RÉSUMÉ DE THESE

HINCKELMANN RIVAS María Victoria

Régulation du Transport Axonale et Energétique

Ecole Doctorale Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie

Université Paris Sud 11

Directeur de thèse: Fréderic SAUDOU

Laboratoire : « Signalisation, Neurobiologie et Cancer »

Institut Curie – UMR3306, U1005

I. Première Partie

La fonction de la huntingtine dans le transport axonal est conservée chez la Drosophile.

Résumé

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire dominante provoqué par une expansion anormale de la répétition polyglutaminique dans la partie N-terminale de la protéine huntingtine (HTT). HTT est une grande protéine d'échafaudage qui interagit avec plus d'une centaine de protéines et est probablement impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires. La mutation est dominante, altère les fonctions normales de la HTT et lui confère des fonctions cytotoxiques. Pour être pertinents, les modèles de MH doivent récapiltuler cette dualité. La drosophile (*Drosophila melanogaster)* est un modèle *in vivo* très utile, largement utilisé pour étudier la MH par surexpression de la HTT humaine mutante entière ou bien de fragments N-terminaux de la HTT. Cependant, il est difficile de savoir si la huntingtine de la drosophile (DmHTT) partage des fonctions similaires à celles de la HTT de mammifères. Ici, nous avons utilisé diverses approches complémentaires pour analyser la fonction de DmHTT dans le transport axonal rapide. Nous montrons que la DmHTT interagit avec le moteur moléculaire dynéine, est associée aux vésicules de transport et co-sédimente avec des microtubules. DmHTT co-localise avec des vésicules contenant le « Brain Derived Neurotrophic Factor » (BDNF) dans les neurones corticaux de rat et remplace partiellement la fonction de la HTT de mammifère dans un essai de transport axonal rapide. Dans les motoneurones de mouches DmHTT-KO, le transport axonal rapide des vésicules de synaptotagmine est réduit. Ces résultats suggèrent que la fonction de la HTT dans le transport axonal est conservée entre les mouches et les mammifères. Notre étude confirme que la drosophile est un modèle animal pertinent pour l'étude de la fonction de la HTT sauvage ou mutante.

INTRODUTION

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire dominante causée par une expansion polyglutaminique anormale (polyQ) dans la protéine huntingtine (HTT).

Plusieurs souches de mouches ont été générées pour modéliser la MH sur la base de la surexpression de la HTT humaine entière ou bien de fragments N-terminaux de la protéine. En effet, la mutation est dominante et la surexpression des fragments de la HTT contenant l'expansion polyQ est suffisante pour induire les phénotypes associés à la MH dans la mouche. Cependant, des données récentes suggèrent que chez les mammifères, l'altération des fonctions normales de la HTT sauvage contribue également à la MH.

HTT est une grande protéine d'échafaudage de 350 kDa chez l'homme et sa taille serait de 400 kDa chez les mouches. HTT interagit avec des centaines de protéines et régule plusieurs fonctions cellulaires. Par exemple, il a été rapporté que HTT est un régulateur positif du transport dépendant des microtubules (MT). Cette fonction est altérée quand la HTT est mutée: le transport vésiculaire est ralenti.

Ici, nous étudions, par diverses approches complémentaires, le rôle de la HTT dans le transport axonal rapide chez la mouche *Drosophila melanogaster*.

RÉSULTATS

Le fragment N-terminal de la huntingtine de la *Drosophile* interagit avec la chaîne intermédiaire de la Dynéine

La partie N-terminale de la HTT de mammifère interagit avec les protéines appartenant au complexe des moteurs moléculaires. Il existe une interaction directe avec la chaîne intermédiaire de la Dynéine (DIC) (Caviston et al., 2007) et une interaction indirecte, par l'intermédiaire de la protéine associée à la huntingtine 1 (HAP1) (Li et al., 1998), avec la

sous-unité p150Glued de la dynactine (Engelender et al., 1997; Li et al., 1998) et avec la chaîne légère de la Kinésine (KLC) (McGuire et al., 2006). Ces interactions permettent le transport axonal de vésicules.

