	↓ à 5 mois Ou Ø	Pang et al., 2006; Spires et al., 2004; Zajac et al., 2010
Souris R6/2	-	↓ à 10 semaines	Peng et al., 2008
<i>Modèles transgéniques exprimant une huntingtine pleine-longueur</i>			
Souris YAC 72	-	↓ à partir de 9 mois	Zuccato et al. 2001
<i>Modèles Knock-in</i>			
Souris <i>Hdh</i> ^{Q92}	-	↓ 29% du BDNF mature, et ↓ 32% du pro-BDNF à 26 semaines (Western Blot)	Lynch et al. 2007
Souris <i>Hdh</i> ^{Q111}	-	↓ 43% du BDNF mature, et ↓ 57% du pro-BDNF à 8,5 semaines (Western Blot)	Lynch et al. 2007
Souris <i>Hdh</i> ^{Q140}	-	↓ 30% à 8 semaines (Western Blot)	Simmons et al. 2009

↓ : diminution; ↑ : augmentation; Ø : pas de différence par rapport au groupe contrôle ; - : non décrit.

Modifications de l'expression de *TrkB*

De manière similaire à ce qui a été observé en clinique, plusieurs modèles rongeurs de la maladie de Huntington affichent une diminution du récepteur du BDNF, *TrkB*, dans le striatum et le cortex (Ginés, et al., 2010). Ce travail a également porté sur l'étude d'un modèle inductible de HD, la lignée murine HD94, qui présente un phénotype identique et une diminution de la quantité d'ARN messager codant *TrkB*. Les résultats ont montré que cela était dû à une diminution de la transcription dans chaque cellule, et non pas à une perte des cellules exprimant *TrkB*. Ainsi, l'expression réduite de *TrkB* est une conséquence directe de la baisse des niveaux d'ARNm dans les cellules du striatum plutôt qu'un effet de la perte de cellules neuronales. Dans ce même travail, il est apparu que les faibles niveaux de *TrkB* n'étaient pas modulés par l'expression du *bdnf*. En effet, les souris *bdnf* hétérozygotes ne montrent pas d'altération de l'expression de *TrkB*, et aucune diminution n'a été observée dans la lignée double mutante R6/1;*bdnf*^{+/-} (Ginés et al., 2010). Un examen plus approfondi de la mécanistique mène à la constatation d'une réduction de la signalisation de *TrkB* via Ras/MAPK/ERK1/2, associée à une diminution de l'expression des protéines adaptatrices Shc p52/p46 dans les cellules striatales exprimant la forme mutée de la huntingtine (Ginés et al., 2010).

IV. Neurogenèse adulte dans l'hippocampe des rongeurs modèles de la maladie de Huntington

Le cerveau adulte des mammifères conserve la capacité à générer de nouveaux neurones dans deux zones : la zone sous-ventriculaire (SVZ), à proximité des ventricules latéraux, et la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus dentelé (DG) de l'hippocampe (Figure 13). Dans la SVZ, les cellules progénitrices donnent naissance à des neurones qui migrent le long d'un axe caudo-rostral vers les bulbes olfactifs, où ils vont se différencier.

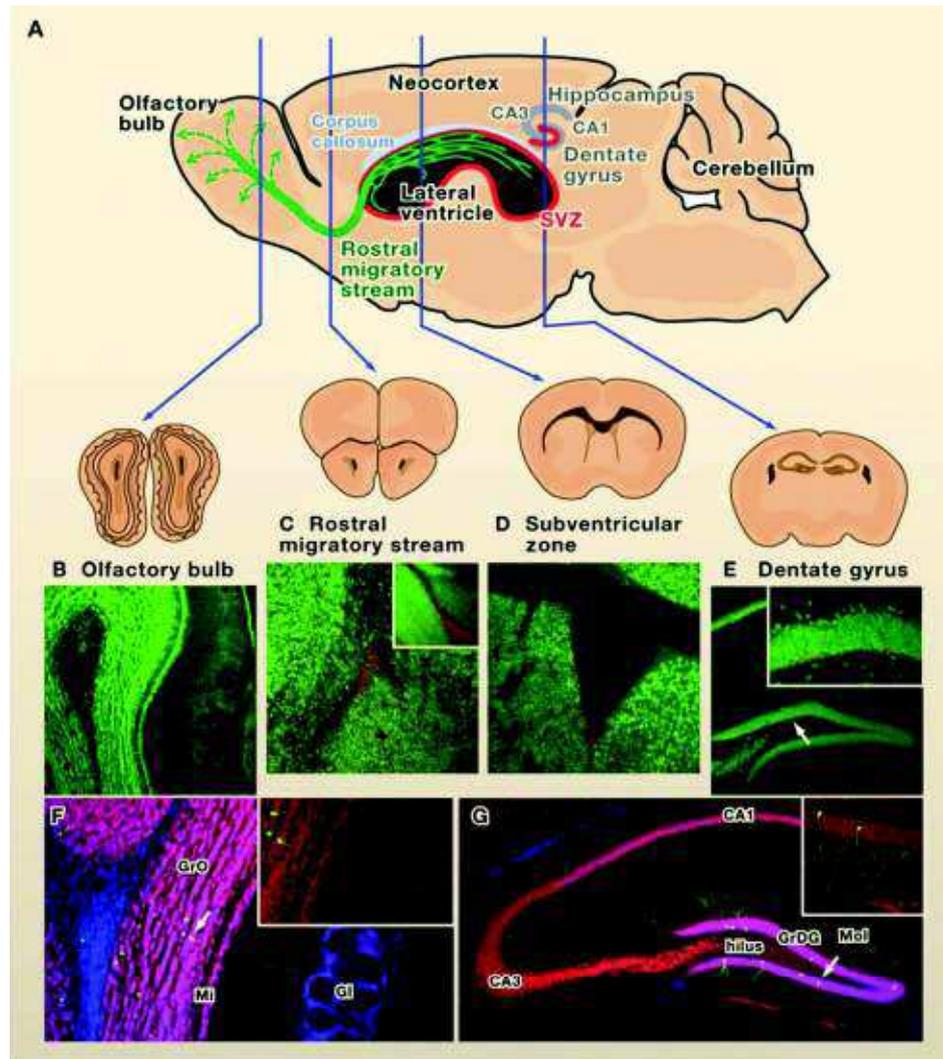


Figure 13 : Neurogenèse dans le cerveau de rongeur adulte

(A) Représentations des vues sagittales et coronales de cerveau de souris dans les zones où a lieu la neurogenèse. Les zones en rouge indiquent les zones germinales du cerveau des mammifères adultes : la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus dentelé de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux. Les neurones générés dans la SVZ migrent en direction rostrale et sont intégrés dans les bulbes olfactifs.

(B à E) Neurogenèse révélée par l'incorporation de BrdU dans le bulbe olfactif (B), le flux de migration rostral (C), la SVZ (D), et le DG (E). L'encart dans (C) est une vue sagittale du flux migratoire rostral avant d'atteindre le bulbe olfactif, et dans (E), une vue à fort grossissement de la zone indiquée par la flèche. En rouge, marquage BrdU, en vert, NeuN. (F et G) Neurones nouvellement formés dans le bulbe olfactif et le gyrus dentelé marqués par la GFP exprimée via un rétrovirus. En médaillon sont représentés les grossissements des neurones indiqués par des flèches. En rouge, NeuN; vert, GFP, bleu, DAPI.

D'après Zhao, Deng, & Gage, 2008

Curtis et ses collaborateurs ont observé une prolifération cellulaire augmentée dans la couche sous-épendymaire du cerveau de patients HD (Curtis et al., 2003). Dans les modèles de rongeurs HD, il semble néanmoins que la neurogenèse adulte soit affectée exclusivement dans l'hippocampe. En effet, de nombreuses études ne montrent aucune altération dans la zone sous-ventriculaire (Duan et al., 2008; Gil et al., 2005; Lazic et al., 2006; Phillips et al., 2005; Simpson et al., 2011). Cependant, dans notre analyse nous ne nous intéresserons pas à cette région, mais nous focaliserons sur l'autre zone où se poursuit la neurogenèse.

A. La neurogenèse dans l'hippocampe adulte

Dans l'hippocampe, les cellules souches neurales (cellules de type 1) qui résident et persistent durant la vie adulte dans la SGZ, produisent, par division asymétrique, des cellules progénitrices (cellules de type 2). Celles-ci prolifèrent et se différencient en neuroblastes qui migrent dans la couche granulaire (Figure 14). Cette niche de cellules souches produirait également les interneurons du gyrus dentelé et des cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes). Les nouveaux neurones font l'objet d'une sélection intense et seule une petite fraction d'entre eux devient mature et fonctionnelle, et s'intègre dans le circuit neuronal préexistant. Il existe des marqueurs neuronaux endo- et exogènes variés permettant par immunohistochimie l'étude des différentes étapes de la neurogenèse (voir plus loin dans le descriptif des différentes étapes).

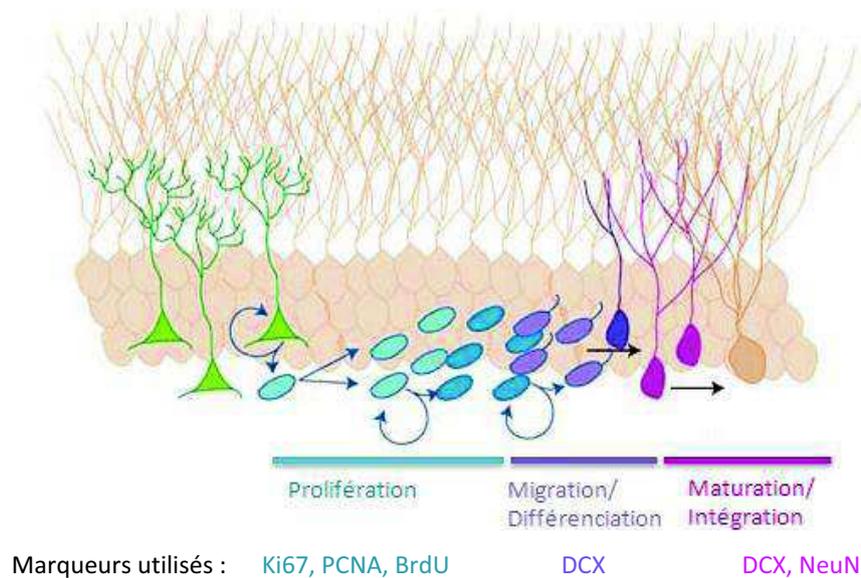


Figure 14 : Etapes de la neurogenèse dans l'hippocampe des mammifères adultes

Les cellules de type 1 (en vert) se renouvellent par division asymétrique et donnent naissance à des cellules de type 2 (en bleu). Celles-ci sont également capables de prolifération, et vont donner naissance à des cellules de type 3 (mauves), qui se différencient en neurones (bleus foncés). Les neurones immatures (roses) migrent dans la couche de cellules granulaires (beige) au fur et à mesure de leur maturation. Au cours de la maturation, l'arborisation des neurites va se mettre en place, et le patron des gènes exprimés évolue de manière progressive.

D'après Eisch et al., 2008

B. Implication de la neurogenèse hippocampique dans les troubles de l'humeur

La neurogenèse hippocampique adulte a gagné une attention considérable en tant que substrat cellulaire de la physiopathologie de la dépression (Duman, 2002; Malberg et al., 2000a; Nibuya et al., 1995). En outre, des études ont démontré qu'une prolifération cellulaire accrue dans l'hippocampe est associée à des traitements antidépresseurs tels que l'électro-convulsivothérapie (ECT) ou des thérapies pharmacologiques (pour revue, voir Malberg & Blendy, 2005). A l'inverse, l'ablation de la prolifération neuronale par irradiation atténue la réponse aux antidépresseurs. Ces résultats suggèrent que les effets thérapeutiques des antidépresseurs impliquent la neurogenèse (Santarelli et al., 2003). Toutefois, ces données sont contestées par plusieurs études qui suggèrent que l'effet des antidépresseurs est indépendant de la neurogenèse hippocampique (pour revue, voir Autry & Monteggia, 2012).

La neurogenèse adulte est aussi importante pour l'apprentissage et la mémoire (Neves et al., 2008). De multiples mécanismes ont été suggérés sur la relation entre hausse de la neurogenèse et amélioration de la cognition, y compris des théories computationnelles, afin de démontrer que les nouveaux neurones accroissent les capacités mémorielles (Becker, 2005). Les expériences de suppression de la neurogenèse se sont montrées non concluantes, mais plusieurs travaux ont proposé certains types d'apprentissage comme étant dépendants de la neurogenèse hippocampique (Shors et al., 2002). Des études ont démontré que l'acte même de l'apprentissage était associé à une survie neuronale accrue (Gould et al., 1999).

Toutes ces études suggèrent la possibilité qu'un déficit de neurogenèse adulte puisse être la cause, au moins partielle, des altérations de l'humeur et des déficits cognitifs retrouvés dans la maladie de Huntington. En effet, en plus de ses autres fonctions, la huntingtine régulerait la neurogenèse (Godin et al., 2010). En fait, la huntingtine contrôle la division cellulaire par sa localisation au pôle du fuseau mitotique. L'inactivation *in vivo* de la huntingtine par ARN-interférent ou par ablation du gène *Hdh* affecte l'orientation du fuseau et le devenir des progéniteurs corticaux dans l'embryon de souris. Cependant, l'effet de la mutation polyQ sur ces paramètres n'est pas connu avec précision et d'autres effets plus tardifs sur la survie et la différenciation neuronales sont possibles.

C. Prolifération cellulaire

La première étape de la neurogenèse conduit à la formation de cellules progénitrices neurales, et est classiquement mise en évidence par l'utilisation de Bromodéoxyuridine (BrdU), un analogue de la thymidine qui s'insère dans l'ADN de cellules en phase S. Le BrdU est injecté un laps de temps défini

(classiquement 2 heures) avant de sacrifier les animaux par perfusion intracardiaque, et de récupérer leur cerveau. Une immunohistochimie sur les coupes obtenues permet de marquer et de visualiser le BrdU, c'est-à-dire l'ADN des cellules l'ayant incorporé (Figure 15). Cependant, nous nous heurtons à un obstacle majeur pour avoir une vue d'ensemble de la prolifération cellulaire dans les différents modèles de HD. En effet, chaque équipe de recherche a son propre protocole et le délai entre l'administration de BrdU et le sacrifice des animaux est très variable (par exemple 2 heures vs. 12 jours). Certaines études ont également utilisé d'autres marqueurs de la prolifération cellulaire tels que le « proliferating cell nuclear antigen » (PCNA) ou le Ki67. Les observations de la neurogenèse hippocampique adulte faites dans les différents modèles de HD sont résumées dans le Tableau 10.

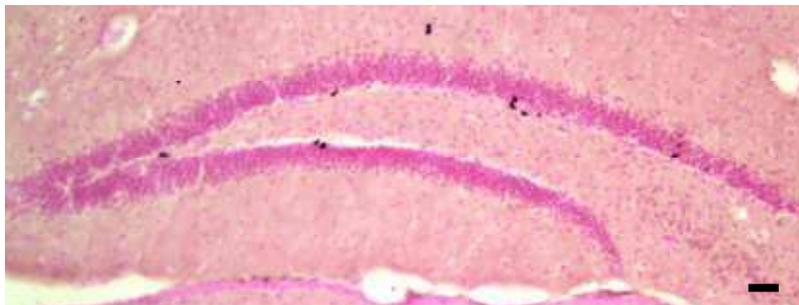


Figure 15 : Immunodétection des cellules du gyrus dentelé de souris ayant intégré le BrdU

Echelle : 50µm.

Prolifération dans les modèles animaux de HD

L'âge d'apparition de défauts dans la prolifération cellulaire dépend des lignées : ils apparaissent soit avant soit après l'apparition des symptômes moteurs. En outre, certains modèles ne présentent pas d'altération de la prolifération. Dans le DG des souris R6/1, la prolifération cellulaire apparaît diminuée tandis que les souris présentent déjà un déficit moteur. En effet, Lazic et ses collègues n'ont pas observé de perte du marquage BrdU chez des souris âgées de 7 semaines, tandis qu'on l'observe chez des souris plus âgées (Lazic et al., 2004, 2006; Walker et al., 2011). De même, les souris YAC 128 présentent une prolifération cellulaire inchangée avant altération motrice (inchangée avant 9-12 mois). Toutefois, âgées de 18 mois, elles présentent une diminution de 26% du nombre de cellules BrdU et Ki-67 positives (Simpson et al., 2011). De même, une perte des cellules BrdU- et PCNA-positives est observée chez les rats transgéniques âgés de 12 mois, *i.e.* après le développement des symptômes moteurs (Kandasamy et al., 2010). Les déficits neurogénique et moteur semblent se produire simultanément chez les souris R6/2, bien qu'aucune étude n'ait été réalisée avant la survenue des symptômes moteurs (*i.e.* avant 4 semaines). Plusieurs études obtiennent des résultats contradictoires quant à une altération de la prolifération cellulaire dans le DG de ces souris R6/2 : il n'y a pas de différence (Phillips et al., 2005), ou une diminution (Gil et al., 2004, 2005; Peng et al.,

2008) du nombre de cellules BrdU-positives. Par ailleurs, un défaut du nombre de cellules exprimant les marqueurs PCNA et Ki-67 a été mesuré (Gil et al., 2005; Kohl et al., 2007).

Aucune altération de la prolifération n'a été observée avant l'apparition des symptômes moteurs chez les R6/1 (Lazic et al., 2004). Au contraire, chez les souris N171-82Q de 16 semaines, la composante motrice est altérée sans qu'il y ait perte de la prolifération cellulaire (Duan et al., 2008).

D. Survie cellulaire

Dans l'hippocampe des rongeurs adultes, environ 80% des neurones meurent dans les 4 semaines suivant leur naissance (Kempermann, 2003). La survie des neurones peut être modulée par divers paramètres, notamment l'âge, l'activité physique, et le régime alimentaire. Pour étudier ce processus, on utilise également le BrdU, que l'on administre aux animaux qui seront sacrifiés classiquement quelques semaines plus tard. Le marquage obtenu par la suite représente le nombre de cellules ayant incorporé le BrdU lors des injections, et ayant persisté jusqu'au sacrifice des animaux.

La survie cellulaire dans les modèles de HD

Quelle que soit la lignée de rongeur HD évaluée, une diminution du taux de survie des cellules nouvellement formées est observée, et ce dans toutes les études (Duan et al., 2008; Gil et al., 2005; Kandasamy et al., 2010; Kohl et al., 2007; Lazic et al., 2006; Peng et al., 2008; Phillips et al., 2005; Potter et al., 2010; Renoir et al., 2012; Simpson et al., 2011; Walker et al., 2011), à l'exception d'une (Grote et al., 2005). En effet, les neurones néoformés présentent une survie moindre chez les souris R6/1 dès l'âge de 10 semaines (Lazic et al., 2006). Cette observation est faite plus précocement encore chez les R6/2 qui présentent une baisse du nombre de cellules marquées par le BrdU dès 5,5 semaines (Gil et al., 2005). De même, les souris de la lignée N171-82Q présentent une altération de la survie des cellules nouvellement formées à 16 semaines (Duan et al., 2008; Potter et al., 2010). Les animaux YAC 128 présentent un déficit plus tardif, survenant à l'âge de 9 mois (Simpson et al., 2011), qui est similaire à celui observé chez les rats HD (8 et 12 mois) (Kandasamy et al., 2010). Dans les deux cas, la diminution du taux de survie neuronale se produit après l'apparition des déficits moteurs.

Malheureusement, il n'y a pas encore de données concernant la survie cellulaire dans les modèles de souris knock-in.

E. Différentiation et maturation

La doublecortine (DCX) est une protéine associée aux microtubules, exprimée de manière transitoire au cours de la vie neuronale et utilisée comme marqueur des néo-neurones immatures. Plus

précisément, elle est exprimée dans les précurseurs neuronaux et les neurones immatures pendant 2 à 3 semaines après leur naissance. Son expression commence à diminuer après 2 semaines, à mesure qu'est exprimé le marqueur de neurones matures NeuN. L'expression de la doublecortine refléterait la neurogenèse (Couillard-Despres et al., 2005), et cette protéine est aujourd'hui largement utilisée pour marquer les jeunes neurones. De par son expression dans l'ensemble du cytoplasme, le marquage DCX laisse voir avec précision l'architecture dendritique des neurones (Figure 16).

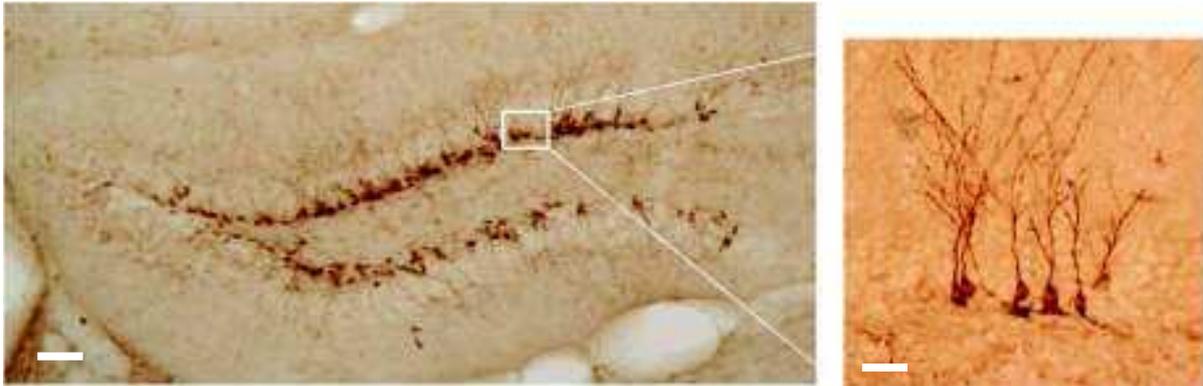


Figure 16 : Immunodétection de la doublecortine dans le gyrus dentelé de l'hippocampe de souris adulte

Echelle : 50µm (gauche) et 25 µm (droite).

Altérations de la maturation neuronale dans les modèles de HD

Même si la plupart des études montrent un défaut de maturation neuronale chez les modèles HD, les résultats ne sont pas unanimes concernant le nombre de cellules DCX-positives dans le gyrus dentelé. Ainsi, les souris R6/1 présentent une diminution du nombre de neurones exprimant la doublecortine à partir de 10 semaines, cette perte s'aggravant avec l'âge (Lazic et al., 2006). La même observation est faite chez les souris YAC 128, qui présentent un nombre de cellules DCX diminué, et un déficit global lié à l'âge à partir de 3 mois (similaire chez les animaux sauvages, Simpson et al., 2011); et chez les rats TgHD où le pourcentage de cellules DCX-positives est inférieur à celui observé dans le DG des animaux contrôles. Toutefois, des données contradictoires montrent une diminution (Fedele et al., 2010; Kohl et al., 2007) ou pas de différence (Phillips et al., 2005) du nombre de cellules DCX-positives chez les souris R6/2 quand on l'étudie après l'apparition des déficits moteurs (9 à 14 semaines). En plus du nombre de cellules exprimant la doublecortine, plusieurs études se sont intéressées à la morphologie des neurones, et ont ainsi révélé des altérations de la maturation neuronale. Il a notamment été décrit des dendrites plus courtes et s'étendant moins loin dans l'épaisseur du gyrus dentelé, un soma de taille réduite, une arborisation dendritique réduite et des neurones migrant moins loin dans la couche granulaire (Fedele et al., 2010; Kohl et al., 2007; Lazic et al., 2006; Phillips et al., 2005; Potter et al., 2010; Simpson et al., 2011).

Modèle	Prolifération cellulaire	Survie cellulaire	Apoptose	Maturation	Dendritogenèse	Références
R6/1	∅ à 7s, ↓ à 22s (12j de BrdU) ↓ à 33s (2h après inj BrdU)	↓ à 10, 12s, ∅ à 24s ou ↓ non significative à 25s (4s après BrdU inj)	∅ de mort cellulaire (cellules Cleaved- caspase3+)	↓ à 10s, ↓↓ à 25s ↓ plus importante chez ♂ que ♀ ↓ cellules NeuN/BrdU chez ♂24s ↓ cellules BrdU/DCX, BrdU/GFAP à 33s	Dendrites moins nombreuses et plus courtes (54% plus courtes). Neurones s'agglutinent dans la SGZ et ne migrant pas dans la GCL.	Grote et al., 2005 Lazic et al., 2004, 2006, Renoir et al., 2012, Walker et al., 2011
R6/2	∅ (9, 14s) or ↓ (3.5, 7.5, 10, 11.5, 12s) du nombre de cellules BrdU ↓ du nombre de cellules PCNA + (♀, 9s) et Ki67+. ↓ liée à l'âge ∅ du nombre de cellules Pax6/Tbr2 (11s)	↓ BrdU cellules 2s après inj (5.5 and 10s). ↓ in BrdU cellules 3s, 4s après injection (9s♀)	↑ mort cellulaire (TUNEL) ∅ du niveau de Wnt3a dans l'hippocampe	∅ or ↓ 57/60% des cellules DCX+. ↓ 65% des cellules NeuroD1 Pas de différence en fonction du sexe. ↓ niveaux protéiques de NeuroD1 & calrétinine	Réduction de taille des cellules et des dendrites, arborisation dendritique moins complexe. ↓ distance de migration dans la GCL	Fedele et al., 2011 Gil et al., 2005 Kohl et al., 2007 Peng et al., 2007 Phillips et al., 2005
N171-82Q	∅ à 16s (sacrifice 3j après inj)	16s : ↓ cellules BrdU 10s après l'inj 19s : ↓ cellules BrdU 3s après l'inj	↓ Bcl-2 dans le striatum	↓ cellules BrdU/NeuN à 16 et 19s.	A 16s : ↓ complexité de l'arborisation dendritique, dendrites ne s'étendent pas dans la ML autant que les WT (empirique)	Duan et al., 2008 Potter et al., 2010
Tg Rat	↓ des cellules BrdU († 36h, 48h après inj) et des cellules PCNA à 12m. ↓ liée à l'âge	↓ cellules BrdU 25j après inj à 8 et 12mois.	-	↑ nombre (237%) et pourcentage de cellules DCX+ à 8m; ↓ cellules DCX+ (- 58%) à 12m. ↑ nombre de cellules indifférenciées et ↓ différenciation neuronale (cellules NeuN) à 8 et 12m. Lié à l'âge	-	Kandasamy et al., 2010
YAC128	∅ à 3m ↓ cellules BrdU († 12h après inj), ↓ cellules Ki67, ∅ cellules PCNA ↓ liée à l'âge comparable chez YAC128 et WT.	↓ cellules BrdU à 9 & 12 mois. Même taux de survie que les WT.	↓ cellules NeuroD (71% à 18m). ↓ liée à l'âge, similaire chez YAC128 et WT.	↓ cellules DCX+ à partir de 3 mois (-63% à 18m). ↓ liée à l'âge ↓ ratio BrdU/NeuN.	↓ arborisation dendritique (empirique)	Simpson et al., 2011

Tableau 10 : Altérations de la neurogenèse hippocampique adulte dans les modèles animaux de la maladie de Huntington

↓ : diminution; ↑ : augmentation; ∅ : pas de différence par rapport au groupe contrôle ; (-) : non décrit.
j : jours, s : semaines, m : mois

Souris R6/1

Les souris R6/1 ne présentent aucune altération de la prolifération cellulaire à 7 semaines, c'est à dire avant l'apparition des symptômes moteurs (Lazic et al., 2004), mais une dégradation liée à l'âge est mise en évidence. En effet, chez les souris plus âgées (22 et 33 semaines), une diminution du nombre de cellules marquées par le BrdU est observée (Lazic et al., 2004, 2006; Walker et al., 2011), coïncidant avec la survenue du déficit moteur. Il n'est pas certain que la survie des cellules soit modifiée puisque les études rapportent des résultats contradictoires, confirmés par le fait qu'aucune différence du nombre de cellules apoptotiques (détection de la forme clivée de la Caspase 3, un marqueur d'apoptose) n'ait été observée entre les génotypes. Ces souris présentent également une diminution du nombre de nouveaux neurones DCX-positifs à partir de 10 semaines, déficit qui semble s'aggraver avec l'âge et être plus important chez les mâles que chez les femelles. Ces neurones ne migrent pas dans la couche de cellules granulaires, mais forment des amas dans la zone sous-granulaire. Leurs dendrites sont également moins nombreuses et plus courtes (Lazic et al., 2006).

Souris R6/2

Les études sur la lignée R6/2, rapportent des résultats contradictoires concernant la neurogenèse qui semble cependant largement modifiée dans l'ensemble. Une diminution du nombre de cellules BrdU-positives a été observée aux âges de 3,5 et 12 semaines, mais ne se retrouve pas chez les souris âgées de 9 et 14 semaines. Une perte des cellules exprimant les marqueurs PCNA ou Ki67 a également été décrite. La baisse de survie cellulaire observée pourrait être expliquée par l'augmentation concomitante du marquage TUNEL dans le gyrus dentelé, qui met en évidence la fragmentation de l'ADN, caractéristique des cellules apoptotiques (Kohl et al., 2007). De même, des données contradictoires montrent une diminution (Fedele et al., 2010; Kohl et al., 2007) ou pas de différence (Phillips et al., 2005) du nombre de cellules exprimant la doublecortine dans le DG des souris R6/2 après l'apparition des déficits moteurs. Néanmoins, il semble que moins de progéniteurs se différencient en neurones, puisque les deux marqueurs neuronaux NeuroD1 et calrétinine voient leur expression diminuée, et que le nombre de cellules co-marquées par BrdU et NeuN est réduit de plus de 70% (Fedele et al., 2010; Kohl et al., 2007). En outre, les nouveaux neurones présentent d'importantes altérations morphologiques, avec un soma et des dendrites réduits, et une arborisation dendritique moins complexe. Ils migrent également moins loin dans la couche de cellules granulaires que ce qui est observé dans la lignée sauvage.

Souris N171-82Q

Dans lignée N171-82Q, on ne rapporte pas d'altération de la prolifération cellulaire chez les souris âgées de 16 semaines, tandis que le déficit moteur est déjà présent (Duan et al., 2008). En revanche,

ces animaux présentent un taux de survie cellulaire réduit à 16-19 semaines, ainsi qu'une baisse de la différenciation des précurseurs en neurones, attestée par le faible nombre de cellules marquées à la fois par BrdU et NeuN. La dendritogenèse est également altérée, puisqu'une réduction de la longueur et de la complexité des arborisations dendritiques sont décrites (Potter et al., 2010).

Rats TgHD

La prolifération cellulaire est réduite chez les rats transgéniques de 12 mois (Kandasamy et al., 2010), comme le montrent les quantités réduites de cellules marquées par le BrdU ou le PCNA. La survie des cellules nouvellement formées, la différenciation neuronale et la maturation sont également touchées. Étonnamment, le nombre de cellules exprimant la doublecortine est dans un premier temps fortement augmenté (+ 237% à 8 mois), puis diminue avec l'âge pour devenir, à 12 mois, inférieur à celui des contrôles. Il est possible que la maturation neuronale ne progresse pas normalement, et que les neurones restent « bloqués » et s'accumulent dans un stade immature. Il apparaît également que moins de cellules nouvellement générées se différencient en neurones. Cela semble être dû à des cellules souches qui demeurent dans un stade quiescent (cellules SOX2-positives).

Souris YAC 128

Les souris YAC 128 présentent une prolifération cellulaire altérée à partir de l'âge de 6 mois, comme l'attestent les nombres réduits de cellules BrdU- et Ki67-positives, bien que le nombre de cellules PCNA soit stable entre les géotypes (Simpson et al., 2011). Le déficit de prolifération s'accroît avec l'âge, mais les écarts entre les deux groupes n'augmentent pas pour autant. Le nombre de nouveaux neurones est également fortement réduit à 18 mois, et ce, une fois encore de manière liée à l'âge. La dendritogenèse est altérée, avec une arborisation dendritique réduite. Dans ce modèle, la prolifération et la maturation diminuent avec l'âge (ce qui est somme toute normal), mais le déficit induit par la huntingtine mutante ne s'aggrave pas avec le temps.

Il n'y a pas à l'heure actuelle, d'étude ayant exploré la neurogenèse dans l'hippocampe d'un modèle knock-in de la maladie de Huntington. Etant donné que ces modèles sont les plus proches, génétiquement parlant, de la pathologie humaine, de tels travaux permettraient peut-être de mieux comprendre les déficits psychiatriques et cognitifs observés chez les patients HD.

V. Effets des thérapies sur le phénotype des modèles animaux de HD

A. Les médicaments antidépresseurs monoaminergiques

1. Effets sur le comportement

Le traitement aigu et chronique par l'inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS) sertraline a un effet sur le comportement dépressif de la souris R6/1 (Pang et al., 2009; Renoir et al., 2011b, 2012). Des études ont mis en évidence une action spécifique de la sertraline chez les souris femelles HD dans le FST, tandis que Renoir et ses collègues rapportent un effet sur les deux sexes dans le TST. Le traitement chronique par la fluoxétine améliore les fonctions cognitives des souris transgéniques R6/1 sans affecter l'activité motrice ou le poids corporel, et inverse aussi le phénotype dépressif des souris HD tandis qu'il n'a aucun effet chez les animaux sauvages (Grote et al., 2005). Un traitement antidépresseur chronique ne parvient pas à améliorer le phénotype dépressif observé dans le modèle YAC 128. En effet, l'imipramine n'induit aucun effet sur la préférence de saccharose, pas plus que ne le fait la fluoxétine sur les performances dans le FST (Pouladi et al., 2009). L'antidépresseur tricyclique (TCA) désipramine a également été testé dans le modèle R6/1, et n'induit aucune amélioration du phénotype. Étonnamment, il a même agi comme un "dépresseur" sur les souris HD mâles. L'utilisation aiguë du flumazénil (antagoniste du récepteur aux benzodiazépines) n'induit aucun effet sur les comportements liés à l'anxiété chez la souris R6/2 (File et al., 1998). Les effets comportementaux des différentes thérapies testées (antidépresseurs et suivants) sont résumés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Effets des traitements sur le phénotype anxio-dépressif des modèles de HD

Traitement	Dose/Durée	Modèle	Effet sur le comportement anxio-dépressif	Réfs.
<i>Antidépresseurs</i>				
Fluoxétine	20mg/kg, 10 sem, ip	R6/1	↓ immobilité dans le FST chez les souris HD (pas WT)	Grote et al. 2005
	20mg/kg, 3 sem, ip	YAC128	∅ sur la préférence de sucrose	Pouladi et al. 2009
Sertraline	20mg/kg, aigu, ip	R6/1	↓ immobilité dans le FST chez les femelles WT et HD, et les mâles WT seulement. ↓ immobilité dans le TST chez les WT et HD. Pas de différence de sexe.	Pang et al. 2009 Renoir et al. 2011b
	10mg/kg, 4sem, ip	R6/1	↑ préférence de saccharine chez les souris HD uniquement. ∅ de l'immobilité dans le FST.	Renoir et al. 2012
	20mg/kg, 4sem, ip	R6/1	↓ immobilité dans le FST chez WT et HD. ↓ réponse de stress dans le test d'hyperthermie induite par le TST (pas chez WT)	Renoir et al. 2012

Traitement	Dose/Durée	Modèle	Effet sur le comportement anxio-dépressif	Réfs.
Désipramine	20mg/kg, aigu, ip	R6/1	∅ sur les scores d'immobilité dans FST et TST chez HD. Effet inverse chez les mâles : ↑ immobilité dans le FST	Pang et al. 2009
Imipramine	10 mg/kg, 3 sem, ip	YAC128	∅ immobilité dans le FST	Pouladi et al. 2009
<i>Traitement GABAergique</i>				
Flumazénil	4mg/kg, aigu, ip	R6/2	Effet inverse chez les WT et HD : ↑ ou ↓ le temps/entrées dans les bras ouverts de l'EPM (↓ non significative chez HD)	File et al. 1998
<i>Prévention du clivage de la huntingtine par la caspase 6</i>				
Mutation C6R		YAC	↓ immobilité dans le FST et ↑ la préférence de sucrose (atteint le niveau des WT, i.e. supérieur aux YAC128)	Pouladi et al. 2009
<i>Exercice physique</i>				
Roue	4 sem	R6/1	↓ immobilité dans le FST chez HD et ↑ chez WT. ∅ préférence saccharine chez HD et ↓ chez WT. ↓ réponse de stress dans le test d'hyperthermie induite par le TST	Renoir et al. 2011a
<i>Enrichissement de l'environnement</i>				
	4 sem	R6/1	↓ immobilité dans le FST chez les femelles HD uniquement	Pang et al., 2009

↓: diminution; ↑: augmentation; ∅: pas de différence par rapport aux contrôles ou wild-types.

2. Effets sur la neurogenèse hippocampique et conséquences sur l'expression de BDNF

Sur le plan histologique, l'administration chronique de sertraline entraîne une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaires chez la souris R6/2, à des niveaux demeurant cependant inférieurs aux contrôles, et sans changer le ratio de cellules BrdU+/NeuN+, indiquant que la différenciation neuronale n'est pas augmentée (Peng et al., 2008). Les effets des différents traitements (antidépresseurs et suivants) sur la neurogenèse hippocampique des modèles de HD sont résumés dans le Tableau 12.

La sertraline restaure également les concentrations de BDNF dans l'hippocampe et le striatum des souris R6/2, mais pas dans le cortex, contrairement à ce qui est observé chez les sauvages. Les concentrations protéiques réduites de BDNF dans l'hippocampe des souris *Hdh^{Q140}* (8 semaines) sont entièrement restaurées par l'ampakine, un modulateur allostérique positif des récepteurs AMPA du glutamate (Simmons et al., 2009). En outre, l'augmentation du BDNF endogène restaure le nombre d'épines dendritiques dans la région CA1 de l'hippocampe.

3. Récepteurs monoaminergiques impliqués dans les effets des antidépresseurs

Les effets des antidépresseurs passent par l'augmentation des concentrations en monoamines dans le SNC. Cette action est induite principalement par trois mécanismes : l'inhibition de la dégradation des neurotransmetteurs, l'inhibition de leur recapture dans la fente synaptique, ou le blocage d'un récepteur. La plupart des antidépresseurs actuels ciblent le système sérotoninergique, et passent par le blocage de son transporteur, le SERT, entraînant à long terme une désensibilisation des récepteurs pré-synaptiques 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}. Une seconde classe d'antidépresseurs cible le système noradrénergique, et donc son transporteur NAT. Il est toutefois important de noter que les trois systèmes monoaminergiques (sérotoninergique, noradrénergique et dopaminergique) sont étroitement liés, et qu'une modification de la signalisation de l'un a des conséquences indirectes sur les deux autres. Nous nous intéressons ici aux observations faites dans les modèles animaux de HD quant à l'expression de certains des récepteurs et transporteurs monoaminergiques.

Des études de liaison reportent des taux réduits des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} dans le cerveau de patients HD (Castro et al., 1998) et dépressifs (Drevets et al., 2007; López et al., 1998; López-Figueroa et al., 2004). Les résultats obtenus dans le modèle transgénique R6/1 (Pang et al., 2009) s'accordent avec une étude précédente montrant une réduction de la densité des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe et le cortex de souris R6/2 à un stade avancé (Yohrling et al., 2002) et dans plusieurs autres rongeurs modèles de dépression. Pang et collaborateurs rapportent également une réduction de l'expression du récepteur 5-HT_{1B} et du transporteur de la sérotonine SERT, ce qui est cohérent avec le comportement des femelles dans le TST et le FST, et semblable à ce qui est observé chez les souris knock-out pour les récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} ou le SERT (Holmes et al., 2002; Jones & Lucki, 2005; Lira et al., 2003; Mayorga et al., 2001). Pang et collaborateurs signalent également un dimorphisme sexuel dans l'expression réduite du récepteur 5-HT_{1B}, ce qui peut expliquer des comportements dépressifs sexe-spécifiques. Dans le modèle de souris R6/2, Mochel et collaborateurs (2011) ont observé une diminution des concentrations tissulaires de sérotonine et de son principal métabolite, le 5-HIAA, dans l'hippocampe et le cortex frontal à partir de l'âge de 4 semaines. En outre, la concentration striatale de dopamine (DA) est diminuée à 8 et 12 semaines, tandis que ses métabolites, la 3-méthoxytyramine et l'acide homovanillique, sont déjà considérablement réduits chez les animaux asymptomatiques âgés de 4 semaines (Mochel et al., 2011). Dans leur globalité, ces études suggèrent une réduction générale de la neurotransmission sérotoninergique et dopaminergique centrale, qui pourrait contribuer au développement des comportements anxio-dépressifs des souris HD.

B. L'exercice physique et l'enrichissement de l'environnement

1. L'exercice physique

L'activité physique profite à la fois à la santé générale et au fonctionnement du cerveau chez les rongeurs comme chez les humains (pour revue, voir Lucassen et al., 2010). Cependant, il est moins évident de savoir si l'activité physique prévient ou améliore les symptômes des maladies neurodégénératives. Un travail de Potter et collaborateurs vise à déterminer si l'exercice volontaire (course dans une roue) peut retarder l'apparition ou réduire la sévérité des symptômes de la maladie de Huntington dans le modèle de souris transgéniques N171-82Q (Potter et al., 2010). La diminution du volume du gyrus dentelé de l'hippocampe, de la neurogenèse hippocampique, et les anomalies morphologiques des neurones immatures n'ont pas été corrigées par l'activité physique initiée à un stade pré-symptomatique. D'autres études ont montré la même inefficacité de l'exercice physique sur la neurogenèse adulte chez les modèles murins R6/1 et R6/2 (Kohl et al., 2007; Renoir et al., 2012).

L'accumulation anormale de la protéine BDNF dans le cortex frontal des souris R6/1 n'a pas été affectée par l'activité physique, et les taux d'ARNm qui étaient réduits dans le cortex antérieur, le striatum et l'hippocampe de souris HD, ont été améliorés par l'exercice uniquement dans le striatum (Pang et al., 2006). Selon Zajac et collaborateurs, les taux totaux d'ARNm de BDNF sont réduits dans l'hippocampe des souris R6/1 mâles et femelles, et l'exercice dans la roue augmente significativement l'expression totale du gène *bdnf* dans tous les groupes, sauf chez les souris HD mâles (Zajac et al., 2010). Dans l'ensemble, les résultats indiquent des effets différentiels de l'exercice physique : il n'a aucun effet sur la neurogenèse hippocampique adulte, mais selon le modèle étudié, peut améliorer l'expression du *bdnf* dans certaines régions cérébrales.

2. L'enrichissement du milieu

L'enrichissement de l'environnement (EE) modifie l'expression de gènes dans le cerveau de la souris normale, et module l'évolution de plusieurs troubles neurologiques. De manière intéressante, la stimulation environnementale semble avoir des effets bénéfiques chez les patients HD (Sullivan et al., 2001). Cependant, les mécanismes qui les sous-tendent restent inconnus.

Chez la souris R6/1 de fortes réductions de BDNF sont mesurées dans l'hippocampe et le striatum à 5 mois (voir partie III), et sont entièrement restaurées par l'enrichissement de l'environnement. Les niveaux de BDNF des animaux HD restent inchangés dans le cortex antérieur, ce qui suggère que l'enrichissement pourrait prévenir ou compenser le déficit de transport antérograde de cette neurotrophine dans le striatum, induit par la forme mutée de la huntingtine. Une autre équipe a observé une augmentation induite par l'EE des concentrations d'ARNm de *bdnf* dans l'hippocampe des animaux sauvages mâles uniquement (Zajac et al., 2010). Un autre travail porte sur

les niveaux d'expression des récepteurs de la sérotonine (Pang et al., 2009). Les manipulations de l'environnement préviennent le phénotype dépressif, et augmentent l'expression génique des récepteurs 5-HT_{1A}, et 5-HT_{1B} dans l'hippocampe des souris HD femelles mais pas dans leur cortex.

L'ensemble de ces données montre que l'enrichissement de l'environnement est susceptible d'inhiber ou de ralentir les altérations de l'humeur et du système moteur des modèles murins de HD. Les mécanismes impliqués pourraient provenir de la limitation des déficits neurotrophiques, éventuellement par le biais du sauvetage de la transcription ou du transport des protéines concernées, notamment le BDNF et les récepteurs de la sérotonine, de façon région-dépendante.

C. Autres stratégies

Le clivage de la huntingtine a été caractérisé *in vitro*, et l'accumulation de fragments représente une altération pathologique précoce dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Huntington. En particulier, la protéolyse de la HTT au site de clivage caspase-6 représente un événement important dans le dysfonctionnement neuronal et la neurodégénérescence. Le groupe de Graham et collaborateurs a généré des souris YAC exprimant une huntingtine mutante résistante au clivage par la caspase-6 (C6R), dont l'expression conduit à une amélioration des fonctions motrices et de la survie cellulaire dans le striatum, et induit une protection contre la neurotoxicité (Graham et al., 2006). Ces souris ont également montré une amélioration des comportements de type dépressif, qui sont restaurés au niveau des animaux contrôles (Pouladi et al., 2009). Ces données conduisent à impliquer le clivage de la huntingtine par la caspase-6 dans l'origine d'un comportement dépressif.

D'autres stratégies ont été testées afin de promouvoir la neurogenèse adulte, tels que l'asialo-érythropoïétine. Malheureusement, aucune preuve d'une amélioration des symptômes ou de la neurogenèse des souris R6/1 traitées avec cette cytokine n'a été rapportée (Gil et al., 2004). Le neuropeptide Y (NPY) a également été décrit comme étant neuroprotecteur et promouvant la neurogenèse dans la SVZ de souris sauvages. Chez les souris R6/2, le NPY stimule également la prolifération cellulaire dans la SVZ, réduit l'atrophie striatale et les symptômes moteurs, mais n'a néanmoins aucun effet sur la neurogenèse dans le gyrus dentelé (Decressac et al., 2010). De manière générale, le facteur de croissance fibroblastique FGF-2 (fibroblast-growth factor) stimule la prolifération cellulaire, et compense ainsi la mort neuronale. Ce traitement a réussi à réduire la propagation de la maladie tant au niveau moteur qu'histologique (Jin et al., 2005). Il serait par conséquent intéressant d'étudier ses effets sur la neurogenèse hippocampique et le phénotype comportemental anxio-dépressif observé dans les modèles de HD.

Traitement	Modèle	Prolifération	Survie cellulaire	Maturation	Dendritogenèse	Références
<i>Antidépresseurs</i>						
Fluoxétine 20mg/kg/j, 10sem	R6/1	-	∅ (4sem après BrdU)	↑ cellules NeuN/BrdU, mais reste inférieur au niveau WT	-	Grote et al. 2005
Sertraline 10mg/kg/j, 4sem	R6/2	↑ (sous le niveau WT)	↑ (3sem après BrdU) ≠ niveau contrôle	∅ cellules Brdu+/NeuN+	-	Peng et al. 2008
	N171-82Q	↑ (chez WT et HD)	↑ (chez WT et HD)	= BrdU/NeuN ratio	-	Duan et al. 2008
<i>Facteurs de croissance et cytokines</i>						
FGF-2	R6/2	∅ (mais ↑ dans SVZ)	-	-	-	Jin et al. 2005
Neuropeptide Y	R6/2	∅	∅ (4sem après BrdU)	-	-	Decressac et al. 2010
Asialoérythropoïétine	R6/2	∅	-	-	-	Gil et al. 2004
<i>Exercice physique</i>						
Roue d'exercice	R6/1	-	∅ (12j de BrdU, sacrifice 4 sem après)	-	-	Renoir et al. 2012
	R6/2	∅ cellules PCNA	∅ (4 sem après BrdU)	∅ cellules DCX+ ∅ cellules Brdu+/NeuN+	∅ arborisation dendritique	Kohl et al. 2007
	N171-82Q	∅ (volume GCL)	∅ cellules BrdU chez HD	↑ NeuN/BrdU ratio in HD mice	∅ complexité et longueur des dendrites	Potter et al. 2010
<i>Enrichissement de l'environnement</i>						
	R6/1	∅ à 7 et 22 sem	↑ survie à 25 sem mais pas 10 (< niveau WT) ∅ survie neuronale (Brdu+/NeuN+) ∅ cellules Cleaved-caspase-3+	↑ cellules DCX+ et ↑ migration neuronale à 25 sem mais pas 10.	↑ longueur dendrites à 25 sem mais pas 10	Lazic et al. 2004, 2006

Tableau 12 : Effet des traitements sur la neurogenèse dans l'hippocampe des animaux modèles de HD

↓ : diminution ; ↑ : augmentation ; ∅ : pas de différence par rapport aux contrôles ou wild-type ; - : non décrit

Malheureusement, la majeure partie des travaux actuels sur de potentiels nouveaux traitements de HD, se concentre sur la neurodégénérescence striatale, et les déficits moteurs qui en découlent. La plupart des études portant sur les troubles de l'humeur et la neurogenèse hippocampique expérimentent les effets de traitements « classiques » tels que les antidépresseurs, l'environnement enrichi ou l'activité physique. Il n'est pas certain que cette recherche puisse mener à des améliorations cliniques, puisque nous avons vu plus haut (Partie Clinique, paragraphe V) que l'utilisation de la fluoxétine, largement étudiée pour ses effets comportementaux et pro-neurogéniques, n'était pas recommandée dans le contexte de HD au vu des effets indésirables qui lui sont propres.

Maintenant que nous savons les aspects de BDNF et neurogenèse adulte impliqués dans la maladie de Huntington, il semble nécessaire de pousser la recherche thérapeutique dans cette direction, afin d'améliorer les conditions de vie des patients avant qu'elles ne soient trop dégradées. Plusieurs études ont d'ailleurs souligné le dysfonctionnement du BDNF dans la maladie de Huntington et ses potentiels effets neuroprotecteurs (Seo et al., 2004; Zuccato et al., 2001), ouvrant ainsi la voie à des stratégies potentielles pour l'amélioration des symptômes de HD.

Problématique du travail

Au cours de mon travail de thèse, je me suis attachée à la compréhension de l'implication de la huntingtine dans les troubles de l'humeur, l'expression et le transport du BDNF, et la neurogenèse hippocampique, composantes étroitement imbriquées. Ce travail s'est donc divisé en trois points : j'ai débuté par l'étude d'un modèle de la maladie de Huntington, les souris *Hdh^{Q111}*, dont les résultats sont relatés dans le premier article (*Article 1*). Par la suite, nous avons voulu disséquer plus précisément les rôles et les mécanismes d'action de la huntingtine sauvage. Ainsi, nous avons étudié l'effet d'une extinction conditionnelle de la huntingtine dans une région cérébrale définie (le cortex et l'hippocampe), puis nous avons analysé le rôle de phosphorylations post-traductionnelles dans le fonctionnement de la protéine. Dans chacune des parties de ce travail, nous avons caractérisé le phénotype comportemental des animaux du point de vue des troubles affectifs (anxiété et dépression). Nous avons également étudié l'expression et le transport du BDNF, ainsi que la neurogenèse dans l'hippocampe des animaux adultes. Le but final étant d'avoir une meilleure compréhension du rôle de la huntingtine dans ces aspects qui sous-tendent le comportement.

Dans un premier temps, je me suis intéressée aux effets de la huntingtine polyQ sur les trois aspects de BDNF, neurogenèse et comportement anxio-dépressif. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler sur un modèle knock-in de la maladie de Huntington, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les modèles knock-in sont décrits comme étant des modèles plus précis de la maladie que les modèles transgéniques, essentiellement parce que la huntingtine mutée est exprimée sous le contrôle du promoteur murin endogène, ce qui induit une expression « physiologique » de la protéine mutée. Deuxièmement, en conséquence du premier point, l'évolution de la maladie chez ces animaux est plus progressive, reproduisant ainsi plus fidèlement les observations faites chez l'homme (c'est-à-dire déclin moteur survenant à un âge « mûr »). Cette progression plus lente de la pathologie permet également de réaliser une étude comportementale en amont des symptômes moteurs, qui n'interféreront donc pas avec nos résultats.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la compréhension des fonctions « normales » de la huntingtine. En effet, la plupart des travaux portent sur des modèles de la maladie de Huntington, et évaluent le fonctionnement de la huntingtine mutée. Il est difficile dans ces conditions de faire la part entre pertes et gains de fonction dans les processus pathologiques. La complexité du problème peut être illustrée par exemple par les réponses spécifiques des différents promoteurs du BDNF à l'expression de la mutation polyQ ou à la diminution de l'expression de la HTT sauvage (voir Partie

II.B.1) où des conclusions différentes peuvent être tirées de l'étude des différents promoteurs. De plus, la huntingtine interagit avec de très nombreuses protéines (voir le Tableau 6) impliquées dans des fonctions multiples. Les relations entre un partenaire protéique particulier d'une part et la huntingtine mutante ou sauvage d'autre part, seront différentes des relations impliquant un autre partenaire protéique. On peut estimer que la pathologie globale résulte d'une mosaïque de pertes et de gains de fonction.

L'étude de la fonction normale de la huntingtine est ainsi un préalable indispensable à la meilleure compréhension des mécanismes pathologiques. Cependant, il est impossible d'évaluer simplement l'effet d'une perte de fonction de la huntingtine, puisque le knock-out de cette protéine entraîne une létalité embryonnaire précoce (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Nous avons donc étudié l'effet d'une extinction conditionnelle de la huntingtine dans les neurones matures du cortex et de l'hippocampe. Cette construction permet une expression normale de la huntingtine pendant les phases critiques du développement embryonnaire et post-natal, et l'extinction du gène à l'âge adulte. L'extinction spécifique dans le cortex et l'hippocampe est particulièrement intéressante puisque ces deux régions sont impliquées dans les troubles de l'humeur et les fonctions cognitives, et sont des zones importantes de production du BDNF. Nous avons évalué l'effet de l'extinction de la huntingtine sur l'expression et le transport du BDNF, et vérifié si l'altération du support trophique en découlant aurait un effet sur la neurogenèse hippocampique adulte et le phénotype comportemental des animaux. Ces travaux font l'objet d'un article en cours de préparation (*Article II*).

