

La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative héréditaire, qui se transmet de façon autosomale dominante. Sa prévalence est d'environ 5-10 personnes pour 10.000 individus dans la population européenne. D'un point de vue clinique, la MH se caractérise par une triade de symptômes moteurs (mouvements involontaires et choréiformes puis hypokinésie), cognitifs et psychiatriques. Du fait de l'absence de traitement curatif, cette pathologie est fatale 15 à 20 ans après l'apparition des premiers symptômes. La mutation à l'origine de cette pathologie est une expansion anormale de polyglutamine (polyQ) dans l'extrémité N-terminale de la protéine huntingtine (HTT).

## **1/ Introduction.**

La MH est caractérisée par la perte préférentielle des neurones du striatum puis du cortex. Bien que les mécanismes qui conduisent à la MH ne soient pas totalement élucidés, plusieurs études ont mis en évidence une série d'événements conduisant finalement à la mort des neurones.

### **Le clivage : une étape clé.**

Une étape cruciale dans la pathogenèse est le clivage de la HTT pleine longueur en fragments N-terminaux (N-ter) plus petits, qui contiennent la mutation polyQ et qui sont toxiques pour les neurones. En effet, les fragments N-ter mutés sont observés dans les cerveaux des patients ainsi que dans des modèles animaux de la MH. D'autre part, plusieurs protéases, y compris les caspases, calpaines, cathepsines et métalloprotéases, clivent la HTT sur différents sites produisant ainsi ces fragments N-ter toxiques. De plus, l'expression de tels fragments dans des modèles murins reproduit d'importants aspects de la MH. En particulier, l'expression du fragment exon1 de la HTT mutée est suffisante pour induire une neuropathie chez la souris. Enfin, l'inhibition de ces clivages réduit la toxicité *in vitro* et *in vivo*, ce qui appuie le rôle capital du clivage dans la maladie.

### **Les fragments N-ter dans la MH.**

Les fragments N-ter contiennent l'expansion polyQ qui est localisée dans l'exon1 de la HTT. Plus les fragments N-ter mutés sont courts, plus ils sont toxiques. De plus, la toxicité dépend d'un événement de translocation nucléaire de ces fragments N-ter, où ils conduisent à un dérèglement de la machinerie de transcription, délétère pour la survie des neurones. Depuis la découverte du gène *HTT* en 1993, plusieurs milliers de publications ont rapporté des mécanismes potentiels impliquant les fragments N-ter mutés dans les dysfonctionnements neuronaux et la mort dans MH. Par

conséquent, il est admis que la génération des fragments N-terminaux de la HTT, contenant la mutation polyglutamine, sont en grande partie responsables de la mort neuronale dans la MH.

### **Nnécessité d'étudier les fragments C-ter de la HTT.**

Cependant, bien que des fragments N-ter récapitulent les caractéristiques de la MH *in cellulo* et dans des modèles animaux, le tableau reste incomplet par rapport à la maladie. En effet, si le clivage de la HTT pleine longueur génère de courts fragments N-ter de tailles croissantes allant des acides aminés 1-105 à 1-586, il génère également les fragments C-terminaux (C-ter) correspondants. Alors que les fragments N-ter polyQ ont été largement étudiés, les conséquences de la présence des fragments C-ter ne sont pas connus. Cependant, ces fragments sont observés dans des extraits de cerveau post-mortem de patients MH. Jusqu'à présent, aucune étude n'a examiné les effets d'une coexistence des fragments N-ter et C-ter. Pour avoir une compréhension plus complète des mécanismes de mort neuronale, nous avons étudié la contribution de ces deux fragments, générés après clivage de la HTT au cours de la maladie.