Nous montrons, que le fragment 600-698 de la HTT humaine, la région minimale pertinente pour l'interaction avec DIC, s`aligné partiellement avec les premiers 620 acides aminés de DmHTT. En particulier, la séquences d'acides aminés de la HTT humaine [600 649] et DmHTT [380-430] présentent une identité de 30% et une similarité de 62%. En effet, nous montrons que DIC co-immunoprécipite avec le fragment N-terminal 620 de la DmHTT. Ainsi, la HTT de la Drosophile, comme la HTT humaine, interagit avec la DIC humaine.

Le fragment N-terminal de la huntingtine de la *Drosophile* est associé avec des vésicules de mammifères

Afin de déterminer si DmHTT agit dans le transport axonal des vésicules, nous avons effectué un fractionnement sous-cellulaire de cellules HEK 293 transfectées avec GFP-Dm620HTT, et on a déterminé sa répartition subcellulaire. Comme attendu, la HTT endogène de mammifère et DIC sont présents dans les fractions cytoplasmiques et vésiculaires, ce qui confirme qu'une proportion importante de ces protéines eest associée aux vésicules; tandis que Dm620HTT-GFP est principalement retrouvée dans la fraction vésiculaire. Ainsi, la DmHTT est associée aux vésicules dans les cellules de mammifères, ce qui confirme la fonction de la HTT de mouche dans le transport dynéine-dépendant des vésicules le long des microtubules.

Le fragment N-terminal de la Huntingtine de drosophile co-localise avec les vésicules de transport du BDNF dans les axones de mammifères

La HTT des mammifères est impliquée dans le transport vésiculaire de plusieurs types de cargaisons, y compris celle du BDNF (Colin et al., 2008; Gauthier et al., 2004; Her

and Goldstein, 2008). Nous avons testé si la DmHTT s'associe aux vésicules de BDNF en transfectant des neurones corticaux de rat avec Dm620HTT-GFP et BDNF-mCherry. Le signal émis par le construit Dm620HTT-GFP co-localise fortement avec les vésicules transportant le BDNFm-Cherry, avec un pourcentage de co-localisation de 69,1% + / 22,5. Ces résultats résultats indiquent que la DmHTT est aussi impliquée dans le transport axonal de vésicules.

La Huntingtine de *Drosophila* s'associe aux microtubules

Nous avons ensuite cherché à savoir si la DmHTT, comme son homologue de mammifère, s'associe avec les microtubules. Pour cela nous avons réalisé des test de dépolymérisation-repolymérisation des microtubules. Dans des cellules HEK 293 transfectées avec le construit GFP-DmHTT, la HTT endogène et le construit Dm620HTT-GFP ont été recrutés dans la fraction enrichie en microtubules.

La huntingtine de drosophile participe au transport axonal rapide et est co-transportée avec les vésicules de BDNF

Les résultats précédents obtenus dans les cellules de mammifères montrent que la DmHTT interagit avec la dynéine, s'associe à la fraction vésiculaire, co-localise avec des vésicules contenant du BDNF dans les axones, et est associée aux microtubules, ce qui suggère que la DmHTT, comme la HTT, est impliquée dans le transport vésiculaire dépendant des microtubules.

Nous avons ensuite exploré la dynamique de la DmHTT dans les axones. Les enregistrements de vidéo-microscopie des neurones corticaux électroporés avec la Dm620HTT-GFP ont révélé des mouvements antérogrades et rétrogrades rapides de la DmHTT dans les axones. Les vitesses de ces mouvements sont typiques du transport axonal rapide.

Puis nous avons déterminé si la DmHTT était co-transportée avec les vésicules de BDNF par co-électroporation de Dm620HTT-GFP et de BDNF-mCherry. L'analyse des deux fluorescences révèle que Dm620HTT-GFP et BDNF-mCherry sont co-

transportées à l'intérieur des axones. Nous concluons que la HTT de drosophile s’associe aux est vésicules de BDNF pendant leur transport à l'intérieur des axones.