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet de la phosphorylation de la huntingtine sur ses sérines 1181 et 1201. La HTT est la cible de diverses modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation de résidus sérines par la Cyclin-dépendant kinase 5 (Cdk5), elle-même impliquée dans la neurogenèse embryonnaire et adulte. Chez l'adulte, la Cdk5 est active principalement dans les neurones post-mitotiques et matures. Des études précédentes ont mis en évidence que la phosphorylation de HTT par Cdk5 sur la sérine 434 diminue le clivage de la huntingtine mutante et l'agrégation des fragments en résultant, et diminue la mort cellulaire induite par HTT-polyQ (Luo et al., 2005). Des études *in vitro* réalisées dans l'équipe des Dr Humbert & Saudou révèlent également une modulation de la survie cellulaire par le statut de phosphorylation des sérines 1181 et 1201 (Anne et al., 2007). Ainsi, l'absence de phosphorylation de ces sérines augmente la toxicité de la huntingtine mutante, tandis que leur phosphorylation diminue la mort cellulaire induite par la HTT-polyQ. Il a également été observé qu'un stress induit la phosphorylation de la protéine HTT. Afin de connaître *in vivo* le rôle physiologique des phosphorylations de la HTT, nous avons étudié les aspects comportementaux et neurogéniques de souris présentant des mutations ponctuelles de la HTT sur les sérines 1181 et 1201, visant à mimer une phosphorylation (*Hdh*^{S1181D/S1201D}) ou une ablation

constitutive de la phosphorylation ($Hdh^{S1181A/S1201A}$). Ces travaux sont relatés dans le troisième article, en cours de publication (*Article III*).



TRAVAIL EXPERIMENTAL

Matériel et méthodes

I. Animaux

A. Souris *Hdh*^{Q111}

Dans un premier temps, nous avons étudié le phénotype d'un modèle knock-in de la maladie de Huntington, les souris *Hdh*^{Q111}.

1. Génération de la lignée

Ces souris de fond génétique CD1 ont été générées par recombinaison homologue en insérant une expansion de 109 CAG dans l'exon 1 du gène murin homologue de la huntingtine *Hdh*, sur le chromosome 5 (Wheeler et al., 1999). La lignée de souris nous a été généreusement donnée par Marcy E. MacDonald, et est entretenue par croisement des animaux hétérozygotes *Hdh*^{Q111/+}. Les souriceaux issus des croisements sont génotypés, les animaux homozygotes (*Hdh*^{Q111/Q111}) et hétérozygotes (*Hdh*^{Q111/+}) utilisés pour l'étude des effets de la mutation polyQ de la huntingtine, et les animaux *Hdh*^{+/+} utilisés comme contrôles.

2. Génotypage des animaux

Le génotypage des souris mutantes a été réalisé grâce à la technique de « Polymerase Chain Reaction » (PCR) à partir de fragments de queues prélevés lors du marquage des animaux.

a) Extraction de l'ADN

Les queues sont digérées dans un tampon de lyse (EDTA 50 mM, Tris 100 mM, sarcosyl 1%, protéinase K 0,2 mg/ml) pendant 9 heures à 48°C. Les digestats sont ensuite centrifugés (15 minutes à 13000 tours/min), puis le surnageant récupéré dans un tube contenant de l'isopropanol qui permet la précipitation des pelotes d'ADN, qui vont sédimenter lors d'une seconde centrifugation. On récupère alors les culots d'ADN, qui sont resuspendus dans de l'éthanol. Après une dernière centrifugation, les culots sont remis en suspension dans de l'eau ultra-pure puis conservés à 4°C.

b) Amplification par Polymerase chain reaction

La PCR s'effectue dans le tampon décrit dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Tampon de PCR pour le génotypage des souris *Hdh*^{Q111}

Solution	Concentration finale
Tris pH8,8	67 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	16,6 mM
MgCl ₂	2 mM
β-mercaptoéthanol	70 μM
DMSO	10%
20x BSA	5%

Solution	Concentration finale
10mM dNTP	0,2 mM
Amorce up	2,5 μ M
Amorce down	2,5 μ M
ddH ₂ O	42%
Taq	50 U/ml

Selon l'allèle recherché (*Hdh* WT ou *Hdh*^{Q111}), on ajoute 3 ou 2 μ l d'ADN, et la PCR s'effectue comme suit :

1) Dénaturation : 94°C pendant 1 minute 30 secondes

Puis 34 cycles d'amplification dont les caractéristiques sont les suivantes (étapes 2 à 4) :

2) Dénaturation : 30 secondes à 94°,

3) Hybridation des amorces : 30 secondes à 56°C (WT) ou 65°C (mutant)

4) Élongation des fragments : 1 minute 30 secondes à 72°C.

5) Puis 10 minutes à 72°C

Les couples d'amorces PCR permettent de déterminer le caractère sauvage (couple 1-2) ou muté (couple 3-4) de la huntingtine (Tableau 14).

Tableau 14 : Descriptif des amorces utilisées en PCR pour le génotypage des souris *Hdh*^{Q111}

Numéro	Nom	Séquence (5'-3')	Taille (bases)
1	Hdh Up	CCT GGA AAA GCT GAT GAA GG	20
2	Hdh Down	TGG ACA GGG AAC AGT GTT GC	20
3	CAG1	ATG AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TTC	30
4	HU3	GGC GGC TGA GGA AGC TGA GGA	21

c) Electrophorèse

Les produits obtenus par la PCR sont séparés par migration électrophorétique en gel d'agarose à 2% (Sigma-Aldrich), immergés dans un tampon (Tris-Borate + BET). Les produits de PCR sont additionnés de 2 μ l de tampon de charge et déposés dans les puits du gel. Sous l'effet du champ électrique (100 V, 70 mA), les fragments d'ADN chargés négativement migrent vers la cathode et sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. L'incorporation de bromure d'éthidium (BET), fluorescent aux UV permet de visualiser les fragments, et ainsi de déterminer le génotype des animaux.

B. Souris *CaMKCre*^{ERT2}; *Hdh*^{lox/flox}

Nous avons utilisé un knock-out conditionnel de la HTT chez la souris adulte en utilisant un système inductible CreERT2/Lox activé par injection de tamoxifène. Le promoteur utilisé, celui de la CamKII α , cible l'expression de Cre^{ERT2} dans les neurones corticaux et hippocampaux matures dans la lignée transgénique utilisée (Erdmann et al., 2007).

1. Génération de la lignée

Les souris $\text{CaMKCre}^{\text{ERT2}}$, de fond génétique FVB/N, ont été obtenues à partir de l'EMMA (European Mutant Mouse Archive, voir <http://www.emmanet.org/index.php>). La génération de ces souris transgéniques est décrite dans Erdmann, Schütz, & Berger, 2007. Les souris $\text{CaMKCre}^{\text{ERT2}}$ ont été croisées avec des souris $\text{Hdh}^{\text{flox/flox}}$ C57BL/6J, les sites flox encadrant l'exon 1 et le promoteur de la huntingtine (Dragatsis et al., 2000). On obtient ainsi des animaux $\text{CaMKCre}^{\text{ERT2}}; \text{Hdh}^{\text{flox/+}}$ qui ont ensuite été croisés avec des souris $\text{Hdh}^{\text{flox/flox}}$ pour obtenir les animaux $\text{CaMKCre}^{\text{ERT2}}; \text{Hdh}^{\text{flox/flox}}$ et leurs frères/sœurs $\text{WT}; \text{Hdh}^{\text{flox/flox}}$ qui ont été utilisés comme contrôles.

2. Induction de l'extinction de la huntingtine

La préparation et l'injection de tamoxifène ont été réalisées comme décrit dans Erdmann et al., 2007. Brièvement, les souris âgées de 8 semaines ont reçu une injection par voie intra-péritonéale d'1 mg de tamoxifène, deux fois par jour pendant cinq jours consécutifs.

3. Vérification des sites d'expression de la recombinaison

Afin de vérifier que la recombinaison Cre est active uniquement dans les régions d'intérêt (*i.e.* cortex et hippocampe), les souris $\text{CaMKCre}^{\text{ERT2}}$ ont été croisées avec des souris ROSA26R de fond génétique C57BL/6.129/SvEv (Soriano, 1999). Les souris ROSA26R; $\text{CaMKCre}^{\text{ERT2}}$ âgées de 2 mois ont été injectées avec le tamoxifène, et leur cerveau fixé 6 mois plus tard. Une coloration X-gal a montré des résultats similaires à ceux obtenus par Erdmann et collaborateurs, notamment une forte activité du gène rapporteur β -galactosidase dans le cortex et l'hippocampe (Figure 17). Une coloration par immunofluorescence du gyrus dentelé de l'hippocampe a montré une expression de la β -galactosidase dans la majorité des neurones matures exprimant NeuN, mais pas dans les neurones immatures exprimant la DCX (Figure 17). Par conséquent, ces souris transgéniques peuvent être utilisées pour supprimer spécifiquement le gène floxé dans les neurones matures de l'hippocampe, sans affecter le génotype des nouveaux neurones.

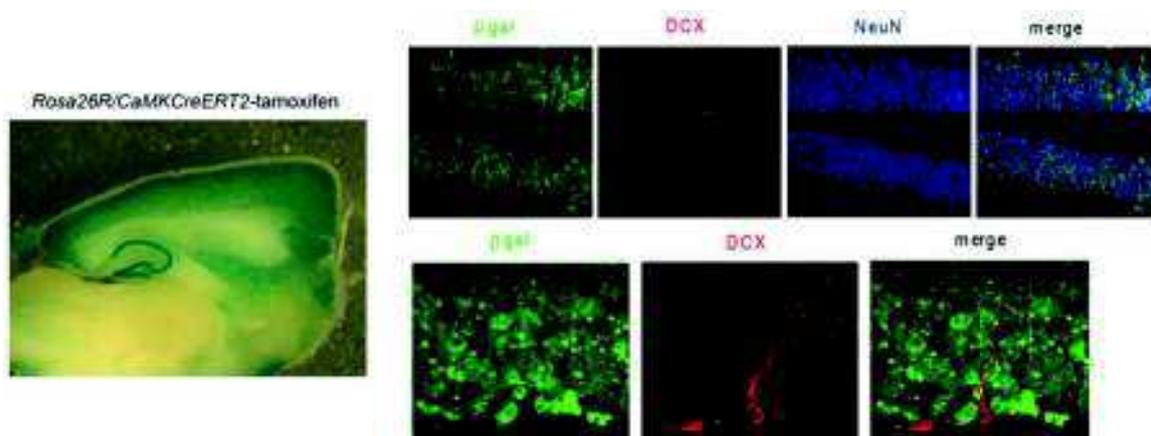


Figure 17 : Vérification de la localisation de l'expression de la recombinaison Cre

La coloration X-gal révèle l'expression du gène rapporteur β -galactosidase spécifiquement dans le cortex et l'hippocampe des animaux (*photo de gauche*). (*Panneau de droite*) Les cellules exprimant la β -galactosidase (en vert) expriment également NeuN (en bleu), mais pas DCX (en rouge).

C. Souris $Hdh^{S1181A/S1201A}$ et $Hdh^{S1181D/1201D}$

Afin d'étudier les effets de la phosphorylation de la huntingtine par Cdk5, deux lignées de souris ont été générées. La première exprime une forme constitutivement « déphosphorylée », et la seconde une forme constitutivement phosphorylée de la huntingtine aux sites d'interaction avec Cdk5 ciblés.

1. Génération des lignées

Nous avons utilisé la recombinaison homologue pour générer des souris knock-in de fond mixte 129S2/Sv.C57BL/6J dans lesquelles les sérines en position 1181 et 1201 du gène codant pour la HTT murine (*Hdh*) ont été remplacées par l'alanine ($Hdh^{S1181A/S1201A}$) ou l'acide aspartique ($Hdh^{S1181D/1201D}$) (Figure 18). Ces substitutions miment respectivement l'absence de phosphorylation ou la phosphorylation constitutive de la protéine HTT par Cdk5 sur ces sites (Anne et al., 2007). L'ADN génomique de souris knock-in homozygotes de chaque génotype a été séquencé pour confirmer le remplacement du triplet AGT par le codon GCT ($Hdh^{S1181A/S1201A}$) ou GAT ($Hdh^{S1181D/1201D}$) (Figure 18).

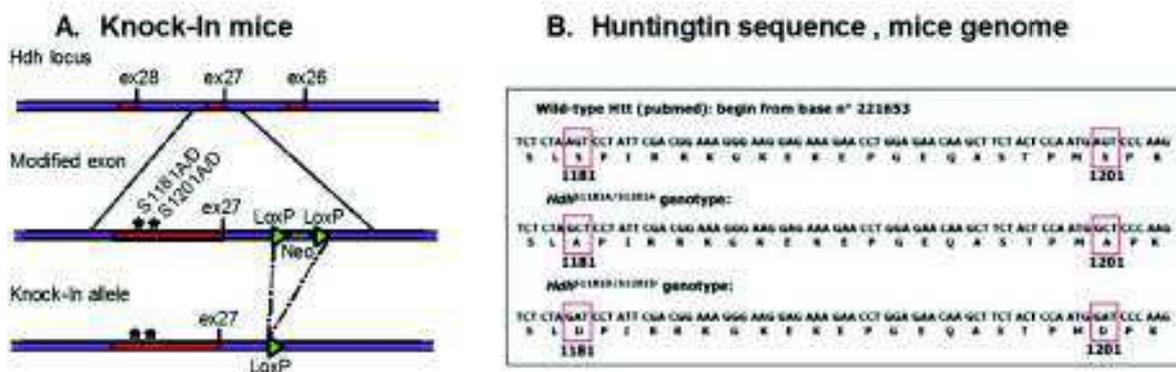


Figure 18 : Construction des lignées $Hdh^{S1181A/S1201A}$ et $Hdh^{S1181D/1201D}$

2. Génotypage des animaux mutants

L'ADN a été préparé comme décrit précédemment à partir de biopsies de queue de souris. Les régions mutées contenant les séquences LoxP ont été génotypées en utilisant les couples d'amorces décrites dans le Tableau 15 ci-dessous, avec, pour les souris $Hdh^{S1181A/S1201A}$, le couple 1-2, et pour les souris $Hdh^{S1181D/1201D}$, le couple 3-4. La PCR est réalisée dans le tampon Thermopol (Biolabs), avec 200 μ M de dNTP, 1 μ M de chaque amorce et 5U/ μ L de Taq polymérase (Biolabs).

Tableau 15 : Amorces utilisées pour le séquençage des animaux mutants.

Numéro	Séquence (5'-3')	Taille (bases)
1	GCA CCC AGA GAA CTC CTC CC	20
2	CCT TCT CTT AGA GGG GAC ATG GC	23
3	CTT GTT CTC CAG GTT CTT TCT CCT TCC	27
4	CAT ATT GGA GAG CAT GGG TCA CAT CTG G	28

La PCR est alors réalisée selon les cycles suivants :

- 3 min à 94°C
- 2 x (1 min à 94 ° C, 1 min à 62 ° C, 1 min à 72 ° C)
- 30 x (30 sec à 94 ° C, 30 sec à 62 ° C; 30 s à 72 ° C)
- Puis 3 min à 72 ° C.

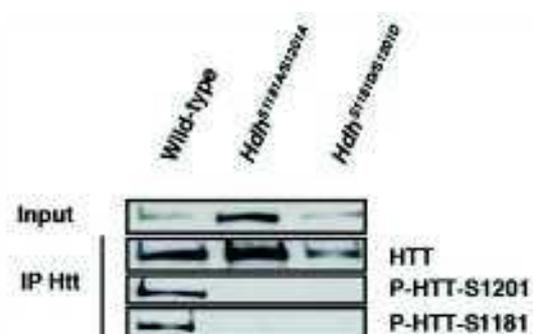
Les produits de PCR sont ensuite séparés sur un gel d'agarose 2% afin de distinguer la bande sauvage de la bande mutante.

3. Contrôle des niveaux de phosphorylation de la huntingtine

Les niveaux de phosphorylation de HTT aux sérines 1181 et 1201 ont été évalués sur des lysats de cortex d'animaux adultes de différents génotypes. Pour ce faire, une immunoprécipitation de la protéine HTT, suivie d'un immunoblot, ont été réalisés, en utilisant deux anticorps reconnaissant spécifiquement l'état de phosphorylation des sérines 1181 et 1201, c'est-à-dire se fixant aux résidus uniquement lorsqu'ils sont phosphorylés. La HTT sauvage est reconnue par les deux anticorps, démontrant que la protéine est phosphorylée à ces deux sites dans le cortex de souris adulte (Figure 19). En revanche, les anti-P-HTT-S1181 et anti-P-HTT-S1201 ne reconnaissent pas la huntingtine immunoprécipitée des extraits corticaux d'animaux *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/1201D}. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des extraits du striatum et l'hippocampe. Ces résultats démontrent que les sérines 1181 et 1201 sont phosphorylées dans le cerveau de souris adultes et modifiées chez les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/1201D}.

Figure 19 : Contrôle des niveaux de phosphorylation de la huntingtine

La HTT sauvage est phosphorylée sur les sérines S1181 et 1201 dans le cortex de souris adulte. En revanche, les anti-P-HTT-S1181 et anti-P-HTT-S1201 ne reconnaissent pas la huntingtine immunoprécipitée des extraits corticaux d'animaux *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/1201D}, mettant en évidence la modification des sites de phosphorylation.



II. Etudes comportementales chez la souris

A. Evaluation des capacités motrices

Test du rotarod

Ce test permet d'évaluer un déficit moteur (Hamm et al., 1994) en plaçant les animaux sur un cylindre en rotation (Figure 20). Pendant les 3 minutes que dure le test, on enregistre le nombre de fois que la souris tombe du cylindre. L'augmentation du nombre de chutes indique un déficit locomoteur ou une relaxation musculaire qui peut par exemple être due à l'administration de tétrazépam (Myolastan®).



Figure 20 : Test du rotarod chez la souris

B. Evaluation d'un comportement anxieux

1. Test d'open field

Le test de champ ouvert (ou open-field, OF) est l'un des plus utilisés en psychopharmacologie. Il est réalisé en plaçant l'animal dans une cage en plexiglas de grandes dimensions (40x40 cm, Figure 21) pendant 30 minutes. Les mouvements de l'animal sont mesurés par un système de suivi par des capteurs infrarouge (Activity Monitor, MED associates, Georgia, VT, USA). L'open-field est utilisé afin de prédire une activité de type anxiolytique. Pour cela, une aire virtuelle représentant un carré de 12,3 cm de côté est définie. Les animaux ont généralement tendance à éviter l'aire centrale, et passent beaucoup plus de temps à la périphérie. L'administration unique d'un anxiolytique, comme une benzodiazépine, ou chronique d'un antidépresseur, augmente le nombre d'entrées et le temps

passé dans cette aire centrale (Prut & Belzung, 2003). Au final, les variables mesurées dans l'open-field sont l'activité ambulatoire totale, le nombre d'entrées dans l'aire centrale, le temps passé dans le centre de l'arène. Ce test peut également être utilisé pour une mesure de l'activité locomotrice, ce qui nous intéresse dans le cadre de la pathologie de Huntington.

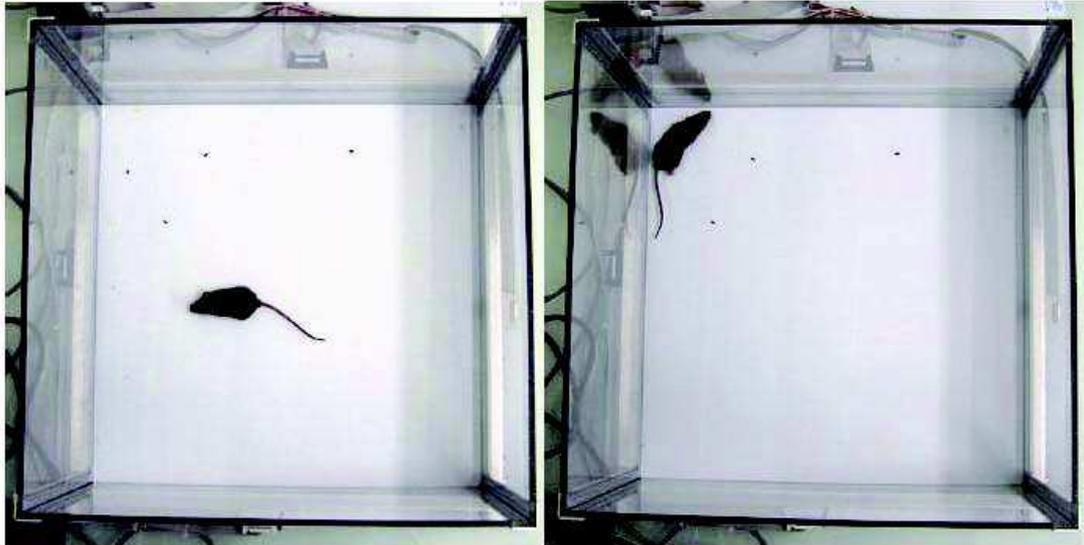


Figure 21 : Test de l'open-field chez la souris.

Une administration unique d'anxiolytique augmente le nombre d'entrées et le temps passé dans l'aire centrale de l'arène chez la souris (*photo de gauche*) tandis que les souris se déplacent classiquement sur les côtés de la cage (*photo de droite*).

2. Elevated plus maze (EPM)

Ce paradigme est un test de mesure d'un comportement de type anxieux, développé d'abord chez le rat (Pellow & File, 1986), puis chez la souris, qui repose sur l'aversion de ces animaux pour le vide. Le labyrinthe est composé de deux bras ouverts et de deux bras fermés reliés par une plateforme centrale, à 80 cm au-dessus du sol, et éclairés par une lampe de faible puissance (Figure 22). Les souris sont placées individuellement sur la plateforme centrale, face à un bras fermé et peuvent explorer librement l'ensemble du labyrinthe pendant 5 minutes. Une caméra placée au-dessus du dispositif et reliée à un logiciel de suivi (ANY-maze, Stoelting Co, IL, USA) permet l'enregistrement des déplacements. Afin de discriminer un effet anxiolytique d'un effet sédatif, le nombre total d'entrées dans les 4 bras est mesuré. Un phénotype anxieux se caractérise par une diminution du temps passé dans les bras ouverts par rapport au temps passé dans les bras fermés. Une administration aigüe de benzodiazépine augmente le temps passé dans les bras ouverts.

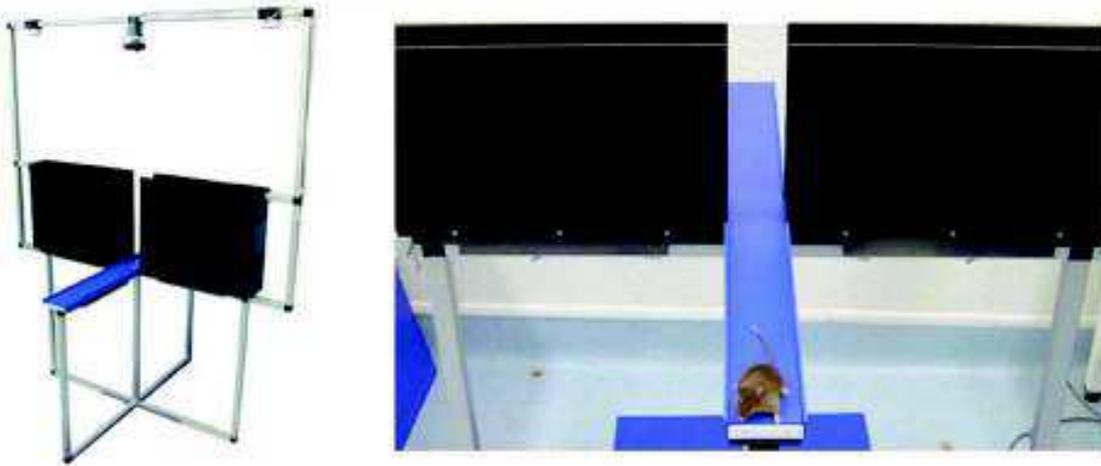


Figure 22 : Test du labyrinthe en croix surélevée chez la souris

Un traitement aigu par des anxiolytiques augmente le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts (*photo de droite*) et diminue le temps passé dans les bras fermés.

C. Evaluation d'un comportement mixte d'anxiété et de dépression

Test du novelty suppressed feeding (NSF)

Ce test représente une situation de motivations conflictuelles chez l'animal, entre celle dirigée vers la nourriture et la peur de s'aventurer au centre d'une enceinte inconnue et fortement éclairée. Ce test a montré son aptitude à mettre en évidence des changements dans le comportement des rongeurs comme le rat et la souris, après un traitement anxiolytique (traitement aigu) ou antidépresseur (traitement chronique) (Santarelli et al., 2003). L'animal à jeun depuis 24 heures est placé dans une cage rectangulaire de 1500 cm² (50x30x20 cm). Au centre de cette cage est disposé un cercle blanc éclairé sur lequel sont déposés 2 granulés de nourriture (Figure 23). L'animal est alors placé dans un coin du dispositif, puis un chronomètre est immédiatement lancé. Le délai avant que l'animal ne vienne mordre manifestement le granulé (croquer dans le granulé en utilisant ses pattes avant) est enregistré. Les animaux sont testés individuellement pendant une période de 10 minutes (David et al., 2009; Santarelli et al., 2003). On mesure le temps de latence mis par l'animal pour aller se nourrir. A la suite de ce test, l'animal est replacé dans sa cage et on mesure sa consommation de nourriture pour vérifier que les variations du temps de latence observées entre les groupes sont dues à un comportement de type anxieux et non à un appétit moindre.



Figure 23 : Test du Novelty Suppressed Feeding.

Un traitement chronique par antidépresseur diminue le temps de latence des animaux pour se nourrir. Le dispositif est constitué d'une enceinte dont le sol est recouvert de sciure, et dans le centre duquel de la nourriture est placée sur un disque blanc cartonné (*photo de gauche*). La latence de prise alimentaire est mesurée (*photo de droite*).

D. Evaluation d'un comportement dépressif

1. Splash test

Ce test est assimilé au caractère dépressif puisqu'il met en œuvre la capacité de toilettage chez le rongeur. Au moment du test, on vaporise une fois et de façon modérée une solution de saccharose à 10% sur le pelage de l'animal. Cette solution est non seulement collante, mais également appétante, ce qui doit initier un toilettage chez le rongeur. L'animal est alors introduit dans sa cage initiale sans nourriture ni eau pour la durée du test, et un chronomètre est lancé simultanément. Plusieurs paramètres sont mesurés : la latence à initier un toilettage (qui doit durer plus de deux secondes et comprend une action des pattes avant sur la face, ou un léchage du pelage ventral ou dorsal), le temps total ainsi que la fréquence des toilettages sur une période de 5 minutes.

2. Test de nage forcée

Le test de la nage forcée (ou Forced swim test, FST) a été établi par Porsolt en 1977 (Porsolt et al., 1977), c'est un test prédictif de l'activité des antidépresseurs reconnu et fiable (Petit-Demouliere et al., 2005). Il consiste à placer une souris dans un bocal de 19 cm de diamètre et de 25 cm de profondeur rempli d'eau (Figure 24). Une caméra placée au-dessus des béciers permet l'enregistrement du comportement de l'animal durant les 6 minutes du test. Un capteur situé sur le côté de chacun des béciers enregistre également les vibrations entraînées par le mouvement de l'animal. Une calibration faite par l'expérimentateur, qui chronomètre les différents comportements présentés par l'animal, permet ensuite au logiciel X'PERT FST (Bioseb, Vitrolles, France) de corréliser ces informations vidéo à celles obtenues grâce au capteur. L'appareil effectue ensuite une analyse automatique des enregistrements. Après une période de tentatives d'échappement, l'animal s'immobilise et adopte un comportement dit « de désespoir ». Les paramètres mesurés sont le

temps d'immobilité des animaux, ainsi que les temps passés à nager ou à escalader la paroi du récipient. Les souris sous traitement antidépresseur (administré 30 min avant le test) ont classiquement un temps d'immobilité réduit en comparaison des souris non traitées. Dans le FST chez la souris, il existe une très bonne corrélation entre l'activité « antidépressive-like » prédite pour une molécule et son effet avéré en clinique puisque 94% des molécules qui induisent une baisse du temps d'immobilité dans le test se révèlent être de futurs antidépresseurs (Thiébot et al., 1992).

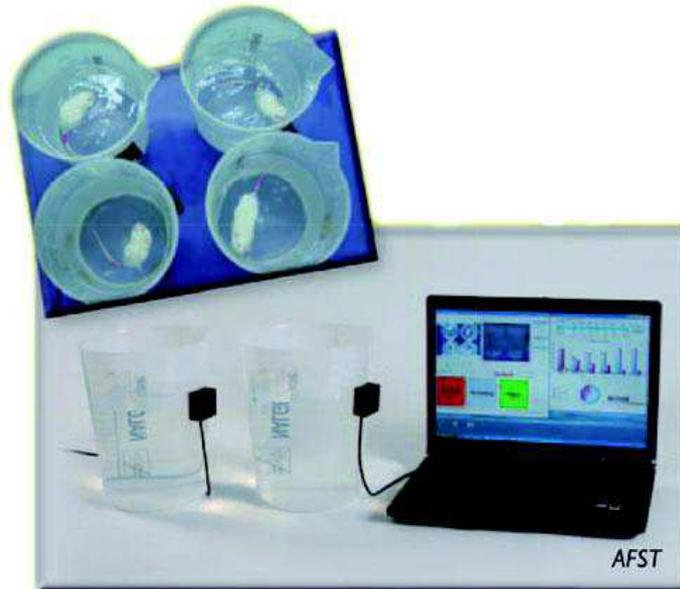


Figure 24 : Dispositif d'enregistrement du test de la nage forcée chez la souris

Logiciel X'PERT FST, Bioseb

III. Etude de la neurogenèse hippocampique chez la souris adulte

A. Préparation des tissus

1. Perfusion intracardiaque

La souris est anesthésiée à l'aide d'un mélange kétamine/xylazine (120 mg/kg et 10 mg/kg, respectivement). On contrôle l'anesthésie en effectuant une pression sur la patte arrière de l'animal, l'absence de réaction permettant d'entreprendre la chirurgie. L'animal est fixé sur le dos sur une planche de liège. Une incision au niveau médian de l'abdomen permet d'introduire les ciseaux de chirurgie et de remonter jusqu'au diaphragme par les flancs de l'animal. Le diaphragme sectionné laisse entrevoir le cœur. La peau et les côtes qui recouvraient la cavité thoracique sont rabattues en arrière puis fixées, permettant un accès dégagé au cœur. Il est primordial d'opérer rapidement pour conserver la propriété pulsatile du cœur, les battements cardiaques permettant de rincer et de fixer les tissus cérébraux. Ceci est nécessaire pour s'affranchir des cellules sanguines pouvant interférer avec le marquage. Une incision est pratiquée dans l'oreillette droite pour permettre au cœur d'évacuer le sang du corps de l'animal. Un cathéter relié à une pompe péristaltique (0,4-85 ml/min, W40578, Fischer Scientific SAS, Illkirch, France) est alors inséré dans le ventricule cardiaque gauche, dans lequel sera perfusée en premier lieu une solution de 0.9% NaCl conservée dans la glace, suivie d'une solution de paraformaldéhyde 4% dans 0,2M de solution de Sørensen. Cette solution va permettre de fixer les tissus et de stopper toute activité cellulaire. Le cerveau est ensuite prélevé et conservé une journée dans une solution de paraformaldéhyde 4% à 4°C. Il sera ensuite placé dans une solution de tampon phosphate (PBS) et de 30% de sucrose, ce qui permettra de protéger les tissus en vue de leur congélation. Les cerveaux sont ensuite inclus dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature, Tissue-Tek) et conservés à -80°C.

2. Préparation des cerveaux

Les cerveaux sont ensuite coupés en sections de 35 μm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (Leica CM 3000). Après l'identification du début de l'hippocampe, l'intégralité des sections de l'hippocampe sont collectées. On obtient ainsi 6 séries de 13 coupes, qui sont conservées dans une solution de PBS additionnée de 0,1% d'azide de sodium qui préservera les tissus d'une éventuelle dégradation par les bactéries ou champignons. On place dans chaque puits 1 coupe sur 6 ce qui permet d'obtenir 6 « cerveaux partiels » dont chaque section est espacée de la suivante par 210 μm . Cette méthode permet d'économiser le nombre d'animaux en utilisant différents marqueurs immunohistochimiques pour le même cerveau.

B. Prolifération et survie des cellules progénitrices

1. Etude de l'expression du Ki-67

Une des manières d'étudier la prolifération cellulaire dans l'hippocampe de la souris adulte est d'évaluer l'expression de la protéine nucléaire Ki-67. Les coupes flottantes sont rincées avec du tampon tri-phosphate (TBS), puis transférées dans une solution de formamide et de SSC 2X (0,3M NaCl et 0,3M citrate de sodium, pH7) à 65°C. Après un nouveau lavage dans le SSC 2X, les coupes sont incubées dans de l'acide chlorhydrique (2N, 37°C), puis transférées dans de l'acide borique à 0,1M. Les sites non-spécifiques sont ensuite bloqués dans du TBS additionné de 5% de sérum de chèvre (normal goat serum, NDS) et 0,1% de Triton X-100. Les anticorps primaires anti-Ki-67 et anti-NeuN sont ensuite ajoutés sur la nuit dans le tampon de blocage, et les anticorps secondaires appropriés (Alexa555 anti-lapin et Cy5 anti-souris, respectivement) sont ajoutés. La liste et le descriptif des anticorps utilisés pour les différents protocoles d'immunohistochimie sont indiqués dans le Tableau 19.

2. Etude de l'incorporation du BrdU

Une seconde étude de la prolifération cellulaire nécessite une injection de 5-bromo-2-déoxyuridine (BrdU) à l'animal 2 heures avant son sacrifice (150 mg/kg). L'étude de la survie cellulaire diffère de la prolifération dans le sens où le BrdU est administré 2 fois par jour pendant 3 jours, 3 ou 6 semaines avant le sacrifice de l'animal. Le BrdU est un analogue synthétique de la thymidine. Au moment de la réplication de l'ADN (pendant la phase S du cycle cellulaire) le BrdU s'incorpore au nouveau brin et permet de marquer ainsi les cellules nouvellement formées. Les anticorps spécifiques anti-BrdU permettent de révéler ces jeunes cellules en suivant le protocole suivant. Les sections de cerveaux sont montées sur lames (super Frost plus, Fischer Scientific SAS, Illkirch, France), puis placées pendant 5 minutes dans une solution d'acide citrique (pH 6.0) à 96°C. Après des rinçages successifs avec du PBS, les tissus sont traités avec de la trypsine (0.01%) dissoute dans du Tris/CaCl₂ pendant 10 minutes. Suite à une nouvelle série de rinçages, du HCl 2N est déposé sur les lames pendant 30 minutes. Le blocage des sites non spécifiques est effectué à l'aide d'une préparation de 5% de sérum de chèvre (normal goat sérum, NGS) dans du PBS. Pendant la nuit, on dépose sur les lames la solution d'anticorps anti-BrdU de souris. Après une série de rinçages, les lames sont recouvertes d'une solution d'anticorps secondaire biotinylé pendant une heure, suivie d'une amplification par le complexe avidine/biotine. Le marquage est visualisé par la 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (SK-4100 DAB kit, Vector, USA) puis les tissus plongés dans des bains successifs permettant le contremarquage nucléaire par le FAST-RED (Vector Nuclear Fast Red H-3403, ABCYS, Paris, France) pendant 2 min puis un rinçage à l'eau (1min) ainsi qu'une déshydratation progressive (dans de l'éthanol 70% puis 100% pendant 5 et 10 minutes, respectivement). Les lames sont recouvertes par une lamelle sous laquelle

on dépose un milieu de montage qui permet de fixer définitivement les tissus. La quantification des cellules marquées se fait comme précédemment décrite par Malberg et collaborateurs (Malberg et al., 2000) à l'aide d'un microscope (Olympus BX51 microscope, Allemagne) au grossissement 40X.

C. Etude de la maturation neuronale

L'étude de la maturation neuronale utilise l'expression d'un marqueur endogène des neurones immatures, la doublecortine (DCX), qui permet de révéler les neurones nouvellement formés dans la couche granulaire de l'hippocampe (Couillard-Despres et al., 2005). La procédure suit celle décrite par Wang et collaborateurs (Wang et al., 2008). Les sections de cerveaux sont rincées avec du tampon tri-phosphate (TBS), puis traitées dans une solution de H₂O₂ 1% pendant 15 minutes. Les tissus sont incubés dans une préparation à 10% de sérum d'âne avec 0.3% de Triton X-100 pendant 30 minutes. Les tissus sont maintenus toute la nuit avec l'anticorps primaire dirigé contre la doublecortine. Les coupes sont ensuite incubées dans l'anticorps secondaire biotinylé pendant 2 heures à température ambiante. Le marquage est amplifié par le complexe avidine/biotine (Vector USA), puis visualisé par l'utilisation de DAB. Une fois la révélation effectuée, les coupes de cerveau sont montées entre lame et lamelle. Les cellules marquées par l'anticorps anti-doublecortine (DCX+) sont comptées et catégorisées selon leur morphologie dendritique : neurone DCX+ avec arborisation tertiaire, quinaire, et celles avec une arborisation moins complexe. L'index de maturation est défini comme étant le ratio entre les cellules avec arborisation complexe sur le total des cellules DCX+.

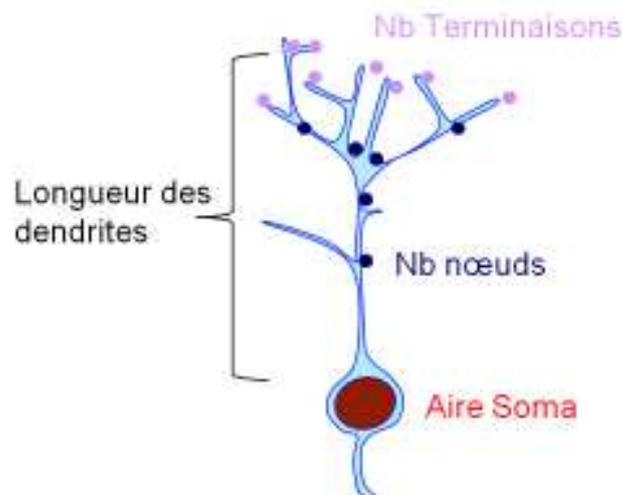


Figure 25 : Evaluation du degré de maturation neuronale

Le degré de maturation neuronale peut être déterminé selon différents critères. La longueur des dendrites donne une première indication, mais c'est surtout la complexité de l'arborisation qui reflète le degré de maturation des neurones. Ainsi, on peut mesurer le nombre de nœuds, c'est-à-dire le nombre de ramifications. On peut aussi compter le nombre de ramifications sur une seule branche (la plus complexe) de l'arborisation. On a procédé de cette manière pour évaluer la dendritogenèse. Une dernière façon de faire consiste à compter le nombre de terminaisons de l'arbre dendritique. On peut aussi faire une analyse de Sholl (voir ci-dessous).

Nous avons également effectué une analyse de Sholl pour une étude complémentaire de la dendritogenèse. Cette analyse est réalisée sur 12 neurones positifs pour la DCX et choisis aléatoirement. Les neurones sélectionnés doivent présenter au minimum des dendrites de second ordre (c'est-à-dire au minimum une ramification). A l'aide du logiciel NeuroLucida, on trace l'arborisation dendritique des neurones choisis dans sa totalité. Le logiciel effectue ensuite une série de mesures afin de déterminer la longueur des dendrites, et le degré de leur arborisation. L'analyse de Sholl consiste à tracer des cercles concentriques virtuels à partir du soma (Figure 26), et à compter le nombre d'intersections entre les dendrites et chaque cercle, cette mesure donnant une idée de la complexité de l'arborisation dendritique des neurones.

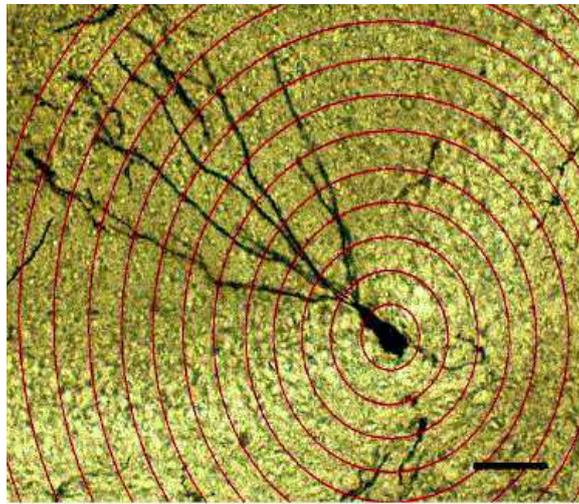


Figure 26 : Analyse de Sholl pour l'évaluation de la complexité de l'arborisation dendritique

Pour chaque cercle, on compte le nombre d'intersections avec des dendrites.

IV. Etude de l'expression, du transport, et de la fonctionnalité de BDNF

A. Etude de l'expression de BDNF

1. Dosage des transcrits de BDNF par PCR quantitative en temps réel

a) *Transcription inverse*

L'ARN total est isolé de l'hippocampe d'animaux, en utilisant les mini kits *miRNeasy* (Qiagen). 1 µg d'ARN total est dénaturé 5 min à 65°C, en présence d'Anchored-Oligo(dT)18 (2,5 µM) dans un volume de 13 µl. Puis, le premier brin complémentaire (ADNc) des ARNm est synthétisé à l'aide du kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche®, USA) en présence de RNaseOUT (20 U) et de dNTP (1 mM) pendant 60 min à 50°C, dans un volume réactionnel total de 20 µl. Une réaction de contrôle négatif « RT₀ » est réalisée en parallèle sans transcriptase inverse, afin de vérifier par qPCR l'absence d'ADN génomique contaminant.

b) *PCR quantitative en temps réel*

La position des introns dans les gènes d'intérêt a été recherchée avec l'outil d'alignement *BLAT* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel *Primer 3 Plus* et synthétisées à façon par Operon (Paris, France). La polymérase chain reaction (PCR) est réalisée par une dilution au 1/20ème dans l'eau avec le réactif *SSOFast™ EvaGreen® SuperMix* (Bio-Rad, USA) dans un volume de 10 µl.

Chaque cycle de PCR commence par une étape de dénaturation de l'ADN (95°C). Puis, les amorces sont appariées à une température dépendant de la température de fusion (T_m) des amorces (ici 60°C). Finalement l'étape de polymérisation a lieu à 72°C. Au cours de la PCR, l'accumulation du produit amplifié est mesurée en temps réel grâce à un intercalant (SYBR®Green I) qui se lie à l'ADN double brin en émettant une fluorescence mesurée à 530 nm après excitation à 488 nm (Figure 27).

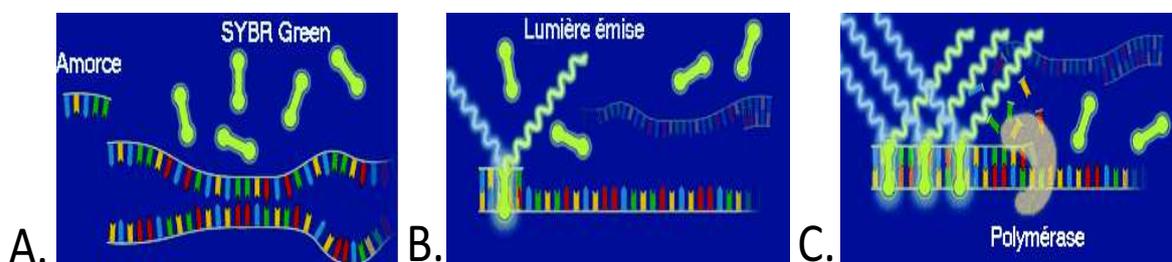


Figure 27 : Principe de la PCR quantitative en temps réel

A, lors de la dénaturation, le SYBR Green est libre en solution et très peu fluorescent. B, à la température d'hybridation, les amorces se lient à l'ADN et le colorant commence à se fixer au double brin. C, la polymérisation fait augmenter la quantité d'ADN et donc le niveau de fluorescence.

Au cours des premiers cycles de PCR la quantité de produit amplifiée est trop faible pour être détectable. La courbe d'accumulation du produit, d'allure exponentielle, apparaît puis atteint un plateau du fait de l'épuisement des substrats et de l'inactivation de l'enzyme. Plus le transcrite est exprimé de façon importante, plus le nombre de cycles nécessaires pour faire apparaître un signal est faible. Ce cycle-seuil ou « cycle threshold » (Ct) est le paramètre utilisé pour la quantification.

Enfin, la quantification relative est faite sur l'ensemble des échantillons dilués par le calcul du $\Delta\Delta C_t$ selon l'équation suivante (où R est le rapport d'abondance normalisé, et le calibre, la condition biologique témoin).

Les résultats de la quantification des ARNm des gènes d'intérêt (« cible ») sont normalisés par rapport à l'abondance des ARNm de gènes d'expression invariante (« ref »), ici la β -actine, GAPDH, et la cyclophiline G.

Tableau 16 : Amorces utilisées pour la qPCR

Cible	Référence	Taille du produit	Séquence forward	Séquence reverse
BDNF-IX	NM_001048139.1	98	CGTTCCTTTCGAGTTAGCC	ATTGGTAAACGGCACAAA
BDNF-IV	EF125673.1	147	AGCTGCCTTGATGTTACTTT	TCCGTGGACGTTTACTTCTT
β-actine	NM_007393	139	GATCTGGCACCACCTTCT	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA
GAPDH	NM_0008084	125	GTGGACCTCATGGCCTACAT	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG
Cyclophiline G	NM_001081086	104	AACTCCAGCCTGCTTCATA	CTGGATCTGGAAGGAGTTCG

2. Dosage des concentrations de BDNF protéique

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, puis on récupère la région cérébrale d'intérêt, ici l'hippocampe. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C . Par la suite, toutes les manipulations se feront dans la glace pour limiter la dégradation des protéines.

a) Extraction des protéines

L'extraction des protéines est faite selon le protocole établi par Szapacs et collaborateurs (Szapacs et al., 2004), et permet de garder en solution les protéines contenues dans les structures cérébrales disséquées et d'éliminer les autres composants (membranes plasmiques, organelles, etc.). Pour cela, un tampon d'extraction est nécessaire, dont la composition est donnée dans le tableau suivant.

Tableau 17 : Composition du tampon d'extraction de protéines pour l'ELISA

	Concentration finale	Fonction
PIPES pH=7	100mM	Tampon
NaCl	500mM	Stringence
Triton X-100	0,2%	Détergent non dénaturant
NaN ₃	0,1%	Biocide
BSA	2%	Protection des protéines
EDTA Na ₂ H ₂ O	2mM	Chélateur des ions calcium
PMSF	200μM	Inhibiteurs de protéases
Leupeptine	10μM	
Aprotinine	0,3μM	
Pepstatine	1μM	

Les échantillons sont pesés puis placés dans 2mL de ce tampon de lyse, les inhibiteurs de protéases étant ajoutés juste avant usage. Les échantillons subissent alors une sonication de 15 pulses de 1 seconde, puis on rajoute 2mL de tampon de lyse avant de soniquer à nouveau. Les échantillons restent 15 minutes sur glace avant d'en centrifuger 2mL pendant 30 minutes à 16000g à 4°C. Le surnageant est ensuite conservé à -80°C.

b) ELISA BDNF

Pour l'ELISA, le kit BDNF Emax® ImmunoAssay System (Promega, France) est utilisé (Figure 28). Tout d'abord on coate une plaque 96 puits avec l'anticorps anti-BDNF issu de souris au 1:1000 dans le tampon « carbonate coating buffer » (0.025M sodium bicarbonate, 0.025M sodium carbonate, pH 9.7), puis on dépose 100μL d'échantillon par puits avant d'incuber à 4°C pendant la nuit. Ensuite les sites non spécifiques sont bloqués avec le tampon Block & Sample pendant 1h, à température ambiante. Puis les standards pour la courbe de calibration sont préparés : dilution au 1:2000 du standard (1μg/ml) dans le tampon Block & Sample puis dilution en cascade 1:2 pour les puits suivants. Le dépôt des échantillons se fait en triplicata, et l'incubation pendant 2h sous agitation (400 rpm). Suit l'hybridation avec l'anticorps anti-BDNF humain (1:500 dans Block & Sample) pendant 2h sous agitation, puis avec l'anticorps secondaire anti-Ig Y couplé à la HRP (1:200 dans Block & Sample Buffer) pendant une heure sous agitation. Pour la réaction colorée, on ajoute une solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) dans les puits, qu'on met sous agitation environ 10 minutes jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue. La réaction est alors stoppée par le dépôt de 100 μl d'acide chlorhydrique 1N : la coloration devient jaune. On utilise un lecteur de plaques pour mesurer l'absorbance à 450nm, avant de calculer les concentrations de BDNF dans chaque échantillon en se basant sur la courbe des standards.

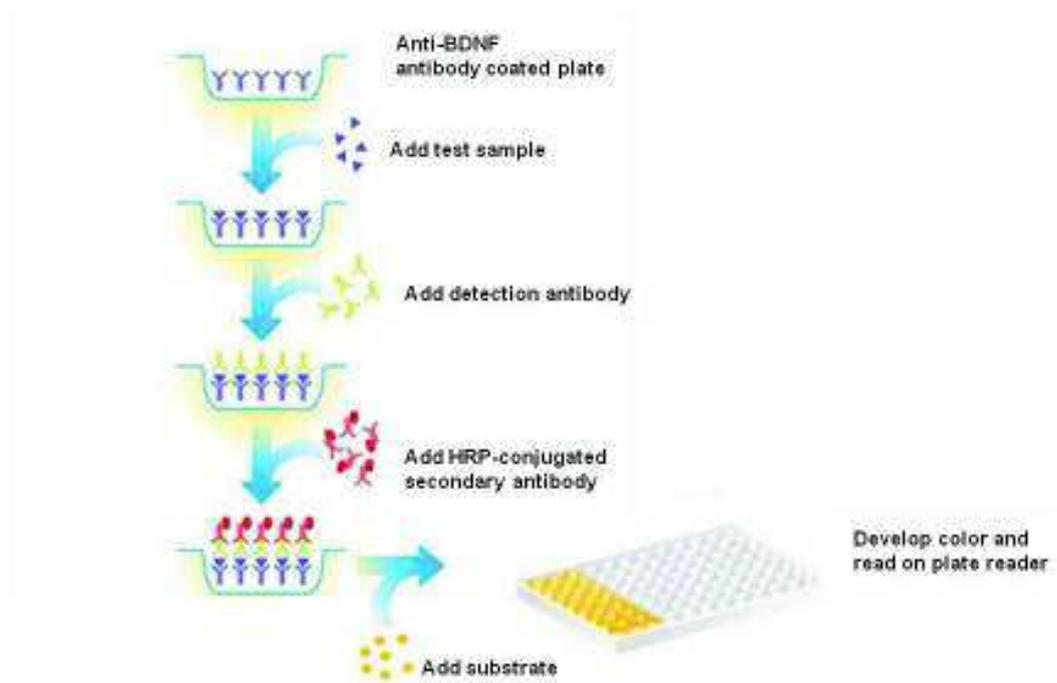


Figure 28 : Méthode de mesure des concentrations protéiques de BDNF par ELISA

B. Etude du transport et de la libération du BDNF

1. Etude du transport de BDNF

Pour analyser le trafic vésiculaire du BDNF, des neurones primaires d'hippocampe de rat (E17) sont préparés comme décrit précédemment dans (Gauthier et al., 2004). Cinq millions de neurones sont ensuite soumis à une électroporation avec le Kit *Amaxa Nucleofactor* pour neurones de rats (Lonza) avec 1 µg de BDNF-Cherry et 2 µg de l'une des constructions décrites dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Constructions employées dans l'étude du transport du BDNF

Construction	Nom	Séquence/Construction	Fournisseur	Référence
ARN	ARN siHtt	GGAACUCUCAGCCACCAAGTT	Eurogentec	Zala et al., 2008
	ARN scHtt	AUCGAGCUACCACGAACGCTT	Eurogentec	Zala et al., 2008
Plasmide	ShHtt	SIN-PGK-GFP-WHV-LTR-TRE-siHtt6	Don de N. Déglon	Drouet et al., 2009
	ShLuc	SIN-PGK-GFP-WHV-LTR-H1-siLuc	Don de N. Déglon	Drouet et al., 2009

Les neurones sont alors déposés sur des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine (1 mg/mL) dans du Neurobasal additionné de 2% de B27, 2 mM de Glutamax, 1% de pénicilline/streptomycine, 10 µM de forskoline et 100 µM de IBMX. Les expériences de vidéomicroscopie sont réalisées 3 jours après la transfection : les lamelles de verre avec les neurones sont montées dans une chambre Ludin tandis que le microscope et la chambre sont maintenus à 37°C. L'acquisition des images se fait à l'aide d'un objectif à immersion à huile 100X Planapo NA 1,4 sur un microscope Leica DM Irbe, toutes les 200 millisecondes avec un temps d'exposition de 150 millisecondes. La caméra employée est une

Micromax (Ropper scientifique, Trenton, NJ, USA), contrôlée par le logiciel Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Les vidéos, kymographes et analyses sont générés avec le logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, NIH, USA) et le plug-in KymoToolbox (Zala 2012).

Une fois les vidéos recueillies, on superpose les images obtenues dans le temps afin de visualiser la trajectoire des vésicules de BDNF-Cherry. Dans le logiciel ImageJ, on dessine alors la trajectoire de chacune des vésicules observées (Figure 29).