Afin d'analyser les conséquences du clivage de la HTT pleine longueur, nous avons développé un outil de clivage permettant de cliver la HTT à des temps et à des endroits stratégiques de la protéine *in vitro* et *in vivo*. Nous avons observé, qu'à l'issue de clivages successifs de la HTT, les interactions intramoléculaires liant les parties N-ter et C-ter de la HTT ensemble, sont détruites. Ceci entraîne la libération d'un fragment N-ter muté qui migre dans le noyau et d'un fragment C-ter qui reste cytoplasmique. Nous démontrons, par la suite, que non seulement les fragments N-ter générés sont toxiques mais que les fragments C-ter de la HTT participent également à la pathogenèse *via* un nouveau mécanisme. Ces fragments provoquent un stress du réticulum endoplasmique, qui se dilate et devient vacuolaire, induisant ainsi la mort cellulaire. Ces résultats soulignent la complexité des mécanismes pathogéniques et soutiennent l'importance d'étudier la HTT comme une protéine pleine longueur chez les patients MH.

## **2/ Les fragments C-terminaux ont une toxicité propre qui s'additionne à celle des fragments N-ter polyQ.**

### **Le système expérimental.**

Les protéases clivent de nombreux substrats dans la cellule et cela pourrait masquer la toxicité induite spécifiquement par le clivage de la HTT seule. Pour étudier spécifiquement la relation entre le clivage et la toxicité engendrée, nous avons utilisé la protéase TEV (Tobacco Etch Virus) capable de cliver spécifiquement des protéines cibles. Ce système est basé sur l'introduction d'une séquence de sept acides aminés (ENLYFQ/S) reconnue par la protéase TEV en tant que site de clivage et qui n'est pas présente dans le protéome des mammifères.

Comme indiqué précédemment, la HTT est clivée sur de nombreux sites. Nous avons d'abord étudié le clivage de la HTT pleine longueur à la position 586 correspondant au site de clivage par la caspase-6 (FL-HTT-586TEV), un site important dans le développement de la MH. Nous avons également généré des constructions HTT dont le clivage est inductible à la position 167 (FL-HTT-167TEV). Le clivage à cette position est induit par la cathepsine Z et la bléomycine hydrolase (BLMH) et génère également un fragment N-ter (N-HTT1-167) muté dont le rôle toxique est bien établi.

Nous avons exprimé ces différentes constructions dans des cellules et traité les extraits protéiques par des quantités croissantes de protéase recombinante TEV. Tandis que les constructions FL-HTT-586TEV sont clivées efficacement, les constructions FL-HTT-167TEV nécessitent une quantité considérable de TEV pour générer un produit protéolytique détectable. Cela suggère que, contrairement au site de clivage en position 586, le site de clivage en position 167 serait moins accessible compte tenu de son emplacement dans la protéine.

Nous avons ensuite analysé la protéolyse de HTT dans les cellules en utilisant le système SNIPER-TEV. La protéase TEV est coupée en deux fragments, chacun dans un vecteur différent et fusionné respectivement aux fragments FRB et FKBP. En présence de rapamycine, ces deux fragments forment à nouveau une TEV fonctionnelle dans un laps de temps très court. Avec cette stratégie, un traitement bref à la rapamycine induit le clivage efficace des constructions FL-HTT-586TEV, ce qui confirme l'accessibilité du site 586. En revanche, et comme observé *in vitro*, la protéolyse à la position 167 est moins efficace, nécessitant un traitement rapamycine long pour induire le clivage de la HTT à cette position.

### **Conformation de la HTT et clivage.**

Quand le clivage de la HTT est induit aux positions 586 et 167 simultanément (FL-HTT-167/586TEV), la production du fragment N-HTT1-167 est augmentée. Ceci suggère qu'un premier clivage en position 586 peut conduire à un changement de conformation de la HTT et ainsi faciliter l'accessibilité du site 167. De façon intéressante, nous avons également observé que la présence de l'expansion polyglutamine dans la HTT mutée favorise l'apparition du fragment N-HTT1-167 suggérant que cette mutation, en accord avec les nombreuses études qui ont signalé un changement de conformation de la HTT par l'expansion polyglutamine, pourrait rendre le site 167 plus accessible. Ces résultats valident ainsi l'utilisation de l'outil TEV pour étudier le clivage de la HTT dans sa forme normale ou pathologique et suggèrent que la HTT mutée est soumise à un clivage préférentiel.