La huntingtine de drosophile restaure partiellement la perte de la HTT de mammifères dans le transport axonal rapide

Nous avons ensuite testé si la HTT endogène de mammifère pouvait être remplacée par la HTT de drosophile. Nous avons diminué l’expression de la HTT endogène chez le rat et analysé la dynamique du transport du BDNF dans les axones. Comme démontré précédemment (Colin et al., 2008; Gauthier et al., 2004; Zala et al., 2008), la diminution de l’expression de la HTT réduit de façon marquée les transports rétrograde et antérograde du BDNF. L’expression du construit Dm620HTT-GFP dans les neurones avec des niveaux réduits de HTT, permet une reprise significative du transport du BDNF. Cette expérience démontre que la HTT de drosophile facilite le transport axonal et restaure partiellement la fonction de la HTT de mammifère.

II. Deuxième Partie

La glycolyse vésiculaire fournit de l'énergie à bord pour le transport axonal rapide.

Résumé

Le transport axonal rapide (TAR) nécessite de l'énergie pour «ravitaillé» les moteurs moléculaires que transportent les vésicules sur de longues distances. Nous démontrons que la glycolyse fournit de l'ATP pour le TAR des vésicules. Bien que l'inhibition de la production d'ATP par les mitochondries n'a pas d'incidence sur la motilité des vésicules, l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'enzyme de la glycolyse GAPDH réduit le transport dans des neurones en culture et en larves de drosophile. GAPDH est localisé sur les vésicules via un mécanisme dépendant de la huntingtine. GAPDH est transporté sur les vésicules qui se déplacent rapidement à l'intérieur des axones. Il existe une activité enzymatique de GAPDH ainsi qu'une production d'ATP dans des préparations de vésicules mobiles purifiées. Enfin, nous montrons que le GAPDH est nécessaire et suffisant pour fournir de l'énergie à bord des vésicules de transport. L'ablation de GAPDH des vésicules réduit le transport, alors que cibler GAPDH aux vésicules promeut le TAR dans les neurones déficients en GAPDH. Ainsi, la glycolyse spécifiquement localisée aux vésicules peut fournir de l'énergie nécessaire aux mouvements des vésicules sur de longues distances dans les axones et cela de façon indépendante de la mitochondrie.

INTRODUCTION

Le transport axonal rapide (FAT) transporte des cargos le long des microtubules (MT). Il est assuré par des moteurs moléculaires protéiques qui utilisent l'ATP comme source d'énergie.

Le glucose est la source majeure d'énergie dans le cerveau. Le glucose métabolisé dans le cytosol lors de la glycolyse fournit 2 ATP et du pyruvate. Dans la mitochondrie

34 molécules d'ATP par molécule de glucose sont obtenues. Les mitochondries ne sont cependant pas distribuées de façon homogène dans les axones ce qui pose la question du « ravitaillement » en énergie des moteurs moléculaires lors du transport axonal rapide. Nous avons étudié la contribution relative de la glycolyse cytosolique et de la chaîne respiratoire mitochondriale à l'apport d'ATP nécessaire au FAT.

RÉSULTATS

Mitochondrie, GAPDH, et ATP axonal

Nous avons analysé la distribution des mitochondries et de l'enzyme de la glycolyse « glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase » (GAPDH) le long des axones de neurones isolés des corps cellulaires grâce à l'utilisation de microchambres. Comme décrit précédemment (Miller and Sheetz, 2006), les mitochondries sont abondantes dans le corps cellulaire mais distribuées de façon discontinue dans les neurites alors que GAPDH est présente de façon diffuse dans tout le cytoplasme aussi bien dans les axones que dans le corps cellulaire. Nous avons aussi mesuré le ratio ATP:ADP dans les cellules non fixées et observé que ce ratio est constant sur de longues distances dans l'axone. Cela suggère que l'ATP est continuellement present dans les axons et qu'il est produit par la glycolyse et la mitochondrie.

L'enzyme GAPDH (mais pas les mitochondries) est nécessaire aux FAT

Afin d'étudier la contribution de la glycolyse et des mitochondries dans l'approvisionnement en ATP de la cellule, nous avons inhibé pharmacologiquement l'enzyme GAPDH avec l'iodure d'acetate et l'enzyme mitochondriale H+-ATP-synthase avec l'oligomycine. L'inhibition de l'enzyme mitochondriale diminue rapidement les niveaux d'ATP dans les cellules de 80% en 30 min. Par contre, l'inhibition de GAPDH pendant 30 min réduit ces niveaux seulement de 40% ce qui indique que la plus grande partie de l'ATP dans les neurones est généré par les mitochondries.