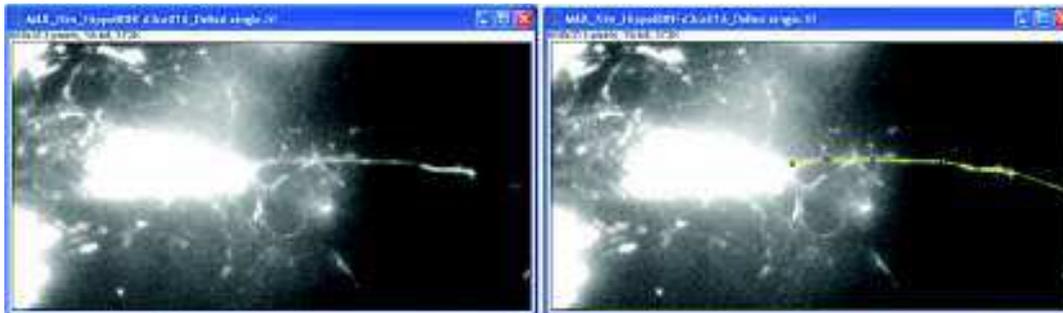


Figure 29 : Trajectoire des vésicules contenant le BDNF-Cherry

Image obtenue après superposition des images composant le film (*photo de gauche*). Tracé en jaune de la trajectoire d'une vésicule, le long de l'axone (*photo de droite*).

Ces données sont ensuite converties en kymographe, qui représente le déplacement de la vésicule en fonction du temps (Figure 30). La distance parcourue est indiquée selon l'axe des abscisses, et le temps en ordonnées. Ainsi, on peut visualiser les vésicules ayant une trajectoire antérograde lorsque la pente est positive, rétrograde, lorsque la pente est négative. Les vésicules immobiles ont, sur le kymographe, un tracé vertical. Une nouvelle fois, on trace les différentes trajectoires, et l'outil d'analyses du KymoToolbox nous permet d'obtenir la vitesse de chacune des vésicules, la distance parcourue, ainsi que le temps de pause.

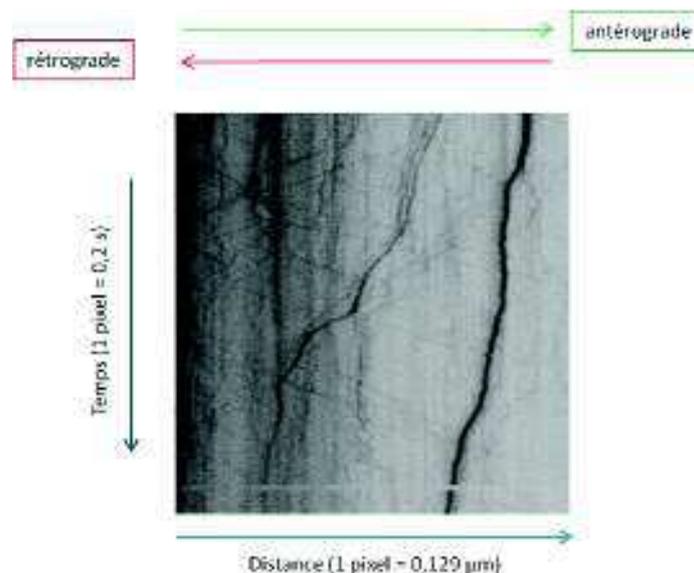


Figure 30 : Kymographe pour l'analyse de la vitesse de migration des vésicules de BDNF

2. Etude de la libération de BDNF

L'analyse de la libération transport-dépendante de BDNF a été réalisée comme décrit dans Zala et al., 2008. Les neurones de l'hippocampe sont soumis à une électroporation avec une construction exprimant une séquence non « taggée » du BDNF humain. Trois jours plus tard, les neurones sont dépolarisés (traitement pendant 20 min avec les milieux de culture neuronaux contenant 28 mM de KCl, 30 mM de CaCl₂, 30 mM de NaCl), ce qui induit l'exocytose des vésicules, dont celles contenant le BDNF. Le surnageant est récupéré (fraction K1). Les neurones sont ensuite lavés et incubés 30 min dans un milieu de culture neuronal normal et à nouveau dépolarisés. Cela entraîne la libération du stock de vésicules formé pendant les 30 minutes précédentes. Le surnageant K2 est prélevé, et le lysat protéique des cellules extrait pour évaluer l'expression générale de BDNF. Les niveaux de BDNF sont mesurés par ELISA sandwich anti-BDNF selon le protocole décrit plus haut. La libération transport-dépendante de BDNF est évaluée comme étant le rapport de K2/K1.

C. Etude des voies de signalisation activées par le BDNF

Afin de vérifier que le BDNF libéré était bien biologiquement actif, c'est-à-dire qu'il se fixe sur son récepteur TrkB et induit l'activation d'une cascade de signalisation, nous avons ensuite étudié la phosphorylation de plusieurs intermédiaires de la voie TrkB. Les protéines Akt, Erk et CREB sont phosphorylées dans cette voie de signalisation, nous avons donc mesuré pour chaque protéine le rapport phospho-protéine/protéine totale.

1. Extraction des protéines

Les souris sont tuées par dislocation cervicale, les hippocampes sont rapidement disséqués et les protéines sont extraites dans un tampon de lyse composé de 20 mM de Tris-HCl pH7,6, 137 mM NaCl, 1% de NP-40, 10% de glycérol, et 1% de cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (Sigma). Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à 10.000 g pendant 10 min à 4°C.

2. Dosage par Western Blot

L'électrophorèse est réalisée dans un gel de polyacrylamide additionné de 8% de SDS, puis les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Whatman). Après le blocage des sites non spécifiques dans 10 mM Tris-HCl pH7,6, 200 mM NaCl, 0,1% Tween-20 et 5% BSA, les membranes sont incubées avec des anticorps pour détecter les quantités totales des protéines Erk et Akt ou CREB, et leurs formes phosphorylées : anticorps anti-phospho Erk, anti-Erk, anti-phospho-Akt, anti-Akt, anti-phospho-CREB et anti-CREB. Les anticorps primaires sont détectés grâce aux anticorps secondaires appropriés couplés à la HRP, et le signal ECL (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent*

Substrate, Pierce, Erembodegem, Belgique) est quantifié par analyse d'image en utilisant le logiciel ImageJ.

Tableau 19 : Récapitulatif des anticorps utilisés en immunohistochimie et Western blot

	Source	Dilution	Référence	Fournisseur	IHC	IP	WB
<i>Anticorps primaire</i>							
BDNF	Polyclonal lapin	1/1000	SC-546	Santa Cruz			x
BrdU	Souris	1/100	558599	Becton Dickinson	x		
	Monoclonal rat	1/100	AbC117-561	Abcys	x		
DCX	Polyclonal chèvre	1/500	SC-8066	Santa Cruz	x		
Ki67	Monoclonal lapin		VP-RM04	Vector	x		
NeuN	Monoclonal souris	1/500	MAB377	Millipore	x		
Akt	Polyclonal lapin	1/1000	9272	Cell Signaling			x
Phospho Akt	Monoclonal lapin	1/1000	4058	Cell Signaling			x
CREB	Monoclonal lapin	1/1000	9197	Cell Signaling			x
Phospho CREB	Monoclonal lapin	1/1000	9198	Cell Signaling			x
Erk	Polyclonal lapin	1/1000	9102	Cell Signaling			x
Phospho Erk	Polyclonal lapin	1/1000	9101	Cell Signaling			x
Huntingtine*	Monoclonal lapin		HU-4C8-As	Euromedex		x	x
	Monoclonal lapin		D7F7	Cell Signaling		x	x
P-HTT-S1181**	Polyclonal lapin	1/500	-	-			x
P-HTT-S1201**	Polyclonal lapin	1/500	-	-			x
<i>Anticorps secondaire</i>							
Biotine	Chèvre anti-souris	1/200	BA-9200	Vector Lab	x		
	Ane anti-chèvre	1/500	705-065-003	Jackson	x		
	Ane anti rat	1/100	AP189B	Millipore	x		
Cy3	Ane anti-chèvre	1/200	705-165-147	Jackson	x		
Cy5	Ane anti-souris	1/200	715-175-150	Jackson	x		
A-555	Chèvre anti-lapin	1/200	A-21429	Invitrogen	x		
A-647	Poulet anti-souris	1/200	A-21463	Invitrogen	x		
HRP	Chèvre anti-lapin	1/10000	111-035-003	Jackson			x

IHC : Immunohistochimie, IP : immunoprécipitation, WB : Western blot

* Les anticorps dirigés contre la huntingtine sont utilisés aux concentrations de 1/50 pour l'immunoprécipitation, et respectivement de 1/1000 et 1/5000 pour le D7F7 et le HU-4C8-As en western blot.

** Anticorps purifiés au laboratoire à partir de prélèvements sanguins de lapin (voir Anne et al. 2007).

Résultats expérimentaux

Article 1 :

Phénotype anxieux et altération de la maturation neuronale spécifiques des mâles dans un modèle knock-in de la maladie de Huntington

Article 2 :

La délétion de la huntingtine dans les neurones matures de l'hippocampe et du cortex entraîne des modifications du comportement lié à l'anxiété et des déficits dans la neurogenèse hippocampique

Article 3 :

La huntingtine régule les comportements d'anxiété/dépression via le transport du BDNF et la neurogenèse hippocampique adulte.

[Article 1](#)

Phénotype anxieux et altération de la maturation neuronale spécifiques des mâles dans un modèle knock-in de la maladie de Huntington

Sophie Orvoën, Patrick Pla, Alain M. Gardier, Frédéric Saudou, Denis J. David

Neuroscience Letters 507 (2012) 127– 132

[Présentation de l'étude](#)

Les manifestations psychiatriques sont une des composantes majeures des symptômes précoces de la maladie de Huntington, bien avant l'apparition de troubles moteurs. Ainsi, des symptômes dépressifs associés à de l'anxiété généralisée sont communément observés au cours des stades pré-symptomatiques précoces de la maladie. On connaît mal à l'heure actuelle les raisons de cette prévalence élevée.

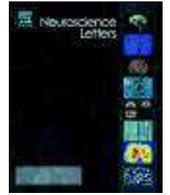
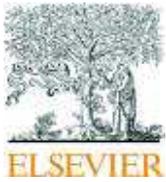
Le gène responsable du développement de la maladie code une protéine appelée huntingtine (HTT), dont la séquence contient une extension de polyglutamines (polyQ). Lorsque cette expansion excède 36 glutamines, la protéine synthétisée conduit au développement de HD. La huntingtine est impliquée dans diverses fonctions cellulaires et notamment dans le transport et l'expression d'un facteur neurotrophique, le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). HD et troubles anxio-dépressifs ont ainsi en commun une dérégulation des concentrations cérébrales, voire plasmatiques de BDNF. Par ailleurs, ce facteur neurotrophique est aussi impliqué dans la réponse à un traitement antidépresseur chronique et dans le phénomène de neurogenèse dans l'hippocampe chez l'adulte. Nous avons voulu étudier ces aspects dans un modèle murin de HD, les souris Knock-in *Hdh*^{Q111}.

L'étude des phénotypes comportementaux et neuropathologiques des modèles HD est marquée par des résultats plutôt inconstants. Ces divergences entre laboratoires semblent issues de l'absence de tests normalisés et surtout des différences intrinsèques entre les modèles. Le choix des souris Knock-in *Hdh*^{Q111} afin de détecter la présence d'un phénotype anxio-dépressif s'est donc fait sur la pertinence du modèle Knock-in, plus proche de la physiopathologie humaine que les souris transgéniques. En effet, le but de notre étude n'était pas d'évaluer spécifiquement les fonctions motrices des souris KI *Hdh*^{Q111}, cette caractérisation ayant déjà été décrite (Wheeler et al., 2000, 2002). Dans ce modèle, le déficit neurologique locomoteur débute à partir de la 96^{ème} semaine

(Wheeler et al., 2002), tandis que dans les modèles transgéniques, ce déficit apparaît beaucoup plus précocement (Klivenyi et al., 2006).

Le deuxième objectif de ce travail était de vérifier si la neurogenèse des animaux adultes était altérée dans l'hippocampe. En effet, ce processus est affecté dans nombre de modèles animaux de dépression et de la maladie de Huntington. En outre, les patients atteints par ces deux affections présentent une diminution du volume de l'hippocampe, qui pourrait résulter d'une neurogenèse diminuée.

Enfin, puisque la huntingtine régule l'expression de BDNF, et que celle-ci est réduite dans la pathologie et dans plusieurs modèles animaux de HD, nous avons voulu mesurer les concentrations hippocampiques de ce facteur neurotrophique.



Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behaviour and altered neuronal maturation

Sophie Orvoen^a, Patrick Pla^{b,c,d,e}, Alain M. Gardier^a, Frédéric Saudou^{b,c,d}, Denis J. David^{a,*}

^a Univ Paris-Sud, EA3544, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry F-92290, 4 France

^b Institut Curie, Orsay F-91405, France

^c CNRS UMR3306, Orsay F-91405, France

^d INSERM U1005, Orsay F-91405, France

^e Univ Paris-Sud, Orsay F-91405, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2011

Received in revised form

22 November 2011

Accepted 30 November 2011

Keywords:

Huntington's disease

Anxio-depressive-like behaviour

Neurogenesis

Hippocampus

Hdh^{Q111} mice

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a devastating genetic neurodegenerative disorder. Major depressive disorder and more generally mood disorders are a major component of the symptoms during the pre-motor symptomatic stages of the disease. We report here that knock-in *Hdh*^{Q111} mice, an animal model of HD, that carry an expanded polyglutamine stretch in the mouse HD protein show an anxio-depressive-like phenotype prior to any impairment of the locomotor function. Strikingly, whereas females develop preferentially a depressive-like behaviour, males had an increased anxiety-like phenotype. Since adult hippocampal neurogenesis has been associated to the pathophysiology and treatment of depression, we investigated whether changes in behavioural phenotypes are associated with proliferation or maturation impairments. Whereas cell proliferation was not affected in knock-in *Hdh*^{Q111} mice, a male-specific marked decrease in late maturation of newborn neurons was observed in the adult dentate gyrus. Together, our results highlight sex differences in both behaviour and adult neurogenesis in a knock-in model of HD.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Huntington's disease (HD) is a devastating neurodegenerative disorder with motor, anxio-depressive, and cognitive components. Disease is caused by a mutation in the HD gene encoding huntingtin (HTT), a protein that contains a polyglutamine stretch in its N-terminal region [37]. In humans, when this expansion exceeds 36–40 glutamines, mutated HTT induces disease [2]. Onset is generally in midlife and disease leads to death within 15–20 years during which motor control declines with the occurrence of troubles like chorea and bradykinesia. Psychiatric manifestations such as anxiety and depression are observed at high frequency in HD patients and appear often earlier than the motor symptoms [10,21]. However, their aetiology is not fully understood.

Anxio-depressive behavioural tests were performed on various HD rodent models including R6/1, R6/2, BACHD and YAC128 transgenic lines. Adult transgenic mice present sex-specific anxio-depressive-related behaviours [18,26,29,32] with a preferential depressive-like behaviour observed in females [29,32]. Unlike

the transgenic lines analyzed, the knock-in (KI) model *Hdh*^{Q111} expresses the mutant huntingtin under the control of the endogenous mouse promoter in the appropriate genomic context, and recapitulates the genetic situation as in HD patients [42]. Compared to transgenic models, the *Hdh*^{Q111} mice show mild phenotype and a slow progression of the disease, similar to what is observed in human HD. In particular, motor defects occur significantly later than in the transgenic lines R6/2 and BACHD [4,26,40,42]. We therefore investigated the anxio-depressive-like phenotype of *Hdh*^{Q111} mice using various complementary behavioural paradigms.

Adult hippocampal neurogenesis has gained considerable attention as a cellular substrate for the pathophysiology of depression [11]. Interestingly, HTT regulates neurogenesis [16] and altered neurogenesis has been reported in HD human post-mortem brains [5] and mouse models [15,17,24,30,31,35]. We therefore examined cell proliferation as well as maturation of newborn neurons in the dentate gyrus of adult *Hdh*^{Q111} mice hippocampus.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All analyses were conducted using male and female *Hdh*^{Q111/Q111} and the corresponding *Hdh*^{+/+} mice littermates in the CD1 background. *Hdh*^{Q111/Q111} knock-in mice, a generous gift from M.E.

* Corresponding author at: Univ Paris-Sud, EA3544, Faculté de Pharmacie, 5 rue JB Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France. Tel.: +33 1 46 83 59 68; fax: +33 1 46 83 53 55.

E-mail address: denis.david@u-psud.fr (D.J. David).

MacDonald, have been previously characterized as an HD model [26,41,42]. All mice were 13-week-old at the beginning of the experiments and were housed 10 per cage (37 cm × 24 cm × 16 cm) in single sex groups, with food and water provided *ad libitum*. Importantly, at the age of the experiment, *Hdh^{Q111/Q111}* mice did not present any locomotor deficits [26,42]. Animals were maintained on a 12L:12D schedule and behavioural testing occurred during the light phase.

All experimental procedures were performed in strict accordance with the recommendations of the European Community (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care and use of laboratory animals (permission #92-256B to D.J. David).

2.2. Behavioural testing

A first cohort of 30 animals was tested in the open field (OF) and novelty suppressed feeding (NSF) tests ($n=7-8$ per group) to assess anxio-depressive-like phenotype in *Hdh^{Q111/Q111}* mice. These results were confirmed in a second cohort of 69 animals, and extended to other behavioural models of anxiety and depression (Forced swim test (FST), splash test (ST) $n=14-23$ mice per group). Data provided hereafter are means ± SEM from the two batches for NSF and OF and from the last one for FST and ST (experiments timeline in Fig. 1a). We then used brains from these mice for adult neurogenesis and Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels studies. Animals were chosen randomly and were 15 weeks old when sacrificed.

2.3. Open field

Anxiety parameters and motor activity were quantified during 30 min in four Plexiglas OF boxes as described in David et al. [6].

2.4. Novelty suppressed feeding

NSF is a conflict test with competing motivations: the drive to eat and the fear of venturing into the center of the brightly lit arena. The testing apparatus was a plastic box (50 cm × 30 cm × 15 cm), the floor of which was covered with wooden bedding. 24 h prior to testing, all food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food was placed on a white paper in the center of the box. An animal was placed in a corner of the box, and a stopwatch was immediately started. The latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet with the use of forepaws) was timed. Immediately afterwards, the animal was transferred to its home cage, and the amount of food consumed in the subsequent 5 min was measured.

2.5. Splash test

This test consists of squirting two sprays of a 10% sucrose solution on the dorsal coat of a mouse in its home cage [6]. The viscosity of the sucrose solution dirties the mouse's fur and animals initiate grooming behaviour. The grooming duration was recorded for a 5 min period. A decreased grooming behaviour can be interpreted as a loss of motivational behaviour considered paralleling some symptoms of depression such as apathic behaviour [20].

2.6. Forced swim test

Mice were placed into plastic buckets (19 cm diameter, 30 cm depth, filled with 23–25 °C water) and videotaped from the top for the 6 min session. Only the last 4 min were scored using X'PERT FST (Bioseb, France) for immobility, climbing and swimming durations [6].

2.7. Immunohistochemistry

2.7.1. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labelling for proliferation study in the dentate gyrus of adult hippocampus

Mice were administered with BrdU (150 mg/kg, ip.) 2 h before sacrifice. We then proceeded as described in David et al. [6]. We used 5–10 brains per group, and BrdU-positive cells were counted using Olympus BX51 microscope (Germany).

2.7.2. Doublecortin (DCX) labelling for maturation study in the dentate gyrus of adult hippocampus

Histo-immunochemistry protocol was adapted from David et al. [6] on 5–6 brains per group. DCX+ cells were subcategorized as follows: DCX+ cells, DCX+ cells with little complex tertiary dendrites, and DCX+ cells with complex, quinary dendrites.

2.7.3. Brain Derived Neurotrophic Factor protein levels measurement in mouse brain tissue homogenates

BDNF levels in hippocampus were measured by anti-BDNF sandwich-ELISA (Promega, France) according to the protocol in Szapacs et al. [36]. Brains from 3 animals per group, randomly selected, were used.

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed using a two-way ANOVA with genotype and sex as main factors. Bonferroni/Dunn test was then used to analyze the statistical significance between groups. In the NSF, animals that did not eat during the test were removed from analyses. In other paradigms, outliers animals were removed when data were $>|2SD|$. Data were analyzed using StatView 5.0 software (SAS Institute, Cary, NC).

3. Results

The anxiety-like behaviour of *Hdh^{Q111/Q111}* mice was first assessed in the OF paradigm. A two-way ANOVA on the time spent or on the number of entries in the center of the OF revealed a significant effect of genotype factor [$F(1, 81)=7.78$; $P<0.01$]; [$F(1, 81)=4.55$; $P<0.05$] respectively. A Bonferroni/Dunn test revealed in *Hdh^{Q111/Q111}* male animals a decreased time and number of entries in the center (Fig. 1b and c), indicating an anxiety-like phenotype in male *Hdh^{Q111/Q111}*. This was not associated with a significant change in the locomotor activity [$F(1, 81)=2.49$; $P>0.05$] (Fig. 1d). However, as there was a tendency to a decrease in locomotor activity in *Hdh^{Q111/Q111}* males, we calculated the “distance in center/total distance travelled” ratio to distinguish possible locomotory influence on anxiogenic effects. This ratio was significantly decreased in *Hdh^{Q111/Q111}* males compared to wild-type males (resp. 0.17 ± 0.01 and 0.21 ± 0.01 , $P=0.01$), but not between *Hdh^{Q111/Q111}* and wild-type females (resp. 0.18 ± 0.01 and 0.17 ± 0.01 , $P=0.65$).

In the NSF (Fig. 1e), an anxiety-depressive-related behaviour paradigm, a two-way ANOVA on the latency to feed showed significant effect of sex [$F(1, 85)=12.48$; $P<0.001$] and genotype [$F(1, 85)=4.86$; $P<0.05$]. A post hoc analysis with a Bonferroni/Dunn test unveiled a significant increase in the latency to feed in *Hdh^{Q111/Q111}* female but not in male mice compared with their wild-type littermates. This anxiety-depressive-like phenotype was not confounded with a change in food consumption in the home cage [$F(1, 85)=0.01$; $P>0.05$]. Food consumption was expressed as means (mg) ± SEM: WT females 221.4 ± 29 , mutant females 185 ± 29.4 , WT males 277.5 ± 34.1 and mutant males 247.4 ± 29.5 .

We then explored whether a depressive-like behaviour is observed in the ST and the FST. In the ST, a two-way ANOVA

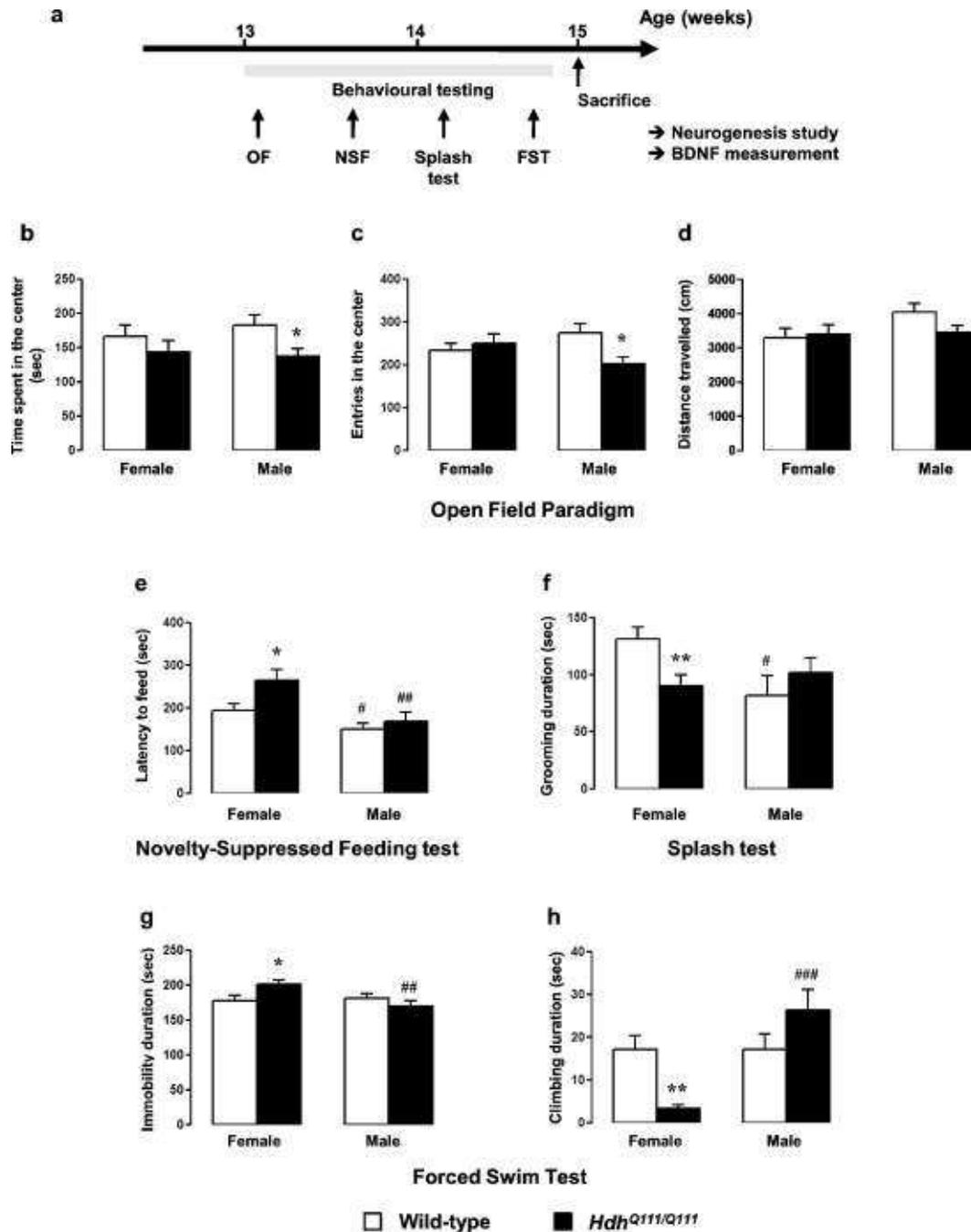


Fig. 1. Huntingtin mutation induced an anxiety-depressive-like behaviour in *Hdh*^{Q111} mice. (a) Experiments timeline. (b–d) *Hdh*^{Q111/Q111} male mice develop an anxiety-like phenotype in the open field paradigm. Anxiety is measured as mean of the time spent in the center (b) and as mean of the number of entries in the center (c). Locomotor activity is represented as mean of the total distance travelled in the open field (d). Values plotted are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ versus corresponding matched sex control group. (e) *Hdh*^{Q111/Q111} female mice develop an anxiety-depressive-like phenotype in the novelty suppressed feeding test. Results are expressed as mean of latency to feed in seconds. Values plotted are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ versus corresponding matched sex control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus female group of the same genotype. (f) *Hdh*^{Q111/Q111} female mice develop a depressive-like phenotype in the Splash test. Results are expressed as mean duration of grooming after receiving a 10% sucrose solution on the snout. Values plotted are mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ versus corresponding matched sex control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ versus female group of the same genotype. (g and h) *Hdh*^{Q111/Q111} female mice develop a depressive-like behaviour in the forced swim test. Results are expressed as mean of immobility duration in seconds (g) and mean of climbing duration (h). Values plotted are mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus corresponding matched sex control group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ versus female group of the same genotype.

on the grooming behaviour revealed a significant sex \times genotype interaction [$F(1, 55) = 5.31$; $P < 0.05$]. In female *Hdh*^{Q111/Q111} mice, a decreased grooming duration was observed, indicating a depressive-like state in these animals (Fig. 1f).

In the FST, a two-way ANOVA on the immobility duration showed significant interaction sex \times genotype [$F(1, 56) = 6.06$; $P < 0.05$]. A post hoc analysis with a Bonferroni/Dunn test

revealed a significantly increased immobility duration for *Hdh*^{Q111/Q111} female mice (Fig. 1g). Then, swimming and climbing behaviours were distinguished from each other. A two-way ANOVA revealed significant effect on climbing duration of sex [$F(1, 56) = 10.39$; $P < 0.01$] and a sex \times genotype interaction [$F(1, 56) = 10.56$; $P < 0.01$], indicating that the depressive-like phenotype observed in *Hdh*^{Q111/Q111} female mice was linked to a

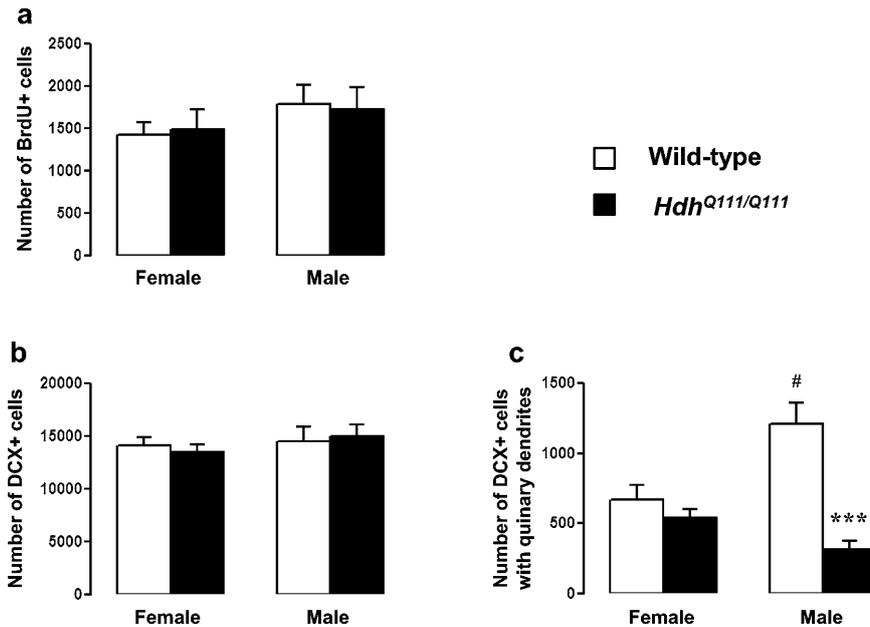


Fig. 2. Huntingtin mutation induces a sex-specific reduction of dendritic maturation but not proliferation in the dentate gyrus of *Hdh*^{Q111} male mice. (a) Cell proliferation is not affected in the subgranular cell layer of the dentate gyrus in adult hippocampus of *Hdh*^{Q111/Q111} mice. Data are the mean \pm SEM of the BrdU-labelled cells from 5 to 10 animals per group. (b and c) Maturation of newborn neurons is impaired in the subgranular layer of the dentate gyrus in adult *Hdh*^{Q111/Q111} male mice. (b) Doublecortin-labelled (DCX) cells from dentate gyrus. Late maturation is represented as the number of DCX+ neurons with quinary dendrites (c). Values plotted are mean \pm SEM. *** P < 0.001 versus corresponding matched sex control group, [#] P < 0.05 versus female group of the same genotype.

change in climbing (Fig. 1h) but not in swimming duration (not shown).

Adult hippocampal neurogenesis plays an important role in the regulation of affective states in behavioural paradigm such as the NSF [6,33]. We thus investigated whether pathogenic polyQ expansion in huntingtin could alter adult hippocampal neurogenesis. Huntingtin mutation had no significant effect on the cell proliferation in the adult dentate gyrus of the hippocampus [$F(1, 22) = 0.0003$; $P = 0.98$] (Fig. 2a). However, we observed a striking defect in the late (DCX cells with quinary dendrites) but not early (DCX cells with tertiary dendrites) maturation of newborn neurons. Indeed, although the total number of DCX-positive cells was stable [$F(1, 17) = 0.23$; $P = 0.6$] (Fig. 2b), a two-way ANOVA on DCX-positive cells with quinary dendrites showed significant effect of genotype [$F(1, 14) = 16.76$; $P < 0.01$] and a significant sex \times genotype interaction [$F(1, 14) = 9.23$; $P < 0.01$]. Male *Hdh*^{Q111/Q111} mice presented a significant decrease in DCX-positive cells with quinary dendrites in comparison to their WT littermates (Fig. 2c). These results suggest that maturation of hippocampal neurons and in particular the formation of quinary dendrites is specifically altered in HD mutant males.

Changes in BDNF levels have been linked to a modification of adult hippocampal neurogenesis [12]. We measured whether modifications in BDNF protein levels in the hippocampus could be related to the observed phenotypes. BDNF levels in the hippocampus were not changed [$F(1, 8) = 0.93$; $P = 0.36$]. Values are expressed as means (pg/mg of hippocampus) \pm SEM: WT females 24.19 ± 2.82 , mutant females 27.73 ± 1.88 , WT males 22.09 ± 3.4 and mutant males 23.91 ± 2.77 .

4. Discussion

The first clinical symptoms of HD are generally psychiatric abnormalities, most commonly major depression and mood disturbances [10,21]. Here, we assessed in an animal model of HD, whether anxiety-depressive-like phenotype associated with an

altered adult hippocampal neurogenesis could be observed *Hdh*^{Q111} mice.

We showed that early behavioural abnormalities exist in 13-week-old *Hdh*^{Q111/Q111} mice, an age where mutant animals do not exhibit any changes in motor functions [26,40,42]. Interestingly, a sex-specific phenotype was observed, with an anxious phenotype in male *Hdh*^{Q111/Q111} mice, and a depressive-like phenotype in females. Indeed, in contrast to *Hdh*^{Q111/Q111} males that show a decrease in the time and number of entries in the center of the OF, mutant female animals present a depressive-like phenotype, with an increased latency to feed in the NSF, an increased immobility duration in the FST and decreased grooming duration in the ST. It is unlikely that the behavioural deficit, *i.e.* the depressive-like phenotype, observed in the ST in *Hdh*^{Q111/Q111} mice primarily results from a striatal dysfunction in the motor coordination loop since no motor impairment (rotarod, grip strength, gait, etc.) are observed at this age [26,41,42]. However, we cannot exclude a striatal dysfunction affecting mouse cognitive functions [3]. A previous study [26] showed no significant differences in the open field test for *Hdh*^{Q111/Q111} males. This may be due to the lower number of mice tested compared to our study. Our results match previous data obtained in another mouse model of HD, *i.e.* transgenic R6/1 line, where only female mice displayed a depressive-like behaviour [29]. Another knock-in model (*Hdh*^{Q140} mice) presents also sex-specific behavioural alterations with an increased anxious phenotype in male mice [9]. The literature shows few reports of the prevalence of anxiety disorders in HD: Dewhurst et al. [8] found that anxiety was a relatively common prodromal symptom of HD. Interestingly, a higher administration of benzodiazepines, anxiolytic drugs of reference, has been observed in male HD patients [38].

Previous studies performed in the R6/1 transgenic model demonstrated that expression of serotonin receptors and transporter were decreased in the hippocampus, suggesting an impairment of the brain monoaminergic system functionality in these mutants [29]. Thus, we also scored in the FST the swimming and climbing durations, which have been linked in mice to an increase in brain serotonin and noradrenalin levels, respectively

[19]. We found that the depressive-like phenotype observed in female mice was linked to a decreased climbing behaviour, suggesting that the brain noradrenergic component rather than the serotonergic one could be impaired in the knock-in model used in this study [7,28].

Interestingly, in Parkinson's disease and HD, the specific alterations in neurogenesis areas parallel the early or premotor symptoms such as depression/anxiety that are seen during the early stages of these neurodegenerative diseases [43]. Thus, we measured cell proliferation and maturation of adult hippocampal dentate gyrus from mice. Cell proliferation in the dentate gyrus of *Hdh^{Q111/Q111}* mice was not affected. No such study had been performed in KI models before. Results in cell proliferation from transgenic rodents are contradictory, with a decrease in late stages [22–25,30,35] or no effect [13,31] on adult hippocampal cell proliferation. Rather than proliferation, neuronal maturation could be affected by the mutated form of Htt. Stimulating dendrites branching as well as facilitating maturation enable young neurons to integrate functionally into the local hippocampal circuitry [39], and any alteration of this process could have important functional consequences. Our study reports for the first time the maturation index (*i.e.* dendritogenesis) of newborn neurons in HD. Simpson et al. [35] evoked morphological differences between immature neurons in YAC128 transgenic and WT mice, without any additional information, especially concerning the sex of the mice and the maturation stage affected. We observed a defect in the dendritogenesis in the hippocampus of homozygous adult male mice compared with wild-type mice as male *Hdh^{Q111/Q111}* mice display a dramatic decrease in late maturation.

Female *Hdh^{Q111/Q111}* mice present a depressive-like behaviour without alteration of the hippocampal neurogenesis. This suggests that depression is not systematically associated with a decrease in neurogenesis in the dentate gyrus and is in agreement with various experiments showing that a decrease in DG neurogenesis is not sufficient, nor necessary to trigger depression [1,6,34].

Moreover, although antidepressants increase BDNF secretion [27], depressive behaviour is not correlated to a decreased BDNF production in this model. However, an effect on BDNF transport and secretion remains possible, as it has been shown that these parameters are affected in cortical neurons [14]. Studies are underway to know if similar effects are present in hippocampal neurons.

Finally, our results in *Hdh^{Q111/Q111}* mice highlight several early behavioural and neurogenic outcomes before the development of any locomotor defect. This study on a KI model, along with transgenic models, shows sex differences in the anxio-depressive behaviour linked to HTT mutation. To our knowledge, this has not been precisely studied in HD patients. We hope that our work will trigger such clinical studies in the near future.

Acknowledgments

We thank Dr. Sandrine Humbert for discussion and comments, the Institut Curie mouse facility and the Animal Care Facility of the IFR141, Université Paris-Sud for mouse care. This study was supported by the French Ministry of Research, University Paris-Sud (A.G.; F.S.), CNRS (F.S.), INSERM (F.S.) and the Institut Curie (F.S.), and by grants from Agence Nationale pour la Recherche (ANR-08-MNP-039, A.G.; F.S.), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 4950, F.S.), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, F.S.) and BQR from University Paris-Sud (D.J.D.).

References

- [1] M. Boldrini, M.D. Underwood, R. Hen, G.B. Rosoklija, A.J. Dwork, J. John Mann, V. Arango, Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus, *Neuropsychopharmacology* 34 (2009) 2376–2389.
- [2] M. Borrell-Pagès, D. Zala, S. Humbert, F. Saudou, Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 2642–2660.
- [3] H.C. Cromwell, K.C. Berridge, Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax, *J. Neurosci.* 16 (1996) 3444–3458.
- [4] Z.R. Crook, D. Housman, Huntington's disease: can mice lead the way to treatment? *Neuron* 69 (2011) 423–435.
- [5] M.A. Curtis, E.B. Penney, A.G. Pearson, W.M.C. van Roon-Mom, N.J. Butterworth, M. Dragunow, B. Connor, R.L.M. Faull, Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain, *PNAS* 100 (2003) 9023–9027.
- [6] D.J. David, B.A. Samuels, Q. Rainer, J.-W. Wang, D. Marsteller, I. Mendez, M. Drew, D.A. Craig, B.P. Guiard, J.-P. Guilloux, R.P. Artymyshyn, A.M. Gardier, C. Gerald, I.A. Antonijevic, E.D. Leonardo, R. Hen, Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression, *Neuron* 62 (2009) 479–493.
- [7] M.J. Detke, J. Johnson, I. Lucki, Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression, *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 5 (1997) 107–112.
- [8] K. Dewhurst, J.E. Oliver, A.L. McKnight, Socio-psychiatric consequences of Huntington's disease, *Br. J. Psychiatry* 116 (1970) 255–258.
- [9] J.L. Dörner, B.R. Miller, S.J. Barton, T.J. Brock, G.V. Rebec, Sex differences in behavior and striatal ascorbate release in the 140 CAG knock-in mouse model of Huntington's disease, *Behav. Brain Res.* 178 (2007) 90–97.
- [10] K. Duff, J.S. Paulsen, L.J. Beglinger, D.R. Langbehn, J.C. Stout, Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study, *Biol. Psychiatry* 62 (2007) 1341–1346.
- [11] R.S. Duman, Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity, *Eur. Psychiatry* 17 (Suppl 3) (2002) 306–310.
- [12] R.S. Duman, Depression: a case of neuronal life and death? *Biol. Psychiatry* 56 (2004) 140–145.
- [13] V. Fedele, L. Roybon, U. Nordström, J.-Y. Li, P. Brundin, Neurogenesis in R6/2 mouse model of Huntington's disease is impaired at the level of NeuroD1, *Neuroscience* 173 (2010) 76–81.
- [14] L.R. Gauthier, B.C. Charrin, M. Borrell-Pagès, J.P. Dompierre, H. Rangone, F.P. Cordelières, J. De Mey, M.E. MacDonald, V. Lessmann, S. Humbert, F. Saudou, Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules, *Cell* 118 (2004) 127–138.
- [15] J.M.A.C. Gil, P. Mohapel, I.M. Araújo, N. Popovic, J.-Y. Li, P. Brundin, A. Petersén, Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice, *Neurobiol. Dis.* 20 (2005) 744–751.
- [16] J.D. Godin, K. Colombo, M. Molina-Calavita, G. Keryer, D. Zala, B.C. Charrin, P. Dietrich, M.L. Volvert, F. Guillemot, I. Dragatsis, Y. Bellaïche, F. Saudou, L. Nguyen, S. Humbert, Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis, *Neuron* 67 (2010) 392–406.
- [17] H.E. Grote, N.D. Bull, M.L. Howard, A. van Dellen, C. Blakemore, P.F. Bartlett, A.J. Hannan, Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 2081–2088.
- [18] M.A. Hickey, K. Gallant, G.G. Gross, M.S. Levine, M.-F. Chesselet, Early behavioral deficits in R6/2 mice suitable for use in preclinical drug testing, *Neurobiol. Dis.* 20 (2005) 1–11.
- [19] K.A. Holick, D.C. Lee, R. Hen, S.C. Dulawa, Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/c mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor, *Neuropsychopharmacology* 33 (2008) 406–417.
- [20] E. Isingrini, A. Surget, C. Belzung, J.-L. Freslon, J. Frisbee, J. O'Donnell, V. Camus, A. D'Audiffret, Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice: UCMS causes relaxation impairment to ACh, *Physiol. Behav.* 103 (2011) 540–546.
- [21] C.L. Julien, J.C. Thompson, S. Wild, P. Yardumian, J.S. Snowden, G. Turner, D. Craufurd, Psychiatric disorders in preclinical Huntington's disease, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78 (2007) 939–943.
- [22] M. Kandasamy, S. Couillard-Despres, K.A. Raber, M. Stephan, B. Lehner, B. Winner, Z. Kohl, F.J. Rivera, H.P. Nguyen, O. Riess, U. Bogdahn, J. Winkler, S. von Hörsten, L. Aigner, Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor- β signaling in an animal model of Huntington disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69 (2010) 717–728.
- [23] Z. Kohl, M. Kandasamy, B. Winner, R. Aigner, C. Gross, S. Couillard-Despres, U. Bogdahn, L. Aigner, J. Winkler, Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease, *Brain Res.* 1155 (2007) 24–33.
- [24] S.E. Lasic, H.E. Grote, R.J.E. Armstrong, C. Blakemore, A.J. Hannan, A. van Dellen, R.A. Barker, Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice, *Neuroreport* 15 (2004) 811–813.
- [25] S.E. Lasic, H.E. Grote, C. Blakemore, A.J. Hannan, A. van Dellen, W. Phillips, R.A. Barker, Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment, *Eur. J. Neurosci.* 23 (2006) 1829–1838.
- [26] L. Menalled, B.F. El-Khodori, M. Patry, M. Suárez-Fariñas, S.J. Orenstein, B. Zahasky, C. Leahy, V. Wheeler, X.W. Yang, M. MacDonald, A.J. Morton, G. Bates, J. Leeds, L. Park, D. Howland, E. Signer, A. Tobin, D. Brunner, Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models, *Neurobiol. Dis.* 35 (2009) 319–336.

- [27] M. Nibuya, S. Morinobu, R.S. Duman, Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments, *J. Neurosci.* 15 (1995) 7539–7547.
- [28] M.E. Page, M.J. Detke, A. Dalvi, L.G. Kirby, I. Lucki, Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test, *Psychopharmacology (Berl)* 147 (1999) 162–167.
- [29] T.Y.C. Pang, X. Du, M.S. Zajac, M.L. Howard, A.J. Hannan, Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 753–766.
- [30] Q. Peng, N. Masuda, M. Jiang, Q. Li, M. Zhao, C.A. Ross, W. Duan, The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model, *Exp. Neurol.* 210 (2008) 154–163.
- [31] W. Phillips, A.J. Morton, R.A. Barker, Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment, *J. Neurosci.* 25 (2005) 11564–11576.
- [32] M.A. Pouladi, R.K. Graham, J.M. Karasinska, Y. Xie, R.D. Santos, A. Petersén, M.R. Hayden, Prevention of depressive behaviour in the YAC128 mouse model of Huntington disease by mutation at residue 586 of huntingtin, *Brain* 132 (2009) 919–932.
- [33] J.-M. Revest, D. Dupret, M. Koehl, C. Funk-Reiter, N. Grosjean, P.-V. Piazza, D.N. Abrous, Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors, *Mol. Psychiatry* 14 (2009) 959–967.
- [34] L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, A. Surget, S.C. Dulawa, F. Battaglia, N. Weisstaub, J. Lee, R.S. Duman, O. Arancio, C. Belzung, R. Hen, Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants, *Science* 301 (2003) 805–809.
- [35] J.M. Simpson, J. Gil-Mohapel, M. a Pouladi, M. Ghilan, Y. Xie, M.R. Hayden, B.R. Christie, Altered adult hippocampal neurogenesis in the yac128 transgenic mouse model of huntington disease, *Neurobiol. Dis.* 41 (2011) 249–260.
- [36] M.E. Szapacs, T.A. Mathews, L. Tessarollo, W. Ernest Lyons, L.A. Mamounas, A.M. Andrews, Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression, *J. Neurosci. Methods* 140 (2004) 81–92.
- [37] The Huntington's Disease Collaborative Research Group, A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes, *Cell* 72 (1993) 971–983.
- [38] E. van Duijn, N. Reedeker, E.J. Giltay, R.A.C. Roos, R.C. van der Mast, Correlates of apathy in Huntington's disease, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 22 (2010) 287–294.
- [39] J.-W. Wang, D.J. David, J.E. Monckton, F. Battaglia, R. Hen, Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells, *J. Neurosci.* 28 (2008) 1374–1384.
- [40] V.C. Wheeler, Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 115–122.
- [41] V.C. Wheeler, J.K. White, C.-A. Gutekunst, V. Vrbanac, M. Weaver, X.-J. Li, J.-P. Vonsattel, J.F. Gusella, S. Hersch, W. Auerbach, M.E. MacDonald, A.L. Joyner, Long glutamine tracts cause nuclear localization of a novel form of huntingtin in medium spiny striatal neurons in HdhQ92 and HdhQ111 knock-in mice, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 503–513.
- [42] V.C. Wheeler, C.-A. Gutekunst, V. Vrbanac, L.-A. Lebel, G. Schilling, S. Hersch, R.M. Friedlander, J.M. Gusella, J.-P. Vonsattel, D.R. Borchelt, M.E. MacDonald, Early phenotypes that presage late-onset neurodegenerative disease allow testing of modifiers in Hdh CAG knock-in mice, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 633–640.
- [43] B. Winner, Z. Kohl, F.H. Gage, Neurodegenerative disease and adult neurogenesis, *Eur. J. Neurosci.* 33 (2011) 1139–1151.

Résultats complémentaires

Les résultats obtenus dans les études de neurogenèse et de comportement, malgré l'absence de changement de la quantité totale de BDNF dans l'hippocampe, nous ont mené à étudier le transport de BDNF. Les travaux (non publiés) réalisés sur des neurones d'hippocampe de souris *Hdh^{Q111}* montrent effectivement que la HTT-polyQ entraîne une diminution de la vitesse des vésicules contenant le BDNF et une augmentation de leur temps de pause (Figure 31). En conséquence, la quantité de BDNF libéré se trouve réduite.

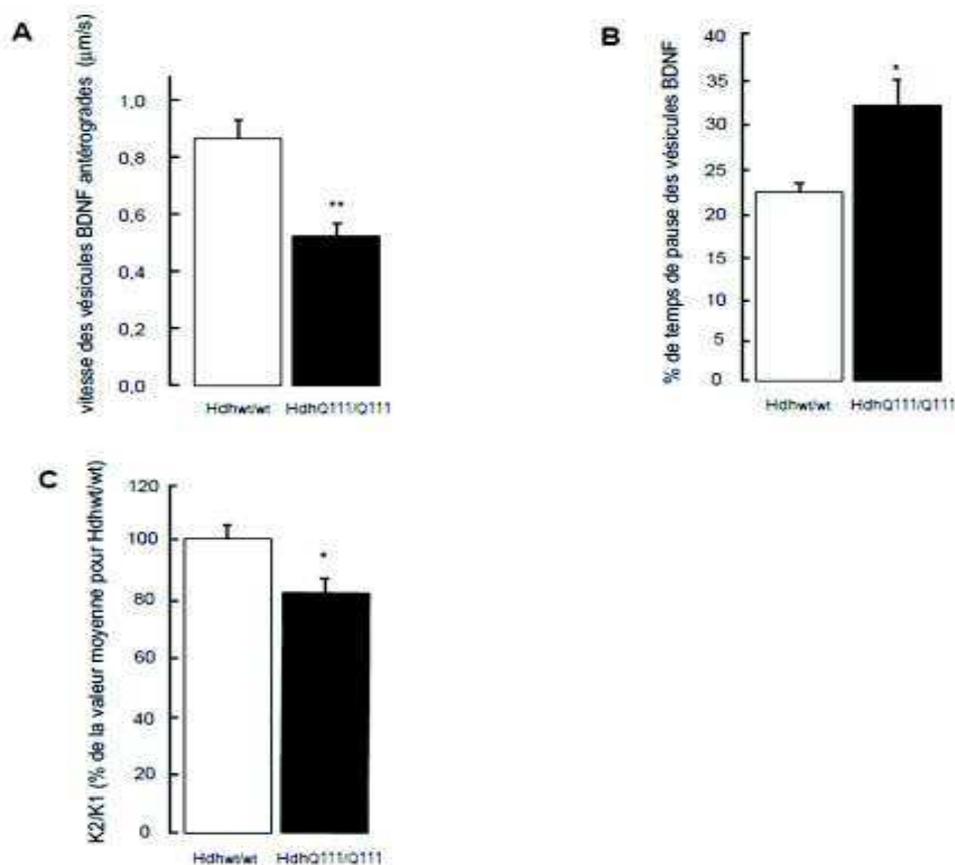


Figure 31 : La mutation Q111 de la huntingtine ralentit le transport vésiculaire du BDNF et diminue sa sécrétion par les neurones hippocampiques de souris

(A,B) Des neurones d'hippocampes d'embryons de souris E14,5 sauvages (*Hdhwt/wt*) ou mutantes (*HdhQ111/Q111*) ont été électroporés avec BDNF-mCherry. Trois jours plus tard, le mouvement des vésicules contenant BDNF a été observé par vidéomicroscopie et quantifié grâce au logiciel ImageJ. Les données présentées sont la moyenne +/- erreur standard de la vitesse antérograde (A) ou du pourcentage de temps qu'une vésicule est en pause (vitesse inférieure à 0,05 µm/s) (B) dans 20-28 neurones par groupe analysés dans 3 expériences indépendantes. (C) Des neurones d'hippocampes d'embryons de souris E14,5 ont été électroporés avec BDNF. Trois jours plus tard, une première dépolarisation permet la sécrétion du BDNF dans le milieu (K1) et épuise les réserves vésiculaires internes de BDNF. Après 30 min de restauration, une seconde dépolarisation est appliquée ce qui permet au nouveau stock de BDNF transport-dépendant d'être excrété dans le milieu (K2). Les concentrations de BDNF dans K1 et K2 ont été mesurées par ELISA. Les données présentées sont la moyenne +/- erreur standard de 3 expériences indépendantes, normalisées sur la valeur de la moyenne obtenue avec les neurones des souris sauvages. Analyse statistique : test T de student. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Nous avons également mené une étude prospective du comportement des animaux *Hdh*^{Q111} âgés, afin de savoir si le comportement anxio-dépressif observé chez les plus jeunes évoluait avec l'âge et le développement de la maladie. Nous avons observé que les mâles conservent un phénotype de type anxieux. Cependant les modifications du comportement de type dépressif ne sont pas retrouvées chez les souris âgées de 60 semaines (Figure 32).

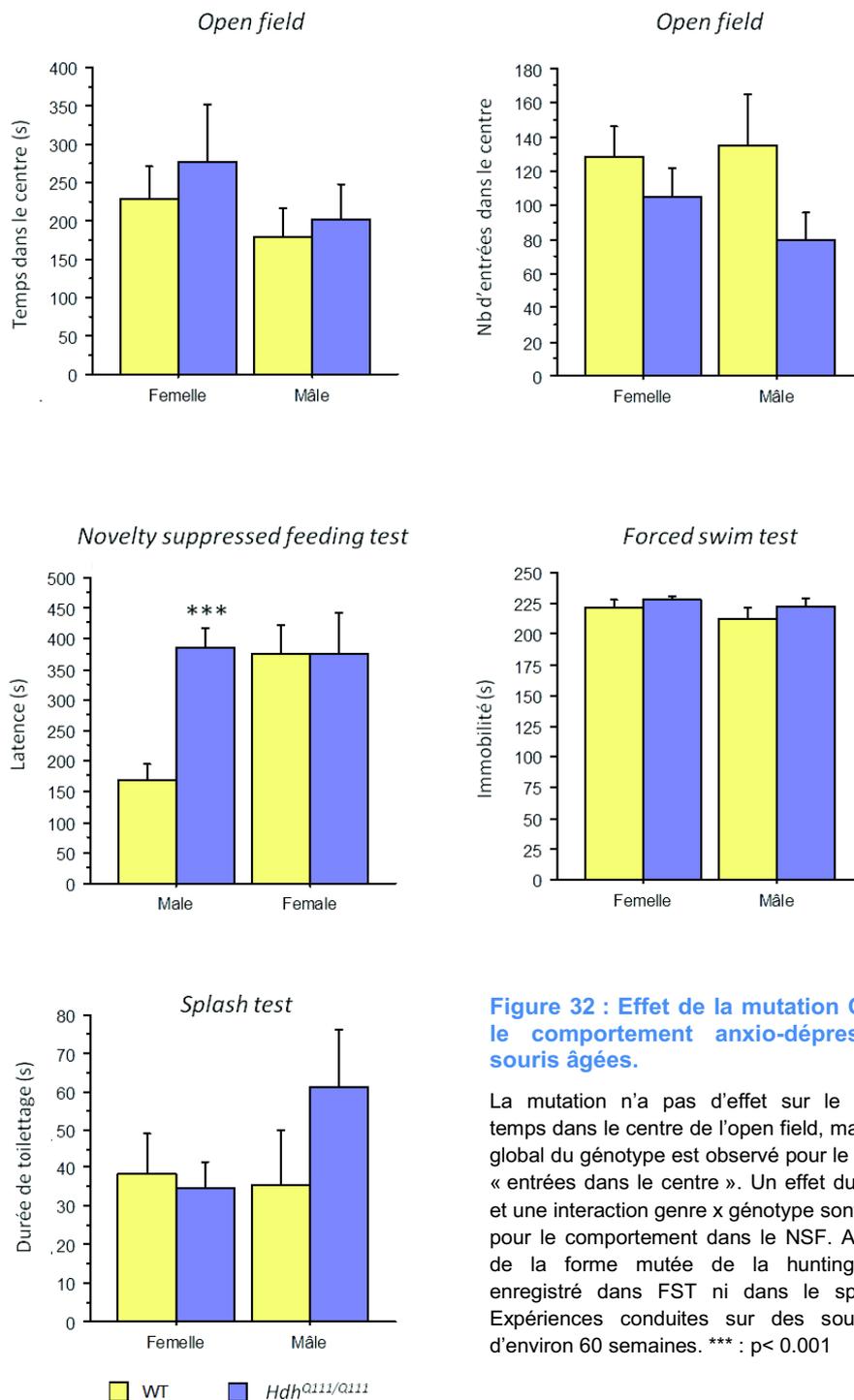


Figure 32 : Effet de la mutation Q111 sur le comportement anxio-dépressif des souris âgées.