Cependant l'inhibition de GAPDH, et non de l'enzyme mitochondriale, affecte les transports antérogrades et rétrograde des vésicules de BDNF. Bien que l'oligomycine n'a pas d'effet sur le transport vésiculaire, le transport mitochondrial est bloqué. L'iodure d'acétate n'a pas d'effet sur le transport mitochondrial. Ces résultats suggèrent que GAPDH (mais pas la mitochondrie) est crucial pour le FAT.

L'extinction post-transcriptionnelle de GAPDH par ARN d'interférence altère le TAR du BDNF, de l'APP et de TrkB mais pas le transport mitochondrial.

Nous avons étudié les effets de l'extinction post-transcriptionnelle de GAPDH par ARNi dans le transport vésiculaire de BDNF. Nous avons observé une diminution significative des transports antérograde et rétrograde dans les neurones déplétés en GAPDH. La réexpression de GAPDH dans sa forme sauvage mais pas dans sa forme non active catalytiquement, restaure le transport de BDNF.

En analysant d'autres cargos, nous montrons que les vésicules de APP et de TrkB sont transportées normalement même après addition d'oligomycine alors que ce transport est réduit après l'extinction post-transcriptionnelle de GAPDH. Ces données suggèrent que GAPDH participe au transport vésiculaire de différents cargos.

L'extinction post-transcriptionnelle de GAPDH in vivo diminue le TAR dans la larve de drosophile

Nous avons analysé *in vivo* les effets de la déplétion de GAPDH sur le transport axonal chez la drospophile *Drosophila melanogaster*. En étudiant la dynamique de vésicules contenant de la synaptotagmine couplée à la GFP dans des motoneurones déplétés en GAPDH (par expression de shGAPDH) de larves de drosophile, nous avons observé une forte réduction de la vitesse de transport de ces vésicules par rapport à des larves contrôle. Ces données in vivo renforcent les conclusions obtenues précédemment in vitro et démontrent que le transport vésiculaire est alimenté en énergie par l'activité enzymatique de GAPDH..

L’enzyme GAPDH est retrouvée au niveau des vésicules

Le fractionnement subcellulaire à partir de cerveaux de souris montre que GAPDH est associée aux ‘‘petites vésicules’’. Dans des neurones électroporés avec le BDNF couplé à mCherry, nous montrons par immunofluorescence que GAPDH co-localise au niveau des vésicules contenant du BDNF le long des axones.

Afin de montrer que GADPH se trouve au niveau des vésicules dynamiques, nous avons isolé des vésicules de cerveaux de souris transgéniques Thy1-p50-GFP exprimant la sous-unité p50 de la dynactine couplée à la GFP sous le promoteur neuronal Thy1. Nous observons que GADPH et PGK sont associées à ces vésicules dynamiques.

Par, immuno-cryotomographie électronique de vésicules dynamiques isolées, nous montrons que GAPDH est localisé au niveau de ces vésicules, à leur surface cytosolique.

Activité enzymatique de GAPDH et production d’ATP au niveau des vésicules dynamiques

Par ailleurs nous montrons que le GAPDH associé aux vésicules dynamiques est enzymatiquement actif et produit de l’ATP : une glycolyse locale produisant de l’ATP s’effectue donc au niveau des vésicules.

Le GAPDH vésiculaire est transporté dans les axones

En exprimant GAPDH couplé à la GFP dans des neurones corticaux, nous voyons en vidéo-microscopie que les vésicules « marquées » à la GAPDH se déplacent rapidement. Par ailleurs, ces vésicules peuvent transporter du BDNF comme observé dbas des neurones co-électroporés avec du BDNF-mCherry. Ceci suggère que le GAPDH vésiculaire pourrait produire l’énergie nécessaire au transport vésiculaire axonal.

Le GAPDH vésiculaire peut à lui seul assurer le TAR

Afin de déterminer si le GAPDH vésiculaire peut à lui seul assurer le TAR, nous avons invalidé le GAPDH endogène par silençage génique et adressé de façon spécifique du GAPDH aux vésicules via sa fusion au domaine transmembranaire de la synaptotagmine. La ré-expression aux vésicules de GAPDH dans les neurones dépourvus de GAPDH endogène permet le transport axonal. Par contre, l'adressage de GAPDH catalytiquement inactif aux vésicules ne restaure pas le TAR. Ces résultats montrent que le GAPDH vésiculaire peut à lui seul alimenter le TAR des vésicules.

La huntingtine associe le GAPDH aux vésicules

Le GAPDH interagit avec la huntingtine (HTT), la protéine qui sous sa forme mutée cause la maladie de Huntington (Bae et al., 2006; Kaltenbach et al., 2007; Ratovitski et al., 2012). La HTT est retrouvée au niveau des vésicules et est une protéine d'échaffaudage essentielle dans la régulation du TAR des vésicules de BDNF. Les marquages immonologiques mntrent que le GAPDH et la HTT colocalisent dans les axones au niveau des vésicules de BDNF. Cette association est perdue quand la HTT est invalidée par silençage. De plus, dans les fractions vésiculaires préparées à partir de cerveaux dépourvus de HTT, le niveau de GAPDH est réduit, mais pas dans les autres fractions ce qui montre que la HTT associe le GAPDH aux vésicules.

Le GAPDH vésiculaire permet de TAR des vésicules.

En déplétant la HTT, le GAPDH se détache des vésicules mais le niveau de GAPDH dans le cytoplasme reste le même. Il se peut donc que le GADPH vésiculaire serve de source d'énergie au transport vésiculaire. Effectivement, quand on adresse spécifiquement le GAPDH aux vésicules, on restaure le TAR dans des neurones où la HTT endogène a été préalablement invalidée par silençage.

L'ensemble de ces résultats monte que le GAPDH vésiculaire, mais pas le GAPDH du cytoplasme, fournit a lui seul l'énergie necessaire au TAR des vésicules dans l'axone.

III. Troisième partie

Profilage moléculaire des vésicules mobiles du cerveau montre que les vésicules se déplacent en autonomie énergétique sur les microtubules.

Résumé

Le transport intracellulaire des vésicules consomme de l'énergie. Dans les neurones, ce transport vésiculaire s'effectue sur de longues distances. La plupart des proteins régulant le transport ont été identifiées cependant la dissection fine des partenaires moléculaires assurant le transport des vésicules reste à faire. Nous avons mis au point une méthode d'enrichissement de fractions cellulaires en vésicules mobiles et analysé ces fractions par protéomique semi-quantitative. En plus des protéines attendues comme les moteurs vésiculaires, les protéines synaptiques vésiculaires et les protéines de l'endocytose et de l'exocytose, nous avons trouvé que dix enzymes de la glycolyse qui clivent le glucose en pyruvate générant ainsi de l'ATP sont associées aux vésicules.

Par des méthodes biochimiques et par microscopie de haute resolution, on montre que la plupart des enzymes de la glycolyse sont associées aux vésicules et que la glycolyse fournit l'énergie nécessaire au TAR des vésicules dans les neurones.

Enfin, nous montrons que les vésicules sont mobiles avec seulement de l'ADP et des substrats de la glycolyse dans un système in vitro de transport de vésicules. L'ensemble des résultats montre que le transport vésiculaire peut se faire en autonomie énergétique.

INTRODUCTION

Les nombreuses études qui se sont intéressées au protéome des vésicules synaptiques et sécrétoires ont permis d'établir une liste exhaustive des protéines spécifiquement présentes dans ces organelles (Ahmed et al., 2013; Au et al., 2007; Blondeau et al., 2004; Boyken et al., 2013; Burré et al., 2006; Coughenour et al., 2004; Grønborg et al., 2010; Takamori et al., 2006). Cependant l'identité moléculaire des vésicules transportées sur de longues distances dans les axones reste inconnue. Identifier ces vésicules permettrait une meilleure compréhension des mécanismes régulant le transport vésiculaire.

RÉSULTATS

Purification des vésicules mobiles

Nous avons purifié avec succès une fraction enrichie en vésicules mobiles à partir de cerveaux de souris. Nous avons pour cela utilize les souris transgéniques Thy1:p50-GFP chez lesquelles la sous-unité de la dynactine, la dynamitine, est couplée à la GFP sous le promoteur neuronal Thy1 (Ross et al., 2006). Par conséquent les vésicules associées à la p50-GFP sont considérées comme mobiles car elles peuvent s'associer aux moteurs moléculaires. Nous avons effectué une immunoprécipitation dirigée contre la GFP de la fraction enrichie en petites vésicules mobiles. Nous avons observé que cette fraction contient toutes les molécules associées au complexe dynactine ainsi que les moteurs moléculaires des transports rétrogrades et antérogrades. Les marqueurs vésiculaires SNAP25, synaptophysine et le pro-BDNF sont aussi présents.