La mutation n'a pas d'effet sur le paramètre temps dans le centre de l'open field, mais un effet global du génotype est observé pour le paramètre « entrées dans le centre ». Un effet du génotype et une interaction genre x génotype sont observés pour le comportement dans le NSF. Aucun effet de la forme mutée de la huntingtine n'est enregistré dans FST ni dans le splash test. Expériences conduites sur des souris âgées d'environ 60 semaines. *** : p < 0.001

Résultats principaux

Cette étude a consisté en la caractérisation complète du phénotype anxio-dépressif des souris *Hdh*^{Q111}. Ici, nous mettons en évidence une altération du phénotype comportemental basal des souris *Hdh*^{Q111} dans les tests prédictifs d'une activité anxiolytique et/ou antidépressive, comme cela l'a déjà été rapporté dans d'autres modèles de rongeurs HD (Chiu et al., 2011; Ciamei & Morton, 2008; Faure et al., 2011; Grote et al., 2005; Hickey et al., 2008; Menalled et al., 2009; Naver et al., 2003; Nithianantharajah et al., 2008; Pang et al., 2009; Peng et al., 2008; Pouladi et al., 2009, 2012; Renoir et al., 2011a, b, 2012). Nous révélons également, en amont de la survenue de déficits moteurs, un phénotype distinct concernant les mâles (phénotype anxieux accentué) et les femelles (phénotype dépressif accentué).

Puisque que les souris *Hdh*^{Q111} présentent un phénotype anxio-dépressif, nous avons examiné deux étapes de la neurogenèse, la prolifération et la maturation cellulaires. La prolifération n'apparaît pas diminuée à l'âge où nous avons étudié les animaux. Un certain nombre de travaux révèlent un défaut de prolifération cellulaire dans les autres modèles de HD, mais ils ont été menés à un âge plus avancé (Gil et al., 2005, 2004; Kandasamy et al., 2010; Lazic et al., 2004, 2006; Peng et al., 2008; Walker et al., 2011). Nous avons également mis en évidence que la maturation neuronale était affectée, et plus particulièrement la mise en place d'une arborisation dendritique complexe. Ici encore, nous avons observé un effet de la mutation dépendant du sexe des animaux, puisque seuls les mâles présentent ce défaut. Ainsi, il semblerait que chez les souris *Hdh*^{Q111}, seul le phénotype anxieux soit associé à une neurogenèse hippocampique altérée.

Nous avons ensuite mesuré les concentrations intratissulaires de BDNF dans l'hippocampe. En effet, le lien BDNF/huntingtine est maintenant bien établi, à la fois dans la synthèse et le transport du facteur neurotrophique (Cattaneo et al, 2005). De plus, le BDNF est essentiel dans la neurogenèse hippocampique adulte, et principalement dans les étapes de survie et de maturation des neurones néoformés. Une diminution des concentrations tissulaires de BDNF pourrait causer la réduction de l'arborisation dendritique que nous avons observée. A notre grande surprise, cette altération du processus de neurogenèse ne peut s'expliquer par des changements de concentration de BDNF dans l'hippocampe. Néanmoins, il apparaît que ce sont le transport et la libération de BDNF et non sa synthèse générale qui sont altérés dans ce modèle.

Discussion des résultats

L'aspect novateur de notre étude consiste en la caractérisation complète du phénotype anxio-dépressif des souris *Hdh*^{Q111} qui, à ce jour, a été réalisée quasi-exclusivement dans les modèles transgéniques de la maladie de Huntington. Ainsi que d'autres travaux l'ont démontré auparavant, nous avons mis en évidence un effet du sexe dans le phénotype du modèle étudié. On note en effet, chez les souris femelles une augmentation de la latence pour se nourrir dans le NSF et du temps d'immobilité dans le FST, reproduisant les résultats obtenus dans la lignée transgénique R6/1 (Grote et al., 2005; Pang et al., 2009; Renoir et al., 2011b), et une diminution de l'activité de toilettage dans le splash test. Chez les souris mâles, seuls les paramètres mesurés dans l'open-field sont modifiés, révélant un comportement de type anxieux. Les résultats obtenus dans les autres modèles de HD ne laissent pas voir de spécificité des mâles quant à l'anxiété, qui tendent plutôt à présenter un comportement moins anxieux que les contrôles. Nous avons vu plus haut que ces animaux étaient souvent décrits comme hyperactifs, ce qui peut interférer avec les résultats des tests d'anxiété. De plus, un certain nombre d'études n'ont pas pris le parti d'étudier les différences existant entre les sexes, et ont soit étudié l'un ou l'autre isolément, soit présenté des résultats groupés.

En outre, dans la lignée *Hdh*^{Q111} comme dans un certain nombre d'autres, les altérations de comportements anxio/dépressifs surviennent en amont des déficits moteurs. Une étude prospective sur des animaux *Hdh*^{Q111} âgés de 20 mois a donné des résultats similaires à ceux décrits chez l'Homme, c'est-à-dire que le phénotype anxio-dépressif ne s'aggrave pas, voire même régresse avec l'âge et le développement de la maladie.

Notre travail est le premier rapportant une étude de la neurogenèse dans un modèle knock-in de la maladie de Huntington. La prolifération n'apparaît pas altérée à l'âge où nous avons étudié les animaux. Cela peut être dû à la faible vitesse de progression de la maladie, autant qu'à l'âge auquel nous avons étudié les animaux. En effet, bien que la plupart des modèles dans lesquels cela a été examiné présentent une prolifération réduite, ces observations ont (à l'exception des souris R6/2) été faites à un âge relativement tardif. Il est probable qu'étudiée à un âge un peu plus avancé, nous aurions également observé une baisse de la prolifération cellulaire, qui en outre diminue avec l'âge. En ce qui concerne la maturation neuronale, et contrairement aux observations faites dans la plupart des autres modèles, nous n'avons pas observé de changement du nombre total de neurones exprimant la DCX. Une nouvelle fois, cette différence peut être due à la combinaison âge/développement progressif de la maladie de notre modèle. Si la formation de nouveaux neurones n'est pas altérée, en revanche la dendritogenèse l'est, ce qui recoupe les résultats obtenus dans les autres lignées.

De manière surprenante, l'altération de la dendritogenèse n'était pas liée à une baisse des concentrations hippocampiques de BDNF. Toutefois, la technique utilisée dans nos expériences mesure la quantité de BDNF totale, *i.e.* pour la plus grande partie, le BDNF stocké [si on pose l'hypothèse que le BDNF intra-tissulaire est à 80% intracellulaire, et à 20% extracellulaire (Lessmann et al., 2003)]. C'est donc le transport du BDNF et non sa synthèse qui serait affecté par la mutation, comme le révèlent la diminution de la vitesse de transport et l'augmentation du temps de pause des vésicules contenant le BDNF. Ceci aboutit à une diminution de la libération de BDNF, comme déjà démontré dans les neurones corticaux (Gauthier et al., 2004). Néanmoins, une autre étude a observé une réduction du BDNF chez les souris *Hdh^{Q111}* à l'âge précoce de 8,5 semaines (Lynch et al., 2007). Nous avons employé des méthodes de dosage distinctes, qui pourraient expliquer la variabilité des résultats, mais l'ELISA est plus sensible que le Western blot employé par l'équipe californienne. Pour l'instant pas la divergence de ces données reste inexpliquée.

Il a été établi que les comportements de nage et d'escalade adoptés pendant le test de la nage forcée résultent respectivement de l'activation des systèmes sérotoninergique et noradrénergique (Dulawa et al., 2004). Les résultats d'escalade obtenus par les souris *Hdh^{Q111}* dans le test de la nage forcée indiquent une diminution de l'activité noradrénergique centrale. Il semble qu'avec l'âge, cette inhibition du système noradrénergique perdure et s'étende aussi au système sérotoninergique, puisque les observations menées par le groupe de Hannan révèlent une diminution de l'expression du SERT et de plusieurs récepteurs de la sérotonine, ainsi qu'une baisse des concentrations cérébrales de cette monoamine chez les souris R6/1 (Pang et al., 2009; Renoir et al., 2011a, 2012).

[Article 2](#)

La délétion de la huntingtine dans les neurones matures du cerveau antérieur entraîne des déficits non cellulaires-autonomes de la neurogenèse hippocampique, et des altérations du comportement lié à l'anxiété.

Patrick Pla, Sophie Orvoen, Caroline Benstaali, Sophie Dodier, Sandrine Humbert, Denis David, Frédéric Saudou

En préparation

Présentation de l'étude

Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été faits pour caractériser le rôle de la mutation polyQ de la huntingtine dans des modèles de souris transgéniques ou knock-in. Cependant, la fonction de la huntingtine normale chez les souris adultes n'a pas été étudiée jusqu'à présent. Nous avons développé un nouveau modèle de souris dans lequel la huntingtine est délétée de manière inducible dans les neurones corticaux et hippocampiques matures (souris *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*). L'intérêt de ce modèle est que l'on peut induire la délétion du gène de la huntingtine à l'âge adulte, une fois que le développement cérébral est terminé, et induire ainsi des déficits relativement précis.

Dans un premier temps, nous avons étudié le phénotype comportemental de ces animaux, et particulièrement les comportements de type anxieux et dépressifs, qu'on s'attend à trouver similaires à ceux observés dans les modèles de HD.

Ensuite nous nous sommes penchés sur les différentes étapes du processus de neurogenèse dans l'hippocampe des animaux adultes. Etant donné l'implication de la huntingtine dans le transport et la synthèse du BDNF, et les fonctions connues de ce dernier dans la neurogenèse, nous nous attendons à observer des anomalies dans au moins certaines des étapes. Le modèle a été construit de telle manière que les nouveaux neurones de l'hippocampe expriment toujours la huntingtine, permettant ainsi d'interpréter toute éventuelle anomalie de la neurogenèse comme un effet non cellulaire autonome, avec le BDNF comme candidat idéal pour la compréhension des défauts histologiques. En effet, le maintien de la huntingtine dans les précurseurs neuronaux permet de s'affranchir des éventuels effets cellulaires autonomes liés à l'orientation du fuseau mitotique mis en évidence dans l'équipe de Sandrine Humbert (Godin et al., 2010).

Ensuite, et afin d'aller un peu plus en avant dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'action de la huntingtine sur ces différents aspects, nous nous sommes intéressés à l'expression, au transport, et à la voie de signalisation du BDNF.

Les travaux décrits dans cet article ont été réalisés au sein de l'EA3544 (analyse comportementale), et à l'Institut Curie d'Orsay (analyses *in vitro* et étude de la neurogenèse). J'ai effectué le travail de caractérisation de phénotype comportemental, et participé au travail sur le transport du BDNF.

Huntingtin deletion in adult forebrain mature neurons induces non-cell autonomous defects in hippocampal neurogenesis and anxiety-related behavioral alterations

Patrick Pla^{1,2,3,4}, Sophie Orvoen⁵, Caroline Benstaali^{1,2,3}, Sophie Dodier^{1,2,3}, Denis David⁵, Sandrine Humbert^{1,2,3} and Frédéric Saudou^{1,2,3}

1 - Institut Curie, Orsay, F-91405

2 - CNRS UMR3306, Orsay, F-91405

3 - INSERM U1005, Orsay, F-91405

4 - Université Paris-Sud, Orsay, F-91405

5 – EA3544, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, F-92290

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a fatal neurodegenerative disease, characterized by motor defects and psychiatric symptoms including mood disorders such as anxiety and depression. HD is caused by an abnormal polyglutamine (polyQ) expansion in the huntingtin (HTT) protein. The development and analysis of various mouse models that express pathogenic polyQ-HTT revealed a link between mutant HTT and the development of anxio-depressive behaviors and various hippocampal neurogenesis defects. However, it is unclear whether such behaviors are linked to alteration of HTT wild-type function in adults. Here, we report the analysis of a new mouse model in which HTT is inducibly deleted in adult mature cortical and hippocampal neurons using the CreER^{T2}/Lox system. These mice present sex-specific altered anxiety-related behaviors and defects in the survival and the dendritic arborization of hippocampal newborn neurons. This non-cell autonomous effect is linked to defects in BDNF transport and release upon HTT silencing in hippocampal neurons and in BDNF/TrkB signaling, as suggested by altered Erk and Akt phosphorylation levels in HTT knock-out hippocampi. Our results point out a crucial role of endogenous wild-type HTT in the control of mood disorders and adult hippocampal neurogenesis.

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is a fatal neurodegenerative disorder with motor, anxio-depressive and cognitive components. It is caused by a dominantly inherited mutant allele of the gene encoding huntingtin protein (HTT) in which the number of CAG triplet repeat encoding glutamines in the N-terminal part of the protein exceeds 36. Onset is generally in midlife and disease leads to death within 15-20 years during which motor control and cognitive functions declines. Anxiety and depression are observed with high frequency in HD patients, and appear earlier than the motor symptoms (Duff et al. 2007; Julien et al., 2007).

Various mouse lines have been generated to understand the aetiology of HD symptoms (Gil-Mohapel et al., 2011; Menalled et al., 2009). These mice are either transgenic mice overexpressing N-terminal parts of or the full-length HTT protein with an expanded polyQ stretch or knock-in mice in which the wild-type polyQ repeat has been replaced by an expanded one. Most models present anxio-depressive related behaviors before the onset of motor symptoms, and often these altered behaviors were sex specific (Orvoen et al., 2012; Pang et al., 2009; Renoir et al., 2011). Similarly, most of these models show altered hippocampal neurogenesis in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (DG) on at least one of the parameters such as proliferation, survival and maturation (Gil-Mohapel et al., 2011; Orvoen et al., 2012).

Extensive analyses of these mice have revealed toxic roles for the pathogenic form of HTT. However, it is unclear whether some behavioral defects observed in these mice are related to the function of wild-type HTT. Also transgenic mice as well as knock-in mice express mutant HTT from early developmental stages making impossible to analyse specifically adult-related mechanisms. Here, we generated a conditional knock-out of Htt in adult mice using an inducible CreER^{T2}/Lox system activated by tamoxifen injection. The promoter used, CamKII α promoter, targets the expression of CreER^{T2} to mature cortical and hippocampal neurons in the chosen transgenic line (Erdmann et al., 2007). Neural stem cells or immature neurons that do not express CamKII α at the time of tamoxifen injection maintain HTT expression. Consequently, in this study, we specifically addressed the consequences of HTT deletion in adult neurons on mouse behavior and on the development of newborn neurons. HTT depletion in hippocampal neurons induced a defect in BDNF transport and release thereby reducing BDNF/TrkB signaling in hippocampus. Our results suggest that wild-type

HTT, by controlling BDNF dynamics and its downstream signaling in hippocampus has a prominent role in regulating anxiety-like behaviors in mice.

RESULTS

Inducible depletion of huntingtin in hippocampus and cortex

As first step to generate mice deleted for HTT in adult mouse brains, we crossed *CaMKCreER^{T2}* mice with *ROSA26R* mice to verify that the Cre recombinase is activated only in mature cortical and hippocampal neurons in the forebrain. Two-month old *ROSA26R;CaMKCreER^{T2}* mice were injected with tamoxifen and their brain were fixed 6 months later. A whole mount X-gal staining showed results similar to previous studies (Erdmann et al., 2007), notably a strong induction of the beta-galactosidase reporter activity in the cortex and hippocampus (Fig. 1B). Immunofluorescence stainings in the DG of the hippocampus showed expression of beta-galactosidase in the majority of NeuN-expressing mature neurons but not in DCX-expressing immature neurons (Fig. 1C). Hence, these transgenic mice can be used to delete specifically floxed genes in mature hippocampal neurons without affecting the genotype of newborn neurons.

We then crossed *CaMKCreER^{T2}* mice with *Htt^{flox/flox}* mice as described in the materials and methods section to obtain *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}* mice referred throughout the text as mutants and, their littermates *WT; Htt^{flox/flox}* mice which were used as controls. Tamoxifen was injected when mice were 2 months aged and we analyzed the consequences of HTT deletion 6 months after. Indeed, in most of the previous studies, expression of mutant *Htt* or deletion of endogenous *Htt* either in the forebrain or in the projecting neurons from the cortex show slowly progressing phenotypes only in aged mice (Dragatsis et al., 2000; Lazic et al., 2006; Simpson et al., 2011).

Mice deleted for huntingtin in cortex and hippocampus show deficits in anxiety-related behaviors

Mutant mice 6 months post-tamoxifen treatment, showed no obvious motor deficits in rotarod (Fig. 2A). In contrast, female mutant mice showed an increase in the time and in the number of entries in the open arms of the elevated plus maze (EPM), suggesting an anxiolytic phenotype (Fig. 2B, C). This effect was sex-specific as mutant males did not show any

significant difference with their wild-type littermates in EPM. We further investigate mouse behavior using the open-field (OF) that give indications on anxiety-related behaviors. Mutant females showed reduced anxiety-like behavior as shown by an increase time spent in the center of the lit area (Fig. 2D). In OF, mutant males spent significantly less time than controls in the center of the OF and showed also fewer entries in this area (Fig. 2E), suggesting an anxiogenic phenotype. However, the investigation of locomotor activity in this paradigm showed a reduction of the total ambulatory distance travelled for males, which almost reached significance [$F(1,49)=4.005$; $p=0.051$; post-hoc $p=0.074$ for males and $p=0.744$ for females]. There was no such tendency with the females. To assess whether the anxiogenic phenotype observed in males is a consequence of the observed tendency in their locomotor behavior, we examined the percentage of the travelled distance in the center of the OF over the total travelled distance (Fig. 2F). This percentage was significantly decreased in male mutant mice, demonstrating that there is an anxiogenic component in male behaviour, independently of a motor component. Conversely, this ratio was slightly increased in female mutant mice but the values did not reach significance. Nevertheless, these results suggest that in contrast to mutant males that show increased anxiety, mutant females mice show reduced anxiety in EPM and OF.

We further investigated anxiety/depression-related behaviours using the novelty-suppressed feeding (NSF) paradigm that is sensitive to both anxiety and depressive states. We observed a significant increase in the latency to feed in mutant males, whereas it was significantly decreased in the females (Fig. 2G, H). These changes are not due to modifications in total food consumption in the home cage (sex/genotype ANOVA $F(1,52)=0.883$; $p>0.05$). Finally, we also analyzed mutant mice in another depression-related behavioral test using Forced swim test (FST), but found no effect of HTT depletion since the immobility behavior was unchanged for both sexes and genotypes (Fig. 2I). Together, our data reveal that the depletion of huntingtin in cortical and hippocampal mature neurons has a significant effect on anxiety-related behavior and that this effect varies by gender. Whereas females show anxiolytic-like behavior, males depleted for HTT show a consistent increase in anxiety in all the various experimental anxiety-related paradigms tested.

Huntingtin depletion in mature hippocampal neurons affects survival and maturation of new-born neurons

Hippocampal adult neurogenesis can be evaluated through the analysis of proliferation, survival and differentiation/maturation in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus. These steps have been shown to be altered in various mouse HD models (Gil-Mohapel et al., 2011) making the possibility that loss of HTT could also affect neurogenesis.

To analyze proliferation, we injected BrdU 2 hours before sacrificing control and mutant mice that were previously injected 6 months before with tamoxifen. We found no significant differences in the number of BrdU positive neurons in the DG between control or mutant mice in both males and females (Figure 3A).

We next analyzed mid-term and long-term survival of newborn hippocampal neurons by performing BrdU injection of control and mutant mice and analyzing the number of BrdU immunopositive neurons 21 days and 42 days after injection. Whereas we observed no significant difference in the mid-term neuronal survival (Figure 3B), we found a significant decrease in the long-term survival of neurons from the DG both in male and female mutant mice (Figure 3C-D). No significant changes were observed between mutant and control mice in the total number of DCX⁺ neurons 6 months after tamoxifen injection (Supplemental Figure 1). Altogether, these experiments show that there is a specific non-cell autonomous effect of huntingtin depletion in mature hippocampal and cortical neurons on the long-term survival of DG hippocampal newborn neurons.

Huntingtin depletion reduces dendritic arborization of hippocampal neurons

To further investigate the consequences of HTT depletion, we analyzed dendritic arborization whose complexity is an index of maturation and differentiation of newly born hippocampal neurons. This parameter is altered in knock-in *Htt*^{Q111} mice (Orvoen et al., 2012). To measure dendritic arborization in the hippocampus we immunostained brain sections with anti-DCX antibodies and performed a Sholl analysis on randomly selected DCX positive hippocampal neurons. Both male and female mutant mice showed an altered hippocampal dendritic arborization. Indeed, we observed in sections from mutant mice a significant decrease in the number of dendrites crossing the digital circles of 60 μm in radius, with the circle centered on their cell body of the neurons (Figure 3E). The length of dendrites was also similarly affected (Supplemental Figure 2). Together, our results indicate that the maturation and differentiation

of newborn DG neurons is impaired after the specific invalidation of HTT in hippocampal mature neurons.

Altered hippocampal BDNF/TrkB signaling in mice deficient for huntingtin in hippocampus and cortex

The effects observed in hippocampal newborn neurons of mutant mice are strongly reminiscent of the effects seen when TrkB, the receptor for the neurotrophic factor BDNF, is specifically deleted in these neurons (Bergami et al., 2008). Upon BDNF binding, cell-surface TrkB receptors are activated, leading to the stimulation of downstream kinases, such as extracellular-regulated kinases (Erk1/2) and Akt (Huang & Reichardt, 2003). To determine whether BDNF/TrkB signaling is altered in the hippocampus of mutant mice, we prepared protein extracts from the hippocampus of mutant and control mice and determined by Western blotting analyses the phosphorylation status of Erk and Akt. We observed a marked reduction in the phosphorylation levels of both Erk and Akt in mutant mice compared to their control siblings (Figure 4A-C). We also determined the levels of immature and mature BDNF but found no significant difference (Figure 4A and 4D). These results are suggesting that the downregulation of BDNF/TrkB signaling in mutant hippocampus could be triggered by a defect in BDNF transport and release. Huntingtin is a crucial regulator of BDNF transport in cortical neurons in health and disease and loss of HTT in cortical neurons reduces BDNF transport (Gauthier et al., 2004). However, whether loss of HTT in hippocampal neurons has an effect in the transport of BDNF remains to be tested. We therefore downregulated HTT expression in hippocampal neurons in cultures using an siRNA targeting *Htt* that has been previously validated and whose absence of any off-target effects in neurons has been previously tested using rescue strategy (Zala et al., 2008). To further avoid any possible target effects, we also used a shRNA targeting a different region of the coding sequence of *Htt* to reduce HTT levels in hippocampal primary neurons. Neurons were co-electroporated with BDNF-mCherry with the siRNA or shRNA targeting *Htt*. scramble RNA or shLuciferase (shLuc) were used respectively as controls. Using fast videomicroscopy, we measured the dynamics of BDNF-mCherry-containing vesicles as previously reported (Colin et al., 2008; Pineda et al., 2009; Zala et al., 2008). We observed a statistically significant decrease in the anterograde velocity of BDNF-mCherry vesicles as well as an increase in their pausing times when HTT is depleted in hippocampal neurons. (Figure 5A-C). To further evaluate the physiological relevance of such reduction transport in BDNF transport, we aim to determine whether the reported transport defects impact on the capacity of hippocampal neurons to

release BDNF. We therefore depolarized hippocampal neurons that were previously electroporated with a BDNF construct and next measured the BDNF released in the medium after two successive depolarizations. As previously reported, the BDNF released ratio of the second/first depolarization corresponds to transport-dependent release of BDNF. Indeed, whereas the first depolarization release the pool present at the membrane, the second release is strictly dependent on MT-dependent transport (Colin et al., 2008; Dompierre et al., 2007; Gauthier et al., 2004). We found that BDNF release was decreased in hippocampal neurons when huntingtin expression was downregulated either by siRNA or shRNA (Figure 5D). Altogether, these results indicate that downregulation of huntingtin in cortical and hippocampal neurons leads to a defect in BDNF transport and release in the hippocampus and a subsequent alteration of the Erk and Akt signaling pathways.

DISCUSSION

Here we show that huntingtin depletion in adult hippocampal and cortical mature neurons induces defects in anxiety-related behaviors in mice. We demonstrate that a non-cell autonomous mechanism dependent on HTT is occurring in hippocampus as we found that the capacity of newborn neurons of the hippocampus to survive is reduced when the mature hippocampal and cortical neurons are depleted of HTT protein. Indeed, we observed that specific parameters, long-term survival and maturation of dendritic arborization, are selectively altered by this non-cell autonomous effect. Since the defect in dendritic arborization is occurring around the same stage at which we observe a decrease in neuronal survival, it is tempting to speculate that the two events are linked and that newborn neurons that are not branched correctly have a higher probability to die. In support, survival of newborn neurons has been shown to be linked to the functional integration into existing networks (Lledo et al., 2006).

The steps in hippocampal neurogenesis that are defective in *CaMKCreER^{T2}; Htt^{fllox/fllox}* mutants are similar to the steps that have been shown to depend on the TrkB signaling in newborn neurons (Bergami et al., 2008). Moreover, the downregulation of TrkB in these neurons leads to an anxiogenic phenotype in OF that is similar to the anxiogenic-related defects that are observed in *CaMKCreER^{T2}; Htt^{fllox/fllox}* mutant males (Bergami et al., 2008). Accordingly, we show that HTT downregulation leads to a defect in the BDNF/TrkB downstream signaling kinases Erk and Akt observed *in vivo*. It was previously reported that Akt signaling regulates

dendritic growth and arborization downstream of BDNF (Kumar et al, 2005). These findings may provide an explanation for the failed dendritic arborization in the *CaMKCreER^{T2}; Htt^{lox/lox}* mutants. We show that the defects in Erk and Akt activation are unlikely to be the consequence of a downregulation of BDNF expression. It is rather the consequence of a reduction in BDNF transport and in BDNF secretion. Indeed, we found that BDNF vesicle trafficking is reduced when huntingtin is downregulated and that this leads to a decreased capacity of neurons to release BDNF. This effect is similar to what was observed in cortical neurons in which HTT silencing results in a decrease transport and release of BDNF (Colin et al., 2008; Gauthier et al., 2004). A possible role of huntingtin in vesicular transport in hippocampal neurons was previously reported by Her and Goldstein (2008) but only by using overexpression of wild-type and mutant polyQ huntingtin and by using APP-YFP as a tag for moving vesicles. Our findings that loss of HTT impacts on BDNF transport in hippocampal neurons is in agreement for a loss of HTT function in axonal transport in HD condition since the presence of a polyQ expansion in HTT also results in a decrease in axonal transport in both cortical and hippocampal neurons (Gauthier et al., 2004, Colin et al., 2008, Zala et al., 2008, Her et al., 2008).

In contrast to the anxiogenic effect observed in males *CaMKCreER^{T2}; Htt^{lox/lox}* mice, we found that females have a decreased level in anxiety. Sex specific differences on anxiety-related behaviour were already reported in a model of knock-in polyQ-HTT expressing mice (Orvoen et al., 2012). The recapitulation of this sex specific difference in our model suggests that its mechanism is linked to the function of normal HTT in adult mature cortical and hippocampal neurons. However, since we do not find any sex differences in the defects of hippocampal neurogenesis and BDNF/TrkB signaling in the mutant mice, we can assume that HTT is implicated in a yet unknown mechanism of anxiety regulation that is sex specifically regulated.

In conclusion, we report here that huntingtin loss of function in the adult cortex and hippocampus alter anxiety behavior affects and that these findings correlate with altered neurogenesis and neuronal maturation and with the loss of HTT function in the axonal transport of BDNF. Consequently, BDNF and the downstream TrkB signaling kinases are altered. Together, our findings suggest that some of the anxiety disorders observed at high frequency in HD patients may be caused by an alteration of normal HTT function in the hippocampus and cortex.

MATERIAL AND METHODS

Mice and tamoxifen injection

CaMKCreER^{T2} mice were obtained from EMMA (European Mouse Mutant Archive, see <http://www.emmanet.org/index.php>). The generation of these transgenic mice is described in Erdmann et al., 2007.

CaMKCreER^{T2} mice were crossed with *Htt^{flox/flox}* mice to obtain *CaMKCreER^{T2}; Hdh^{flox/+}* mice, which were crossed with *Hdhflox/flox* mice to obtain *CaMKCreER^{T2}; Hdhflox/flox* mice named as mutants and their littermates *WT; Hdhflox/flox* mice which were used as controls.

Tamoxifen preparation and injection was performed as described in Erdmann et al., 2007. Briefly, eight week old mice were injected intraperitoneally with 1 mg tamoxifen twice a day for five consecutive days.

Behavioral analyses

Motor performance was assessed using a rotarod. Mice were placed on the rod, and the number of falls in the subsequent 3 minutes was counted.

Anxiety-related behaviours were measured using the elevated plus maze (EPM) and the open field (OF). EPM is based on the aversion of mice to open spaces and height and was performed as described previously in David et al., 2009. Briefly, animal was placed in the center of the apparatus, facing a close arm, and let exploring for 5 minutes. Experiment was videotaped from the top, and time and number of entries in the open arms were measured using Any-Maze software (Stoelting Inc.). Anxiety parameters and motor activity were quantified during 30 min in Plexiglas open field boxes as previously described (David et al., 2009).

Novelty suppressed feeding (NSF) test is a conflict test with competing motivations: the drive to eat and the fear of venturing into the center of the brightly lit arena. The testing apparatus consisted in a plastic box (50 cm × 30 cm × 15 cm), the floor of which was covered with wooden bedding. 24 h prior to testing, all food was removed from the home cage. At the time of testing, a single pellet of food was placed on a white paper in the center of the box. The animal was placed in a corner of the box, and a stopwatch was immediately started. The latency to eat (defined as the mouse sitting on its haunches and biting the pellet with the use

of forepaws) was timed. Immediately afterwards, the animal was transferred to its home cage, and the amount of food consumed in the subsequent 5 min was measured.

Depression-related behaviour was assessed in the forced swim test (FST). Briefly, mice were placed into plastic buckets (19 cm diameter, 30 cm depth, filled with 23–25°C water) and videotaped from the top for the 6 min session. The last 4 min were scored for immobility, climbing and swimming durations.

Immunohistochemistry

For β -galactosidase whole mount stainings, we followed the same protocol as Erdmann et al., 2007. To study proliferation mice were administrated with BrdU (150 mg/kg, intraperitoneal) 2 hours before sacrifice in control and mutant mice injected 6 months ago with tamoxifen. Alternatively, to study the survival of newborn neurons, BrdU was administrated twice a day during three days 21 days or 42 days before sacrifice. After anesthesia with 100 mg/ml ketamine and 20 mg/ml xylazine, mice were perfused transcardially with cold PBS and 4% paraformaldehyde (PFA). The brains were removed, fixed overnight in 4% PFA and then cryoprotected in 30% (w/v) sucrose in PBS before embedding in Tissue-Teck. Serial sections (35 μ m) were made on a cryostat (). Every twelveth floating section was used for each staining, covering the whole hippocampus. Epitopes were unmasked in formamide/SSC (1/1) for 1h at 65°C and in 2N HCl at 37°C for 20 min. After blocking in 5% NGS and 0.1% Triton X-100 in PBS, sections were incubated overnight at 4°C with rat anti-BrdU (1/100), mouse anti-NeuN (1/500) and goat anti-DCX (1/500) antibodies (from Chemicon, Santa Cruz respectively). After washings, sections were incubated at room temperature for 2 hours with secondary biotinylated donkey anti-rat (1/100), chicken anti-mouse A647 (1/200) and donkey anti-goat Cy3 (1/200) secondary antibodies, washed and incubated with streptavidin-Cy2 (1/200) during 1h at room temperature. After washings, sections were mounted in Mowiol-DABCO. For DCX immunohistochemistry used for the Sholl analysis, 35 μ m floating sections were incubated 30 min with 0,3% H₂O₂, then blocked 10% foetal bovine serum () in 0.1M TrisHCl pH7,4, 0.15M NaCl (=TBS) with 0.5% Triton X100 and incubated overnight at 4°C with goat anti-DCX antibody (1/200) (Santa Cruz) in blocking solution. After washes in 0.1M TBS, sections were incubated in biotinylated bovine anti-goat antibody (1/500) and procedure was finished using the ABC kit and DAB staining procedure from Vector Laboratories. Sections were mounted on slides, dehydrated in ethanol, delipidated in xylene and mounted with Entellan.

Sholl analysis was performed on 12 randomly chosen DCX positive hippocampal neurons per brain that presented at least a second order dendrite, using NeuroLucida software.

Western blotting analysis

For Western Blot analysis, mice were killed by cervical dislocation, hippocampi were rapidly dissected and the proteins were extracted in 20 mM Tris-HCl pH7,6, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 1% protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma). Cell lysates were centrifuged 10,000g for 10 min at 4°C. Electrophoresis was performed in 8% (or 15% for BDNF detection) SDS-polyacrylamide gels and the proteins were transferred to Protran nitrocellulose membranes (Whatman). After blocking in 10 mM Tris-HCl pH7,6, 200 mM NaCl, 0,1% Tween-20 and 5% BSA, membranes were incubated with anti-phospho ERK (rabbit polyclonal 9101), anti-ERK (rabbit polyclonal 9102), anti-phospho-Akt (rabbit monoclonal 4058), and anti-Akt (rabbit polyclonal 9272) antibodies to detect phosphorylated and total ERK and phosphorylated and total Akt, respectively. All antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. Mature and precursor BDNF were detected with an anti-BDNF antibody (rabbit polyclonal sc-546, Santa Cruz). All antibodies were diluted 1/1000 in blocking buffer. Primary antibodies were detected with appropriate HRP-coupled secondary antibodies and ECL signals (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Erembodegem, Belgium) were quantitated with image analysis (ImageJ).

BDNF vesicular trafficking and secretion

To analyze BDNF vesicular trafficking, E17 rat primary hippocampal neurons were prepared as previously described (Gauthier et al., 2004). Five million neurons were electroporated in Amaxa Nucleofactor Kit for Rat Neurons (Lonza) with 2 µg of BDNF-Cherry and 1 µg of siRNA or 2 µg of shRNA constructs and plated on glass coverslips coated with poly-L-lysine (1 mg/mL) in Neurobasal supplemented 2% B27, 2 mM GlutaMax, 1% penicillin/streptomycin, 10 µM forskolin and 100 µM IBMX. The plasmid BDNF-mCherry was a generous gift from G. Banker (Oregon Health and Science University, Portland, Oregon). siRNA targeting huntingtin had the following sense sequence : GGAACUCUCAGCCACCAAGTT and scRNA had the following sense sequence : AUCGAGCUACCACGAACGCTT and both were synthesized and annealed with their antisense sequence by Eurogentec. They have been previously used and tested in Zala et al., 2008. shRNA constructs SIN-PGK-GFP-WHV-LTR-TRE-siHtt6 (shHtt) and the control SIN-PGK-GFP-WHV-LTR-H1-siLuc (shLuc) were a generous gift from N. Déglon (Centre

Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland) and described and tested in Drouet et al., 2009.

Videomicroscopy experiments were performed 3 days after transfection. Glass coverslips with neurons were mounted in a Ludin chamber. The microscope and the chamber were kept at 37°C. Images were recorded with a 100X PlanApo N.A. 1.4 oil immersion objective on a Leica DM IRBE microscope and collected every 200 milliseconds in stream mode with 150 milliseconds of exposure and a 2 x 2 binning using a Micromax camera (Ropper scientific, Trenton, NJ, USA) controlled by Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Videos, kymographs, and analyses were generated with ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, NIH, USA) and the KymoToolbox plug-in (Zala et al., 2012).

The analysis of BDNF transport-dependent secretion was done as described in Zala et al. 2008. Briefly, hippocampal neurons were electroporated with BDNF. Three days later, neurons were depolarized (treatment for 20 min with neuronal culture media containing 28 mM KCl, 30 mM CaCl₂, 30 mM NaCl). The supernatant was extracted (K1 fraction). The neurons were washed and incubated 30 min in normal neuronal culture medium and depolarized again. The supernatant K2 was extracted and a whole protein lysate (L) of cells was extracted to assess the general expression of BDNF. BDNF levels were measured by anti-BDNF sandwich-ELISA using BDNF Emax Immunoassay system (Promega, France), following manufacturer's instructions. Microtiter plates (96-well) were coated overnight at 4°C with monoclonal anti-BDNF antibody (1:1000). Unspecific sites were blocked for 1 hour. Standard BDNF concentration ranging from 7.8 to 500 pg/ml and brain samples were added in triplicate and incubated for 2 hours at room temperature. After washing, polyclonal anti-human BDNF antibody (1:500) was added to each well and incubated at room temperature for 2 hours. Then, peroxidase conjugated anti-Ig Y antibody (diluted 1:200) was added and incubated at room temperature for 1 hour. After addition of substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and stop solution (HCl 1N), the concentration of BDNF was determined by absorbance in 450 nm.

All quantifications were done by an experimenter blind to the genotype of the mice. Statview 4.5 software (SAS Institute Inc., Cary, NC) was used for statistical analysis. Data are expressed as mean +/- S.E.M. They were analyzed using a two-way ANOVA with genotype and sex as main factors.

REFERENCES

- Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Götz, M., & Canossa, M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15570-5.
- Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-pages, M., Li, X. J., Saudou, F., et al. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J*, 27, 2124-2134.
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J.-W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62(4), 479-93.
- Drouet, V., Perrin, V., Hassig, R., Dufour, N., Auregan, G., Alves S, Bonvento G., Brouillet, E., Luthi-Carter, R., Hantraye, P., Déglon, N. (2009). Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Annals of Neurology*, 65(3):276-85.
- Dompierre, Jim P, Godin, J. D., Charrin, B. C., Cordelières, F. P., King, S. J., Humbert, S., & Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *The Journal of neuroscience* , 27(13), 3571-83.
- Dorner, J. L., Miller, B. R., Barton, S. J., Brock, T. J., & Rebec, G. V. (2007). Sex differences in behavior and striatal ascorbate release in the 140 CAG knock-in mouse model of Huntington's disease. *Behavioural brain research*, 178(1), 90-97.
- Dragatsis, I., Levine, M. S., & Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature Genetics*, 26, 300-306
- Duff, K., Paulsen, J. S., Beglinger, L. J., Langbehn, D. R., & Stout, J. C. (2007). Psychiatric Symptoms in Huntington's Disease before Diagnosis: The Predict-HD Study. *Biological Psychiatry* 62, 1341-46.
- Erdmann, G., Schütz, G., & Berger, S. (2007). Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC neuroscience*, 8, 63-71.
- Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-pages, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelieres, F. P., Mey, D., et al. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 118, 127-138.
- Gil-Mohapel, J., Simpson, J. M., Ghilan, M., & Christie, B. R. (2011). Neurogenesis in Huntington's disease: Can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies? *Brain research*, 1406, 84-105.
- Her, L.-S., & Goldstein, L. S. B. (2008). Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. *The Journal of neuroscience*, 28(50), 13662-72.
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 72, 609-42.

- Kumar, V., Zhang, M.-X., Swank, M. W., Kunz, J., & Wu, G.-Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *The Journal of neuroscience*, 25(49), 11288-99.
- Lazic, S. E., Grote, H. E., Blakemore, C., Hannan, A. J., van Dellen, A., Phillips, W., & Barker, R. a. (2006). Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *The European journal of neuroscience*, 23(7), 1829-38.
- Lledo, P.-M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(3), 179-93.
- Menalled, L., El-Khodori, B. F., Patry, M., Suárez-Fariñas, M., Orenstein, S. J., Zahasky, B., Leahy, C., et al. (2009). Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiology of disease*, 35(3), 319-36.
- Orvoen, S., Pla, P., Gardier, A. M., Saudou, F., & David, D. J. (2012). Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behaviour and altered neuronal maturation. *Neuroscience letters*, 507(2), 127-132.
- Pang, T Y, Du, X., Zajac, M. S., Howard, M. L., & Hannan, A. J. (2009). Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, 18, 753-766.
- Pineda, J. R., Pardo, R., Zala, D., Yu, H., Humbert, S., & Saudou, F. (2009). Genetic and pharmacological inhibition of calcineurin corrects the BDNF transport defect in Huntington's disease. *Molecular brain*, 2, 33.
- Renoir, T., Zajac, M. S., Du, X., Pang, T. Y., Leang, L., Chevarin, C., Lanfumey, L., et al. (2011). Sexually Dimorphic Serotonergic Dysfunction in a Mouse Model of Huntington's Disease and Depression. *PLoS One*, 6(7), 1-11.
- Simpson, J. M., Gil-mohapel, J., Pouladi, M. A., Ghilan, M., Xie, Y., Hayden, M. R., & Christie, B. R. (2011). Neurobiology of Disease Altered adult hippocampal neurogenesis in the YAC128 transgenic mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of Disease*, 41(2), 249-260.
- Zala, Diana, Colin, E., Rangone, H., Liot, G., Humbert, S., & Saudou, F. (2008). Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Human molecular genetics*, 17(24), 3837-46.

FIGURES AND LEGENDS

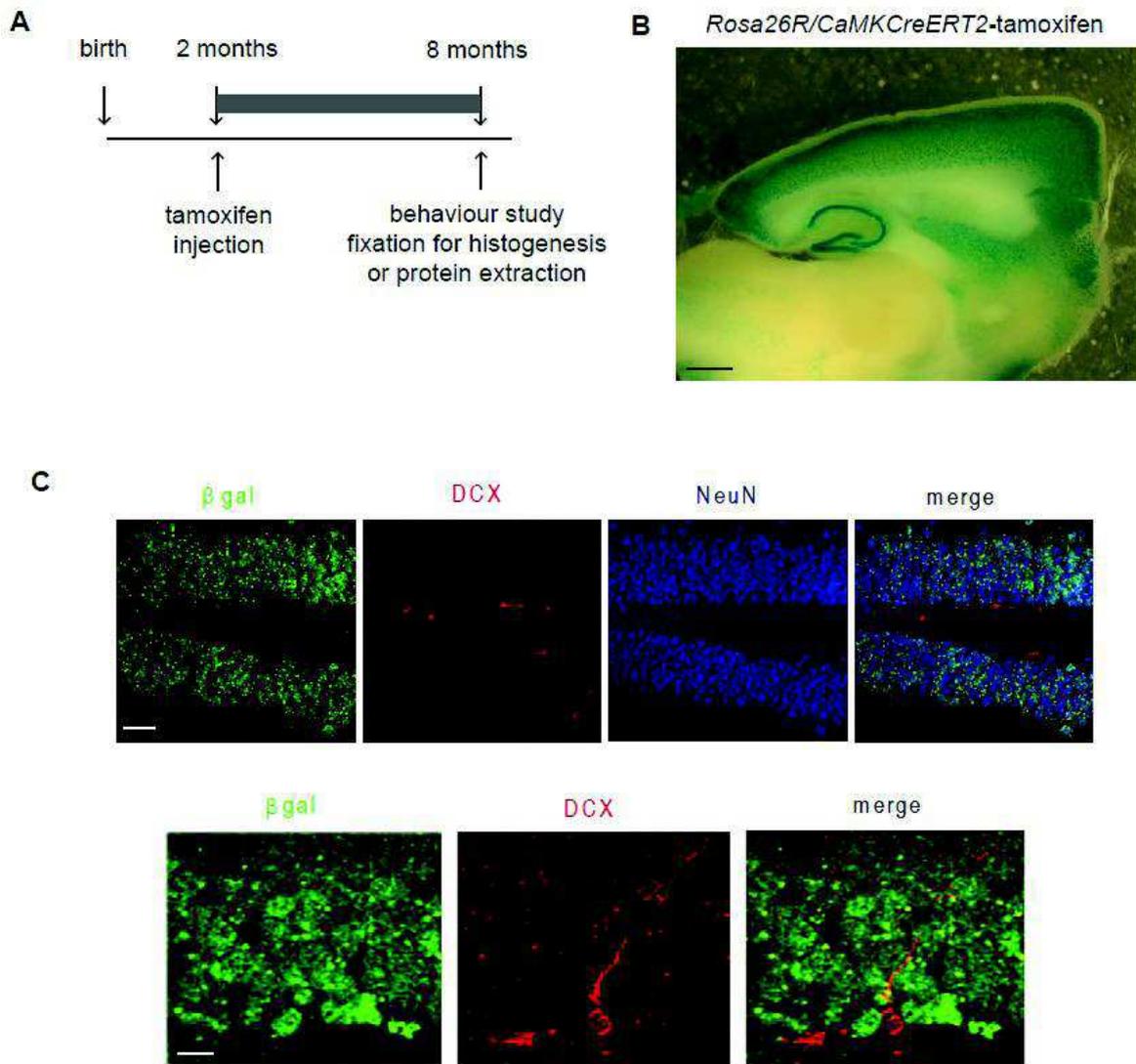


Figure 1: Tamoxifen injection in 2 month old *CaMKCreER^{T2}* mice activates Cre expression in mature hippocampal neurons but not in hippocampal newborn neurons

(A) Design of experiments performed on *CaMKCreER^{T2};ROSA26R* , *CaMKCreER^{T2};Hdhflox/flox* and *WT; Hdhflox/flox* mice. (B) Whole mount X-gal staining of a brain cut parasagittally of a *CaMKCreER^{T2};ROSA26R* mouse injected with tamoxifen. Scale bar : 500 μ m. (C,D) Immunofluorescence in the hippocampal region of a *CaMKCreER^{T2};ROSA26R* mouse injected with tamoxifen with antibodies recognizing beta-galactosidase, DCX and NeuN. Scale bar for C : 30 μ m ; scale bar for D : 10 μ m

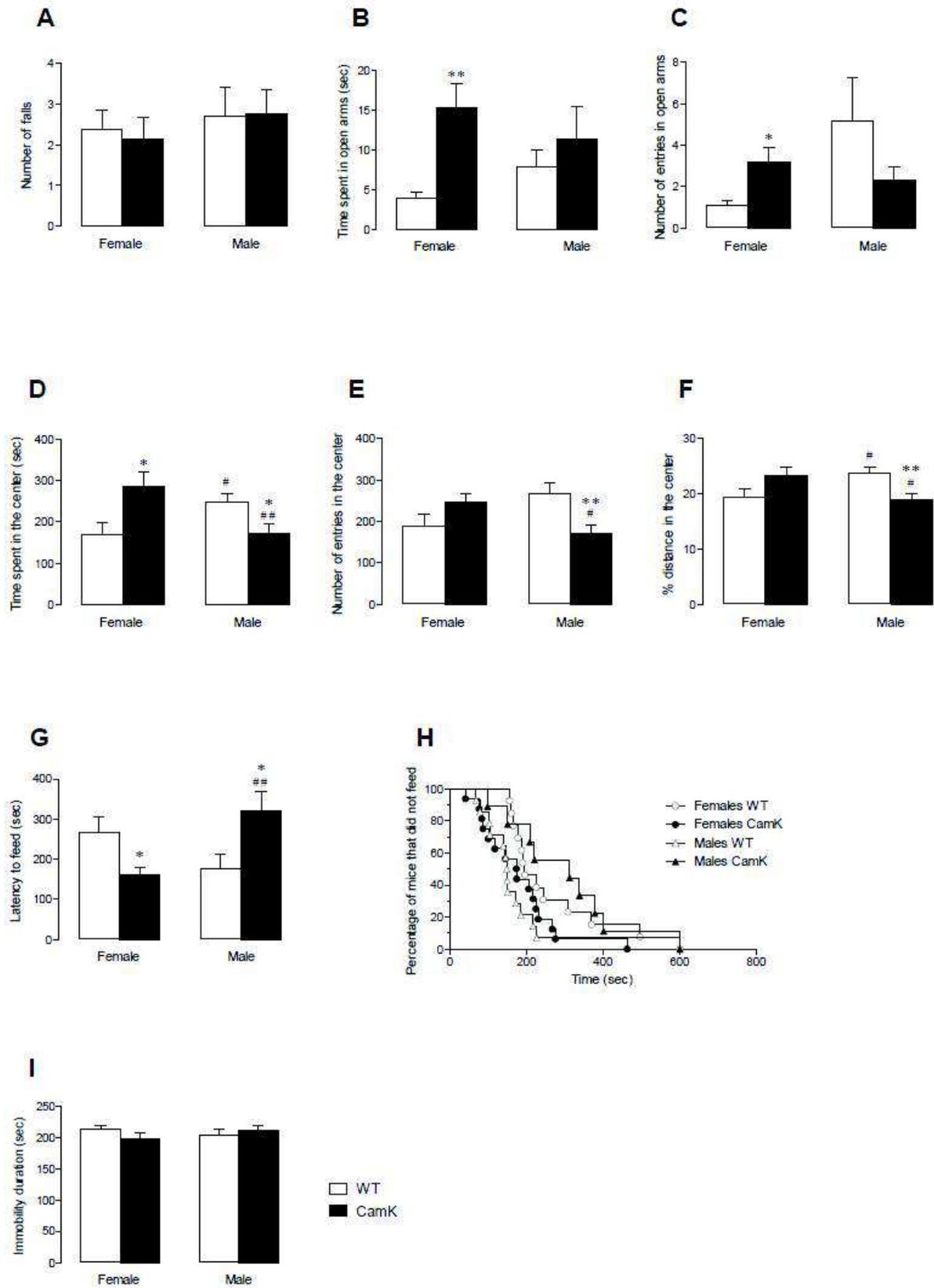


Figure 2 : Deletion of huntingtin in mature cortical and hippocampal neurons triggers sex specific modifications of anxiety-related behaviours

(A) Motor performance was assessed by placing mice on a rotarod, and the number of falls in the subsequent 3 minutes was counted. (B, C) Anxiety-related behaviour was assessed by placing mice in the center of an EPM, and time and number of entries in the open arms were measured during 5 minutes. (D-E) Anxiety-related behaviour was assessed by placing mice in the center of a plexiglass open field box, and time and number of entries in the center were measured during 30 minutes. (F) In the previous open field test, the distance travelled in the center and the total distance travelled were measured and the percentage of distance travelled in the center over the total distance travelled was calculated. (G, H) Mixed anxio-depressive behaviour was assessed by the NSF test where starving mice are placed in a corner of a plastic box containing a pellet of food in the center. The latency to feed is timed. The data are presented with means +/- SEM and as a percentage of mice that did not feed per group during the 10 min of the test. (I) Depressive-like behaviour was assessed by the forced swim test (FST) where mice are placed into plastic buckets filled with water and the immobility durations were measured.

For all the tests, n=9-16 per group. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ for comparisons between genotypes for the same sex and # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,005$ for comparisons between sexes for the same genotype.

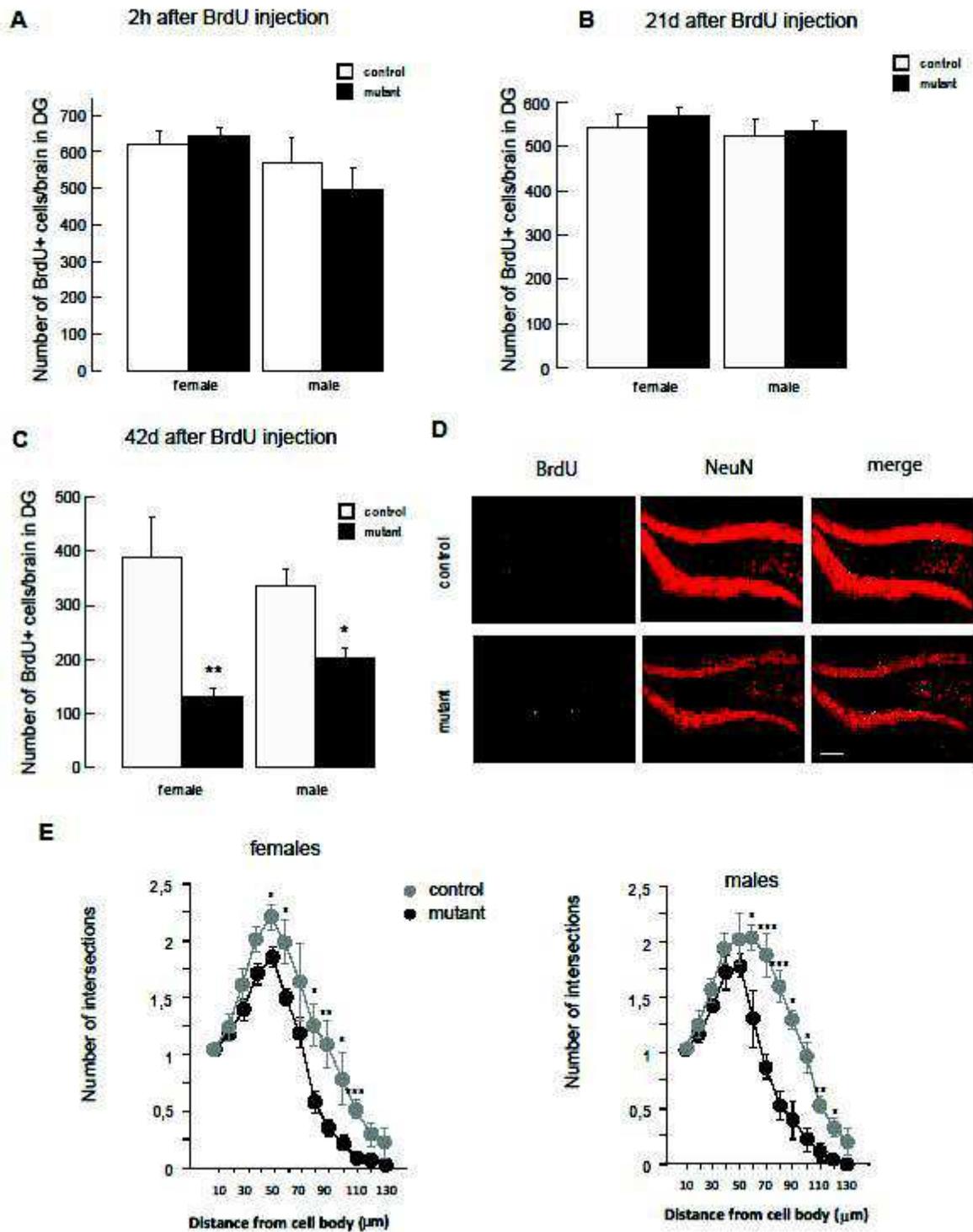


Figure 3 : Deletion of huntingtin in mature cortical and hippocampal neurons alters long-term survival and dendritic arborization of newborn hippocampal neurons

(A) BrdU was injected 2 h before sacrifice into mutant and control mice 6 months after being injected with tamoxifen. Immunofluorescence with an anti-BrdU antibody was performed. Data are the mean +/- SEM of the positive BrdU positive cell counts in DG from 3-4 brains per group. **(B)** BrdU was injected 21 days before sacrifice into mutant and control mice 6 months after being injected with tamoxifen. Immunofluorescence with an anti-BrdU antibody was performed. Data are the mean +/- SEM of the positive BrdU positive cell counts in DG from 3 brains per group. **(C)** BrdU was injected 42 days before sacrifice into mutant and control mice 6 months after being injected with tamoxifen. Immunofluorescence with an anti-BrdU antibody was performed. Data are the mean +/- SEM of the positive BrdU positive cell counts in DG from 3-4 brains per group. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. **(D)** BrdU (green) and NeuN (red) immunofluorescence in DG of control and mutant mice injected with BrdU 42 days before sacrifice into mutant and control mice 6 months after being injected with tamoxifen. Scale bar : 50 μm . **(E)** Sholl analysis was performed on 12 randomly chosen DCX positive neurons in DG of control and mutant mice (n=4-5 per group) 6 months after being injected with tamoxifen. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$

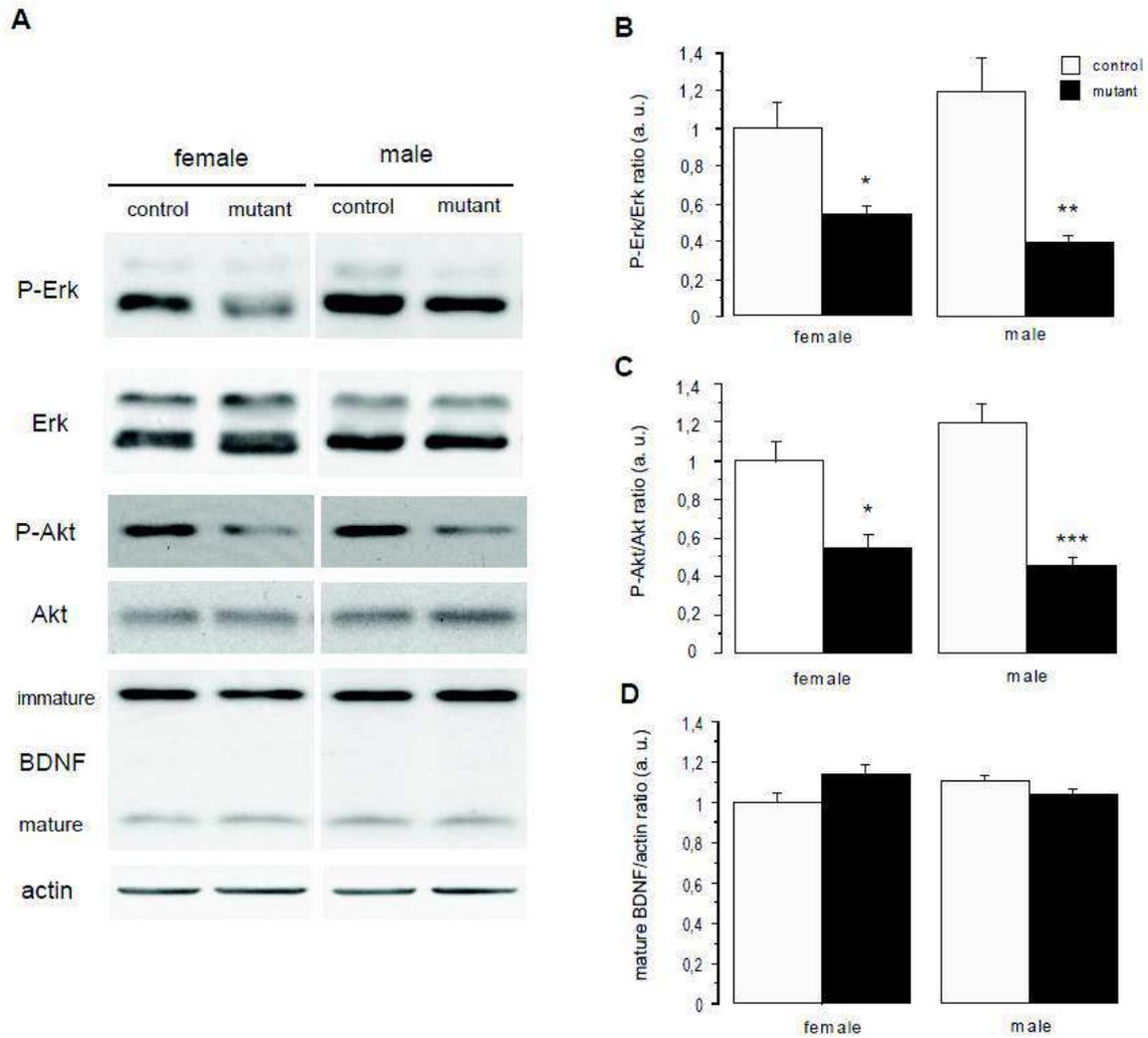


Figure 4 : Deletion of huntingtin in mature cortical and hippocampal neurons alters Akt and Erk phosphorylation status in hippocampus without affecting BDNF production

(A) Representative western-blot of hippocampal proteins extracted from mutant and control mice 6 months after being injected with tamoxifen incubated with phospho-ERK, ERK, phospho-Akt, Akt, BDNF or actin recognizing antibodies. (B-D) Data are the mean +/- SEM of the ratios phospho-ERK/ERK, phospho-Akt/Akt, mature BDNF/actin obtained by western-blot densitometric analysis, normalized so that the mean value of female controls is equal to 1 (n= 3-5 per group) * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,005

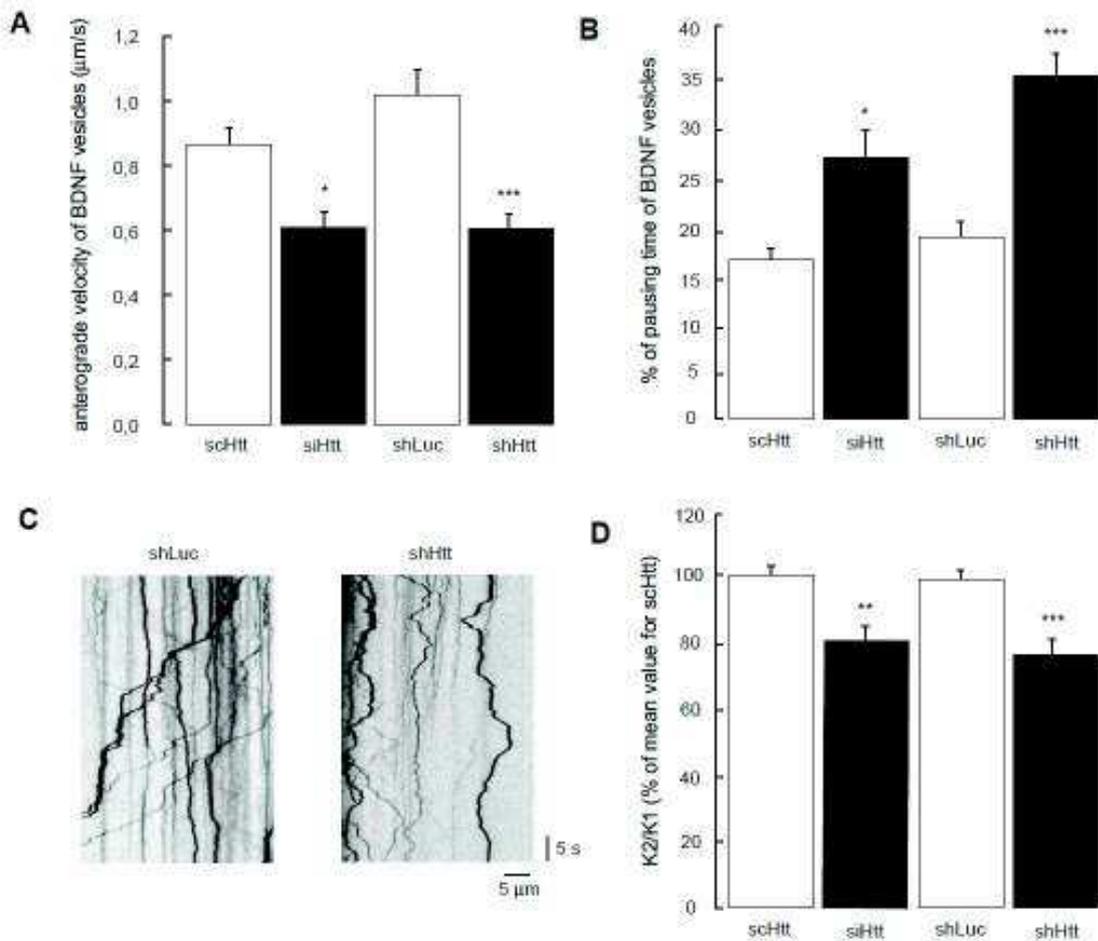
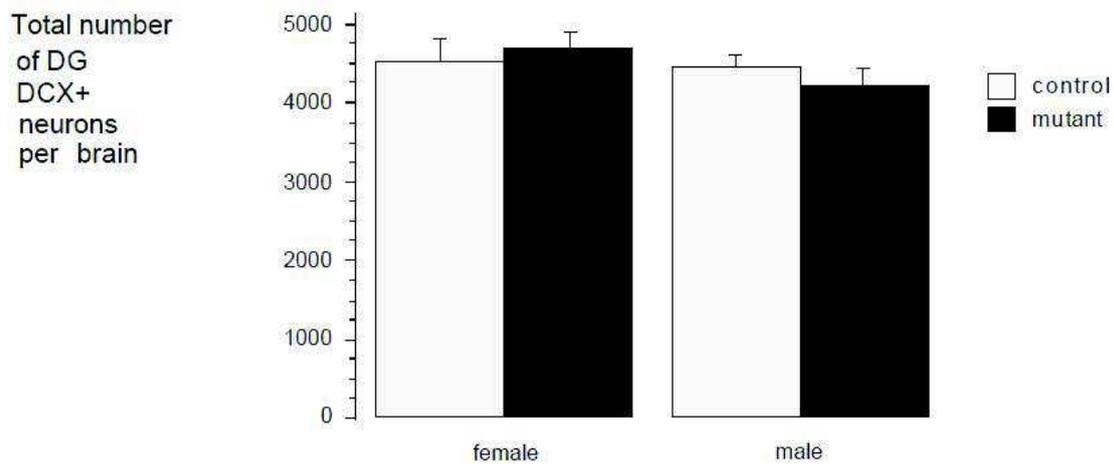


Figure 5 : Downregulation of huntingtin expression slows BDNF vesicular trafficking and downregulates BDNF secretion in hippocampal neurons

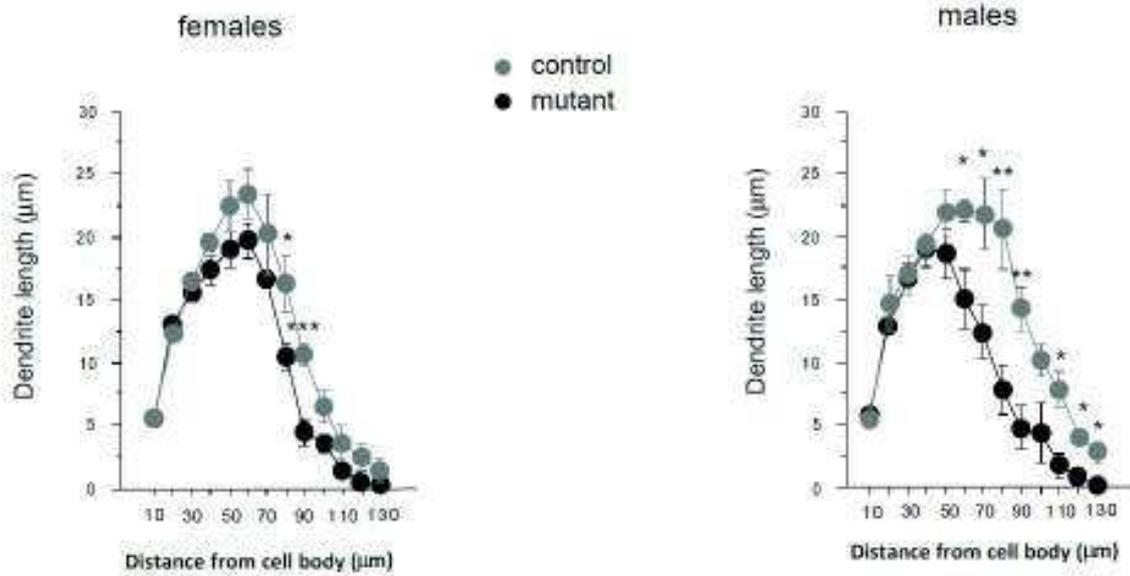
(A,B) Rat primary hippocampal neurons were electroporated with BDNF-mCherry and scrambled RNA (scRNA) or siRNA targeting Htt (siHtt) or shRNA targeting luciferase (shLuc) as a control or shRNA targeting Htt (shHtt). Three days later, the movements of BDNF containing vesicles were observed by videomicroscopy and analyzed with kymographs. Data are the mean \pm SEM of the anterograde velocity (A) or percentage of time a vesicle is pausing (velocity less than $0,05 \mu\text{m/s}$) (B) in 18-27 neurons per group analyzed in 3 independent experiments. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$ (C) Representative kymographs of BDNF-mCherry vesicles in primary hippocampal neurons expressing shLuc or shHtt. (D) Rat primary hippocampal neurons were electroporated with BDNF and scrambled RNA (scRNA) or siRNA targeting Htt (siHtt) or shRNA targeting luciferase (shLuc) as a control or shRNA targeting Htt (shHtt). Three days later, a first depolarization allowed the cellular release of BDNF in the medium (K1) and depleted the internal BDNF vesicular store. After 30 min of recovery, a second depolarization was applied and a new

sample of the medium was isolated (K2). Concentrations of BDNF in K1 and K2 samples were estimated by ELISA. Data are the mean \pm SEM of 3 independent experiments per group, normalized to the value obtained for the scHtt group. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,005$



Supplemental Figure 1: Total amount of DCX+ DG neurons is not affected by the deletion of huntingtin in mature cortical and hippocampal neurons

Floating slices of brains from control and mutant mice injected with tamoxifen 6 month ago were processed for immunohistochemistry with anti-DCX antibody and appropriate secondary antibody and treatments for DAB staining. The number of DCX+ neurons in DG was counted (n=3-4 per group).



Supplemental Figure 2: Length of dendrites of DCX+ hippocampal neurons is shortened by the deletion of huntingtin in mature cortical and hippocampal neurons

Sholl analysis was performed on 12 randomly chosen DCX positive neurons in DG of control and mutant mice 6 months after being injected with tamoxifen. The length of the dendrites between two concentric circles of the indicated radius centered on the cell body was measured. * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,005

Résultats principaux

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une extinction conditionnelle de la huntingtine dans le cortex et l'hippocampe des animaux *CaMKCreER^{T2}; Htt^{fllox/fllox}* adultes, et ce à différents niveaux. Les études comportementales ont révélé que la huntingtine sauvage exprimée chez les adultes était directement impliquée dans la régulation des comportements liés à l'anxiété, et ce de manière différentielle en fonction du sexe des animaux. Ainsi, l'extinction de HTT a un effet de type anxiolytique chez les animaux femelles, tandis que l'effet inverse est induit chez les mâles qui présentent un comportement de type anxieux.

Dans un second temps, nous avons voulu comprendre si l'altération comportementale était liée à un déficit de la neurogenèse dans l'hippocampe adulte. S'il s'avère que le knock-out inductible tissu-spécifique n'entraîne pas de déficit de prolifération, la survie cellulaire à long terme se trouve altérée. En effet, nous avons observé une diminution du nombre de nouveaux neurones 42 jours, mais pas 21 jours après leur naissance. La délétion conditionnelle de la huntingtine n'affecte pas la différenciation neuronale, puisque le nombre de cellules BrdU+/DCX+ et BrdU+/NeuN+ est inchangé. En revanche, une altération de la dendritogenèse est observée, avec des dendrites moins longues et aux ramifications moins complexes.

De manière surprenante, il est apparu que l'altération de la neurogenèse observée dans notre lignée de souris n'était pas causée par une diminution de l'expression du *bdnf*, qui est inchangée dans l'hippocampe. Cependant, il apparaît que la signalisation ou la fonctionnalité de TrkB sont altérées, avec une diminution de l'activation des kinases Erk et Akt situées en aval du récepteur TrkB. Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence des anomalies de transport et de relargage du BDNF dans les neurones de l'hippocampe lorsque l'expression de la huntingtine est diminuée. Ainsi, à la fois la vitesse du transport vésiculaire et l'exocytose du BDNF sont réduites.

Dans leur ensemble, ces données indiquent que l'expression de la huntingtine dans l'hippocampe est nécessaire au transport et à l'exocytose du BDNF, et à l'activation des voies de signalisation qui en découlent. Il semble également que le BDNF soit nécessaire à la survie et à la dendritogenèse neuronales, comme d'autres études l'ont suggéré auparavant. Ainsi la huntingtine contrôle la survie et la dendritogenèse des nouveaux neurones hippocampiques via le contrôle de la sécrétion de BDNF, et ce d'une manière non cellule-autonome. L'aspect surprenant de ce travail est qu'un même déficit au niveau moléculaire et tissulaire entraîne sur l'anxiété des effets comportementaux opposés selon les sexes.

Discussion des résultats

Comme chez les souris *Hdh^{Q111}*, on observe un effet sexe-spécifique sur le comportement des *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*. En effet, les mâles présentent un phénotype de type anxieux, ce qui est similaire aux observations faites chez les *Hdh^{Q111}*. En revanche, la délétion de la huntingtine a l'effet inverse chez les femelles, à la différence des *Hdh^{Q111}* qui ne présentent pas de phénotype lié à l'anxiété, mais un phénotype dépressif. Les souris femelles semblent ainsi bénéficier d'une relative protection vis-à-vis des comportements anxieux. En outre, il apparaît que l'expression de la huntingtine dans le cortex et l'hippocampe est liée à l'anxiété plutôt qu'à la dépression.

Nous observons chez les souris *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}* une altération des étapes de survie et de maturation de la neurogenèse, comme c'est le cas dans de nombreux modèles de HD (Duan et al., 2008; Fedele et al., 2010; Gil et al., 2005; Kandasamy et al., 2010; Kohl et al., 2007; Lazic et al., 2006; Orvoen et al., 2012; Phillips et al., 2005; Potter et al., 2010; Renoir et al., 2012; Simpson et al., 2011; Walker et al., 2011). Comme dans la lignée *Hdh^{Q111}*, nous n'observons pas d'altération de la prolifération cellulaire. La même observation est faite, notamment en fonction de l'âge, dans d'autres modèles de HD (Lazic et al., 2004; Phillips et al., 2005; Simpson et al., 2011). Les étapes de la neurogenèse défectueuses dans notre modèle sont les mêmes que celles révélées dépendantes du récepteur TrkB dans les jeunes neurones. En effet, la délétion de la forme pleine longueur de TrkB, responsable des effets biologiques du BDNF, dans les progéniteurs neuronaux adultes, induit un phénotype très proche du nôtre. Bergami et collaborateurs ont ainsi observé une réduction de la survie neuronale à long terme après l'induction de la délétion, et une architecture dendritique altérée (Bergami et al., 2008). En revanche, ni la croissance neuronale, ni la capacité à former des synapses ne sont modifiées dans ce modèle, indiquant que TrkB régule plutôt la complexité de l'arborisation dendritique et la formation des épines. Ces caractéristiques neurogéniques sont associées à un phénotype comportemental de type anxieux. Il est intéressant de remarquer que l'influence de la délétion de TrkB sur le comportement n'a lieu qu'une fois que les nouveaux neurones sont fonctionnellement intégrés. Les résultats de ce travail concordent avec les nôtres, et mettent ainsi en évidence l'importance du BDNF et de son récepteur TrkB sur les étapes de survie et de dendritogenèse de la neurogenèse, ainsi que leur influence sur le comportement lié à l'anxiété. Cela suggère également l'implication des neurones matures sur ces différents aspects.

De manière surprenante, il est apparu que l'altération de la neurogenèse hippocampique observée dans notre lignée de souris CamK n'était pas causée par une diminution de l'expression du BDNF, qui est inchangée dans l'hippocampe. En revanche, le transport et l'exocytose du facteur neurotrophique sont bien altérés dans notre modèle. Cela suggère que la quantité totale de BDNF n'est pas déterminante de ses effets sur la neurogenèse adulte, mais que c'est la quantité de BDNF « actif »,

c'est-à-dire déclenchant une cascade de signalisation, qui est importante. En effet, on observe dans l'hippocampe des animaux, que si la quantité de BDNF est inchangée, il y a une diminution des formes activées des intermédiaires Erk et Akt des cascades de signalisation en aval du récepteur TrkB. C'est cette activation moindre qui induirait les effets délétères sur la neurogenèse.

Une étude similaire sur une lignée de cellules souches neurales issues d'un modèle knock-in de la maladie de Huntington (souris *Hdh^{Q140}*) montre des résultats surprenants, à savoir une phosphorylation exacerbée de Akt (P-Akt/Akt augmenté) en conditions basales et suite à une stimulation par le BDNF (Ritch et al., 2012). L'augmentation de la phosphorylation induite par l'ajout de BDNF exogène a lieu dans les groupes contrôle et HD, mais est bien supérieure dans le système « pathologique ». Néanmoins, les neurones obtenus par la différenciation des cellules souches présentaient une architecture altérée, corroborant nos résultats. L'hypothèse proposée pour expliquer l'hyperactivation de la voie de signalisation Akt serait une adaptation des neurones à des quantités moindres de BDNF. Au demeurant, la phosphorylation basale de Akt paraît surprenante puisque les souris *Hdh^{Q140}* présentent *a priori* une faible expression de BDNF dans l'hippocampe (Simmons et al., 2009), bien que ce paramètre n'ait pas été exploré dans le travail de Ritch et collaborateurs. En outre, ce travail est réalisé *in vitro*, sur des cultures mises en place dans un environnement non physiologique. On peut donc estimer que notre étude, effectuée *in vivo*, est plus à même de décrire les mécanismes impliqués chez la souris.

Article 3

La huntingtine régule les comportements d'anxiété/dépression via le transport du BDNF et la neurogenèse hippocampique.

Karim Ben M'Barek, Sophie Orvoën, Patrick Pla, Caroline Benstaali, Juliette D. Godin, Marc-André Mouthon, François D. Boussin, Alain M. Gardier, Frédéric Saudou, Denis J. David, Sandrine Humbert

Soumis dans Neuron (Manuscrit S-12-01727)

Présentation de l'étude

La maladie de Huntington est un trouble neurodégénératif monogénique caractérisé par une triade de symptômes : moteurs, cognitifs et psychiatriques. Le gène responsable de cette pathologie code une protéine appelée huntingtine (HTT) et la mutation responsable de la maladie est une expansion anormale d'une répétition de glutamines en région N-terminale (polyQ-HTT). Les symptômes affectifs (anxiété et dépression) apparaissent tôt au cours de la pathogenèse, et cette caractéristique est également signalée dans des modèles murins de HD. Jusqu'à présent, les symptômes de la maladie ont été associés à un gain de fonction par le biais des mécanismes induits par la mutation polyQ. Dans cette étude, nous avons analysé la fonction de deux sites de phosphorylation de la huntingtine, les sérines 1181 et 1201, sur le phénotype anxio-dépressif de lignées murines.

Les travaux présentés dans cet article ont été réalisés en collaboration avec l'équipe « Signalisation, Neurobiologie et Cancer » dirigée par le Dr Sandrine Humbert de l'Institut Curie à Orsay. Une partie des expériences a été conduite au laboratoire de l'EA3544 (analyse comportementale, dosage du BDNF), et le restant a été réalisé au sein de l'Institut Curie, notamment la caractérisation du transport de BDNF et l'étude de la neurogenèse adulte. J'ai réalisé la caractérisation du phénotype comportemental, et le dosage par qPCR de l'expression de BDNF.

Huntingtin Mediates Anxiety/Depression-related Behaviors through Hippocampal Neurogenesis

Karim Ben M'Barek,^{1,2,3} Sophie Orvoen,^{4,7} Patrick Pla,^{1,2,3,5,7} Caroline Benstaali,^{1,2,3} Juliette D. Godin,^{1,2,3} Marc-André Mouthon,⁶ François D. Boussin,⁶ Alain M. Gardier,⁴ Frédéric Saudou,^{1,2,3} Denis J. David,⁴ and Sandrine Humbert^{1,2,3,*}

¹Institut Curie, ²CNRS UMR 3306, ³INSERM U1005, Orsay F-91405, France.

⁴Univ Paris-Sud, EA3544, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

⁵Univ Paris-Sud, Orsay F-91405, France

⁶CEA, DSV IRCM SCSR, Laboratoire de Radiopathologie, UMR 967, Fontenay-aux-Roses, France

⁷These authors contributed equally to this work

*Correspondence: sandrine.humbert@curie.fr

SUMMARY

Huntington disease (HD) is associated with early psychiatric symptoms including anxiety and depression. Here, we demonstrate that wild-type huntingtin, the protein mutated in HD, modulates anxiety/depression-related behaviors according to its phosphorylation at serines 1181 and 1201. Genetic phospho-ablation at serines 1181 and 1201 in mouse reduces basal levels of anxiety/depression-like behaviors. Focal γ -ray irradiation of the dentate gyrus impairs neurogenesis and anxiety/depression-related behavior in the Novelty Suppressed Feeding test, indicating that some of these behavioral effects depend directly on increased adult hippocampal neurogenesis. By improving the attachment of molecular motors to microtubules, huntingtin dephosphorylation increases axonal transport of BDNF, a crucial factor for hippocampal adult neurogenesis. Consequently, the huntingtin-mediated increased BDNF dynamics lead to an increased delivery and signaling of hippocampal BDNF. These results support the notion that huntingtin participates in anxiety and depression-like behavior and is thus relevant to the etiology of mood disorders and anxiety/depression in HD.

Running title

Huntingtin modulates anxiety/depression-like behaviors

INTRODUCTION

Depression is a major public health problem worldwide as it is the most prevalent mental illness (Krishnan and Nestler, 2008). The molecular basis of this heterogeneous disorder is still not fully understood. Depression frequently exhibits comorbidity with anxiety and neurodegenerative conditions (Krishnan and Nestler, 2008). Huntington disease (HD) is a devastating neurodegenerative disorder, involving severe cognitive deterioration and motor impairment. Mood disorders including anxiety and depression are also prevalent components of HD (Duff et al., 2007; Kirkwood et al., 2001): they may be present early in the disease progression, prior to the diagnosis and preceding chorea by ten years or more. The etiology of these symptoms in HD is not known.

The mutation that causes HD is an abnormal expansion of a polyglutamine (polyQ) stretch in the protein huntingtin (HTT). Given the mean age of onset at 40 years old and the characteristic neuronal dysfunction and death of adult neurons, most studies have focused on the toxic pathways elicited by polyQ-HTT in post-mitotic neurons. However, it is now established that HD pathology is due to both the loss of the normal function(s) of wild-type HTT and the gain of new toxic functions of polyQ-HTT. Striking genetic evidence come from studies showing that the inactivation of wild-type HTT in adult mice leads to neurodegeneration with features of HD pathology (Dragatsis et al., 2000). In addition, wild-type HTT is an essential protein. It is required for embryonic development as the inactivation of the IT15 gene (encoding HTT) is lethal in mice (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; White et al., 1997; Zeitlin et al., 1995). More specifically, studies showed that HTT is important for the formation of the nervous system and embryonic neurogenesis *in vivo*. Mice producing less than 50% of the normal amount of wild-type HTT develop masses of ectopic differentiated neurons in the striatum (White et al., 1997). Work with chimeric embryos, in which a limited number of cells are depleted of HTT, showed that the protein is essential for

the differentiation of neuroblasts in the regions of the striatum, cortex and thalamus (Reiner et al., 2001). The specific invalidation of HTT in cortical progenitors promotes neuronal differentiation at the expense of maintaining them in a proliferative state (Godin et al., 2010), demonstrating an essential role of HTT in embryonic cortical neurogenesis. However, nothing is known about the role of this essential protein during adult neurogenesis.

Several studies have documented a connection between mood disorders and hippocampal neurogenesis. The neurogenesis hypothesis of depression postulates that a decrease in the production of newborn granule cells in the dentate gyrus is related to the pathophysiology of major depressive disorders, whereas enhanced hippocampal neurogenesis is required for antidepressant treatment to be beneficial (Petrik et al., 2012; Samuels and Hen, 2011). In line with this hypothesis, mice administered chronic corticosterone show decreased neurogenesis associated with behavioral abnormalities indicative of anhedonia and hopelessness, mimicking depressive symptoms observed in humans (David et al., 2009). The hippocampus is thus a target for stress hormones and exerts, through neurogenesis, a negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis leading to the buffering of stress responses by the newly generated neurons (Snyder et al., 2011). Conversely, chronic treatment with several classes of antidepressants increases adult neurogenesis specifically in the dentate gyrus of the hippocampus in rodents and human (Boldrini et al., 2012; Malberg et al., 2000; Perera et al., 2011; Santarelli et al., 2003). Indeed, studies have described a causative role for adult neurogenesis in the response to antidepressants in stress mouse models (David et al., 2009). However, it remains to be established whether increased neurogenesis *per se* reduces depressive behavior.

The brain-derived neurotrophic factor BDNF is at the crossroads of depression and neurogenesis. While its expression is reduced by stress and in major depression disorder, it is induced by antidepressant treatment (Autry and Monteggia, 2012). Part of the effects of

BDNF in the regulation of mood disorders has been linked to hippocampal neurogenesis. More specifically, BDNF regulates dendritic maturation and survival of newly generated neurons in the dentate gyrus of the hippocampus (Krishnan and Nestler, 2008). BDNF is also a key factor in HD. BDNF is absolutely required by striatal neurons, the most affected neurons in HD, to survive and differentiate. However, the local striatal production of BDNF is not sufficient (Baquet et al., 2004), and BDNF is provided to the striatal neurons by cortical neurons through axonal transport. Interestingly this microtubule (MT)-based transport depends on HTT and is altered in HD resulting in decreased neuronal survival (Gauthier et al., 2004).

We previously identified two cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) phosphorylation sites on HTT: serines 1181 and 1201 (S1181/1201) (Anne et al., 2007). While phosphorylation at these sites is important to regulate oxidative stress- and polyQ-HTT mediated toxicity in rat neuronal cultures, their function in physiological conditions is not known (Anne et al., 2007). We therefore studied the consequences of the absence of, and constitutive, phosphorylation at these sites in the mouse. We report that the absence of phosphorylation of wild-type HTT at S1181/1201 reduces basal levels of anxiety/depression-like behaviors through increased hippocampal neurogenesis. These findings demonstrate that wild-type HTT itself participates in adult neurogenesis, with phosphorylation at S1181/1201 being key regulatory events, and with consequences for anxiety and depression states.

RESULTS

Generation of *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} Mice

We used homologous recombination to generate knock-in mice in which the codons for serines at positions 1181 and 1201 of the gene encoding mouse HTT (*Hdh*) were replaced by codons for alanine (*Hdh*^{S1181A/S1201A}) or aspartic acid (*Hdh*^{S1181D/1201D}; Figure 1A). Using expression of exogenous Cdk5, and inhibition of endogenous Cdk5 by RNA interference or pharmacological approaches in primary cultured neurons, we have previously shown that these substitutions mimic the absence of phosphorylation and constitutive phosphorylation of HTT by Cdk5 on these sites (Anne et al., 2007). Genomic DNA from homozygous knock-in mice from each genotype was sequenced to confirm the replacement of the AGT codons by the GCT codons (*Hdh*^{S1181A/S1201A}) and by the GAT codons (*Hdh*^{S1181D/1201D}; Figure 1B). Wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice can be discriminated by genotyping with specific primers recognizing sequences around the residual intronic LoxP sequence (Figure 1C).

We evaluated the phosphorylation of HTT at serines 1181 and 1201. Lysates were prepared from adult cortices from the mice of the three genotypes, and HTT was immunoprecipitated and analyzed by immunoblotting with two phosphorylation state-specific polyclonal antibodies. Anti-P-HTT-S1181 specifically recognizes phosphorylated serine 1181 and anti-P-HTT-S1201 specifically recognizes phosphorylated serine 1201 (Anne et al., 2007). Both antibodies recognized HTT in wild-type mouse extracts showing that HTT is phosphorylated at these sites in the cortex of adult mouse (Figure 1D). Neither anti-P-HTT-S1181 nor anti-P-HTT-S1201 detected HTT immunoprecipitated from *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} cortical extracts. This is in agreement with our previous findings that an N-terminal 1301 amino-acid fragment of wild-type HTT with S1181D/1201D mutations is not

recognized by the specific phospho-antibodies (Anne et al., 2007). Similar results were obtained using striatal and hippocampal extracts (not shown). These results demonstrate that serines 1181 and 1201 are phosphorylated in the brain of adult wild-type mice, and are modified in *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice.

***Hdh*^{S1181A/S1201A} Mice Show Reduced Anxiety and Depression-Related Behavior**

Hdh^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice are viable, fertile and do not show a motor phenotype (Figure S1A). To investigate their anxiety/depressive-like state, we applied standardized behavioral tests routinely used to evaluate the efficacy of anti-depressive drugs on mice suffering from depression-related behavior (David et al., 2009). We tested the behavior of wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice in the open field paradigm (OF). *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice spent more time than wild-type mice in the center, indicating less anxiety (Figure 2A). *Hdh*^{S1181D/S1201D} behaved in the same way as wild-type mice. The ratio of total distance moved in the center to total distance moved was higher for *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice (Figure 2A and Figure S1B). This demonstrates that the absence of phosphorylation of HTT at serines 1181/1201 reduces the anxiety-like phenotype in mice without affecting locomotor activity. Similarly, in the novelty suppressed feeding test (NSF), the latency to feeding was shorter for *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice (Figure 2B), with no confounding feeding effect (Figure S1C).

We also evaluated the grooming behavior, that is an index of a depressed-like state (Surget et al., 2008). After a 10% sucrose solution was sprayed on the mouse snout, *Hdh*^{S1181A/S1201A} spent more time grooming than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice (Figure 2C).

There was no difference between female and male behavior, for each genotype, in any of the behavioral tests. Collectively, these various findings show that abolition of HTT

phosphorylation at S1181/S1201 reduces both anxiety and depression-related behavior in mice.

Ablation of HTT Phosphorylation at S1181/S1201 Promotes Survival and Maturation of Newborn Neurons in the Hippocampal Dentate Gyrus

The hippocampus is important for the regulation of mood disorders and hippocampal neurogenesis is involved, at least in part, in the regulation of the response to antidepressants (reviewed in (Samuels and Hen, 2011)). We analyzed neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus in 14 week-old animals that had performed the behavioral tests. We first estimated the number of proliferating cells using Ki67. We did not observe any differences in the numbers of proliferating cells in the dentate gyrus between the different genotypes (data not shown). We next assessed the survival rate of newly generated neurons by labeling with the thymidine analog bromodeoxyuridine (BrdU) (Figure 3A). The number of newborn cells surviving three weeks after BrdU administration in the dentate gyrus was higher in the hippocampi of *Hdh*^{S1181A/S1201A} than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} animals.

We then quantified the number of doublecortin (DCX)-positive neurons: DCX is produced by neuronal progenitors and immature neurons and is a marker for adult neurogenesis. We found no differences between the quantities of new immature DCX-positive neurons produced in the three genotypes (Figure 3B). We then analyzed the DCX-positive neurons according to the degree of complexity of their dendrites (Orvoen et al., 2011) (Figure 3C). There were more DCX-positive neurons with quinary dendrites and a higher maturation index in *Hdh*^{S1181A/S1201A} than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} animals. Thus, to further examine this latest effect, we performed a Sholl analysis to study dendritic arborization of DCX-positive neurons (Figure 3D). Sholl analysis quantifies dendritic complexity and growth according to the distance from the soma by considering concentric circles around the soma

(Sahay et al., 2011; Wang et al., 2008). The numbers of intersections at 60-140 μ m from the soma (left graph) and dendritic length (right graph) were both higher in *Hdh*^{S1181A/S1201A} than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice.

These data show that the presence of a non phosphorylatable HTT at positions S1181/S1201 is associated with greater neurogenesis due to increased survival and dendritic maturation of the newborn neurons in the dentate gyrus of the adult hippocampus.

The Behavioral Effect in the NSF Test Induced by the Absence of Huntingtin Phosphorylation is Neurogenesis-Dependent

We investigated the relationship between hippocampal neurogenesis in *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice and their behavior. We abolished hippocampal neurogenesis in these animals using γ -ray irradiation (Lazarini et al., 2009). The *de novo* production of neurons was completely inhibited, as assessed by DCX labeling 8 weeks later (Figure S2). At this time point, we tested the effect of impaired adult neurogenesis on behavior. These tests were performed 8 weeks after irradiation to avoid any nonspecific effects due to inflammation (Lazarini et al., 2009). In the OF paradigm, the complete loss of hippocampal neurogenesis had no effect on the total time spent in the center by the *Hdh*^{S1181A/S1201A} animals (Figure 3E). In sharp contrast, the latency to feeding in the NSF test was longer for the irradiated *Hdh*^{S1181A/S1201A} than non-irradiated *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice (Figure 3F). This agrees with previous reports showing that hippocampal neurogenesis is specifically associated with the behavioral response to antidepressants only as assessed in the NSF assay (David et al., 2009; Perera et al., 2011; Surget et al., 2008).

Taken together these results demonstrate that at least part of the behavioral effects of the expression of an unphosphorylated HTT at S1181/S1201 are mediated through a hippocampal neurogenesis-dependent mechanism.

BDNF Levels and Induced-Signaling are Increased in the Hippocampus of *Hdh*^{S1181A/S1201A} Mice

Given that the absence of phosphorylation of HTT at S1181/1201 leads to increased maturation and survival of hippocampal neurons, we evaluated BDNF levels and signaling in the hippocampus of mice of the three genotypes. Indeed, BDNF is a key factor regulating dendritic maturation and survival of newly generated neurons in the dentate gyrus of the hippocampus (Krishnan and Nestler, 2008). We first assayed BDNF protein by ELISA in hippocampal extracts (Figure 4A). Total BDNF protein abundance, including both pro-BDNF and mature BDNF, was significantly greater in *Hdh*^{S1181A/S1201A} than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice. We used immunoblotting to discriminate between pro-BDNF and mature BDNF in hippocampal extracts of wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice (Figure 4B). The mature-BDNF/pro-BDNF ratio was very much higher in *Hdh*^{S1181A/S1201A} hippocampal protein extracts.

To determine whether BDNF production was efficiently converted into signaling, we studied the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. This pathway is elicited by BDNF and plays a role in adult neurogenesis (Cohen and Greenberg, 2008). Binding of BDNF to its receptor, the tropomyosin-related kinase receptor type B TrkB, results in the sequential activation of Erk and the cAMP responsive element binding protein (CREB). We therefore used immunoblotting to evaluate the levels of total and activated Erk and CREB in hippocampal extracts from the three mouse lines (Figure 4C). The ratio of active to total amounts of these targets was significantly higher in *Hdh*^{S1181A/S1201A} than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mouse lines. Therefore, BDNF production and activation of Erk and CREB are elevated in the hippocampus of *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice.

Unphosphorylated HTT Increases BDNF Transport and Release

We investigated the mechanisms by which HTT phosphorylation status at S1181/S1201 affects on BDNF. One key event in the regulation of BDNF signaling is its MT-based vesicular transport, a process facilitated by HTT (Caviston et al., 2007; Gauthier et al., 2004). We therefore tested the consequences of phosphorylating HTT at S1181/S1201 on BDNF trafficking by expressing constructs encoding the N-terminal 1301 amino acids of wild-type HTT with either intact S1181/S1201, or S1181A/1201A or S1181D/1201D mutations (HTT-1301; HTT-1301-S1181A/S1201A; HTT-1301-S1181D/S1201D; Figure 5A). These constructs contain the domains required for the interaction between HTT and molecular motors, and increase axonal transport when expressed in neurons (Caviston et al., 2007; Pardo et al., 2010). To ensure that the observed effects were due solely to the ectopic expression of the various constructs and their different S1181 and S1201 status, we used primary cultures of rat hippocampal neurons in which endogenous HTT was silenced using small interfering RNA (siRNA). The expression of these constructs was not affected by the siRNA used because it targets a different portion of the HTT gene. Neurons were also co-electroporated with BDNF-mCherry and plated in microchambers derived from a previously described microfluidic culture platform (Taylor et al., 2005). Our device contains channels that are 5 μm wide, 450 μm long and three μm high, and allows central nervous system axons to grow into a fluidically isolated environment free of any chemoattractants or trophic factors. Embryonic rat cortical neurons can extend long processes into the channels, but only axons can reach the distal chamber located 450 μm away from the proximal chamber containing the cell bodies and most of the dendrites. After four days of neuron culture *in vitro*, we quantified the movements in the distal part of the microchamber as anterograde and retrograde according to their direction relative to the cell bodies.

Both anterograde and retrograde velocities of BDNF vesicles were higher for HTT unphosphorylated at S1181/S1201 than for HTT with intact serines or S1181D/1201D substitutions (Figure 5A). We next used a BDNF release assay that is strictly dependent upon BDNF transport to test the ability of neurons to release BDNF (Gauthier et al., 2004). BDNF release was measured by ELISA after two successive KCl-induced depolarizations (K1 and K2). The first depolarization allowed the release of the readily releasable pool at the membrane, and the second that of the pool reconstituted through MT-based transport. K2 is thus a measure of transport-dependent release. Neurons were co-electroporated with siRNA targeting endogenous HTT, BDNF and the constructs encoding HTT-1301, HTT-1301-S1181A/S1201A or HTT-1301-S1181D/S1201D. The transport-dependent release by neurons expressing unphosphorylatable HTT was higher than that by neurons expressing HTT or HTT-S1181A/1201D (Figure 5B). Thus, BDNF transport and subsequent release are increased when HTT is unphosphorylatable at S1181/S1201.

We then evaluated BDNF transport and release in more physiological conditions. Primary cultures of newborn cortical neurons from wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/S1201D} mice were electroporated with BDNF-mCherry and the dynamics of BDNF-mCherry-containing vesicles studied as described for Figure 5A (Figure 5C and Movies S1-S3). When endogenous HTT was not phosphorylated, transport of BDNF increased: anterograde and retrograde velocities of BDNF vesicles were higher in *Hdh*^{S1181A/S1201A} neurons than controls, and the percentage of vesicles pausing was lower. Kymographs generated from the video recordings illustrated these findings (Figure 5D). We also investigated the subsequent release of BDNF upon mutation of endogenous HTT and observed greater transport-dependent BDNF release by *Hdh*^{S1181A/S1201A} neurons than wild-type and *Hdh*^{S1181D/S1201D} neurons (Figure 5E).

These experiments demonstrate that BDNF transport and subsequent release are significantly modified by the S1181/S1201 phosphorylation status of HTT.

Unphosphorylated HTT Increases the Attachment of Motor Proteins and BDNF Vesicles to Microtubules

HTT promotes BDNF MT-dependent transport by scaffolding motor proteins on MTs (Colin et al., 2008; Gauthier et al., 2004). We assessed whether the phosphorylation status of HTT affects the interactions between dynein/dynactin and MTs. We fractionated the subcellular components of HeLa cells expressing HTT-1301, HTT-1301-S1181A/S1201A or HTT-1301-S1181D/S1201D and obtained MT and cytosolic fractions (Figure 6A). Immunoblotting analyses (left) and corresponding quantifications (right) revealed that the levels of HTT, the p150^{Glued} subunit of dynactin, and dynein were higher in the MT fraction of cells expressing HTT-1301-S1181A/S1201A than in MT fractions of cells expressing HTT-1301 or HTT-1301-S1181D/S1201D.

We also co-expressed constructs encoding BDNF with HTT-1301 or HTT-1301-S1181A/S1201A or HTT-1301-S1181D/S1201D (Figure 6B). We immunostained the cells for α -tubulin and BDNF, and quantified the number of BDNF vesicles on MTs. The percentage of vesicles attached to MTs was significantly higher in cells expressing HTT-1301-S1181A/S1201A than in cells expressing HTT-1301 or HTT-1301-S1181D/S1201D (Figure 6B).

Together, these results provide strong evidence that the presence of S1181/S1201 unphosphorylatable HTT leads to the recruitment of dynein/dynactin and BDNF vesicles to the MTs.

DISCUSSION

Huntingtin is a Central Player in the Function of Adult Tissues

The physiological functions of HTT in adulthood have been largely overlooked. The only study specifically addressing this aspect involved conditional genetic inactivation of *Hdh* under the control of the promoter of the gene encoding the α -subunit of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, *Camk2a* (Dragatsis et al., 2000). The conditional loss of HTT from the postnatal mouse forebrain and testis led to a degenerative neuronal phenotype and sterility. This work established that the function of HTT in adulthood may contribute to HD progression. Since then, there has been growing interest in the functions of the non-pathological HTT, although the involvement of these functions in an adult phenotype has not been addressed. Here, we provide a causal link between a function of HTT and a behavior. By studying the regulatory roles of HTT phosphorylation at S1181/1201, we show that HTT affects neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus and also anxiety and depression-like behavior in adult mouse. Our study thus further supports the idea that HTT has essential biological functions in the adult brain, that are perturbed during HD progression leading to specific pathological manifestations in patients.

Functions in neuronal transcription, intracellular dynamics, ciliogenesis and division have been attributed to HTT (Cattaneo et al., 2005; Caviston et al., 2007; Gauthier et al., 2004; Godin et al., 2010; Keryer et al., 2011). Therefore, HTT is implicated in central cellular pathways important in development, in adults and in disease processes. The molecular biology of HTT is complex, but consistent with HTT being a scaffold protein that coordinates diverse events at the cellular level. For instance, HTT binds to the dynein intermediate chain and to the p150^{Glued} subunit of dynactin via the huntingtin-associated protein 1 (HAP1) to regulate the intracellular trafficking of various organelles (Caviston et al., 2007; Engelender et

al., 1997; Gauthier et al., 2004; Li et al., 1998). Phosphorylation of S421 of HTT regulates the assembly of this complex, specifically favoring anterograde transport (Colin et al., 2008). The regulatory effect of S1181/S1201 applies to both anterograde and retrograde transport. This suggests that phosphorylating S421 and S1181/S1201 have differential consequences for the function of HTT as a dynein/dynactin scaffold. HTT is also involved in mitotic spindle orientation through the assembly of a dynein/dynactin complex also including NuMA, an essential component of the mitotic spindle poles (Godin et al., 2010). Finally, a recent report showed that association of HTT with dynein/dynactin and the pericentriolar protein 1 (PCM1) is essential to motile and primary cilia dynamics and function (Keryer et al., 2011).

Our study reinforces the idea that HD should not be solely viewed as a gain-of-function disease. The situation is more complex as most patients express not only one copy of the mutant huntingtin, but also half the amount of the wild-type protein. Work involving modulating the expression of mutant HTT at and for different times may help elucidate if and how mutant HTT specifically interferes with HTT-dependent functions and their contributions to HD pathogenesis.

Depression Symptoms in HD are Linked to Huntingtin Function

Typical symptoms of HD include involuntary choreiform movements, hypokinesia, cognitive deterioration and personality changes. Although chorea is the most prominent symptom in HD, psychiatric disturbances and personality changes are among the first to appear in patients. Depression is prevalent, and is often manifest before the diagnosis of the disease (Duff et al., 2007; Kirkwood et al., 2001). Duff and colleagues specifically showed that non-diagnosed HD carriers show greater levels of depression than expansion-negative at-risk individuals.

Several studies have now investigated how adult neurogenesis is affected in the brains of HD mouse models (for a review see (Gil-Mohapel et al., 2011). The functional consequences of these alterations have not been directly addressed, but it is tempting to speculate that a compromised neurogenic process might contribute, at least in part, to depression. Adult neurogenesis in two locations has been studied: the dentate gyrus of the hippocampus and the sub-ventricular zone (SVZ) adjacent to the lateral ventricles. Defects in the proliferation of progenitors, and differentiation and maturation of newborn neurons in adult HD mouse hippocampus have been reported. In contrast, no significant alteration in adult neurogenesis in the SVZ has been observed in the same mouse models. In contrast, in post-mortem samples from HD patients, adult neurogenesis in the SVZ is impaired, and there is greater than normal cell proliferation (Curtis et al., 2012; Curtis et al., 2003).

Thus, several studies have described parallel alterations in neurogenesis and specific early symptoms of depression and anxiety in HD. The underlying molecular mechanisms leading to these phenotypes are unknown. Here, we link HTT function in axonal transport of BDNF and in neurogenesis to depression, suggesting that the depressive behavior observed in patients is not just an epiphenomenon to a severe disorder with a fatal outcome, but the result of the modification in the biological function of HTT in the control of mood disorders.

Is Huntingtin a Target of Cdk5 in Neurogenesis and Anxiety/Depression related Behavior?

S1181/1201 are Cdk5 phosphorylation sites (Anne et al., 2007). Coherent with our results, a recent report suggests that Cdk5/p35 participates in depression-like behavior in rat through a neurogenesis-dependent mechanism. Cdk5 activity is induced in the hippocampus upon the chronic mild stress (CMS) procedure that leads to a depressive phenotype (Zhu et al., 2012).

The authors show that hippocampal Cdk5 activity is required to induce the CMS depressive-related behavior. Moreover, antidepressants decrease Cdk5 activity.

Cdk5 has been implicated in wide range of cellular mechanisms including those contributing to embryonic and adult neurogenesis (Jessberger et al., 2009; Su and Tsai, 2011). In the adult brain, Cdk5 regulates spine formation. Overactivation of Cdk5 leads to a transient increase in dendritic spine density in the adult hippocampus, followed by a reduction in spine formation (Fischer et al., 2005). Another study showed that inhibition of Cdk5 activity in newly generated neurons of the adult hippocampus interferes with the formation of mature spines (Jessberger et al., 2008). Interestingly, the genetic ablation of Cdk5 from hippocampal neurons specifically impacts on the survival and maturation of neurons, but not on their proliferation (Lagace et al., 2008).

What are the molecular mechanisms underlying the effects of Cdk5 in hippocampal neurogenesis and behavior in rodent models? BDNF-stimulated dendritic growth in cultured hippocampal neurons involves the phosphorylation of the BDNF receptor TrkB (Cheung et al., 2007), and regulation of HTT-mediated BDNF axonal transport by Cdk5 may also be involved. Cdk5 regulates both anterograde and retrograde axonal transport. Overexpression of Cdk5 in neuronal cells inhibits neurofilament axonal transport (Shea et al., 2004). Inhibition of Cdk5 in neurons leads to reduced kinesin (Morfini et al., 2004) and dynein-driven motility (Pandey and Smith, 2011). In particular, when the Cdk5 phosphorylation of NDEL1 - a protein interacting with LIS1 - is inhibited, transport of acidic organelles by dynein is reduced (Pandey and Smith, 2011).

Although Cdk5 is clearly involved in neurogenesis and axonal transport, the literature does not always fit with the absence of HTT phosphorylation - corresponding to low Cdk5 activity - leading to increased transport and neurogenesis. Several points have to be considered. The activity of Cdk5 depends on the direct binding of its activators p35 and p39.

In physiological or pathological conditions, there are several ways in which Cdk5 activity may be modulated, including its hyperactivation through the conversion of p35 to p25 by the calcium-dependent protease, calpain (Su and Tsai, 2011). Furthermore, the activity of Cdk5 is dynamic and may lead to transient and reversible effects (Fischer et al., 2005). Thus, the nature of the stimulus and of the Cdk5 complex assembled, and time- and space-related cues, may account for the differences observed. In our experimental system (this work and (Anne et al., 2007) using mouse models or cultured neurons, constitutively S1181/S1201 phosphorylated HTT behaves like the wild-type HTT. Possibly, HTT is constitutively phosphorylated by Cdk5, and it is the dephosphorylation event which is the critical switch leading to the dynamic regulation of induced molecular mechanisms.