Composition protéique des vésicules mobiles

La composition en protéines des vésicules mobiles a été analysée par spectrométrie de masse. Parmi les protéines les plus abondantes nous avons retrouvé les membres du complexe dynéine et les moteurs moléculaires du transport antérograde Kif5C et Kif1A. L'analyse protéomique a aussi montré que la fraction purifiée est enrichie en protéines transmembranaires et en différents compartiments vésiculaires.

Les protéines présentes dans la fraction des vésicules mobiles pourraient jouer un rôle de régulation du trafic vésiculaire.

Les enzymes de la glycolyse sont associées aux vésicules mobiles.

Les analyses protéomiques ont montré que les dix enzymes de la glycolyse sont enrichies dans la fraction enrichie en vésicules mobiles. Pour vérifier la spécificité de l'association de ces enzymes aux vésicules mobiles nous avons réalisé des immunoprécipitations suivies de western blots. De plus, en utilisant la microscopie dite de *Ground State Depletion (GSD)* qui permet une résolution spatiale à 20 nm, nous montrons que les enzymes de la glycolyse co-localisent avec les vésicules positives pour SNAP25.

Le TAR est alimenté par l'ATP produit par les enzymes de la glycolyse

Nous avons montré récemment que la production d'ATP par l'enzyme de la glycolyse GAPDH (et pas l'ATP mitochondrial) facilite le TAR (Zala et al., 2013). Cependant cela n'est pas le GAPDH mais la PGK et la PK qui produisent directement de l'ATP. Nos résultats montrent que toutes les enzymes de la phase de *pay-off* de la glycolyse sont associées aux vésicules mobiles ce qui suggère qu'une glycolyse foncrionnelle est nécessaire pour fournir de l'énergie « à bord » des vésicules de TAR.

Nous avons donc examiné les conséquences sur le TAR, de l'invalidation génétique de PK contournant la GAPDH. Le silençage de PK et de GAPDH réduit la rapidité des vésicules de BDNF. Cependant les consequences du silençage de GAPDH peuvent être annulées par addition de pyruvate de phospho-enol (PEP), un substrat de PK.

Ces résultats montrent dans leur ensemble que la glycolyse est une source d'énergie importante pour le TAR dans l'axone.

Les vésicules mobiles produisent de l'ATP par glycolyse

Nous avons évalué la capacité de vésicules mobiles purifiées à produire de l'ATP. Les vésicules purifiiées sont incubées avec les substrats des différentes enzymes la phase

de *pay-off* de la glycolyse, de l'ADP et des cofacteurs nécessaires à la réaction. Le contenu en ATP est mesuré à différents temps d'incubation. Les organelles purifies produisent rapidement de l'ATP démontrant que les vésicules mobiles présentent des enzymes de la glycolyse fonctionnelles.

Les vésicules mobiles présentent les moteurs moléculaires fonctionnels.

Nous avons testé la fonctionnalité des moteurs moléculaires associés aux vésicules mobiles purifiées en mesurant l'hydrolyse de l'ATP sur microtubules. Les vésicules mobiles purifiées hydrolysent de l'ATP en présence, mais pas en absence, de microtubules polymérisés suggérant que les vésicules mobiles présentent des moteurs moléculaires fonctionnels.