Do HD and Mood Disorders Share a Common Pathway through HTT and Neurogenesis?

BDNF is a neurotrophin involved in mood disorders. BDNF is less abundant in postmortem tissue taken from patients with major depression disorder and in the serum of patients with major depression disorder than controls (Autry and Monteggia, 2012). Most effective treatments of depression stimulate BDNF production; they include electroconvulsive therapy, classical antidepressant drugs and repetitive transcranial magnetic stimulation. Patients treated with antidepressants long-term show increased levels of BDNF in their serum and hippocampus (Duman and Monteggia, 2006). BDNF is essential for adult neurogenesis in the hippocampus where it specifically increases maturation and survival of the newly generated neurons (Krishnan and Nestler, 2008; Scharfman et al., 2005). It is less clear whether BDNF has a role in cell proliferation. This may be because progenitors are more likely to express TrkB as their morphology become more mature (Donovan et al., 2008). Note that in our *Hdh*^{S1181A/S1201A} mouse line, neuronal maturation and survival is greater than in controls but no

effect on proliferation was detected. This underlines the specific effect of unphosphorylatable HTT on BDNF.

BDNF is also a key factor in HD. Its MT-based transport from the cortex to striatum depends on HTT and is altered in HD (Gauthier et al., 2004). Here we also show that the function of HTT in MT-based transport is important locally in the hippocampus where BDNF is produced at high levels (Tokuyama et al., 1998).

Using ablation by irradiation and a genetic mouse model, we unequivocally show that hippocampal neurogenesis is sufficient and required for the effect observed in the NSF paradigm. However, in agreement with other reports, ablating neurogenesis had no effect in the OF (David et al., 2009; Perera et al., 2011). We do not exclude the possibility that HTT is involved in mood disorders through pathways other than hippocampal neurogenesis. The hypothalamo-pituitary-adrenal HPA axis plays a role in the pathogenesis of mood disorders (de Kloet et al., 2005; Frodl and O'Keane, 2012). Functional changes in the HPA axis have been reported to be associated with major depressive disorders leading to abnormally elevated levels of cortisol. Exposure to corticosterone is used in rodents to induce anxiety/depression-related behavior, consistent with this finding. The HPA axis is impaired early during HD and cortisol secretion is higher in patients than controls (Aziz et al., 2009; van Duijn et al., 2010). Whether this dysfunction is linked to a normal function of HTT and whether it is relevant to mood disorders in HD patients remain to be established.

Several classes of drugs with antidepressant activity have been developed. Nevertheless, many patients do not respond to the molecules currently available and for many others, the effects are incomplete (Kupfer et al., 2012). As a consequence, new classes of antidepressant need to be developed and this will inevitably require a sound understanding of the neurobiological basis of this complex disease. The observation that HTT is a determinant of mouse anxiety/depression-related behavior, identifies HTT as a component of the pathways

regulating mood disorders. Our work thus suggests that it may constitute a novel target for therapy for anxiety and depression not only in HD but also in mood disorders.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Statistical Analyses

Statview 4.5 software (SAS Institute Inc.) was used for statistical analysis. Data are expressed as mean \pm S.E.M. Complete statistical analyses may be found in Supplemental Information.

Generation of Mutant Mouse Lines

Hdh^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mutant mouse lines were established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute, Illkirch, France; <http://www-mci.u-strasbg.fr>). The targeting vectors were constructed as follows. A 0.7 kb fragment encompassing the two mutations in exon 27 was amplified by PCR using 129S2/SvPas DNA as a template and subcloned in an MCI proprietary vector resulting in step 1 vectors. These MCI vectors had a floxed Neomycin resistance cassette. The two 3' and 5' homology arms were subsequently subcloned in step1 plasmid to generate the final targeting construct. The linearized constructs were electroporated in 129S2/SvPas mouse embryonic stem (ES) cells. After selection, targeted clones were identified by PCR using external primers and further confirmed by Southern blot with 5' and 3' external probes. Positive ES clones were injected into C57BL/6J blastocysts, and male chimaeras derived gave germline transmission.

All experiments were carried out with homozygous *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice derived from heterozygous crosses. Littermates were kept in 12/12 hours of light/dark cycle on plastic cages, and allowed to eat and drink *ad libitum*. BrdU (150mg/kg) was injected twice daily (morning and afternoon) during 3 days by intra-peritoneal injections. Mice were sacrificed 3.5 weeks following the last injection.

All experiments were performed in strict accordance with the recommendations of the European Community (86/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care and use of laboratory animals (permissions 91-448 to S.H. and 92-256B to D.J.D).

Genotyping

DNA was prepared from tails biopsies from mutant mice. Mutated regions containing LoxP sequence were genotyped using 5'-GCACCCAGAGAACTCCTCCC-3' and 5'-CCTTCTCTTAGAGGGGACATGGC-3' primers for *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice, and 5'-CTTGTTCTCCAGGTTCTTTCTCCTTCC-3' and 5'-CATATTGGAGAGCATGGGTCACATCTGG-3' primers for *Hdh*^{S1181D/1201D} mice in Thermopol buffer (Biolabs), 200 μM dNTPs, 1μM of primers and 5U/μL Taq DNA polymerase (Biolabs). Cycling conditions were 3 min at 94°C, 2 x (1 min at 94°C; 1 min at 62°C; 1 min at 72°C), 30 x (30 sec at 94°C; 30 sec at 62°C; 30 sec at 72°C), 3 min at 72°C. PCR products were separated on a 2% agarose gel to distinguish wild-type from mutant band.

Sequencing

Sequencing was carried on by MWG operon (France) from PCR products purified using Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). The sequences obtained were aligned to huntingtin gene sequence from PubMed with the Serial cloner 2.0 software (available at http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html).

Behavioral Testing

Behavioral testing was performed as described (David et al., 2009).

Focal γ -ray irradiation

Irradiation was performed using a medical Alcyon irradiator (γ -rays ^{60}Co) (Lazarini et al., 2009). Mice were anaesthetized and placed on a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA). Animals were protected by two shields of a total 10 cm thickness. The second shield had a 3x11mm opening to allow the focal irradiation of the hippocampal region, which was determined between interaural 0.00 and +3.00. Three irradiation sessions with a 5 Gy dose at 1 Gy/min each, were conducted at day 1, 3 and 5.

Immunohistochemistry

Mice were anesthetized with ketamine (250mg/mL; 100 μ L/10g body weight) by intraperitoneal injections. Mice were then perfused with a saline solution and, after complete blood clearing, by paraformaldehyde (PFA) 4%. Brains were removed and kept in PFA 4% overnight. They were then cryoprotected in 30% sucrose. Frozen blocks were sectioned at 35 μ m and slices were kept free-floating in PBS with 0.1% azide. Serial sections were made, each one covering the whole hippocampus.

For BrdU immunostaining, slices were first treated using 0.01M citric acid. Peroxydase was quenched by 0.3% H_2O_2 in 0.1M TBS. Slices were then permeabilized with 0.1% trypsin in 0.1M Tris HCl with 0.1% CaCl_2 , and transferred in 2N HCl solution. Slices were blocked with 10% normal donkey serum (NDS) in PBS 0.5% tween 20. They were incubated with rat anti-BrdU Antibody (AbD Serotec) in blocking solution overnight. Secondary biotinylated donkey anti-rat was used and revelation was performed using Vector ABC Elit kit and Vectastain DAB kit. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in ethanol, delipidated in xylene and mounted with entellan.

For doublecortin (DCX) immunostaining, slices were washed with 0.1M TBS. Peroxydase were quenched by 0.3% H₂O₂ in 0.1M TBS. Slices were blocked with 10% NDS in 0.1M TBS with 0.5% triton X100. Slices were then incubated overnight at 4°C in blocking solution containing goat anti-DCX antibody (Santa Cruz). After washing, slices were incubated with biotinylated donkey anti-goat. Revelation was performed as described for BrdU immunostaining and sections were dehydrated and mounted as before.

For Sholl Analysis, DCX-positive cells with tertiary, relatively untruncated dendritic branches were traced for each 35 µm hippocampal slice using NeuroLucida software (MicroBrightField, Williston, VT) on an Olympus BX51 microscope equipped with a motorized stage device and x100 immersion oil objective. DCX immunohistochemistry was done to maximize the labelling of dendrites. Sholl analysis for dendritic complexity was performed using the accompanying software (NeuroExplorer; MicroBrightField, version 10), calculating dendritic complexity including dendritic length and number of intersections (branch points). All samples were number coded, and analysis was done blind to treatment.

Immunoblotting, Immunoprecipitation

Mice were sacrificed by cervical translocation. Brains were removed and hippocampi were collected and frozen in liquid nitrogen. Hippocampi were lyzed in 50mM Tris HCl, 2mM EGTA, 10mM Beta-mercaptoethanol 0.1% (v/v), 10 µg/mL aprotinine, 10 µg/mL leupeptine, 1mM sodium orthovanadate. Primary antibodies used in this study are as follows: anti-huntingtin (HU-4C8-As, Euromedex; D7F7, Cell signaling; P-HTT-S1201 and P-HTT-S1181 (Anne et al., 2007)), anti-alpha-tubulin (clone DM1A, Sigma), anti-BDNF (Santa Cruz), anti-CREB and anti-pCREB (phospho-Ser133, Cell Signaling), anti-ERK and anti-pERK (p42/p44, phospho-Thr202/Tyr204 Cell Signaling). HRP-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories.

For immunoprecipitation, protein G-Sepharose beads (Sigma) were incubated overnight with anti-HTT antibodies (4C8 or D7F7). Beads conjugated to 4C8 were incubated 5 hours with brain lysates, washed and analyzed by immunoblotting.

Videomicroscopy Experiments and Analyses

Rat primary hippocampal neurons and P0 cortical primary neurons from mice of various genotypes were prepared as previously described (Anne et al., 2007) and electroporated with rat or mouse neuron Nucleofector (Amaxa), respectively. Neurons were electroporated as indicated with BDNF-mCherry (Zala et al., 2008); HTT-1301; HTT-1301-S1181A/S1201A; HTT-1301-S1181D/S1201D constructs (Anne et al., 2007) and a siRNA (UUACUGUCUACUGGAUUCATT annealed with UGAAUCCAGUAGACAGUAATT) that targets a sequence outside the region coding the N-terminal 1301 amino acids of HTT.

One million neurons were plated in the upper chambers of dual microchambers coated with a mixture of poly-D-lysine (0.5 mg/ml) + laminin (10 µg/ml) and cultivated 5 days in Neurobasal supplemented with 2% B27, 1% Glutamax and 1% Penicillin/streptomycin.

For microchamber fabrication, master was made with SU8 resin on silicon wafer using photolithography (Taylor et al., 2005). Fabrication was done in two steps: a first layer for the microchannels (3 µm high) being crossed by neuronal processes, a second layer for the chamber (50 µm high) where cell bodies are seeded. Replicates of the master were made with epoxy resin. A mixture of silicone elastomer (PDMS, Sylgard 184, Dow corning) and its curing agent was poured on the masters. Air bubbles were removed in a dessicator under vacuum during 1 h and polymerization was performed by incubating 3 h at 60°C. PDMS microchambers and Iwaki boxes with a glass bottom were placed into a plasma cleaner for surface activation during 30 seconds. After a rapid passage at 60°C, PDMS pieces and Iwaki boxes were brought together to form an irreversible tight seal. The microfluidic devices were

coated with a mix of poly-D-lysine (0.5 mg/ml) + laminin (10 mg/ml) and incubated overnight at 4°C, then washed three times with Neurobasal medium. One million neurons were plated in the upper chambers in neuronal media.

Videomicroscopy was performed at 37°C on the distal part. The microscope and the chamber were kept at 37°C. Images were recorded with a 100X PlanApo N.A. 1.4 oil immersion objective on a Leica DM IRBE microscope and collected every 200 milliseconds in stream mode with 150 milliseconds of exposure and a 2 x 2 binning using a Micromax camera (Roper scientific, Trenton, NJ, USA) controlled by Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Videos, kymographs, and analyses were generated with ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Maximal projection was performed to identify the vesicles paths, which in our system corresponds to vesicle movements in axons. Kymographs and analyses were generated with the KymoToolBox, a home-made plug-in. This plug-in allows the generation of multiple kymographs that are calibrated in space (x axis in μm) and time (y axis in s). Kymographs were then analyzed manually by drawing the vesicles trajectories. The plug-in extracts the dynamic parameters directly from the trajectories and also reports the tracked particles on the original video with a color directionality code (red for anterograde, green for retrograde and blue for stationary dynamics). KymoToolBox is available upon request to Fabrice.Cordelieres@curie.fr.

Measure of Transport-Dependent BDNF Release

Rat primary hippocampal neurons and P0 cortical primary neurons from mice of various genotypes were electroporated with a construct expressing a non-tagged version of human BDNF (Zala et al., 2008). To measure transport-dependent release, cells were depolarized (treatment for 20 min with neuronal culture medium with 28 mM KCl, 30 mM CaCl₂ and 30 mM NaCl) and the supernatant recovered (K1 fraction). After washings, neurons were

incubated 30 min with normal neuronal culture medium, depolarized again and the new supernatant was recovered (K2 fraction). Finally, cells were lysed (L fraction) and the concentration of BDNF in all fractions was analyzed using BDNF Emax Immunoassay system (Promega).

BDNF Immunoenzyme Assays on Hippocampi Extracts

Hippocampi were lysed in 100 mM PIPES (pH=7), 500 mM NaCl, 0.2% Triton X100, 0.1% NaN₃, 2% BSA, 2 mM EDTA, 10 μM leupeptine, 0.3 μM aprotinin, 1 μM pepstatin, 200 μM PMSF. The amount of BDNF was measured in supernatants and cell lysates using the BDNF Emax Immunoassay system (Promega) and expressed relative to the content of proteins in cells. BDNF levels in hippocampal extracts are reported in ng/mg wet tissue weight.

Microtubules Preparation

MTs were prepared from HeLa cells transfected with HTT-1301; HTT-1301-S1181A/S1201A and HTT-1301-S1181D/S1201D. Cells were scrapped with PBS after 1 h treatment at 37°C with 1 μM taxol. After a 5 min centrifugation at 1,000 g, the pellet was dissociated in PM2G buffer (0.1 M PIPES pH6.8, 2 M glycerol, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) and diluted with the same volume of PM2G containing 0.4% NP40. Another 5 min centrifugation at 1,000 g followed a 15 min incubation at 37°C. The supernatant underwent a last centrifugation at 10,000 g (45 min). The MTs containing pellet obtained was quickly washed with PM2G and dissolved in SDS buffer (31 mM Tris pH 6.8, 1% SDS, 5% glycerol). The supernatant was diluted by addition of an equal volume of 2X SDS buffer.

Immunofluorescence

Cells were transfected with BDNF-mCherry and HTT-1301; HTT-1301-S1181A/S1201A and HTT-1301-S1181D/S1201D. Cells were fixed 2 min in cold methanol with 2% paraformaldehyde. Immunofluorescence was performed for tubulin (mouse anti-alpha-tubulin; clone DM1A, Sigma) and for the cherry-tag (rabbit anti-cherry; Recombinant Protein and Antibody Platform of the Institut Curie). Secondary antibodies, purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, were goat anti-mouse-A488 and anti-rabbit-A555. Coverslips were mounted in 0.1 g/ml Mowiol 4-88 (Calbiochem) in 20% glycerol. Acquisitions of images were performed with a confocal Leica SP5 microscope. Analysis of BDNF vesicles on microtubules was performed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes complete statistical analyses with number of measures, 2 figures and 3 movies.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly acknowledge the staff from Institut Curie facilities: Animal, Histology, Imaging and Recombinant Protein and Antibody Platforms for help; S. Anne, R. Hen and members of the Saudou and Humbert's laboratories for discussions. This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche - Maladies Rares (ANR-09-BLAN-0080, S.H.), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC subvention libre n°3188, S.H.), CNRS, INSERM and Institut Curie. The mouse mutant line was established at the Mouse Clinical Institute (Strasbourg, France) in the Targeted Mutagenesis and Transgenesis Department with funds from ANR-09-BLAN-0080.

K.B. and S.O. were supported by fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale (K.B.) and by the French Minister of Research (K.B., S.O.); P.P and D.J.D. are assistant professors at Université Paris-Sud 11; A.M.G is professor at Université Paris-Sud 11; F.S. and S.H. are INSERM and INSERM/AP-HP investigators respectively.

REFERENCES

- Anne, S.L., Saudou, F., and Humbert, S. (2007). Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. *J Neurosci* 27, 7318-7328.
- Autry, A.E., and Monteggia, L.M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 64, 238-258.
- Aziz, N.A., Pijl, H., Frolich, M., van der Graaf, A.W., Roelfsema, F., and Roos, R.A. (2009). Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in Huntington's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 1223-1228.
- Baquet, Z.C., Gorski, J.A., and Jones, K.R. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 24, 4250-4258.
- Boldrini, M., Hen, R., Underwood, M.D., Rosoklija, G.B., Dwork, A.J., Mann, J.J., and Arango, V. (2012). Hippocampal Angiogenesis and Progenitor Cell Proliferation Are Increased with Antidepressant Use in Major Depression. *Biol Psychiatry*, doi:10.1016/j.biopsych.2012.04.024.
- Cattaneo, E., Zuccato, C., and Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 919-930.
- Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., and Holzbaur, E.L. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10045-10050.
- Cheung, Z.H., Chin, W.H., Chen, Y., Ng, Y.P., and Ip, N.Y. (2007). Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons. *PLoS Biol* 5, e63.
- Cohen, S., and Greenberg, M.E. (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 183-209.

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

Curtis, M.A., Low, V.F., and Faull, R.L. (2012). Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: A comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation. *Dev Neurobiol* 72, 990-1005.

Curtis, M.A., Penney, E.B., Pearson, A.G., van Roon-Mom, W.M., Butterworth, N.J., Dragunow, M., Connor, B., and Faull, R.L. (2003). Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9023-9027.

David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., *et al.* (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479-493.

de Kloet, E.R., Joels, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-475.

Donovan, M.H., Yamaguchi, M., and Eisch, A.J. (2008). Dynamic expression of TrkB receptor protein on proliferating and maturing cells in the adult mouse dentate gyrus. *Hippocampus* 18, 435-439.

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

Duff, K., Paulsen, J.S., Beglinger, L.J., Langbehn, D.R., and Stout, J.C. (2007). Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study. *Biol Psychiatry* 62, 1341-1346.

Duman, R.S., and Monteggia, L.M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59, 1116-1127.

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., *et al.* (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407-410.

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

Fischer, A., Sananbenesi, F., Pang, P.T., Lu, B., and Tsai, L.H. (2005). Opposing roles of transient and prolonged expression of p25 in synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory. *Neuron* 48, 825-838.

Frodl, T., and O'Keane, V. (2012). How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. *Neurobiol Dis*, doi:10.1016/j.nbd.2012.03.012.

Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., *et al.* (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127-138.

Gil-Mohapel, J., Simpson, J.M., Ghilan, M., and Christie, B.R. (2011). Neurogenesis in Huntington's disease: can studying adult neurogenesis lead to the development of new therapeutic strategies? *Brain Res* 1406, 84-105.

Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., *et al.* (2010). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392-406.

Jessberger, S., Aigner, S., Clemenson, G.D., Jr., Toni, N., Lie, D.C., Karalay, O., Overall, R., Kempermann, G., and Gage, F.H. (2008). Cdk5 regulates accurate maturation of newborn granule cells in the adult hippocampus. *PLoS Biol* 6, e272.

Jessberger, S., Gage, F.H., Eisch, A.J., and Lagace, D.C. (2009). Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 32, 575-582.

Keryer, G., Pineda, J.R., Liot, G., Kim, J., Dietrich, P., Benstaali, C., Smith, K., Cordelieres, F.P., Spassky, N., Ferrante, R.J., *et al.* (2011). Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease. *J Clin Invest* 121, 4372-4382.

Kirkwood, S.C., Su, J.L., Conneally, P., and Foroud, T. (2001). Progression of symptoms in the early and middle stages of Huntington disease. *Arch Neurol* 58, 273-278.

Krishnan, V., and Nestler, E.J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 894-902.

Kupfer, D.J., Frank, E., and Phillips, M.L. (2012). Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet* 379, 1045-1055.

Lagace, D.C., Benavides, D.R., Kansy, J.W., Mapelli, M., Greengard, P., Bibb, J.A., and Eisch, A.J. (2008). Cdk5 is essential for adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18567-18571.

Lazarini, F., Mouthon, M.A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., Lamarque, S., Abrous, D.N., Boussin, F.D., and Lledo, P.M. (2009). Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One* 4, e7017.

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

Malberg, J.E., Eisch, A.J., Nestler, E.J., and Duman, R.S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 9104-9110.

Morfini, G., Szebenyi, G., Brown, H., Pant, H.C., Pigino, G., DeBoer, S., Beffert, U., and Brady, S.T. (2004). A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J* 23, 2235-2245.

Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., and Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823.

Orvoen, S., Pla, P., Gardier, A.M., Saudou, F., and David, D.J. (2011). Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behaviour and altered neuronal maturation. *Neurosci Lett* 2, 127-132.

Pandey, J.P., and Smith, D.S. (2011). A Cdk5-dependent switch regulates Lis1/Ndel1/dynein-driven organelle transport in adult axons. *J Neurosci* 31, 17207-17219.

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

Perera, T.D., Dwork, A.J., Keegan, K.A., Thirumangalakudi, L., Lipira, C.M., Joyce, N., Lange, C., Higley, J.D., Rosoklija, G., Hen, R., *et al.* (2011). Necessity of hippocampal neurogenesis for the therapeutic action of antidepressants in adult nonhuman primates. *PLoS One* 6, e17600.

Petrik, D., Lagace, D.C., and Eisch, A.J. (2012). The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology* 62, 21-34.

Reiner, A., Del Mar, N., Meade, C.A., Yang, H., Dragatsis, I., Zeitlin, S., and Goldowitz, D. (2001). Neurons lacking huntingtin differentially colonize brain and survive in chimeric mice. *J Neurosci* 21, 7608-7619.

Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A., and Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466-470.

Samuels, B.A., and Hen, R. (2011). Neurogenesis and affective disorders. *Eur J Neurosci* 33, 1152-1159.

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., *et al.* (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.

Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., and Croll, S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol* 192, 348-356.

Shea, T.B., Yabe, J.T., Ortiz, D., Pimenta, A., Loomis, P., Goldman, R.D., Amin, N., and Pant, H.C. (2004). Cdk5 regulates axonal transport and phosphorylation of neurofilaments in cultured neurons. *J Cell Sci* 117, 933-941.

Snyder, J.S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., and Cameron, H.A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476, 458-461.

Su, S.C., and Tsai, L.H. (2011). Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 465-491.

Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., Hen, R., and Belzung, C. (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* 64, 293-301.

Taylor, A.M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., and Jeon, N.L. (2005). A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2, 599-605.

Tokuyama, W., Hashimoto, T., Li, Y.X., Okuno, H., and Miyashita, Y. (1998). Highest *trkB* mRNA expression in the entorhinal cortex among hippocampal subregions in the adult rat: contrasting pattern with BDNF mRNA expression. *Brain Res Mol Brain Res* 62, 206-215.

van Duijn, E., Selis, M.A., Giltay, E.J., Zitman, F.G., Roos, R.A., van Pelt, H., and van der Mast, R.C. (2010). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in Huntington's disease mutation carriers compared with mutation-negative first-degree controls. *Brain Res Bull* 83, 232-237.

Wang, J.W., David, D.J., Monckton, J.E., Battaglia, F., and Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci* 28, 1374-1384.

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

Zala, D., Colin, E., Rangone, H., Liot, G., Humbert, S., and Saudou, F. (2008). Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Hum Mol Genet* 17, 3837-3846.

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

Zhu, W.L., Shi, H.S., Wang, S.J., Xu, C.M., Jiang, W.G., Wang, X., Wu, P., Li, Q.Q., Ding, Z.B., and Lu, L. (2012). Increased Cdk5/p35 activity in the dentate gyrus mediates depressive-like behaviour in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 15, 795-809.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Generation of *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} Mice

- (A) Schematic representation of the *Hdh* locus.
- (B) Mouse HTT sequence for wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} around the serines of interest. Data correspond to the non-coding strand.
- (C) Representative PCR genotyping. Top: photo of a gel obtained after the migration of PCR products. Hetero: heterozygous, homo: homozygous. Bottom: primers location and size of PCR products obtained for wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} on the left and *Hdh*^{S1181D/1201D} on the right.
- (D) HTT (4C8) immunoprecipitates (IP) of extracts from wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} cortices are immunoblotted using anti-HTT (4C8), anti-P-HTT-S1181 and anti-P-HTT-S1201 antibodies.

Figure 2. *Hdh*^{S1181A/S1201A} Mice Show Reduced Anxiety/Depression-Like Behavior as Compared to *Hdh*^{S1181D/1201D} and Wild-type Mice

- (A) Open Field test. Anxiety is measured as the mean of the total time spent in the center and the distance in the center over total ambulatory distance. Representative trajectories (red) followed by a mouse of each genotype during one session are shown in the three squares.
- (B) Novelty Suppressed Feeding paradigm. The anxious/depressed-like phenotype of each group of mice is measured as the latency to feed.
- (C) Splash test. The depression-related phenotype is measured by the grooming duration after 10% sucrose solution is sprayed on the mouse coat.

All graphs: n > 40 per group; Values plotted are mean \pm S.E.M.; NS, not significant; *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001; complete statistical analyses may be found in Supplemental Information.

Figure 3. The Behavioral Effects Observed in Mice Expressing Unphosphorylated HTT are Mediated by a Neurogenesis-Dependent Mechanism

(A) Protocol used to measure neuronal survival and representative immunostaining for BrdU positive cells in the dentate gyrus of wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice. Nuclei are counterstained with hematoxylin. Scale bar: 50 μ m. The graph represents the quantitative assessment of the mean total number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus per mouse (n=4) from each genotype.

(B) Quantification of the mean total number of DCX-positive neurons in the dentate gyrus per mouse (n=4) from each genotype.

(C) Illustration of a DCX-positive neuron with quinary dendrites. White arrow heads point to dendritic nodes. Scale bar: 10 μ m. Histograms show the quantification of the mean total number of neurons with quinary dendrite per mouse (n > 3) from each genotype, and the maturation index. The maturation index is a normalisation of the number of neurons with quinary dendrites over the total number of DCX-positive neurons.

(D) Sholl analysis of DCX-positive neurons. The graphs indicate the number of intersections (left graph) and the dendritic length (right graph) according to the distance from the soma for each condition (n > 3).

(E) Open Field test of *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice treated with a sham procedure or focal γ -ray hippocampal irradiation (IRR). Anxiety is measured as the mean of the total time spent in the center and the distance in the center over total ambulatory distance (n > 8 per group).

(F) Novelty Suppressed Feeding paradigm of *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice treated with a sham procedure or focal γ -ray hippocampal irradiation (IRR). The anxious/depressed-like phenotype of each group of mice is measured as the latency to feed ($n > 8$ per group).

All graphs: Values plotted are mean \pm S.E.M.; NS, not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$; complete statistical analyses may be found in Supplemental Information.

Figure 4. BDNF Expression and Signaling is Increased in *Hdh*^{S1181A/S1201A} Hippocampi

(A) BDNF total protein levels in the hippocampus of wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice are measured by BDNF immunoenzyme assays.

(B) Hippocampal extracts from mice of the different genotypes are analyzed by immunoblotting for the presence of BDNF. The graph represents the quantitative assessment of the ratio of mature-BDNF/pro-BDNF.

(C) Hippocampal extracts from mice of the different genotypes are analyzed by immunoblotting for the presence of phosphorylated-Erk (phospho-Ser133-Erk, pErk), Erk, phosphorylated-CREB (phospho-Thr202/Tyr204-CREB, pCREB) and CREB. The graphs represent the quantitative assessments of the ratio of activated Erk/CREB over total Erk/CREB.

All graphs: Values plotted are mean \pm S.E.M.; NS, not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$; complete statistical analyses may be found in Supplemental Information.

Figure 5. S1181A/S1201A-HTT Promotes Microtubule-based BDNF Transport and Release

(A) Anterograde and retrograde transports of BDNF-mCherry-containing vesicles are analyzed in primary cultures of rat hippocampal neurons co-electroporated as indicated with constructs expressing the first N-terminal 1301 amino acids of wild-type HTT with HTT-1301

(HTT) or HTT-1301-S1181A/S1201A (HTT-AA) or HTT-1301-S1181D/S1201D (HTT-DD), siRNA targeting HTT (siHTT) and BDNF-mCherry (vesicles number: $n > 42$ for each condition).

(B) Transport-dependent BDNF release is evaluated after two KCl-induced depolarizations in hippocampal neurons co-electroporated as indicated with siRNA targeting HTT (siHTT) and HTT-1301 (HTT) or HTT-1301-S1181A/S1201A (HTT-AA) or HTT-1301-S1181D/S1201D (HTT-DD) and BDNF. Release is expressed as a K2/L (L, lysate) ratio.

(C) Anterograde and retrograde transports of BDNF-mCherry-containing vesicles are analyzed in primary cultures of cortical neurons from wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice electroporated with BDNF-mCherry (vesicles number: wild-type $n=46$; *Hdh*^{S1181A/S1201A} $n=59$; *Hdh*^{S1181D/1201D} $n=32$).

(D) Representative kymographs of BDNF-mCherry-containing vesicles dynamics.

(E) Transport-dependent BDNF release is evaluated after two KCl-induced depolarizations of cultured cortical neurons from wild-type, *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice electroporated with BDNF. Release is expressed as a K2/L ratio.

All graphs: Values plotted are mean \pm S.E.M.; NS, not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$; complete statistical analyses may be found in Supplemental Information.

Figure 6. The S1181/S1201 Phosphorylation Status of HTT Regulates Motors and BDNF Vesicles Attachment to Microtubules

(A) MT fractionation of HeLa cells expressing HTT-1301 (HTT) or HTT-1301-S1181A/S1201A (HTT-AA) or HTT-1301-S1181D/S1201D (HTT-DD). Samples are analyzed by immunoblotting for the presence of HTT, p150^{Glued} and dynein (DIC, dynein intermediate chain). The graphs represent the ratios of HTT, p150^{Glued} and DIC to tubulin.

Values refer to band densities. S: supernatant; P: pellet corresponding to the MT-enriched fraction.

(B) Cells express HTT-1301 (HTT) or HTT-1301-S1181A/S1201A (HTT-AA) or HTT-1301-S1181D/S1201D (HTT-DD) and BDNF-mCherry. Cells are immunostained for the presence of BDNF (red) and α -tubulin (green). Scale bar: 1 μ m. The graph represents the quantifications of BDNF-mCherry vesicles localized on MTs for each conditions.

All graphs: Values plotted are mean \pm S.E.M.; NS, not significant; *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001; complete statistical analyses may be found in Supplemental Information.

Figure 1

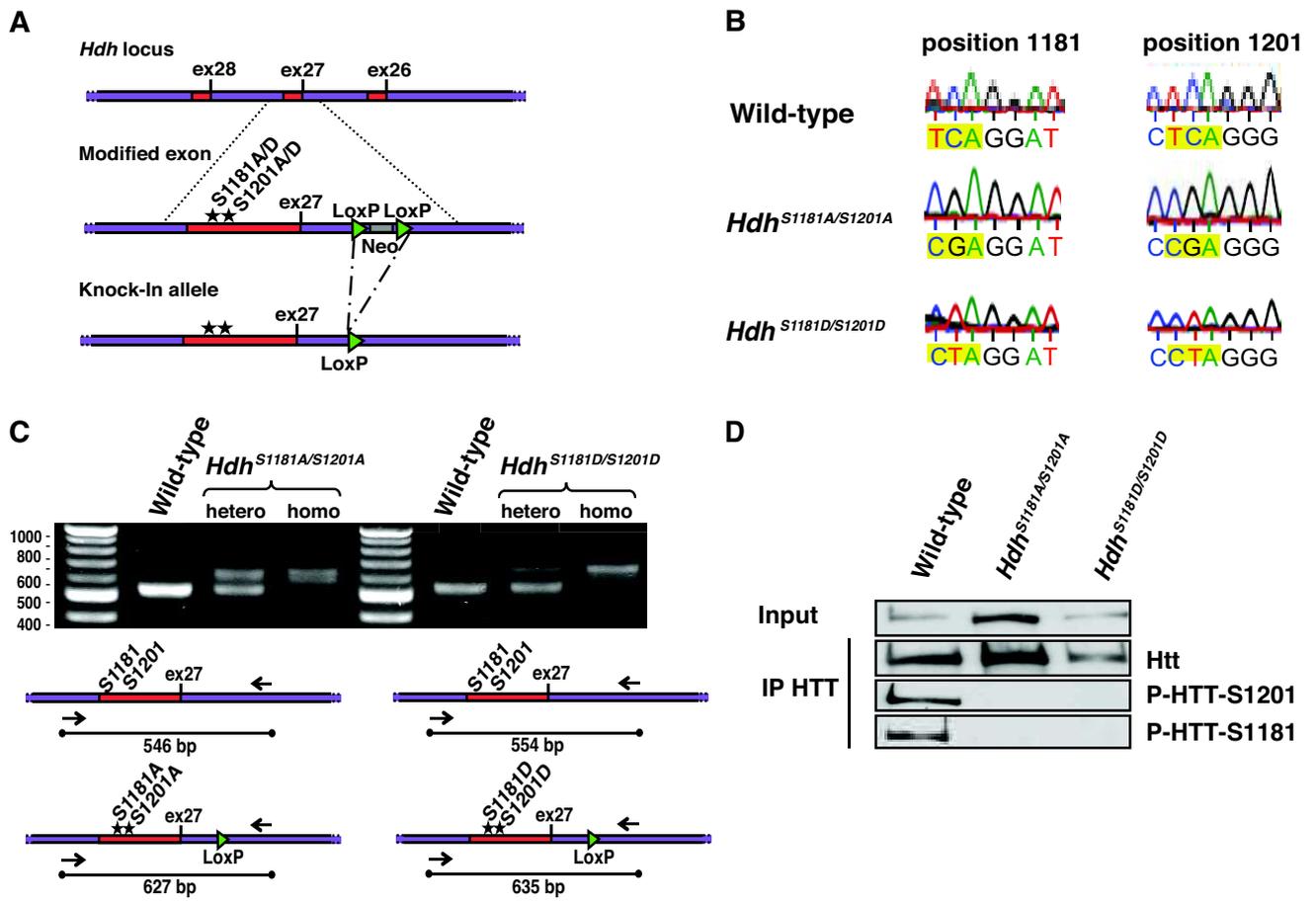


Figure 2

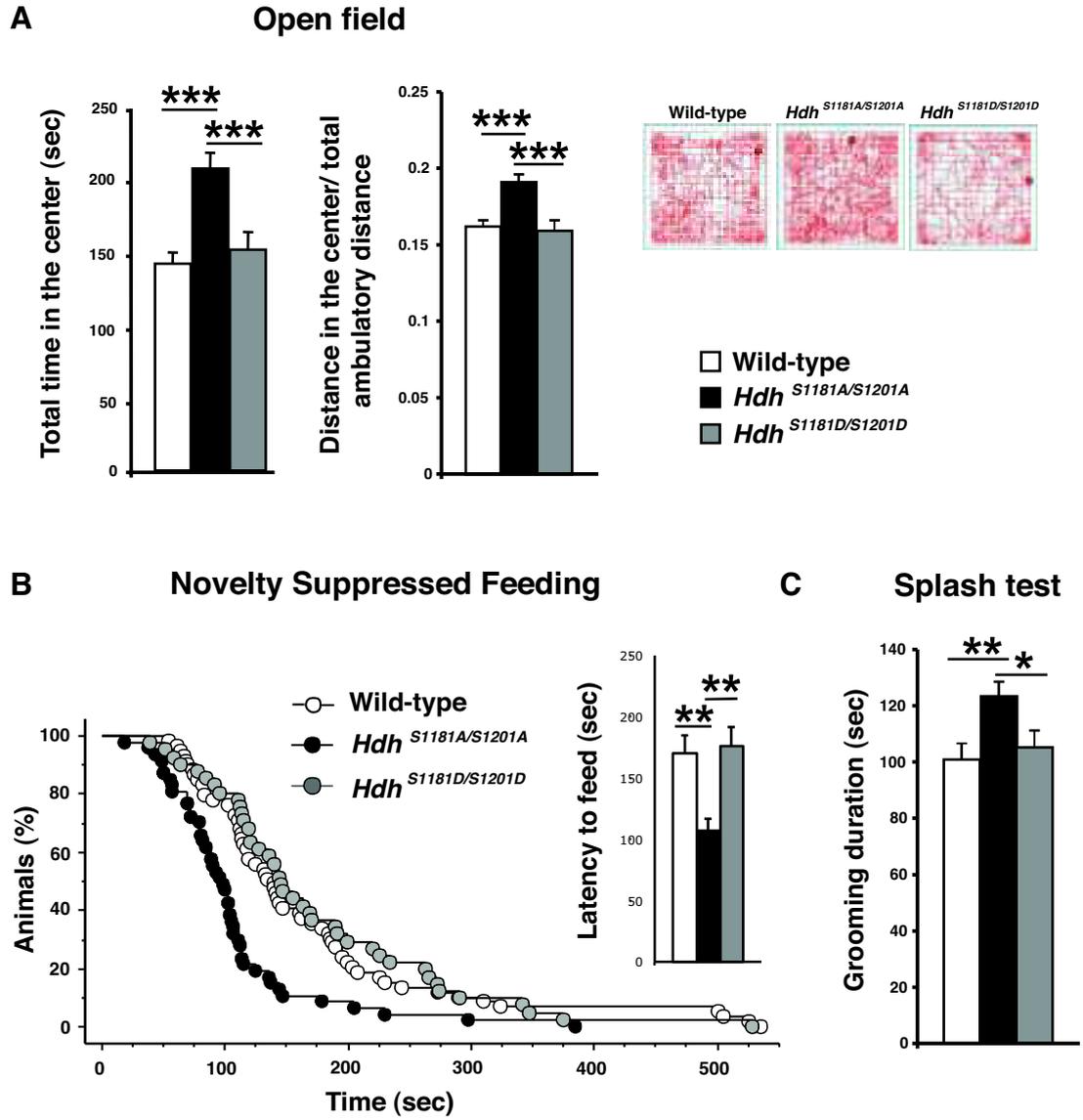


Figure 3

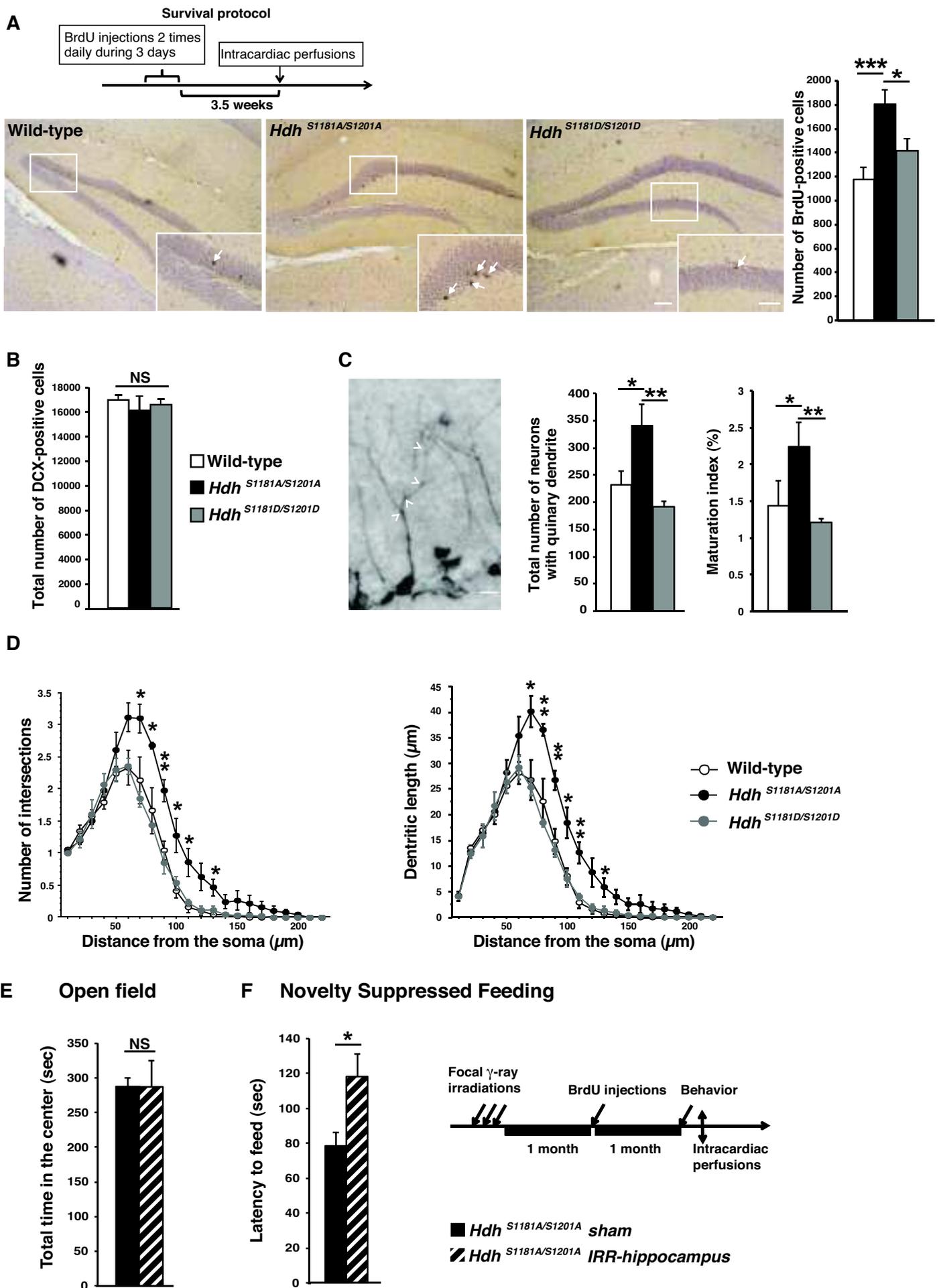


Figure 4

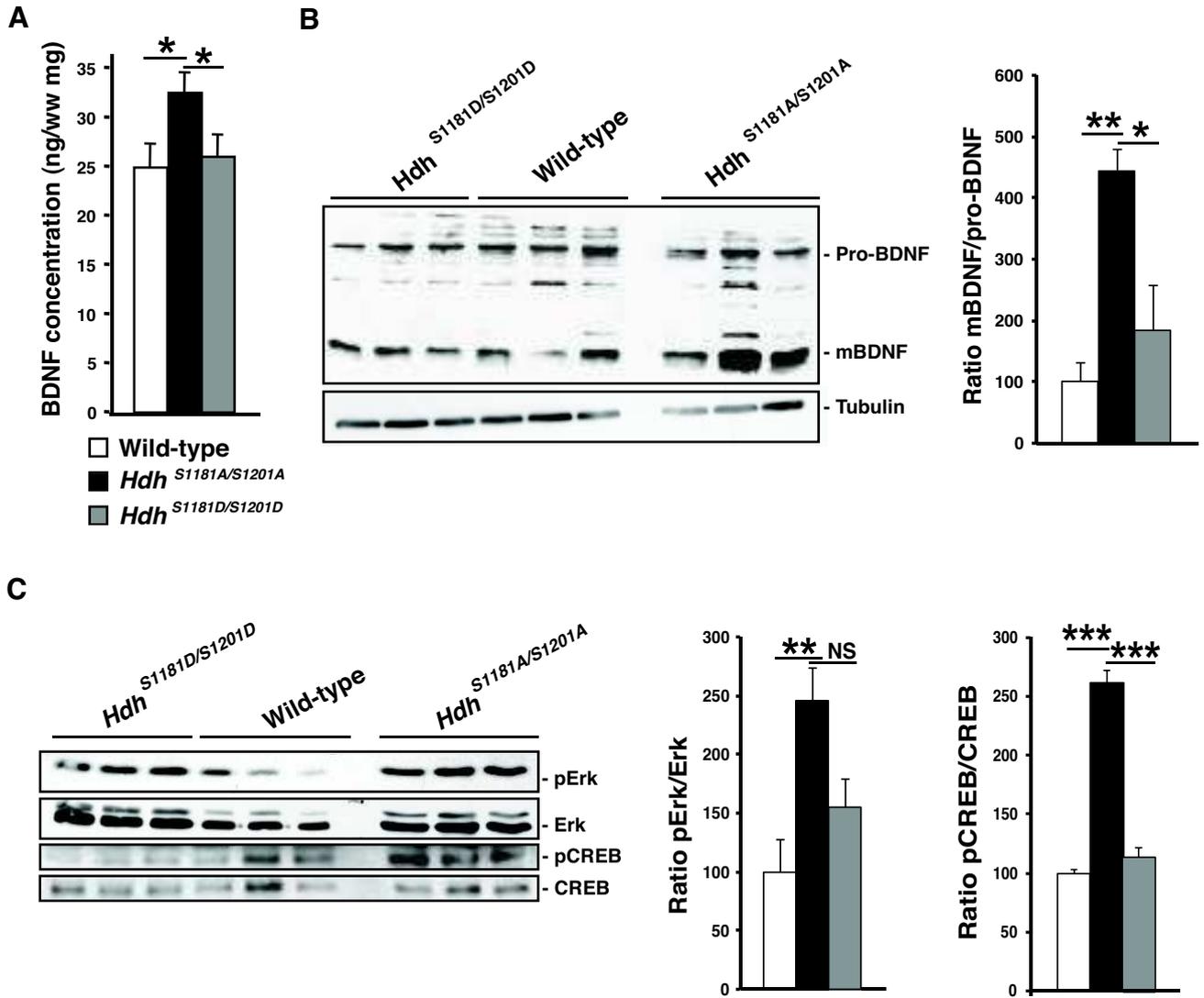


Figure 5

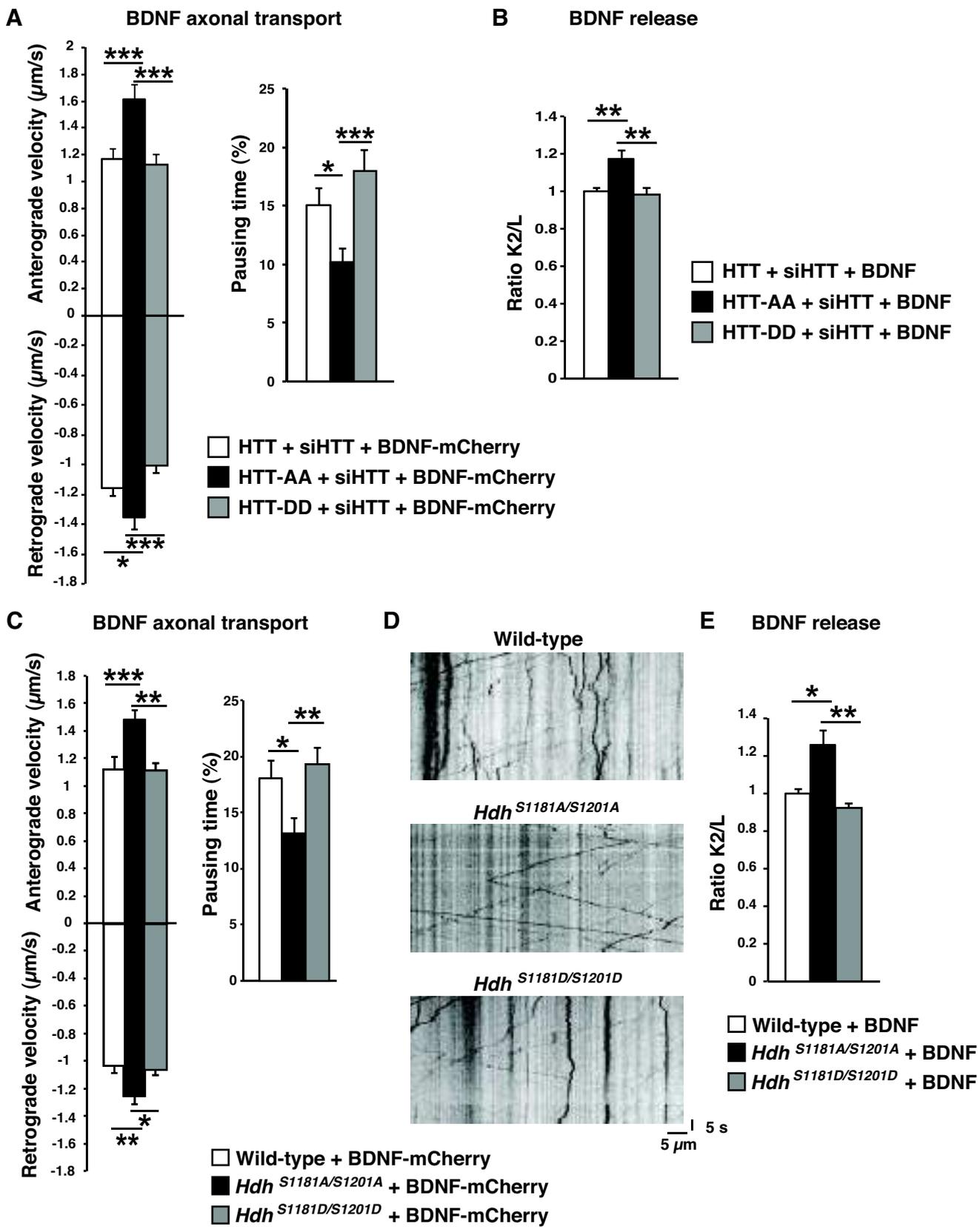
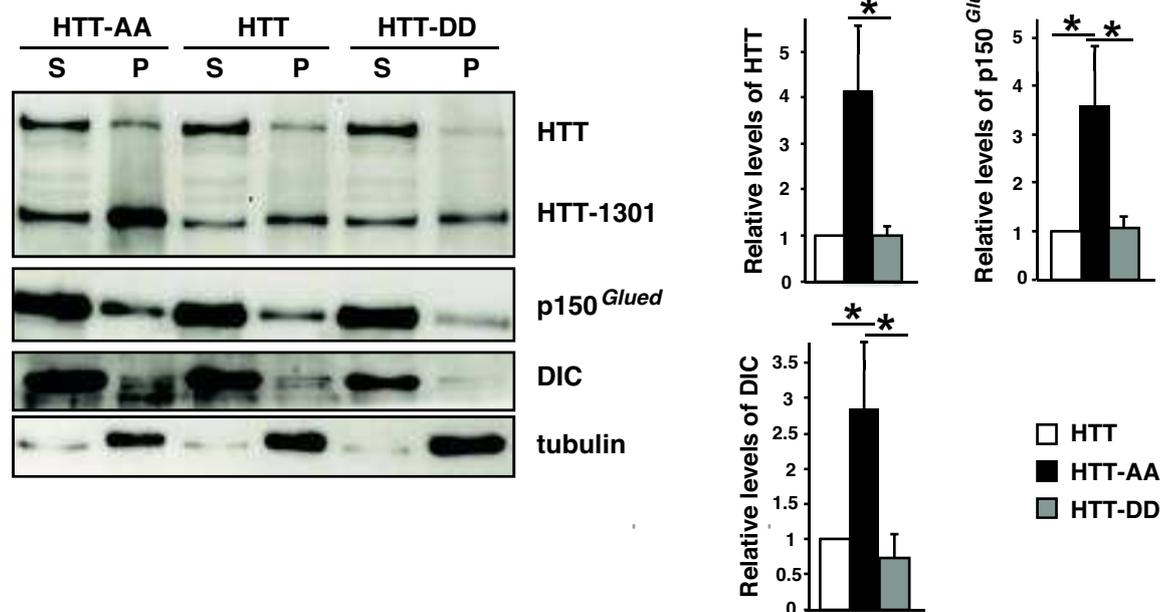
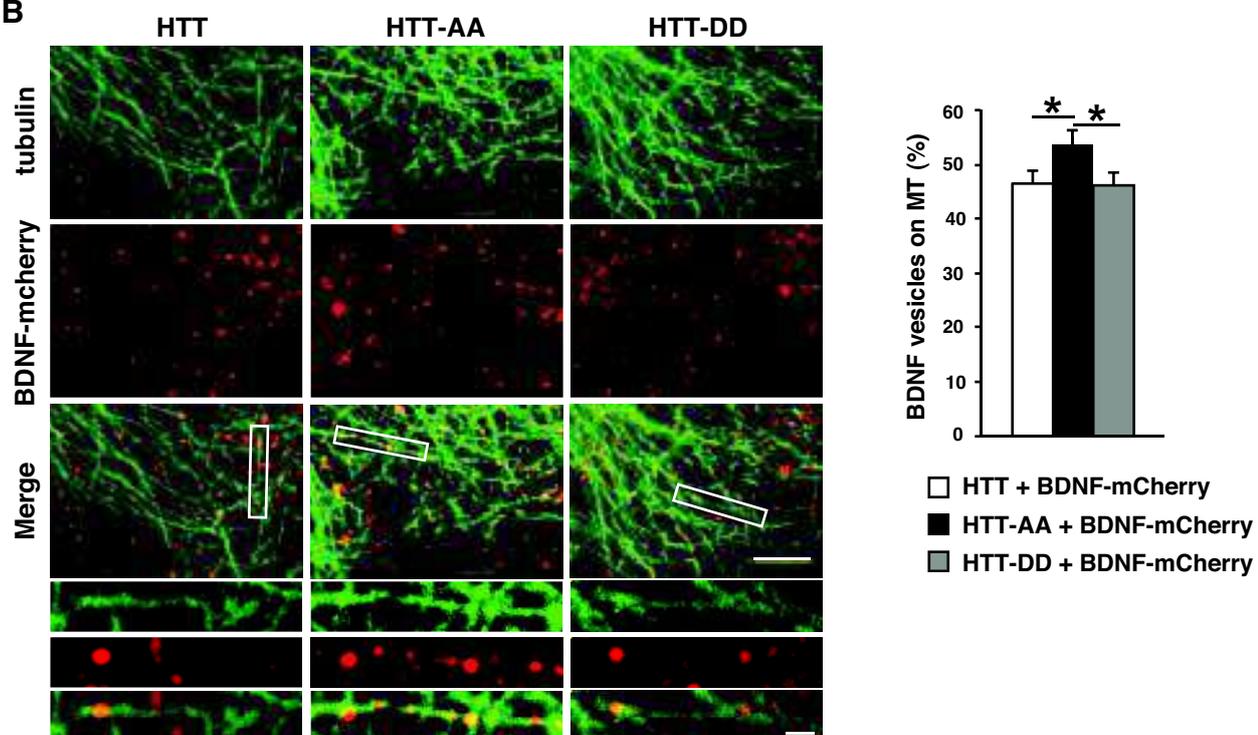


Figure 6

A



B



SUPPLEMENTAL INFORMATION

SUPPLEMENTAL FIGURES LEGENDS

Supplemental Figure S1, related to Figure 2. *Hdh*^{S1181A/S1201A} and *Hdh*^{S1181D/1201D} mice do not show motor phenotype in a non-accelerating rotarod.

(A) Motor coordination was assessed as the total number of falls during a 3 min session on a non-accelerating rotarod.

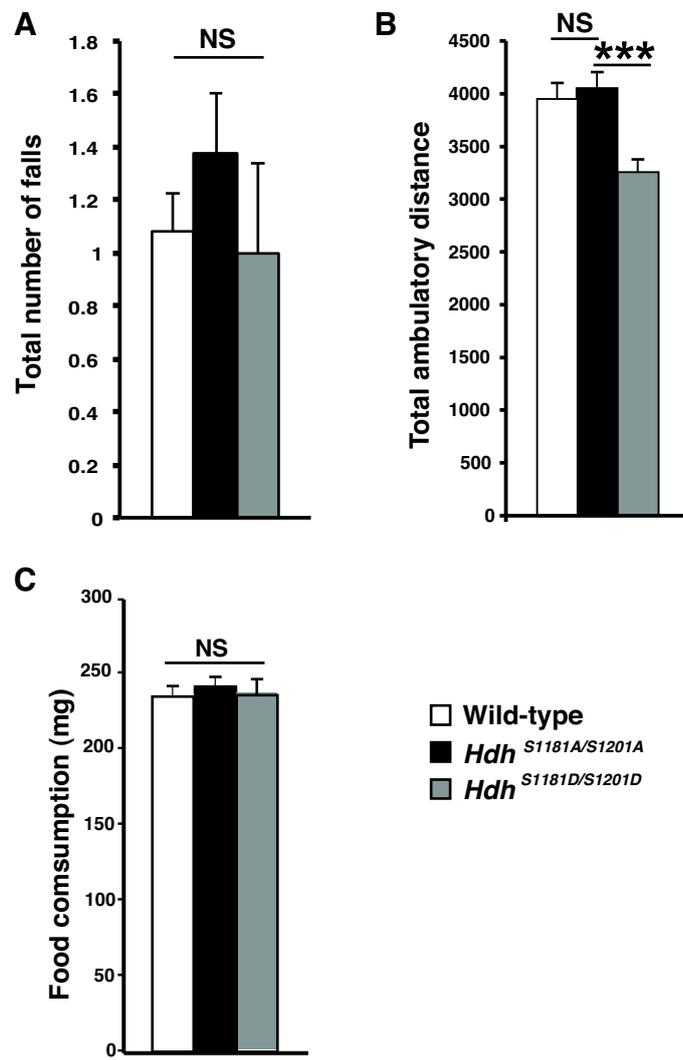
(B) Open Field test. The total ambulatory distance measured during a 30 min sessions is shown for each group of mice.

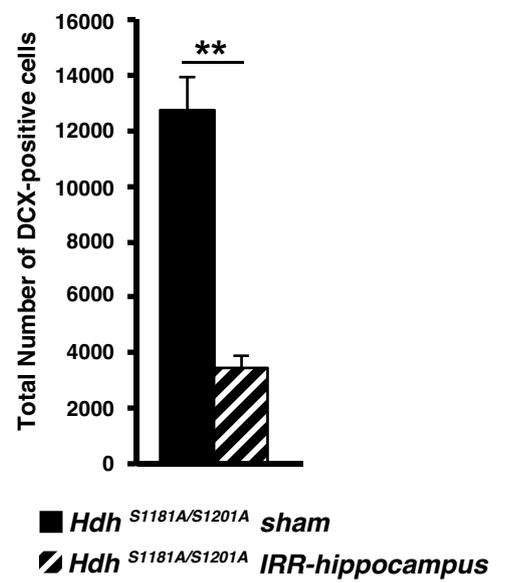
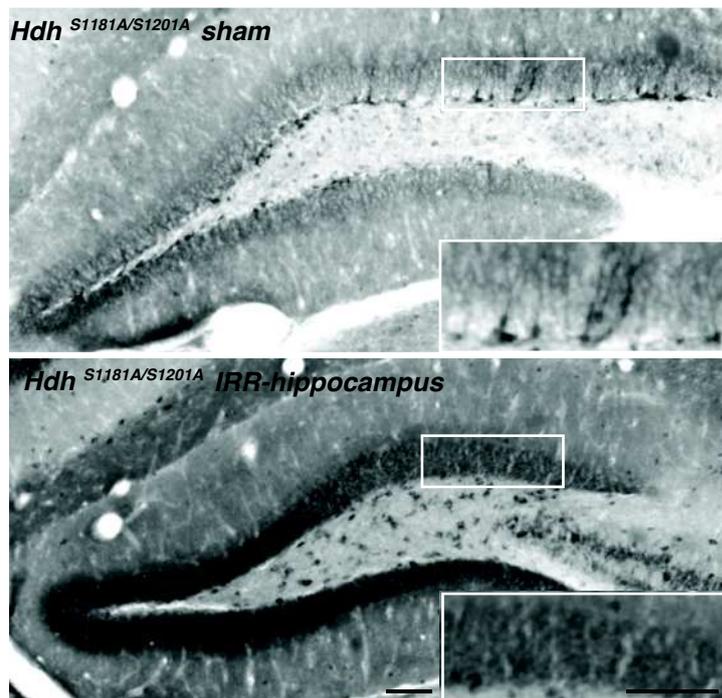
(C) Novelty Suppressed Feeding paradigm. The food consumption during a 5 min session is shown for each group of mice.

Values plotted are mean \pm S.E.M.; NS, not significant; ***P<0.001.

Supplemental Figure S2, related to Figure 3. *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice: Effect of Focal γ -ray Irradiation on DCX-positive Neurons.

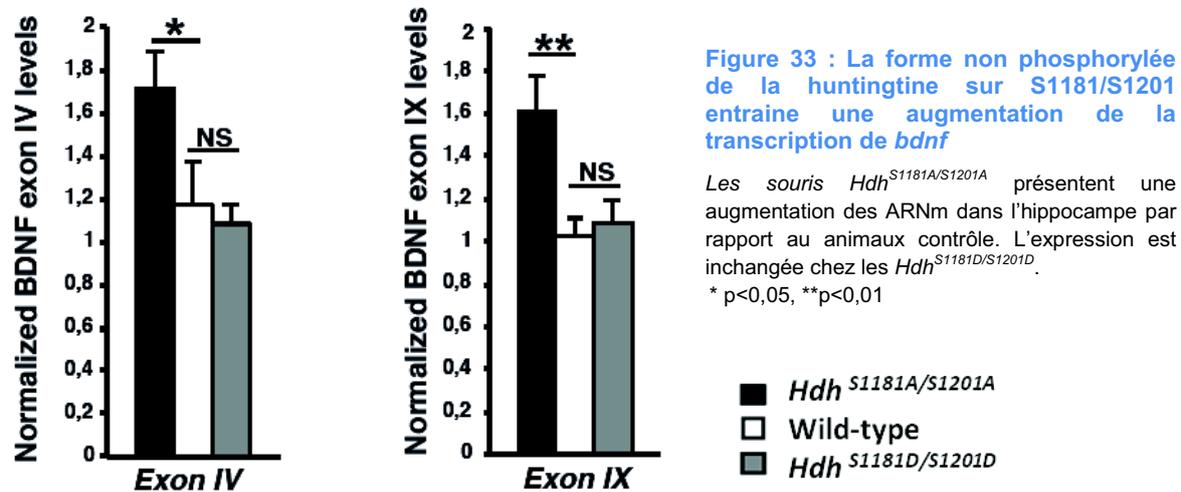
Representative DCX stainings of hippocampal sections from sham and irradiated *Hdh*^{S1181A/S1201A} mice. Scale bar: 50 μ m. The graph represents the quantitative assessment of the mean total number of DCX-positive cells in the dentate gyrus per mouse (n=3) from each condition. Values plotted are mean \pm S.E.M.; **P<0.01.





Résultats complémentaires

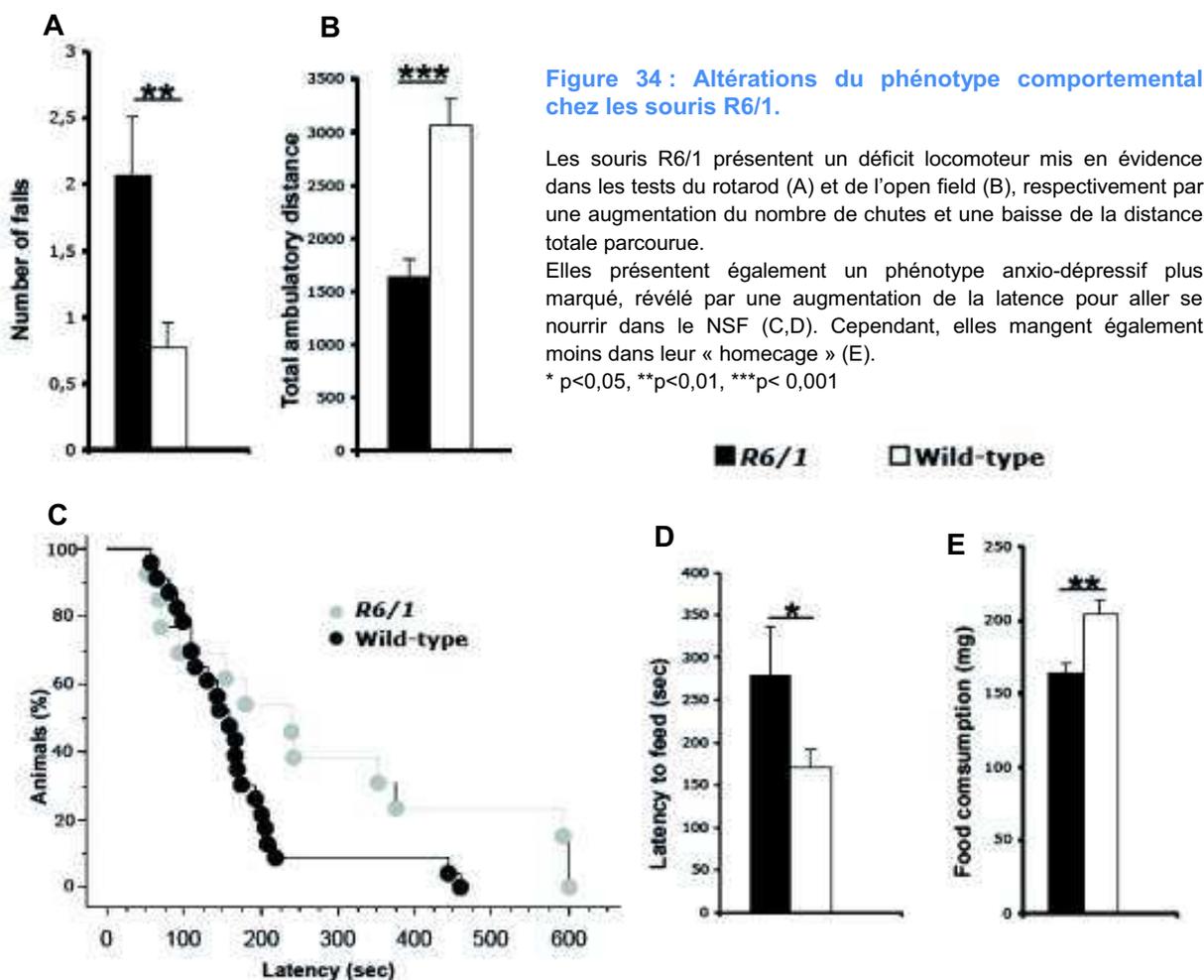
En plus des données présentées dans l'article, nous avons étudié par qPCR l'expression de deux des exons du gène *bdnf* (Figure 33).



Au vu des effets bénéfiques de la délétion de la phosphorylation aux sites 1181 et 1201, nous avons ensuite voulu vérifier si ces mutations ponctuelles étaient suffisantes pour promouvoir un effet anxiolytique/antidépresseur dans un modèle murin de HD. Pour cela, nous avons croisé les lignées *Hdh*^{S1181A/S1201A} et *Hdh*^{S1181D/S1201D} avec la lignée R6/1, modèle de HD largement étudié et décrit. Le choix du modèle transgénique R6/1 nous permet d'obtenir des animaux exprimant à la fois la huntingtine S1181A/S1201A de manière homozygote, et la polyQ.

Comme précédemment, nous avons étudié le comportement anxio-dépressif, l'expression du *bdnf*, ainsi que la neurogenèse hippocampique. Ces données préliminaires feront l'objet d'un futur article.

Bien que cela ait déjà été démontré dans de nombreuses études, nous avons en premier lieu vérifié que les animaux R6/1 présentaient des altérations comportementales, concernant à la fois le phénotype moteur et anxio-dépressif (Figure 34). Nos résultats corroborent ceux obtenus précédemment, avec une altération motrice observée dans le rotarod et l'open-field, ainsi qu'un comportement de type anxio-dépressif mise en évidence dans le test du novelty-suppressed feeding. Cependant, ces résultats sont encore une fois à prendre avec précaution puisque l'altération des capacités motrices et alimentaires peut interférer avec les tâches effectuées dans le test d'anxiété-dépression.



Une fois cette vérification effectuée, nous avons évalué le comportement des animaux issus du croisement $Hdh^{S1181A/S1201A}$ ou $Hdh^{S1181D/S1201D}$ avec la lignée R6/1 (Figure 35). Quel que soit le groupe considéré, il n'y a pas d'amélioration du phénotype moteur dans le test du rotarod. Ainsi, nous avons décidé de présenter les résultats des lignées R6 séparément, puisqu'il est délicat de comparer des animaux ayant des activités locomotrices différentes.

Dans les paradigmes comportementaux, on retrouve les effets bénéfiques de la forme non phosphorylable de la huntingtine, puisque le temps passé dans le centre, et le rapport « distance dans le centre/ distance totale parcourue » dans l'open-field sont augmentés chez les animaux $Hdh^{S1181A/S1201A}$; R6/1. De même, le score dans le NSF est nettement amélioré chez les $Hdh^{S1181A/S1201A}$ R6/1 par rapport aux R6/1, sans que la consommation de nourriture ne soit modifiée (non présenté).

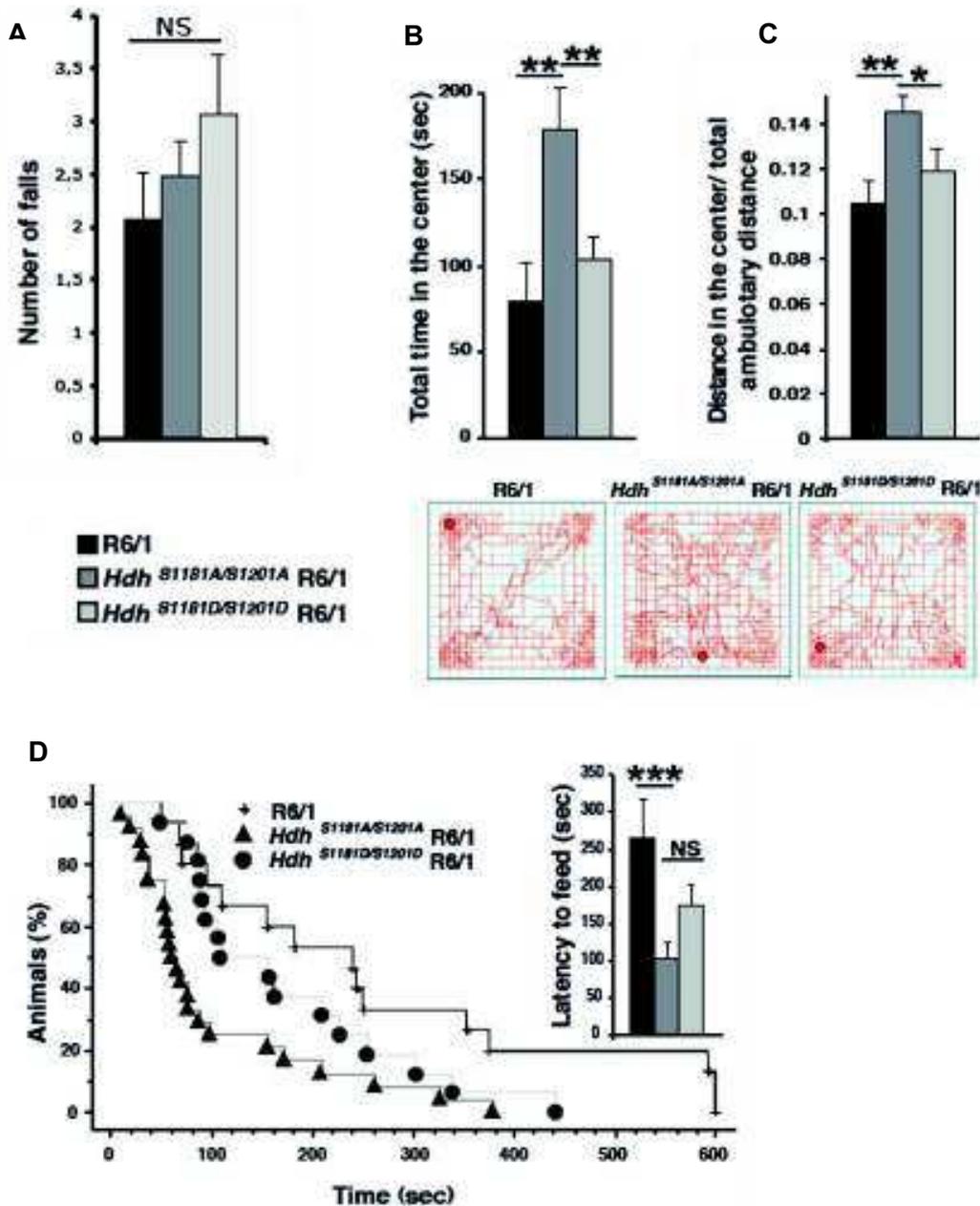


Figure 35 : Effet du statut de phosphorylation de la huntingtine sur le phénotype comportemental des souris R6/1.

La délétion des phosphorylations aux sérines 1181 et 1201 n'a pas d'effet sur les capacités motrices des animaux (A), mais entraîne une amélioration du phénotype anxio-dépressif des animaux. Les souris R6/1; *Hdh*^{S1181A/S1201A} ont un temps et une activité locomotrice dans le centre de l'OF accrues (B,C), ainsi qu'une diminution de la latence pour aller se nourrir dans le NSF (D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ensuite, nous avons observé une tendance à une augmentation de la quantité de BDNF dans l'hippocampe des animaux *Hdh*^{S1181A/S1201A} ; R6/1 relativement aux deux autres groupes (Figure 36). Une augmentation des effectifs permettra sans doute de confirmer ces résultats obtenus par ELISA. De plus, la mesure du BDNF mature par western blot confirme l'augmentation de l'expression de *bdnf* chez les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} ; R6/1. Enfin, la forme non phosphorylable de la huntingtine entraîne une augmentation de la survie neuronale, 3 semaines après l'injection de BrdU.

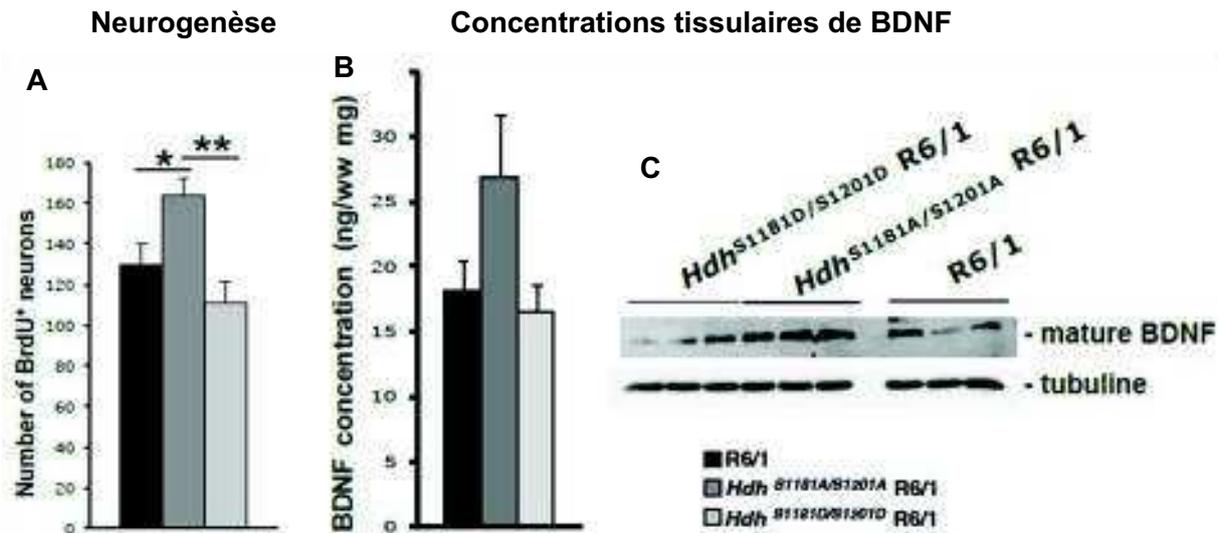


Figure 36 : Effet du statut de phosphorylation de la huntingtine sur la survie neuronale et l'expression de BDNF chez les souris R6/1.

La délétion des phosphorylations aux sérines 1181 et 1201 induit une augmentation du nombre de cellules marquées par le BrdU dans l'hippocampe des animaux adultes (A), 3 semaines après l'injection du marqueur, ainsi qu'une augmentation de l'expression de *bdnf* (ELISA (B) et Western Blot (C)). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Résultats principaux

L'anxiété et la dépression, chez la souris, sont modifiées selon l'état de phosphorylation de la huntingtine sur ses sérines 1181 et 1201. Les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} exprimant une HTT non phosphorylable montrent une diminution des phénotypes anxieux et dépressif par rapport au groupe sauvage. Ce phénotype est associé à une augmentation de la neurogenèse hippocampique et reproduit ainsi le phénotype obtenu avec un traitement chronique par antidépresseur tel que les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS).

Afin d'associer un mécanisme moléculaire à ce phénotype, nous avons quantifié la concentration de BDNF, qui est augmentée chez les souris *Hdh*^{S1181A/S1201A}. Nous avons en effet mis en évidence une augmentation de la transcription de *bdnf* dans l'hippocampe, puisque la quantité de transcrits des exons IV et IX est augmentée ; ainsi que de la synthèse protéique, qui est également renforcée dans l'hippocampe. Nous avons ensuite étudié le transport in vitro de BDNF, et démontré que la délétion de la phosphorylation de la huntingtine dans des neurones d'hippocampe entraîne une augmentation de la vitesse des vésicules transportant le BDNF, tant de manière antérograde que rétrograde. Une diminution des temps de pause des vésicules est également observée, tandis que l'accrochage entre les microtubules, les vésicules contenant du BDNF, et les moteurs moléculaires, est renforcé. Enfin, il apparaît que la délétion des phosphorylations aux sérines 1181 et 1201 est suffisante pour induire l'augmentation de l'exocytose des vésicules de BDNF.

En outre, nous avons mis en évidence que la signalisation BDNF était renforcée dans la lignée de souris *Hdh*^{S1181A/S1201A} par l'augmentation de la phosphorylation des intermédiaires Erk et CREB, et une corrélation avec l'augmentation de la neurogenèse a été établie.

En revanche, la forme constitutivement phosphorylée de la huntingtine exprimée dans la lignée de souris *Hdh*^{S1181D/S1201D} n'entraîne pas de modification du phénotype par rapport au groupe contrôle.

Ainsi, il apparaît que l'état de phosphorylation de la huntingtine sur les sérines 1181 et 1201 est directement impliqué dans l'expression et le transport du BDNF, et que cet effet sur le facteur neurotrophique est suffisant pour entraîner des modifications à un niveau bien plus global, comme une modification des comportements liés à l'humeur.

Discussion des résultats

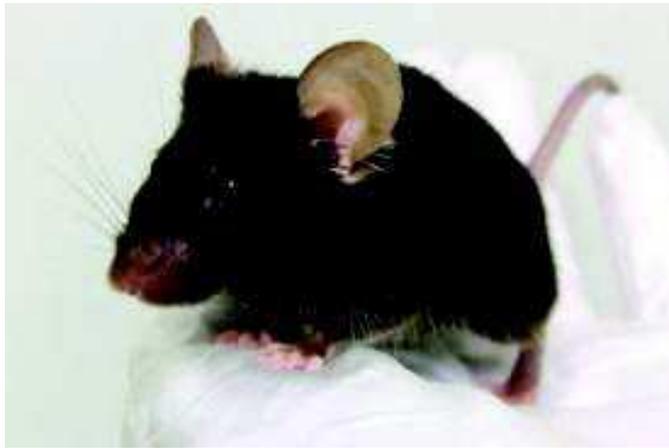
Les travaux précédents effectués à l'Institut Curie d'Orsay et ayant permis l'identification des sites de phosphorylation S1181 et 1201, indiquaient un effet protecteur de la forme phosphorylée de la huntingtine sur la toxicité induite par la huntingtine mutante (Anne et al., 2007). On observait effectivement une phosphorylation de la protéine en réponse à des lésions de l'ADN, et une protection vis-à-vis de la toxicité induite par la huntingtine polyQ. Inversement, l'absence de phosphorylation confère des propriétés toxiques à la huntingtine sauvage en déclenchant la mort cellulaire par apoptose, et accélère la mort neuronale induite par des lésions de l'ADN. Néanmoins, les résultats obtenus ici amènent à nuancer le rôle négatif joué par la forme non phosphorylée de la huntingtine. Cette forme a un effet positif à la fois sur le BDNF, la neurogenèse, et le comportement anxio-dépressif. Luo et collaborateurs ont observé une baisse de l'activité de Cdk5 dans des modèles cellulaires et le cerveau de modèles animaux de HD (N171-82Q), probablement causée par une baisse de l'interaction avec son activateur p35 dans le contexte polyQ (Luo et al., 2005). Cette observation d'une baisse d'activité kinase de Cdk5 dans HD devrait en conséquence induire une augmentation de la forme déphosphorylée de la huntingtine sur les cibles de Cdk5, et notamment S1181 et 1201. Les effets plutôt bénéfiques qui sont observés alors pourraient être un mécanisme de protection, ralentissant la progression de la maladie.

L'importance de la phosphorylation de la huntingtine sur le transport du BDNF a déjà été mise en évidence. Il a ainsi été montré que le statut de phosphorylation de la sérine 421, dans la région N-terminale de la protéine, régule la direction du transport axonal de BDNF (Colin et al., 2008). En conditions pathologiques, il a également été démontré que la phosphorylation de la HTT-polyQ en position 421 restaure l'interaction de la huntingtine avec la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine d'une part, et le microtubule d'autre part, et ainsi le transport et le relargage du BDNF (Zala et al., 2008). Les sérines 1181 et 1201 de la huntingtine sont donc des nouvelles sérines impliquées dans le contrôle du transport du BDNF, la déphosphorylation constitutive de ces sérines accélérant ce transport. Cependant, aucun effet particulier sur la direction du transport (antérograde ou rétrograde) n'a été trouvé, contrairement à la sérine 421. De manière étonnante, les mutations S1181A/S1201A et S1181D/S1201D n'ont pas des effets opposés, puisque la forme phosphomimétique des sérines ne ralentit pas le transport. Cela peut provenir du fait que les sérines 1181 et 1201 de la fraction de la huntingtine associée aux vésicules est de toute manière phosphorylée *in vivo*. Des travaux récents au laboratoire montrent que Cdk5 est associée aux vésicules (données non publiées), et peut ainsi phosphoryler la huntingtine sur les vésicules.

Les conséquences du transport amélioré des vésicules BDNF en présence de la forme non phosphorylable de HTT conduisent à une augmentation de la libération du BDNF et de la signalisation

en aval. Il est possible que l'activation de cette signalisation, et notamment de phospho-CREB, aboutisse à l'augmentation de l'expression de *bdnf* que nous observons car phospho-CREB stimule la transcription du gène *bdnf* (Martinowich & Lu, 2008). Il y aurait alors activation d'une boucle d'autorégulation positive de la production/sécrétion du BDNF. Il est également possible que la forme non phosphorylable de HTT ait *per se* une fonction plus directe sur la transcription du *bdnf*, peut-être en liaison avec REST/NSF.

L'absence de phosphorylation de la huntingtine sur les sérines 1181 et 1201 a un effet de type antidépresseur sur les animaux sains, et également sur le phénotype d'animaux HD. La forme déphosphorylée serait ainsi suffisante à contrer les effets délétères de la polyQ à la fois sur la synthèse et le transport de BDNF. On peut supposer que la forte signalisation en aval du récepteur TrkB observée chez les animaux *Hdh*^{S1181A/S1201A} se retrouve chez les R6/1; *Hdh*^{S1181A/S1201A}, et explique l'augmentation de survie neuronale et l'amélioration du phénotype comportemental.



DISCUSSION

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de comprendre les mécanismes impliquant la huntingtine dans le contrôle des troubles anxio-dépressifs. Pour ce faire, nous avons posé l'hypothèse que l'expression et le transport du BDNF étaient dépendants de la huntingtine, modulant en conséquence le processus de neurogenèse hippocampique adulte. Enfin, les modifications de la neurogenèse résultantes influeraient sur les comportements liés à l'humeur.

I. Bilan des résultats expérimentaux

Nous avons pu mettre en évidence que la huntingtine était directement impliquée dans les troubles de l'humeur, puisque les trois modèles murins que nous avons étudiés, du plus « général » au plus précis, présentent tous une modification des réponses dans plusieurs tests de comportement liés à l'anxiété et/ou à la dépression. Ainsi, nous avons confirmé que la polyglutamination, responsable chez l'humain de la maladie de Huntington, entraînait un phénotype de type anxio-dépressif chez les animaux *Hdh*^{Q111} (Article I), comme démontré dans plusieurs autres lignées modèles de HD. Ensuite, la délétion de la huntingtine dans les neurones matures de l'hippocampe et du cortex est suffisante pour induire une modification du comportement lié à l'anxiété (Article II). Enfin, la mutation de deux sites de phosphorylation suffit pour modifier le phénotype anxio-dépressif des animaux (Article III).

Ensuite, nous nous sommes penchés sur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pouvaient sous-tendre ces modifications du comportement. Il apparaît ainsi que la huntingtine est impliquée et nécessaire au bon déroulement de l'expression, du transport, et de l'exocytose du BDNF. De ces étapes dépend l'activation des voies de signalisation Akt et des MAPK, qui en conséquence sont également modulées par la huntingtine. De même, il apparaît maintenant évident que la huntingtine normale joue un rôle prépondérant dans la neurogenèse hippocampique chez l'adulte, et tout particulièrement dans les étapes de survie et de maturation des jeunes neurones. Nous avons démontré que ces effets passent au moins en partie par des mécanismes non cellulaires autonomes. Enfin, il apparaît que le statut déphosphorylé de la protéine joue un rôle positif à la fois sur la production et la sécrétion de BDNF et au sens large, sur la neurogenèse.

Comme la forme S1181D/S1201D de la huntingtine ne confère aucune particularité phénotypique aux animaux par rapport au groupe contrôle, nous ne nous intéresserons par la suite qu'aux trois lignées *Hdh*^{Q111}, *CaMKCreER*^{T2}; *Htt*^{flox/flox}, et *Hdh*^{S1181A/S1201A}.

Tableau 20 : Comparatif des observations réalisées sur les différentes lignées de souris étudiées

	<i>Hdh</i> ^{Q111}	<i>CaMKCreER</i> ^{T2} ; <i>Htt</i> ^{flox/flox}	<i>Hdh</i> ^{S1181A/S1201A}	<i>Hdh</i> ^{S1181D/S1201D}
Comportement				
Anxiété	♂ ↗ ♀ ∅	♂ ↗ ♀ ↘	♂ ↘ ♀ ↘	♂ ∅ ♀ ∅
Dépression	♂ ∅ ♀ ↗	♂ ∅ ♀ ∅	♂ ↘ ♀ ↘	♂ ∅ ♀ ∅
Neurogenèse hippocampique adulte				
Prolifération	∅	∅	∅	∅
Survie	-	↘	↗	∅
Maturation/ Dendritogenèse	∅ ♂ ↘ ♀ ∅	∅ ↘	∅ ↗	∅ ∅
BDNF				
Expression	∅	∅	↗	∅
Transport	↘	↘	↗	∅
Exocytose	↘	↘	↗	∅
Signalisation	-	↘	↗	∅

Observations faites par rapport à des différences statistiques vis à vis du groupe contrôle approprié : augmentation (↗), diminution (↘), ou pas de changement (∅) du paramètre étudié (pour le comportement, ↗ signifie par exemple augmentation du phénotype anxieux). Pour la composante maturation de la neurogenèse hippocampique, les paramètres renseignés sont le nombre de cellules NeuN et/ou DCX-positives. Nous avons séparé l'aspect de dendritogenèse, puisque les résultats étaient distincts.

Lorsqu'aucun effet du sexe sur le phénotype n'a été observé, les résultats des mâles et femelles sont présentés regroupés.

A. BDNF

Parmi les données convergentes de l'ensemble de nos modèles, figure le rôle de la huntingtine dans le transport et la sécrétion de BDNF dans les neurones de l'hippocampe (Figure 37). L'expression de la forme polyQ a le même effet que la diminution de l'expression de la huntingtine sauvage, ce qui indique que la polyglutamination de HTT aboutit à une perte de fonction de HTT. La phosphorylation de la HTT sur les sérines 1181 et 1201 agit comme une modification modulatrice de la vitesse des vésicules transportant le BDNF, qui est augmentée lorsque ces sites sont maintenus déphosphorylés.

Selon nos données, les souris *Hdh*^{Q111} ne présentent pas de modification de l'expression de la protéine BDNF qui soit révélée par ELISA ou Western blot. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Lynch et collaborateurs (2007), qui observaient une baisse de BDNF à un âge plus précoce (8,5 semaines), ainsi qu'avec les travaux réalisés sur d'autres lignées modèles de Huntington (voir le Tableau 9). Néanmoins, la délétion de la huntingtine dans les neurones matures du cortex et de l'hippocampe (souris *CaMKCreERT2*; *Htt*^{flox/flox}) n'aboutit pas non plus à une modification de l'expression du *bdnf*. Dans la lignée *Hdh*^{S1181A/S1201A}, une étude de l'expression du transcrite *bdnf* par qPCR nous a permis de révéler clairement une augmentation de la transcription génique, mais

comme discuté précédemment, il peut s'agir d'une conséquence de l'augmentation de la sécrétion de BDNF et de l'activation d'une boucle d'autostimulation via phospho-CREB.

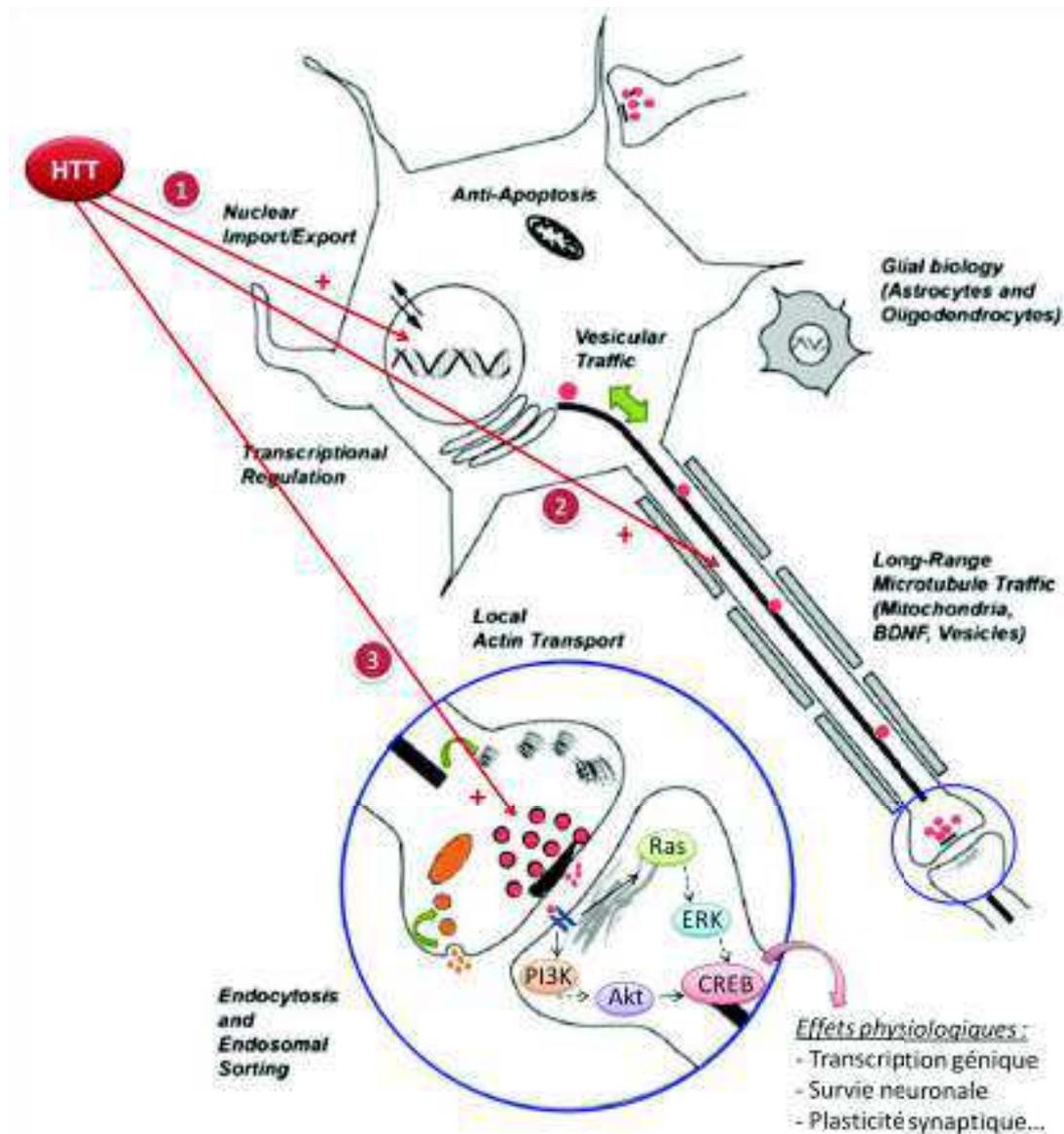


Figure 37 : Action de la huntingtine sur l'expression, le transport et la sécrétion de BDNF

La huntingtine a une action positive (flèches rouges) sur la transcription génique du *bdnf* (1), son transport vésiculaire (2), et son exocytose (3). La libération synaptique de BDNF (points roses) et sa fixation sur son récepteur Trkb (en bleu) entraînent l'activation des cascades de signalisation Akt et MAPK, qui vont permettre son effet biologique.

Les flèches noires en pointillés représentent une activation indirecte (étapes supplémentaires non représentées).

Modifié et complété d'après Schulte & Littleton, 2011

B. Neurogenèse hippocampique

L'ensemble de nos modèles implique la HTT dans le contrôle de la neurogenèse dans l'hippocampe adulte. L'altération de l'arborisation dendritique est présente dans tous les modèles (sauf étonnamment chez les femelles *Hdh^{Q111}*). Puisqu'elle est présente chez les *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*, cela indique que c'est un mécanisme non cellulaire autonome qui est à l'œuvre, probablement *via* le BDNF comme expliqué plus haut. La mise en place et le maintien des nouveaux neurones impliquent donc le substrat trophique constitué par les neurones préexistants. Ces résultats laissent penser que les défauts de maturation neuronale observés dans le modèle *Hdh^{Q111}*, de même que les effets bénéfiques observés chez les *Hdh^{S1181A/S1201A}*, sont dus à la mutation de la huntingtine dans le réseau préexistant, plus que dans les jeunes neurones eux-mêmes. En revanche en ce qui concerne la prolifération cellulaire, aucun effet n'a été observé dans la lignée *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*, ce qui contraste avec la plupart des modèles de souris HD. Les souris *Hdh^{Q111}* ne présentent pas non plus de défauts de prolifération, car sans doute trop jeunes, ces effets apparaissant tardivement dans les autres lignées HD, lorsque des défauts moteurs deviennent apparents (Gil et al., 2005, 2004; Kandasamy et al., 2010; Lazic et al., 2004, 2006; Peng et al., 2008; Walker et al., 2011). Il est ainsi possible que les défauts de prolifération cellulaire mis en évidence dans les autres modèles HD soient la conséquence d'un mécanisme cellulaire autonome qui n'est pas reproduit dans le modèle *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*, peut-être lié au rôle de HTT dans l'orientation du fuseau mitotique au cours de la neurogenèse (Godin et al., 2010).

C. Résultats de comportement

Dans les trois lignées de souris que nous avons étudiées, on observe une modification de la réponse des mâles dans les tests d'anxiété, que ce soit dans le sens d'un effet anxiogène (*Hdh^{Q111}* et *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*) ou anxiolytique (*Hdh^{S1181A/S1201A}*) de la mutation. En ce qui concerne les souris femelles, elles présentent soit une réponse de type anxiolytique (*CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}* et *Hdh^{S1181A/S1201A}*), soit une absence de modification par rapport au groupe témoin (*Hdh^{Q111}*). Ces résultats suggèrent donc une relative protection des femelles par rapport au phénotype de type anxieux. Ce n'est en revanche pas le cas des comportements liés à la dépression, puisque mis à part le cas des *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*, elles affichent un changement du phénotype lié à la dépression qui va soit dans le sens d'une protection (*Hdh^{S1181A/S1201A}*), soit dans celui d'une « sensibilité » accrue (*Hdh^{Q111}*) aux tests évaluant un comportement de type dépressif.

Chez les *Hdh^{S1181A/S1201A}*, un lien de cause à effet a pu être démontré entre la neurogenèse dans l'hippocampe et les effets anxiolytiques/antidépresseurs observés dans le comportement dans le

NSF. Dans ce modèle du moins, une partie du comportement est expliquée de manière claire par l'histologie. Cette amélioration du phénotype comportemental reproduit les effets des antidépresseurs, qui nécessitent la neurogenèse pour induire certains de leurs effets comportementaux (Santarelli et al., 2003). Il a ainsi été démontré que les antidépresseurs, via la neurogenèse adulte, restaurent le contrôle de l'hippocampe sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Surget et al., 2011). Il semble ainsi que les neurones nouvellement générées peuvent faciliter l'intégration du stress, et l'augmentation de la neurogenèse permet à l'hippocampe dysfonctionnel de restaurer le contrôle sur les systèmes de réponse au stress, permettant ainsi la récupération.

Les résultats de comportement obtenus sur la lignée *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}* laissent supposer que les phénotypes de type dépressif ne sont pas liés à un rôle de la huntingtine sauvage dans les neurones matures de l'hippocampe et du cortex, au contraire des comportements d'anxiété. Ainsi, si l'on observe un phénotype lié à la dépression dans les modèles *Hdh* impliquant les formes polyQ, le rôle de la huntingtine est soit lié à des gains de fonctions dans ces cellules, soit lié à son implication dans d'autres types cellulaires, par exemple les cellules sérotoninergiques provenant du raphé, dans lesquelles l'expression de récepteurs sérotoninergiques serait modifiée dans des modèles HD (Pang et al., 2009; Renoir et al., 2012). Une altération des systèmes monoaminergiques est effectivement à envisager, puisque des concentrations tissulaires réduites de sérotonine, dopamine et noradrénaline, et du principal métabolite de la sérotonine, le 5-HIAA, ont été mesurées dans différentes régions cérébrales, notamment le striatum, le cortex et l'hippocampe, chez les souris R6/1 (Renoir et al., 2011a). En outre, l'expression de plusieurs récepteurs de la sérotonine, et celle de son transporteur SERT, sont altérées dans l'hippocampe et le cortex de cette lignée (Pang et al., 2009; Renoir et al., 2012). Par ailleurs, l'absence de réponse des animaux HD à la désipramine, et dans une moindre mesure à la sertraline (respectivement antidépresseur tricyclique et ISRS) (Pang et al., 2009), suggère une altération de la signalisation sérotoninergique et noradrénergique. L'altération du comportement d'escalade présentée par les souris *Hdh^{Q111}* dans le FST corrobore cette hypothèse d'un dysfonctionnement du système noradrénergique central (Orvoen et al., 2012).

D. Aspects dépendants du sexe

L'aspect le plus étonnant des résultats comportementaux concerne les aspects sexe-spécifiques, tout particulièrement chez les *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}* qui présentent par rapport aux contrôles des effets opposés sur l'anxiété selon le sexe. Par ailleurs, nous montrons que les mâles *Hdh^{Q111}* sont plus anxieux (comme les mâles *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*) et que les femelles *Hdh^{Q111}* présentent un

phénotype dépressif. De nombreux effets spécifiques en fonction du sexe ont été observés d'un point de vue comportemental et moléculaire dans plusieurs autres lignées de souris HD (Pang et al., 2009; Renoir et al., 2011b). Chez les humains, nous savons que la dépression touche globalement deux fois plus de femmes que d'hommes. Cette prévalence semble également se dégager dans la maladie de Huntington, bien qu'aucune différence homme/femme ne soit reportée dans la littérature à ce jour. Cependant, nos recherches bibliographiques (Tableau 3) laissent penser qu'elle touche légèrement plus de femmes que d'hommes, ou du moins que plus de patientes consultent. En effet, d'après les études analysées plus haut, il apparaît que, sur un total de près de 4300 patients, 54% sont des femmes. Malheureusement aucune de ces études ne distingue la prévalence des différents troubles de l'humeur en fonction du sexe des patients, rendant difficile l'estimation d'une possible spécificité de sexe. Cependant, une prescription plus fréquente de benzodiazépines a été décrite chez les patients HD masculins (Dewhurst et al., 1970). Ceci suggère que la survenue des troubles anxieux serait plus fréquente chez les hommes, et est en accord avec nos résultats obtenus chez les souris *Hdh*^{Q111} et *CaMKCreER*^{T2}; *Htt*^{flox/flox}.

BDNF

Nous n'avons pas trouvé d'effets sexe-spécifiques dans la lignée *Hdh*^{S1181A/S1201A}. Cette mutation très précise ne doit affecter que des paramètres cellulaires restreints (potentiellement uniquement le transport du BDNF) qui n'entraînent pas de conséquences dépendantes du sexe. En revanche, la mutation polyQ de la huntingtine ou l'ablation de la huntingtine entière dans les neurones matures du cortex et de l'hippocampe doivent avoir des effets plus larges dont certains entrent en interférence avec des mécanismes liés au sexe.

En effet, l'impact du sexe sur les effets de BDNF a déjà été mis en évidence. Ainsi, une étude a examiné l'effet d'un knock-out conditionnel de *bdnf* dans le cerveau antérieur de souris adultes (Monteggia et al., 2007). Les mâles présentaient une hyperactivité et des comportements liés à la dépression normaux. En revanche, les femelles affichent une activité locomotrice normale, mais une augmentation importante des comportements de type dépressifs. Un second travail effectué sur ce modèle a mis en évidence une susceptibilité au stress plus élevée chez les femelles que chez les mâles (Autry et al., 2009). Ces différences relatives au sexe dans les comportements de type anxio-dépressif chez la souris knock-out conditionnelle fournissent une preuve directe du rôle du BDNF dans la dépression, et que des mécanismes sexe-spécifiques sont à l'œuvre dans ce lien. Par ailleurs, seuls les mâles *bdnf* +/- présentent une hyperactivation du récepteur TrkB dans le cortex frontal et le striatum, suggérant des changements de la signalisation TrkB en fonction du sexe (Hill & van den Buuse, 2011). La phosphorylation sexe-spécifique de TrkB correspondrait à des changements en aval dans la phosphorylation de ERK dans le cortex frontal et le striatum.

Système sérotoninergique

Pour émettre des hypothèses sur l'origine de la dépression des animaux *Hdh^{Q111}* femelles, on peut s'appuyer sur les données obtenues dans la lignée R6/1. Une baisse globale d'expression des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} et 5-HT_{2A}, mais pas du 5-HT_{2C} a été mesurée chez ces souris (Pang et al., 2009; Renoir et al., 2012). Des effets du sexe ont également été décrits : les femelles R6/1 expriment moins de récepteurs 5-HT_{1B} que les mâles dans l'hippocampe, tandis qu'une diminution de l'expression des récepteurs 5-HT_{2A} a été observée chez les mâles WT en comparaison des femelles, toujours dans l'hippocampe (Pang et al., 2009). En outre, seules les souris R6/1 femelles présentent une réponse exacerbée dans le test d'hypothermie induite par le 8-OH DPAT (Renoir et al., 2011b, 2012), ce qui suggère une diminution de la fonctionnalité des récepteurs 5-HT_{1A} en fonction du sexe. Les concentrations cérébrales de sérotonine et de tryptophane hydroxylase 2 sont également plus élevées chez les souris R6/1 mâles (Renoir et al., 2011b). De plus, l'expression du transporteur de la sérotonine (le SERT) dans l'hippocampe des souris sauvages femelles tend à excéder celle des animaux contrôles mâles (Pang et al., 2009). Il aurait été intéressant que ces auteurs puissent aussi étudier l'expression des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} et du transporteur SERT au niveau pré-synaptique, c'est à dire sur les corps cellulaires des neurones des noyaux du raphé. Des caractéristiques similaires ont été relevées dans des modèles non HD, ce qui suggère que la spécificité liée au sexe est plus générale.

En ce qui concerne les différences de comportements anxieux des *CaMKCreER^{T2}; Htt^{flox/flox}*, elles ne peuvent être expliquées par les paramètres histologiques et moléculaires que nous avons étudiés puisque la neurogenèse hippocampique et la signalisation BDNF/TrkB sont affectées de manière similaire dans les deux sexes. Nous devons donc supposer que l'absence d'expression de *htt* dans les neurones matures corticaux et hippocampaux à l'âge adulte aboutit à une altération encore inconnue, qui a des conséquences différentes selon le sexe.

E. Implication possible de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Les observations comportementales que nous avons réalisées ne sont pas toutes explicables par ce qui se passe dans l'hippocampe. Notamment, les observations menées chez les souris *HdhQ111* laissent penser que la dépression n'implique pas systématiquement une altération de la neurogenèse hippocampique. Un autre mécanisme indépendant de la neurogenèse serait donc responsable du comportement observé chez les femelles (David et al., 2009 ; Snyder et al., 2011 ; Surget et al., 2008). Un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) est une piste potentielle

pour expliquer ce phénotype. En effet, des dysfonctions de ce système sont observées à la fois dans la dépression et dans la maladie de Huntington.

L'axe HPA permet la réponse adaptative au stress (Matthews et al., 2005), et sa dysfonction est proposée comme une des causes de la dépression. En réponse à un stimulus stressant, l'hypothalamus libère la CRH (corticotropin-releasing hormone), qui agit sur l'hypophyse qui sécrète en retour l'ACTH (adrenocorticotrophic hormone) dans le sang. La glande surrénale répond à ce signal en libérant le cortisol (corticostérone chez la souris), l'hormone du stress. Le cortisol exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Chopra et al., 2011 ; Farvolden et al., 2003), permettant la réponse adaptative aigüe au stress. Il est suspecté que ce rétrocontrôle soit altéré dans le cas de la dépression, entraînant une augmentation chronique des taux de CRF et de cortisol dans le sang. Chez la souris, un apport de corticostéroïde exogène dans l'eau de boisson est suffisant pour reproduire un phénotype anxio-dépressif chez les animaux (David et al., 2009).

Dans la maladie de Huntington, on observe une dégénérescence de l'hypothalamus, qui pourrait entraîner le phénotype d'hypercorticisme observé chez les patients. En effet, de nombreuses études mettent en lumière une augmentation des concentrations sanguines de cortisol, ainsi qu'un dérèglement de la réponse de l'axe HPA (Aziz et al., 2009 ; Heuser et al., 1991 ; Saleh et al., 2009 ; van Duijn et al., 2010). Il semble que cette hyperproduction de glucocorticoïde soit antérieure à l'apparition des troubles moteurs (van Duijn et al., 2010). D'autres observations cliniques, telles que la perte de poids, les troubles du sommeil, et l'altération des rythmes circadiens, peuvent être dus à l'atrophie de l'hypothalamus, et donc au dérèglement du fonctionnement de l'axe HPA (Petersén & Björkqvist, 2006). Une augmentation du taux de glucocorticoïdes due à une sur-activation de l'axe HPA est observée chez les souris R6/2 (Björkqvist *et al.* 2006).

II. Conclusions et perspectives

Malgré la difficulté inhérente à la comparaison de trois modèles murins différents, sur des fonds génétiques différents, avec des âges d'étude différents, nous pouvons conclure grâce à ce travail que :

- 1) la huntingtine sauvage stimule le trafic vésiculaire et la sécrétion de BDNF dans les neurones hippocampiques et cette action est diminuée par la mutation polyQ ou augmentée par la déphosphorylation sur les sérines 1181 et 1201. Cela peut aboutir à des conséquences mesurables *in vivo* sur l'activation de voies de signalisation (Akt, ERK, CREB).
- 2) la huntingtine est impliquée dans le soutien exercé par les neurones matures sur les nouveaux neurones, nécessaires à leur survie à long terme et à la formation d'une arborisation dendritique normale. Le candidat idéal comme support moléculaire de ce soutien est le BDNF.
- 3) la huntingtine est impliquée dans le comportement anxieux des souris lorsqu'il s'agit de la huntingtine exprimée dans les neurones matures corticaux et hippocampiques adultes. La huntingtine exprimée ailleurs dans le cerveau ou exprimée plus tôt qu'à l'âge adulte peut influencer sur le comportement dépressif. La huntingtine interfère avec des processus sex-spécifiques, indépendamment de l'état de phosphorylation des sérines 1181 et 1201.