Les vésicules mobiles sont autosuffisantes en énergie

Nous nous sommes demandé si la production vésiculaire en ATP était capable de généré l'énergie suffisant pour le transport dans un environnement dépourvu de tout contaminant provenant du cytosol. Afin de vérifier que le mouvement vésiculaire n'est pas la conséquence de la diffusion d'ATP dans les cellules, nous avons mis au point un test *in vitro* avec des vésicules mobiles issues de cerveau. Les vésicules dynamiques de cerveau de souris sont marquées par une sonde lipophile fluorescente et déposée dans une chambre contenant des microtubules polymérisés immobilisés. Le mouvement vésiculaire est étudié. En absence d'ATP exogène il n'y a pas de mouvement des vésicules le long des microtubules alors que 1mM d'ATP permet la mobilité des vésicules. Enfin, nous avons testé si la production d'ATP par la glycolyse était suffisante au transport vésiculaire en nous concentrant sur l'étape finale de la glycolyse. Nous avons incubé les vésicules mobiles avec de l'ADP et du PEP, le substrat de la PK. Les vésicules sont capables dans ce cas de s'auto-approvisionner en ATP pour assurer le transport vésiculaire.

IV. Bibliographie

Ahmed, S., Holt, M., Riedel, D., and Jahn, R. (2013). Small-scale isolation of synaptic vesicles from mammalian brain. Nat. Protoc. *8*, 998–1009.

Au, C.E., Bell, A.W., Gilchrist, A., Hiding, J., Nilsson, T., and Bergeron, J.J. (2007). Organellar proteomics to create the cell map. Curr. Opin. Cell Biol. *19*, 376–385.

Bae, B.-I., Hara, M.R., Cascio, M.B., Wellington, C.L., Hayden, M.R., Ross, C.A., Ha, H.C., Li, X.-J., Snyder, S.H., and Sawa, A. (2006). Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 3405–3409.

Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P.D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N.K., Angers, A., Legendre-Guillemin, V., Roy, L., Boismenu, D., et al. (2004). Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 3833–3838.

Boyken, J., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Jahn, R., and Chua, J.J.E. (2013). Molecular profiling of synaptic vesicle docking sites reveals novel proteins but few differences between glutamatergic and GABAergic synapses. Neuron *78*, 285–297.

Burré, J., Beckhaus, T., Schägger, H., Corvey, C., Hofmann, S., Karas, M., Zimmermann, H., and Volknandt, W. (2006). Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. Proteomics *6*, 6250–6262.

Caviston, J.P., Ross, J.L., Antony, S.M., Tokito, M., and Holzbaur, E.L.F. (2007). Huntingtin facilitates dynein / dynactin-mediated vesicle transport. PNAS.

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

Coughenour, H.D., Spaulding, R.S., and Thompson, C.M. (2004). The synaptic vesicle proteome: a comparative study in membrane protein identification. Proteomics *4*, 3141–3155.

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.

Gauthier, L.R., Charrin, C., Dompierre, J.P., Borrell-page, M., Cordelie, F.P., Mey, J. De, Macdonald, M.E., Leßmann, V., Humbert, S., and Gutenberg-universita, J. (2004).

Huntingtin Controls Neurotrophic support and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *118*, 127–138.

Grønborg, M., Pavlos, N.J., Brunk, I., Chua, J.J.E., Münster-Wandowski, A., Riedel, D., Ahnert-Hilger, G., Urlaub, H., and Jahn, R. (2010). Quantitative comparison of glutamatergic and GABAergic synaptic vesicles unveils selectivity for few proteins including MAL2, a novel synaptic vesicle protein. J. Neurosci. *30*, 2–12.

Her, L.-S., and Goldstein, L.S.B. (2008). Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. J. Neurosci. *28*, 13662–13672.

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

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.

McGuire, J.R., Rong, J., Li, S.-H., and Li, X.-J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. J. Biol. Chem. *281*, 3552–3559.

Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2006). Direct evidence for coherent low velocity axonal transport of mitochondria. J. Cell Biol. *173*, 373–381.

Ratovitski, T., Chighladze, E., Boronins, T., Arbez, N., Herbrich, S., Cole, R.N., and Ross, C.A. (2012). Huntingtin protein interactions altered by polyglutamine expansion as determined by quantitative proteomic analysis © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Cell Cycle *11*, 2006–2021.

Ross, J.L., Wallace, K., Shuman, H., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2006). Processive bidirectional motion of dynein-dynactin complexes in vitro. Nat. Cell Biol. *8*, 562–570.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., et al. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. Cell *127*, 831–846.

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.

Zala, D., Hinckelmann, M.-V., Yu, H., Lyra da Cunha, M.M., Liot, G., Cordelières, F.P., Marco, S., and Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. Cell *152*, 479–491.