Enfin, ces travaux suggèrent qu'un inhibiteur de la phosphorylation sur les sérines 1181 et 1201 pourrait représenter une piste thérapeutique intéressante dans le traitement des troubles de l'humeur en général, et de ceux liés à la maladie de Huntington en particulier.

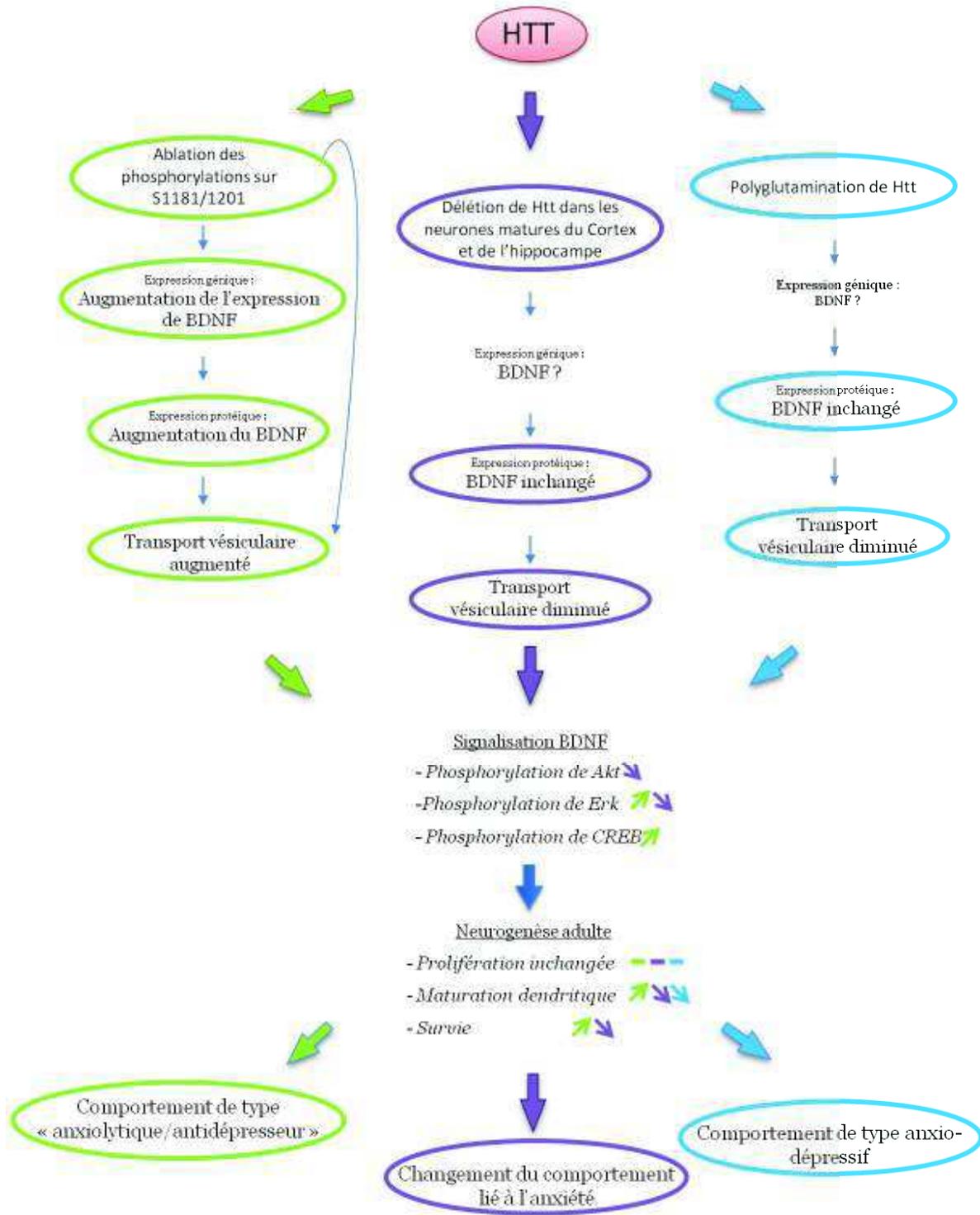


Figure 38 : Schéma récapitulatif des observations

Dans la lignée *Hdh*^{S1181A/S1201D}, la huntingtine agit simultanément sur l'expression générique et le transport du BDNF. Il est possible que les modifications de la signalisation en aval induisent, *via* pCREB, un rétrocontrôle positif sur la transcription de *bdnf*, accentuant encore l'effet premier de la huntingtine.

A noter également que Lynch et collaborateurs ont observé une diminution de la concentration de BDNF dans l'hippocampe de souris *Hdh*^{Q111} (Lynch et al., 2007).

Les suites de ce travail peuvent s'articuler selon deux axes :

- 1) une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'effet de la huntingtine sur les comportements d'anxiété-dépression
- 2) l'étude des mécanismes dépendants de la huntingtine dans le contexte d'anxiété-dépression, hors du contexte de la maladie de Huntington

La phosphorylation de la sérine 421 a, *in vitro*, des effets positifs sur le transport du BDNF, et se trouve réduite dans le cerveau de patients HD (Colin et al., 2008; Warby et al., 2005; Zala et al., 2008). De manière parallèle à ce que nous avons fait pour les sérines 1181 et 1201, il serait intéressant d'étudier le comportement anxio-dépressif des animaux exprimant une huntingtine constitutivement phosphorylée ou déphosphorylée sur cette sérine 421. Si la forme S421D de la huntingtine induit également *in vivo* une amélioration du transport du BDNF, on peut espérer observer une hausse de la neurogenèse adulte et un effet positif sur le contrôle de l'humeur comme c'est le cas pour la forme non phosphorylée S1181A/S1201A. Dans ce cas-là on pourra alors étudier l'effet de l'expression de cette forme de la huntingtine dans un modèle de HD, voire l'effet conjoint des mutations des 3 sérines par la construction d'une lignée *Hdh*^{S421D/S1181A/S1201A}.

Au cours de ce travail, nous avons examiné les fonctions de la huntingtine sur les comportements liés à l'humeur. L'approche inverse, c'est-à-dire l'étude de la huntingtine dans des modèles d'anxiété et dépression, peut également être envisagée. En effet, des travaux récents du laboratoire (Xia et al., 2012) ont mis en évidence une modulation de l'expression de la huntingtine, et d'autres protéines reliées à la maladie de Huntington, dans un modèle de souris anxieuses et hypersérotinergiques, les double knock-out 5-HT_{1A, 1B}.

Nous pourrions ainsi étudier l'expression de la huntingtine, et son statut de phosphorylation dans le modèle CORT de souris anxio-dépressives développé au laboratoire (David et al., 2009). L'étude de microarrays permettrait également de vérifier si les gènes liés à la maladie de Huntington qui se trouvaient différemment exprimés dans le modèle double KO 5-HT_{1A, 1B}, le sont également dans un modèle non génétique d'anxiété-dépression.

Suite à ce travail, plusieurs questions restent néanmoins en suspens :

Chez les patients HD, la longueur de la répétition de CAG est corrélée à l'âge d'apparition des symptômes moteurs, et à la rapidité de développement de la maladie. Mais on ne sait pas si c'est également le cas pour les troubles anxio-dépressifs.

Malgré les preuves de troubles affectifs dans la maladie de Huntington et la sensibilité supérieure des femmes à développer une dépression dans la population générale, une étude du dimorphisme sexuel dans le développement de la dépression chez les patients HD est encore nécessaire. La compréhension des mécanismes sexe-spécifiques chez la souris est cependant un pré-requis pour envisager une adaptation du traitement en fonction du genre.

Références bibliographiques

- A** Anne, S. L., Saudou, F., & Humbert, S. (2007). Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(27), 7318-28.
- Autry, A. E., Adachi, M., Cheng, P., & Monteggia, L. M. (2009). Gender-specific impact of brain-derived neurotrophic factor signaling on stress-induced depression-like behavior. *Biological psychiatry*, 66(1), 84-90.
- Autry, A. E., & Monteggia, L. M. (2012). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacological reviews*, 64(2), 238-258.
- Aziz, N. A., Pijl, H., Frölich, M., van der Graaf, A. W., Roelfsema, F., Roos, R. A. (2009). Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in Huntington's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(4):1223-8.
- B** Bai, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom, T., & Skolnick, P. (2001). Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 70(2-3), 187-92.
- Becker, S. (2005). A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus*, 15(6), 722-38.
- Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M., & Canossa, M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15570-15575.
- Bhattacharyya, N. P., Banerjee, M., & Majumder, P. (2008). Huntington's disease: roles of huntingtin-interacting protein 1 (HIP-1) and its molecular partner HIPPI in the regulation of apoptosis and transcription. *The FEBS journal*, 275(17), 4271-9.
- Björkqvist, M., Petersén, A., Bacos, K., Isaacs, J., Norlén, P., et al. (2006). Progressive alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 15(10), 1713-21.
- Bode, F. J., Stephan, M., Suhling, H., Pabst, R., Straub, R. H., Raber, K. a, Bonin, M., et al. (2008). Sex differences in a transgenic rat model of Huntington's disease: decreased 17beta-estradiol levels correlate with reduced numbers of DARPP32+ neurons in males. *Human molecular genetics*, 17(17), 2595-609.
- Borrell-Pagès, M., Zala, D., Humbert, S., & Saudou, F. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 63(22), 2642-60.
- C** Canals, J. M., Pineda, J. R., Torres-Peraza, J. F., Bosch, M., Martín-Ibañez, R., Muñoz, M. T., Mengod, G., et al. (2004). Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(35), 7727-39.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., Dunnett, S. B., et al. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(8), 3248-57.
- Castro, M. E., Pascual, J., Romón, T., Berciano, J., Figols, J., & Pazos, A. (1998). 5-HT1B receptor binding in degenerative movement disorders. *Brain research*, 790(1-2), 323-8.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F., & Sipione, S. (2001). Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends in neurosciences*, 24(3), 182-8.

- Cattaneo, E., Zuccato, C., & Tartari, M. (2005). Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *6*(12), 919-30.
- Caviston, J. P., & Holzbaur, E. L. F. (2009). Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends in cell biology*, *19*(4), 147-55.
- Cha, J.-H. J. (2007). Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Progress in neurobiology*, *83*(4), 228-48.
- Chiu, C.-T., Liu, G., Leeds, P., & Chuang, D.-M. (2011). Combined treatment with the mood stabilizers lithium and valproate produces multiple beneficial effects in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *36*(12), 2406-21.
- Chopra, K., Kumar, B., Kuhad, A. (2011). Pathobiological targets of depression. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *15*(4): 379-400.
- Ciamei, A., & Morton, a J. (2008). Rigidity in social and emotional memory in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of learning and memory*, *89*(4), 533-44.
- Ciammola, A., Sassone, J., Cannella, M., Calza, S., Poletti, B., Frati, L., Squitieri, F., et al. (2007). Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, *144B*(4), 574-7.
- Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pagès, M., Li, X.-J., Saudou, F., et al. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *The EMBO journal*, *27*(15), 2124-34.
- Conti, A. C., Cryan, J. F., Dalvi, A., Lucki, I., & Blendy, J. A. (2002). cAMP Response Element-Binding Protein Is Essential for the Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcription, But Not the Behavioral or Endocrine Responses to Antidepressant Drugs. *J. Neurosci.*, *22*(8), 3262-3268.
- Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., et al. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *The European journal of neuroscience*, *21*(1), 1-14.
- Craufurd, D., Thompson, J. C., & Snowden, J. S. (2001). Behavioral changes in Huntington Disease. *Neuropsychiatry, neuropsychology, and behavioral neurology*, *14*(4), 219-26.
- Crook, Z. R., & Housman, D. (2011). Huntington's Disease: Can Mice Lead the Way to Treatment? *Neuron*, *69*(3), 423-435.
- Cudkovicz, M., & Kowall, N. W. (1990). Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex. *Annals of neurology*, *27*(2), 200-4.
- Cunha, C., Brambilla, R., & Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in molecular neuroscience*, *3*(February), 1.
- Curtis, A., Mitchell, I., Patel, S., Ives, N., & Rickards, H. (2009). A pilot study using nabilone for symptomatic treatment in Huntington's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, *24*(15), 2254-9.
- Curtis, M. A., Penney, E. B., Pearson, A. G., van Roon-Mom, W. M. C., Butterworth, N. J., Dragunow, M., Connor, B., et al. (2003). Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(15), 9023-7.
- D** David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J.-W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, *62*(4), 479-93.
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. a, Scherzinger, E., et al. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, *90*(3), 537-48.

- de la Monte, S. M., Vonsattel, J. P., & Richardson, E. P. (1988). Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 47(5), 516-25.
- Decressac, M., Wright, B., Tyers, P., Gaillard, A., & Barker, R. A. (2010). Neuropeptide Y modifies the disease course in the R6/2 transgenic model of Huntington's disease. *Experimental neurology*, 226(1), 24-32.
- Dewhurst, K., Oliver, J. E., & McKnight, A. L. (1970). Socio-psychiatric consequences of Huntington's disease. *The British journal of psychiatry: the journal of mental science*, 116(532), 255-8.
- Donovan, M. H., Yamaguchi, M., & Eisch, A. J. (2008). Dynamic expression of TrkB receptor protein on proliferating and maturing cells in the adult mouse dentate gyrus. *Hippocampus*, 18(5), 435-9.
- Dragatsis, I., Levine, M. S., & Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature genetics*, 26(3), 300-6.
- Drevets, W. C., Thase, M. E., Moses-Kolko, E. L., Price, J., Frank, E., Kupfer, D. J., & Mathis, C. (2007). Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nuclear medicine and biology*, 34(7), 865-77.
- Drouet, V., Perrin, V., Hassig, R., Dufour, N., Auregan, G., Alves S, Bonvento G. et al. (2009). Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Annals of Neurology*. 2009 Mar;65(3):276-85.
- Duan, W., Guo, Z., Jiang, H., Ware, M., Li, X.-J., & Mattson, M. P. (2003). Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2911-6.
- Duan, W., Peng, Q., Masuda, N., Ford, E., Tryggestad, E., Ladenheim, B., Zhao, M., et al. (2008). Sertraline slows disease progression and increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, 30(3), 312-22.
- Duff, K., Paulsen, J. S., Beglinger, L. J., Langbehn, D. R., & Stout, J. C. (2007). Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study. *Biol. Psychiatry*, 62, 1341-1346.
- Dulawa, S. C., & Hen, R. (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(4-5), 771-83.
- Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B., & Hen, R. (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29(7), 1321-30.
- Duman, R. S. (2002). Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *European psychiatry: the journal of the Association of European Psychiatrists*, 17 Suppl 3(October), 306-10.
- Duman, R. S. (2004a). Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 6, 157-169.
- Duman, R. S. (2004b). Role of Neurotrophic Factors in the Etiology and Treatment of Mood Disorders. *NeuroMolecular Medicine*, 5(1), 011-026.
- Duyao, M. P., Auerbach, A. B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G. T., McNeil, S. M., Ge, P., et al. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*, 269(5222), 407-10.
- E** Eisch, A. J., Cameron, H. A., Encinas, J. M., Meltzer, L. a, Ming, G.-L., & Overstreet-Wadiche, L. S. (2008). Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(46), 11785-91.
- Erdmann, G., Schütz, G., & Berger, S. (2007). Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC neuroscience*, 8, 63.

- F** Farvolden, P., Kennedy, S. H., Lam, R. W. (2003). Recent developments in the psychobiology and pharmacotherapy of depression: optimising existing treatments and novel approaches for the future. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 12(1): 65-86.
- Faure, A., Höhn, S., von Hörsten, S., Delatour, B., Raber, K., Le Blanc, P., Desvignes, N., et al. (2011). Altered emotional and motivational processing in the transgenic rat model for Huntington's disease. *Neurobiology of learning and memory*, 95(1), 92-101.
- Fedele, V., Roybon, L., Nordström, U., Li, J.-Y., & Brundin, P. (2010). Neurogenesis in R6/2 mouse model of Huntington's disease is impaired at the level of NeuroD1. *Neuroscience*, 173(2009), 76 - 81.
- Ferrer, I., Goutan, E., Marín, C., Rey, M. J., & Ribalta, T. (2000). Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain research*, 866(1-2), 257-61.
- File, S. E., Mahal, A., Mangiarini, L., & Bates, G. P. (1998). Striking changes in anxiety in Huntington's disease transgenic mice. *Brain research*, 805(1-2), 234-40.
- Folstein, S. E., Chase, G. A., Wahl, W. E., McDonnell, A. M., & Folstein, M. F. (1987). Huntington disease in Maryland: clinical aspects of racial variation. *American journal of human genetics*, 41(2), 168-79.
- Frank, S. (2010). Tetrabenazine: the first approved drug for the treatment of chorea in US patients with Huntington disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 6, 657-65.
- Frielingsdorf, H., Simpson, D. R., Thal, L. J., & Pizzo, D. P. (2007). Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiology of disease*, 26(1), 47-55.
- Futter, M., Diekmann, H., Schoenmakers, E., Sadiq, O., Chatterjee, K., & Rubinsztein, D. C. (2009). Wild-type but not mutant huntingtin modulates the transcriptional activity of liver X receptors. *Journal of medical genetics*, 46(7), 438-46.
- G** Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelières, F. P., De Mey, J., et al. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, 118(1), 127-38.
- Geuze, E., Vermetten, E., & Bremner, J. D. (2005). MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. *Molecular psychiatry*, 10(2), 160-84.
- Gil, J. M. A. C., Leist, M., Popovic, N., Brundin, P., & Petersén, A. (2004). Asialoerythropoietin is not effective in the R6/2 line of Huntington's disease mice. *BMC neuroscience*, 5, 17.
- Gil, J. M. A. C., Mohapel, P., Araújo, I. M., Popovic, N., Li, J.-Y., Brundin, P., & Petersén, A. (2005). Reduced hippocampal neurogenesis in R6/2 transgenic Huntington's disease mice. *Neurobiology of disease*, 20(3), 744-51.
- Ginés, S., Bosch, M., Marco, S., Gavaldà, N., Díaz-Hernández, M., Lucas, J. J., Canals, J. M., et al. (2006). Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *The European journal of neuroscience*, 23(3), 649-58.
- Ginés, S., Paoletti, P., & Alberch, J. (2010). Impaired TrkB-mediated ERK1/2 activation in huntington disease knock-in striatal cells involves reduced p52/p46 Shc expression. *The Journal of biological chemistry*, 285(28), 21537-48.
- Ginés, S., Seong, I. S., Fossale, E., Ivanova, E., Trettel, F., Gusella, J. F., Wheeler, V. C., et al. (2003). Specific progressive cAMP reduction implicates energy deficit in presymptomatic Huntington's disease knock-in mice. *Human molecular genetics*, 12(5), 497-508.
- Godin, J. D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B. C., Dietrich, P., et al. (2010). Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis. *Neuron*, 67(3), 392-406.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., & Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience*, 2(3), 260-5.

- Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., et al. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell*, 125(6), 1179-91.
- Gray, M., Shirasaki, D. I., Cepeda, C., André, V. M., Wilburn, B., Lu, X.-H., Tao, J., et al. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *The Journal of neuroscience* □: the official journal of the Society for Neuroscience, 28(24), 6182-95.
- Grote, H. E., Bull, N. D., Howard, M. L., van Dellen, A., Blakemore, C., Bartlett, P. F., & Hannan, A. J. (2005). Cognitive disorders and neurogenesis deficits in Huntington's disease mice are rescued by fluoxetine. *The European journal of neuroscience*, 22(8), 2081-8.
- H Hackam, A. S., Singaraja, R., Wellington, C. L., Metzler, M., McCutcheon, K., Zhang, T., Kalchman, M., et al. (1998). The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *The Journal of cell biology*, 141(5), 1097-105.
- Hamm, R. J., Pike, B. R., O'Dell, D. M., Lyeth, B. G., & Jenkins, L. W. (1994). The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 11(2), 187-96.
- Harjes, P., & Wanker, E. E. (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(8), 425-433.
- Heng, M. Y., Tallaksen-Greene, S. J., Detloff, P. J., & Albin, R. L. (2007). Longitudinal evaluation of the Hdh(CAG)150 knock-in murine model of Huntington's disease. *The Journal of neuroscience* □: the official journal of the Society for Neuroscience, 27(34), 8989-98.
- Heuser, I.J., Chase, T.N., Mouradian, M.M. (1991). The limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis in Huntington's disease. *Biological Psychiatry*. 30(9):943-52.
- Hickey, M. A., Gallant, K., Gross, G. G., Levine, M. S., & Chesselet, M.-F. (2005). Early behavioral deficits in R6/2 mice suitable for use in preclinical drug testing. *Neurobiology of disease*, 20(1), 1-11.
- Hickey, M. A., Kosmalska, A., Enayati, J., Cohen, R., Zeitlin, S., Levine, M. S., & Chesselet, M.-F. (2008). Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience*, 157(1), 280-95.
- Hill, R. a, & van den Buuse, M. (2011). Sex-dependent and region-specific changes in TrkB signaling in BDNF heterozygous mice. *Brain Research*, 1384, 51-60.
- Hobbs, N. Z., Pedrick, A. V., Say, M. J., Frost, C., Dar Santos, R., Coleman, A., Sturrock, A., et al. (2011). The structural involvement of the cingulate cortex in premanifest and early Huntington's disease. *Movement disorders* □: official journal of the Movement Disorder Society, 26(9), 1684-90.
- Hodges, A., Hughes, G., Brooks, S., Elliston, L., Holmans, P., Dunnett, S. B., & Jones, L. (2008). Brain gene expression correlates with changes in behavior in the R6/1 mouse model of Huntington's disease. *Genes, Brain and Behavior*, 7(3), 288-299.
- Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B. R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D. J., et al. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, 23(1), 181-92.
- Holl, A. K., Wilkinson, L., Painold, A., Holl, E. M., & Bonelli, R. M. (2010). Combating depression in Huntington's disease: effective antidepressive treatment with venlafaxine XR. *International clinical psychopharmacology*, 25(1), 46-50.
- Holmes, A., Murphy, D. L., & Crawley, J. N. (2002). Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology*, 161(2), 160-7.
- Iannicola, C., Moreno, S., Oliverio, S., Nardacci, R., Ciofi-Luzzatto, A., & Piacentini, M. (2002). Early Alterations in Gene Expression and Cell Morphology in a Mouse Model of Huntington's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), 830-

839.

- Ille, R., Schäfer, A., Scharmüller, W., Enzinger, C., Schögl, H., Kapfhammer, H.-P., & Schienle, A. (2011). Emotion recognition and experience in Huntington disease: a voxel-based morphometry study. *Journal of psychiatry & neuroscience*: JPN, 36(6), 383-90.
- J Jackson, M., Gentleman, S., Lennox, G., Ward, L., Gray, T., Randall, K., Morrell, K., et al. (1995). The cortical neuritic pathology of Huntington's disease. *Neuropathology and applied neurobiology*, 21(1), 18-26.
- Jech, R., Klempír, J., Vymazal, J., Zidovská, J., Klempírová, O., Růžicka, E., & Roth, J. (2007). Variation of selective gray and white matter atrophy in Huntington's disease. *Movement disorders*: official journal of the Movement Disorder Society, 22(12), 1783-9.
- Jin, K., LaFevre-Bernt, M., Sun, Y., Chen, S., Gafni, J., Crippen, D., Logvinova, A., et al. (2005). FGF-2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18189-94.
- Jones, M. D., & Lucki, I. (2005). Sex differences in the regulation of serotonergic transmission and behavior in 5-HT receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology*: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 30(6), 1039-47.
- Julien, C. L., Thompson, J. C., Wild, S., Yardumian, P., Snowden, J. S., Turner, G., & Craufurd, D. (2007). Psychiatric disorders in preclinical Huntington's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 78(9), 939-43.
- K Kandasamy, M., Couillard-Despres, S., Raber, K. a, Stephan, M., Lehner, B., Winner, B., Kohl, Z., et al. (2010). Stem cell quiescence in the hippocampal neurogenic niche is associated with elevated transforming growth factor-beta signaling in an animal model of Huntington disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 69(7), 717-28.
- Kempermann, G. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2), 391-399.
- Kessler, R. C., Gruber, M., Hettema, J. M., Hwang, I., Sampson, N., & Yonkers, K. A. (2008). Co-morbid major depression and generalized anxiety disorders in the National Comorbidity Survey follow-up. *Psychological medicine*, 38(3), 365-74.
- Kingma, E. M., van Duijn, E., Timman, R., van der Mast, R. C., & Roos, R. A. C. (2008). Behavioural problems in Huntington's disease using the Problem Behaviours Assessment. *General hospital psychiatry*, 30(2), 155-61.
- Klivenyi, P., Bende, Z., Hartai, Z., Penke, Z., Nemeth, H., Toldi, J., & Vecsei, L. (2006). Behaviour changes in a transgenic model of Huntington's disease. *Behavioural brain research*, 169(1), 137-41.
- Kohl, Z., Kandasamy, M., Winner, B., Aigner, R., Gross, C., Couillard-Despres, S., Bogdahn, U., et al. (2007). Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain research*, 1155, 24-33.
- Kremer, H. P., Roos, R. A., Dingjan, G., Marani, E., & Bots, G. T. (1990). Atrophy of the hypothalamic lateral tuberal nucleus in Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 49(4), 371-82.
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215), 894-902.
- Kulisevsky, J., Litvan, I., Berthier, M. L., Pascual-Sedano, B., Paulsen, J. S., & Cummings, J. L. (2001). Neuropsychiatric assessment of Gilles de la Tourette patients: comparative study with other hyperkinetic and hypokinetic movement disorders. *Movement disorders*: official journal of the Movement Disorder Society, 16(6), 1098-104.
- L Laforet, G. A., Sapp, E., Chase, K., McIntyre, C., Boyce, F. M., Campbell, M., Cadigan, B. A., et al. (2001). Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, 21(23), 9112-23.

- Landles, C., & Bates, G. P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO reports*, *5*(10), 958-63.
- Lazic, S. E., Grote, H. E., Armstrong, R. J. E., Blakemore, C., Hannan, A. J., van Dellen, A., & Barker, R. A. (2004). Decreased hippocampal cell proliferation in R6/1 Huntington's mice. *Neuroreport*, *15*, 811-813.
- Lazic, S. E., Grote, H. E., Blakemore, C., Hannan, A. J., van Dellen, A., Phillips, W., & Barker, R. a. (2006). Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *The European journal of neuroscience*, *23*(7), 1829-38.
- Leavitt, B. R., Guttman, J. A., Hodgson, J. G., Kimel, G. H., Singaraja, R., Vogl, A. W., & Hayden, M. R. (2001). Wild-type huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant huntingtin in vivo. *American journal of human genetics*, *68*(2), 313-24.
- Lee, J., Duan, W., & Mattson, M. P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *Journal of neurochemistry*, *82*(6), 1367-75.
- Leroi, I., O'Hearn, E., Marsh, L., Lyketsos, C. G., Rosenblatt, A., Ross, C. A., Brandt, J., et al. (2002). Psychopathology in patients with degenerative cerebellar diseases: a comparison to Huntington's disease. *The American journal of psychiatry*, *159*(8), 1306-14.
- Lessmann, V., Gottmann, K., & Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, *69*(5), 341-374.
- Lewin, G. R., & Barde, Y. A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annual review of neuroscience*, *19*, 289-317.
- Li, S. H., Schilling, G., Young, W. S., Li, X. J., Margolis, R. L., Stine, O. C., Wagster, M. V., Abbott, M. H., Franz, M. L., & Ranen, N. G. (1993). Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, *11*(5), 985-93.
- Li, S.-H., & Li, X.-J. (2004). Huntingtin and its role in neuronal degeneration. *The Neuroscientist*: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry, *10*(5), 467-75.
- Lin, C. H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W. M., Cearley, J. A., Jackson, W. S., Crouse, A. B., Ren, S., et al. (2001). Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, *10*(2), 137-44.
- Lira, A., Zhou, M., Castanon, N., Ansoorge, M. S., Gordon, J. A., Francis, J. H., Bradley-Moore, M., et al. (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biological psychiatry*, *54*(10), 960-71.
- Lucassen, P. J., Meerlo, P., Naylor, a S., van Dam, a M., Dayer, a G., Fuchs, E., Oomen, C. a, et al. (2010). Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *European neuropsychopharmacology*: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology, *20*(1), 1-17.
- Lunkes, A., Lindenberg, K. S., Ben-Haïem, L., Weber, C., Devys, D., Landwehrmeyer, G. B., Mandel, J.-L., et al. (2002). Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions. *Molecular cell*, *10*(2), 259-69.
- Luo, S., & Rubinsztein, D. C. (2009). Huntingtin promotes cell survival by preventing Pak2 cleavage. *Journal of cell science*, *122*(Pt 6), 875-85.
- Luo, S., Vacher, C., Davies, J. E., & Rubinsztein, D. C. (2005). Cdk5 phosphorylation of huntingtin reduces its cleavage by caspases: implications for mutant huntingtin toxicity. *The Journal of cell biology*, *169*(4), 647-56.
- Lynch, G., Kramar, E. a, Rex, C. S., Jia, Y., Chappas, D., Gall, C. M., & Simmons, D. a. (2007). Brain-derived neurotrophic factor restores synaptic plasticity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, *27*(16), 4424-34.

- López, J. F., Chalmers, D. T., Little, K. Y., & Watson, S. J. (1998). Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biological psychiatry*, *43*(8), 547-73.
- López-Figueroa, A. L., Norton, C. S., López-Figueroa, M. O., Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., López, J. F., et al. (2004). Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biological psychiatry*, *55*(3), 225-33.
- Low, V. F., Dragunow, M., Tippett, L. J., Faull, R. L. M., Curtis, M. A. (2011). No change in progenitor cell proliferation in the hippocampus in Huntington's disease. *Neuroscience* *199*, 577-88.
- Lyons, M. R., & West, A. E. (2011). Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Progress in neurobiology*, *94*(3), 259-95.
- M** Malberg, J. E., & Blendy, J. A. (2005). Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends in pharmacological sciences*, *26*(12), 631-8.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, *20*(24), 9104-10.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., et al. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, *87*(3), 493-506.
- Marshall, J., White, K., Weaver, M., Flury Wetherill, L., Hui, S., Stout, J. C., Johnson, S. a, et al. (2007). Specific psychiatric manifestations among preclinical Huntington disease mutation carriers. *Archives of neurology*, *64*(1), 116-21.
- Martinowich, K., & Lu, B. (2008). Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology*: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, *33*(1), 73-83.
- Martinowich, K., Manji, H., & Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nature neuroscience*, *10*(9), 1089-93.
- Matthews, K., Christmas, D., Swan, J., Sorrell, E. (2005). Animal models of depression: navigating through the clinical fog. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, *29*(4-5): 503-513.
- Mattson, M. P., Maudsley, S., & Martin, B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences*, *27*(10), 589-94.
- Mayorga, A. J., Dalvi, A., Page, M. E., Zimov-Levinson, S., Hen, R., & Lucki, I. (2001). Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) receptor mutant mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *298*(3), 1101-7.
- Menalled, L. B., El-Khodori, B. F., Patry, M., Suárez-Fariñas, M., Orenstein, S. J., Zahasky, B., Leahy, C., et al. (2009). Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiology of disease*, *35*(3), 319-36.
- Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., & Chesselet, M.-F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *The Journal of comparative neurology*, *465*(1), 11-26.
- Mestre, T. A., & Ferreira, J. J. (2012). An evidence-based approach in the treatment of Huntington's disease. *Parkinsonism & related disorders*, *18*(4), 316-20.
- Miller, B. H., Schultz, L. E., Gulati, A., Su, A. I., & Pletcher, M. T. (2010). Phenotypic characterization of a genetically diverse panel of mice for behavioral despair and anxiety. *PLoS one*, *5*(12), e14458.

- Mochel, F., Durant, B., Durr, A., & Schiffmann, R. (2011). Altered dopamine and serotonin metabolism in motorically asymptomatic R6/2 mice. *PLoS one*, *6*(3), e18336.
- Monteggia, L. M., Luikart, B. W., Barrot, M., Theobald, D., Malkovska, I., Nef, S., Parada, L. F., et al. (2007). Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biological psychiatry*, *61*(2), 187-97.
- Mozhui, K., Karlsson, R.-M., Kash, T. L., Ihne, J., Norcross, M., Patel, S., Farrell, M. R., et al. (2010). Strain differences in stress responsivity are associated with divergent amygdala gene expression and glutamate-mediated neuronal excitability. *The Journal of neuroscience* □: the official journal of the Society for Neuroscience, *30*(15), 5357-67.
- Murgod, U. A., Saleem, Q., Anand, A., Brahmachari, S. K., Jain, S., & Muthane, U. B. (2001). A clinical study of patients with genetically confirmed Huntington's disease from India. *Journal of the neurological sciences*, *190*(1-2), 73-8.
- N** Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., Borowski, A., et al. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, *81*(5), 811-23.
- Naver, B., Stub, C., Møller, M., Fenger, K., Hansen, A. K., Hasholt, L., & Sørensen, S. A. (2003). Molecular and behavioral analysis of the r6/1 huntington's disease transgenic mouse. *Neuroscience*, *122*(4), 1049-1057.
- Neuwald, A. F., & Hirano, T. (2000). HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome research*, *10*(10), 1445-52.
- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews. Neuroscience*, *9*(1), 65-75.
- Nguyen, H. P., Kobbe, P., Rahne, H., Wörpel, T., Jäger, B., Stephan, M., Pabst, R., et al. (2006). Behavioral abnormalities precede neuropathological markers in rats transgenic for Huntington's disease. *Human molecular genetics*, *15*(21), 3177-94.
- Nibuya, M., Morinobu, S., & Duman, R. S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *The Journal of neuroscience* □: the official journal of the Society for Neuroscience, *15*(11), 7539-47.
- Nibuya, M., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience* □: the official journal of the Society for Neuroscience, *16*(7), 2365-72.
- Nithianantharajah, J., Barkus, C., Murphy, M., & Hannan, A. J. (2008). Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiology of disease*, *29*(3), 490-504.
- Novak, M. J. U., & Tabrizi, S. J. (2010). Huntington's disease. *BMJ*, *340*: c3109.
- Novak, M. J. U., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: clinical presentation and treatment. *International review of neurobiology*, *98*, 297-323.
- Numakawa, T., Yokomaku, D., Richards, M., Hori, H., Adachi, N., & Kunugi, H. (2010). Functional interactions between steroid hormones and neurotrophin BDNF. *World journal of biological chemistry*, *1*(5), 133-43.
- O** Orvoen, S., Pla, P., Gardier, A. M., Saudou, F., & David, D. J. (2012). Huntington's disease knock-in male mice show specific anxiety-like behaviour and altered neuronal maturation. *Neuroscience letters*, *507*(2), 127-32.
- P** Pang, T. Y. C., Du, X., Zajac, M. S., Howard, M. L., & Hannan, A. J. (2009). Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, *18*(4), 753-66.

- Pang, T. Y. C., Stam, N. C., Nithianantharajah, J., Howard, M. L., & Hannan, A. J. (2006). Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience*, *141*(2), 569-84.
- Paulsen, J. S., Ready, R. E., Hamilton, J. M., Mega, M. S., & Cummings, J. L. (2001). Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *71*(3), 310-4.
- Paulsen, J. S., Nehl, C., Hoth, K. F., Kanz, J. E., Benjamin, M., Conybeare, R., McDowell, B., et al. (2005). Depression and stages of Huntington's disease. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, *17*(4), 496-502.
- Paulsen, J. S. (2011). Cognitive impairment in Huntington disease: diagnosis and treatment. *Current neurology and neuroscience reports*, *11*(5), 474-83.
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *24*(3), 525-9.
- Peng, Q., Masuda, N., Jiang, M., Li, Q., Zhao, M., Ross, C. A., & Duan, W. (2008). The antidepressant sertraline improves the phenotype, promotes neurogenesis and increases BDNF levels in the R6/2 Huntington's disease mouse model. *Experimental neurology*, *210*(1), 154-63.
- Petersén, A., Björkqvist, M. (2006). Hypothalamic-endocrine aspects in Huntington's disease. *The European Journal of Neuroscience*. *24*(4):961-7.
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F., & Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*, *177*(3), 245-55.
- Phillips, W., Morton, A. J., & Barker, R. A. (2005). Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment. *The Journal of neuroscience* □: *the official journal of the Society for Neuroscience*, *25*(50), 11564-76.
- Pineda, J. R., Canals, J. M., Bosch, M., Adell, A., Mengod, G., Artigas, F., Ernfors, P., et al. (2005). Brain-derived neurotrophic factor modulates dopaminergic deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Journal of neurochemistry*, *93*(5), 1057-68.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, *266*(5604), 730-2.
- Potter, M., Yuan, C., Ottenritter, C., Mughal, M., & van Praag, H. (2010). Exercise is not beneficial and may accelerate symptom onset in a mouse model of Huntington's disease. *PLoS currents*, *2*, RRN1201.
- Pouladi, M. A., Graham, R. K., Karasinska, J. M., Xie, Y., Santos, R. D., Petersén, A., & Hayden, M. R. (2009). Prevention of depressive behaviour in the YAC128 mouse model of Huntington disease by mutation at residue 586 of huntingtin. *Brain* □: *a journal of neurology*, *132*(Pt 4), 919-32.
- Pouladi, M. A., Stanek, L. M., Xie, Y., Franciosi, S., Southwell, A. L., Deng, Y., Butland, S., et al. (2012). Marked differences in neurochemistry and aggregates despite similar behavioural and neuropathological features of Huntington disease in the full-length BACHD and YAC128 mice. *Human molecular genetics*.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, *463*(1-3), 3-33.
- R** Reddy, P. H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W. O., Miller, G., et al. (1998). Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nature genetics*, *20*(2), 198-202.
- Renoir, T., Chevarin, C., Lanfumey, L., & Hannan, A. J. (2011a). Effect of enhanced voluntary physical exercise on brain levels of monoamines in Huntington disease mice. *PLoS currents*, *3*, RRN1281.

- Renoir, T., Pang, T. Y. C., Zajac, M. S., Chan, G., Du, X., Leang, L., Chevarin, C., et al. (2012). Treatment of depressive-like behaviour in Huntington's disease mice by chronic sertraline and exercise. *British journal of pharmacology*, *165*(5), 1375-89.
- Renoir, T., Païzanis, E., Yacoubi, M. E., Saurini, F., Hanoun, N., Melfort, M., Lesch, K. P., et al. (2008). Differential long-term effects of MDMA on the serotonergic system and hippocampal cell proliferation in 5-HTT knock-out vs. wild-type mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *11*(08), 1149-1162.
- Renoir, T., Zajac, M. S., Du, X., Pang, T. Y. C., Leang, L., Chevarin, C., Lanfumey, L., et al. (2011b). Sexually Dimorphic Serotonergic Dysfunction in a Mouse Model of Huntington's Disease and Depression. *PLoS one*, *6*(7), e22133.
- Ritch, J. J., Valencia, A., Alexander, J., Sapp, E., Gatune, L., Sangrey, G. R., Sinha, S., et al. (2012). Multiple phenotypes in Huntington disease mouse neural stem cells. *Molecular and cellular neurosciences*, *50*(1), 70-81.
- Rosas, H. D., Koroshetz, W. J., Chen, Y. I., Skeuse, C., Vangel, M., Cudkowicz, M. E., Caplan, K., et al. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, *60*(10), 1615-20.
- Ross, C. A. (2002). Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron*, *35*(5), 819-22.
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., Fabbri, M. E., et al. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *The European journal of neuroscience*, *24*(7), 1850-6.
- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castrén, M., & Castrén, E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, *25*(5), 1089-94.
- Saleh, N., Moutereau, S., Durr, A., Krystkowiak, P., Azulay, J.-P., Tranchant, C., et al., (2009). Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease. *PLoS One*. *4*(3) e4962.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Dulawa, S. C., Battaglia, F., Weisstaub, N., et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, *301*(5634), 805-9.
- Saydoff, J. A., Garcia, R. A. G., Browne, S. E., Liu, L., Sheng, J., Brenneman, D., Hu, Z., et al. (2006). Oral uridine pro-drug PN401 is neuroprotective in the R6/2 and N171-82Q mouse models of Huntington's disease. *Neurobiology of disease*, *24*(3), 455-65.
- Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., & Croll, S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Experimental neurology*, *192*(2), 348-56.
- Schilling, G., Sharp, A. H., Becher, M. W., Jinnah, H. A., Duan, K., Kotzok, J. A., Slunt, H. H., et al. (1999). Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Human molecular genetics*, *8*(3), 397-407.
- Schulte, J., & Littleton, J. T. (2011). The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Current trends in neurology*, *5*, 65-78.
- Seo, H., Kim, W., & Isacson, O. (2008). Compensatory changes in the ubiquitin-proteasome system, brain-derived neurotrophic factor and mitochondrial complex II/III in YAC72 and R6/2 transgenic mice partially model Huntington's disease patients. *Human molecular genetics*, *17*(20), 3144-53.
- Seo, H., Sonntag, K.-C., & Isacson, O. (2004). Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Annals of neurology*, *56*(3), 319-28.
- Seong, I. S., Ivanova, E., Lee, J.-M., Choo, Y. S., Fossale, E., Anderson, M., Gusella, J. F., et al. (2005). HD CAG repeat implicates a dominant property of huntingtin in mitochondrial energy metabolism. *Human molecular genetics*, *14*(19), 2871-80.

- Shelbourne, P. F., Killeen, N., Hevner, R. F., Johnston, H. M., Tecott, L., Lewandoski, M., Ennis, M., et al. (1999). A Huntington's disease CAG expansion at the murine Hdh locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Human molecular genetics*, 8(5), 763-74.
- Shimazu, K., Zhao, M., Sakata, K., Akbarian, S., Bates, B., Jaenisch, R., & Lu, B. (2006). NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learning & memory*, 13(3), 307-15.
- Shirendeb, U. P., Calkins, M. J., Manczak, M., Anekonda, V., Dufour, B., McBride, J. L., Mao, P., et al. (2012). Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Human molecular genetics*, 21(2), 406-20.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., & Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12(5), 578-84.
- Sieradzan, K., Mann, D. M., & Dodge, A. (1997). Clinical presentation and patterns of regional cerebral atrophy related to the length of trinucleotide repeat expansion in patients with adult onset Huntington's disease. *Neuroscience letters*, 225(1), 45-8.
- Simmons, D. a, Rex, C. S., Palmer, L., Pandeyarajan, V., Fedulov, V., Gall, C. M., & Lynch, G. (2009). Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4906-11.
- Simpson, J. M., Gil-Mohapel, J., Pouladi, M. A., Ghilan, M., Xie, Y., Hayden, M. R., & Christie, B. R. (2011). Altered adult hippocampal neurogenesis in the yac128 transgenic mouse model of huntington disease. *Neurobiology of disease*, 41(2), 249-260.
- Slow, E. J., Van Raamsdonk, J. M., Rogers, D., Coleman, S. H., Graham, R. K., Deng, Y., Oh, R., et al. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human molecular genetics*, 12(13), 1555-67.
- Smith, R., Brundin, P., & Li, J.-Y. (2005). Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 62(17), 1901-12.
- Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., & Cameron, H. A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 476(7361), 458-61.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature genetics*, 21(1), 70-1.
- Sotrel, A., Williams, R. S., Kaufmann, W. E., & Myers, R. H. (1993). Evidence for neuronal degeneration and dendritic plasticity in cortical pyramidal neurons of Huntington's disease: a quantitative Golgi study. *Neurology*, 43(10), 2088-96.
- Spargo, E., Overall, I. P., & Lantos, P. L. (1993). Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 56(5), 487-91.
- Spires, T. L., Grote, H. E., Varshney, N. K., Cordery, P. M., van Dellen, A., Blakemore, C., & Hannan, A. J. (2004). Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, 24(9), 2270-6.
- Stack, E. C., Kubilus, J. K., Smith, K., Cormier, K., Del Signore, S. J., Guelin, E., Ryu, H., et al. (2005). Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *The Journal of comparative neurology*, 490(4), 354-70.
- Stahl, S. M. (2008). Depression and Bipolar Disorder, Stahl's Essential Psychopharmacology, 3rd edition. Cambridge University Press
- Steffan, J. S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B. L., Kazantsev, A., et al. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila. *Nature*, 413(6857), 739-43.

- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-70.
- Strong, T. V., Tagle, D. A., Valdes, J. M., Elmer, L. W., Boehm, K., Swaroop, M., Kaatz, K. W., et al. (1993). Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nature genetics*, 5(3), 259-65.
- Sullivan, F. R., Bird, E. D., Alpay, M., & Cha, J.-H. J. (2001). Remotivation therapy and Huntington's disease. *The Journal of neuroscience nursing*: journal of the American Association of Neuroscience Nurses, 33(3), 136-42.
- Sun, W., Winseck, A., Vinsant, S., Park, O., Kim, H., Oppenheim, R. W. (2004). Programmed cell death of adult-generated hippocampal neurons is mediated by the proapoptotic gene Bax. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience 24(49): 11205-11213.
- Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalou, S., Griebel, G., Hen, R., et al. (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biological psychiatry*, 64(4), 293-301.
- Surget, A., Tanti, A., Leonardo, E. D., Laugeray, A., Rainer, Q., Touma, C., Palme, R., et al. (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Molecular psychiatry*, 1-12.
- Szapacs, M. E., Mathews, T. a, Tessarollo, L., Ernest Lyons, W., Mamounas, L. a, & Andrews, A. M. (2004). Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. *Journal of neuroscience methods*, 140(1-2), 81-92.
- T** Tabrizi, S. J., Langbehn, D. R., Leavitt, B. R., Roos, R. A., Durr, A., Craufurd, D., Kennard, C., et al. (2009). Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet neurology*, 8(9), 791-801.
- Tabrizi, S. J., Scahill, R. I., Durr, A., Roos, R. A., Leavitt, B. R., Jones, R., Landwehrmeyer, G. B., et al. (2011). Biological and clinical changes in premanifest and early stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: the 12-month longitudinal analysis. *Lancet neurology*, 10(1), 31-42.
- Tartari, M., Gissi, C., Lo Sardo, V., Zuccato, C., Picardi, E., Pesole, G., & Cattaneo, E. (2008). Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Molecular biology and evolution*, 25(2), 330-8.
- Thiébot, M. H., Martin, P., & Puech, A. J. (1992). Animal behavioural studies in the evaluation of antidepressant drugs. *The British journal of psychiatry. Supplement*, (15), 44-50.
- Thomas, E. A., Coppola, G., Tang, B., Kuhn, A., Kim, S., Geschwind, D. H., Brown, T. B., et al. (2011). In vivo cell-autonomous transcriptional abnormalities revealed in mice expressing mutant huntingtin in striatal but not cortical neurons. *Human molecular genetics*, 20(6), 1049-60.
- Torpy, J. M., Burke, A. E., Golub, R. M. (2011). Generalized Anxiety Disorder. *Journal of the American Medical Association*. 305(5):522-522.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E. C., & Mandel, J. L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nature genetics*, 10(1), 104-10.
- Trueman, R. C., Brooks, S. P., Jones, L., & Dunnett, S. B. (2009). Rule learning, visuospatial function and motor performance in the Hdh(Q92) knock-in mouse model of Huntington's disease. *Behavioural brain research*, 203(2), 215-22.
- Trushina, E., Dyer, R. B., Badger, J. D., Ure, D., Eide, L., Tran, D. D., Vrieze, B. T., et al. (2004). Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology*, 24(18), 8195-209.

- Turmaine, M., Raza, A., Mahal, A., Mangiarini, L., Bates, G. P., & Davies, S. W. (2000). Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(14), 8093-8097.
- V van Duijn, E., Kingma, E. M., Timman, R., Zitman, F. G., Tibben, A., Roos, R. A. C., & van der Mast, R. C. (2008). Cross-sectional study on prevalences of psychiatric disorders in mutation carriers of Huntington's disease compared with mutation-negative first-degree relatives. *The Journal of clinical psychiatry*, *69*(11), 1804-10.
- van Duijn, E., Kingma, E. M., & van der Mast, R. C. (2007). Psychopathology in verified Huntington's disease gene carriers. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, *19*(4), 441-8.
- van Duijn, E., Selis, M. A., Giltay, E. J., Zitman, F. G., Roos, R. A., van Pelt, H., van der Mast, R. C. (2010). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning in Huntington's disease mutation carriers compared with mutation-negative first-degree controls. *Brain Research Bulletin*, *83*(5):232-7.
- Van Raamsdonk, J. M., Murphy, Z., Slow, E. J., Leavitt, B. R., & Hayden, M. R. (2005). Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human molecular genetics*, *14*(24), 3823-35.
- von Hörsten, S., Schmitt, I., Nguyen, H. P., Holzmann, C., Schmidt, T., Walther, T., Bader, M., et al. (2003). Transgenic rat model of Huntington's disease. *Human molecular genetics*, *12*(6), 617-24.
- Vonsattel, J.-P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *44*(6), 559-77.
- W Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet*, *369*(9557), 218-28.
- Walker, T. L., Turnbull, G. W., Mackay, E. W., Hannan, A. J., & Bartlett, P. F. (2011). The latent stem cell population is retained in the hippocampus of transgenic Huntington's disease mice but not wild-type mice. *PLoS one*, *6*(3), e18153.
- Wang, H., Chen, X., Li, Y., Tang, T.-S., & Bezprozvany, I. (2010). Tetrabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice. *Molecular neurodegeneration*, *5*(1), 18.
- Wang, J.-W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F., & Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, *28*(6), 1374-84.
- Warby, S. C., Chan, E. Y., Metzler, M., Gan, L., Singaraja, R. R., Crocker, S. F., Robertson, H. A., et al. (2005). Huntingtin phosphorylation on serine 421 is significantly reduced in the striatum and by polyglutamine expansion in vivo. *Human molecular genetics*, *14*(11), 1569-77.
- Wheeler, V. C., Auerbach, W., White, J. K., Srinidhi, J., Auerbach, A., Ryan, A., Duyao, M. P., et al. (1999). Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Human molecular genetics*, *8*(1), 115-22.
- Wheeler, V.C., Gutekunst, C.-A., Vrbanac, V., Lebel, L.-A., Schilling, G., Hersch, S., Friedlander, R. M., et al. (2002). Early phenotypes that presage late-onset neurodegenerative disease allow testing of modifiers in Hdh CAG knock-in mice. *Human molecular genetics*, *11*(6), 633-40.
- Wyneken, U., Sandoval, M., Sandoval, S., Jorquera, F., González, I., Vargas, F., Falcon, R., et al. (2006). Clinically relevant doses of fluoxetine and reboxetine induce changes in the TrkB content of central excitatory synapses. *Neuropsychopharmacology*: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, *31*(11), 2415-23.
- X Xia, L., Deloménie, C., David, I., Rainer, Q., Marouard, M., Delacroix, H., David, D., et al. (2012). Ventral hippocampal molecular pathways and impaired neurogenesis associated with 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors disruption in mice. *Neuroscience letters*, *521*(1), 20-5.

- Xie, Y., Hayden, M. R., & Xu, B. (2010). BDNF overexpression in the forebrain rescues Huntington's disease phenotypes in YAC128 mice. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, 30(44), 14708-18.
- Yohrling IV, G. J., Jiang, G. C.-T., DeJohn, M. M., Robertson, D. J., Vrana, K. E., & Cha, J.-H. J. (2002). Inhibition of tryptophan hydroxylase activity and decreased 5-HT1A receptor binding in a mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 82(6), 1416-1423.
- Youssov, K., & Bachoud-Lévi, A.-C. (2008). Maladie de Huntington: aspects diagnostiques actuels et applications pratiques. *EMC Neurologie*, 155(17-059-C50), 1-13. Doi : 10.1016/S0246-0378(07)27525-6.
- Yu, Z.-X., Li, S.-H., Evans, J., Pillarisetti, A., Li, H., & Li, X.-J. (2003). Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience, 23(6), 2193-202.
- Zabel, C., Mao, L., Woodman, B., Rohe, M., Wacker, M. A., Kläre, Y., Koppelstätter, A., et al. (2009). A large number of protein expression changes occur early in life and precede phenotype onset in a mouse model for huntington disease. *Molecular & cellular proteomics*: MCP, 8(4), 720-34.
- Zajac, M. S., Pang, T. Y. C., Wong, N., Weinrich, B., Leang, L. S. K., Craig, J. M., Saffery, R., et al. (2010). Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus*, 20(5), 621-36.
- Zala, D., Colin, E., Rangone, H., Liot, G., Humbert, S., & Saudou, F. (2008). Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Human molecular genetics*, 17(24), 3837-46.
- Zeef, D. H., Vlamings, R., Lim, L. W., Tan, S., Janssen, M. L. F., Jahanshahi, A., Hoogland, G., et al. (2012). Motor and non-motor behaviour in experimental Huntington's disease. *Behavioural brain research*, 226(2), 435-9.
- Zeitlin, S., Liu, J. P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., & Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature genetics*, 11(2), 155-63.
- Zhang, Y., Leavitt, B. R., van Raamsdonk, J. M., Dragatsis, I., Goldowitz, D., MacDonald, M. E., Hayden, M. R., & Friedlander, R. M. (2006). Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *The EMBO journal*, 25(24), 5896-906.
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132(4), 645-60.
- Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in neurobiology*, 81(5-6), 294-330.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M. E., et al. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, 293(5529), 493-8.
- Zuccato, C., Liber, D., Ramos, C., Tarditi, A., Rigamonti, D., Tartari, M., Valenza, M., et al. (2005). Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. *Pharmacological research*: the official journal of the Italian Pharmacological Society, 52(2), 133-9.
- Zuccato, C., Marullo, M., Conforti, P., MacDonald, M. E., Tartari, M., & Cattaneo, E. (2008). Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain pathology*, 18(2), 225-38.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., et al. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature genetics*, 35(1), 76-83.