### **Clivage et toxicité cellulaire de la HTT mutée.**

Après avoir mis en place les conditions qui permettent le clivage contrôlé de la HTT, nous avons analysé la toxicité induite par différents clivages dans des cellules immortalisées du striatum. Après avoir transfecté les différentes constructions FL-HTT-TEV et induit le clivage par les constructions SNIPER-TEV, nous avons suivi par vidéomicroscopie, pendant 24 heures, les cellules qui expriment la HTT.

L'insertion des sites TEV n'a aucun effet sur les constructions sauvages (Q23) ou mutantes (Q100) FL-HTT-TEV, quant à leurs toxicités propres en l'absence de rapamycine (la forme Q100 étant la plus toxique). Après addition de celle-ci, le clivage au site 167 de la construction FL-HTT-167TEV-Q100 induit une faible toxicité. Ce résultat n'est pas surprenant du fait de la faible efficacité de clivage à cette position. Par contre, bien que la protéolyse de la HTT soit très efficace à la position 586, les fragments produits n'altèrent pas la survie, ce qui suggère que ce clivage n'a pas de conséquences suffisantes sur la toxicité de la HTT mutée. Enfin, nous avons constaté que l'induction du clivage simultané aux positions 586 et 167 conduit à une augmentation marquée de la toxicité de la HTT mutée. Ces données indiquent que la toxicité cellulaire la plus importante n'est atteinte que lorsque ces deux événements de protéolyse sont accomplis et dans un seul ordre possible : d'abord 586 puis 167.

Pour mieux comprendre l'absence d'augmentation de la toxicité suite au clivage 586 de la FL-HTT-586TEVQ100, nous avons d'abord vérifié la toxicité induite par le fragment N-HTT586Q100. Comme attendu, la toxicité induite par la construction N-HTT586Q100 est significativement plus élevée que celle induite par la construction N-HTT586Q23. Les fragments C-ter correspondant C-HTT587-3144, lorsqu'ils sont exprimés avec le N-HTTExon1Q68, le N-HTT167Q100 ou le N-HTT586Q100, induisent une augmentation statistiquement significative de la toxicité induite par ces

fragments N-ter. La toxicité supplémentaire induite par la présence du fragment C-ter est particulièrement évidente avec le N-HTTExon1Q68 et le N-HTT167Q100 mais est plus faible avec le fragment N-HTT586Q100. Ceci suggère que le fragment C-ter potentialise la toxicité induite par les fragments N-ter mutés, ou encore, que le fragment C-HTT587-3144 possède des propriétés toxiques intrinsèques qui s'ajoutent à la toxicité des fragments N-ter courts. Pour tester cette possibilité, nous avons mesuré la toxicité du fragment C-HTT587-3144 seul et constaté que ce fragment est hautement toxique et à un degré similaire au fragment N-HTTExon1 muté seul.

De façon intéressante, le fragment C-ter est retrouvé avec son fragment complémentaire N-HTT586Q100 mais pas avec des N-ter plus courts. Ces observations suggèrent la possibilité d'une existence d'interactions fonctionnelles entre les fragments complémentaires issus du clivage au site caspase-6.

#### **Clivage et toxicité cellulaire de la HTT sauvage.**

Le fragment C-ter induit une forte toxicité bien qu'il ne contienne pas la séquence polyQ mutée. Ceci suggère donc que la protéolyse de la HTT sauvage pourrait également être toxique. Par conséquent, nous avons analysé l'effet du clivage aux sites 167 et 586 de la construction FL-HTT-167/586TEVQ23 sur la survie des cellules. Ainsi, la protéolyse séquentielle de la HTT sauvage conduit à une toxicité élevée par rapport à la condition contrôle non clivée. Ces résultats indiquent donc que la protéolyse de la HTT sauvage, dans des conditions qui génèrent le fragment N-ter C-HTT167Q23 et le fragment C-HTT587-3144, est toxique et est en accord avec la toxicité retrouvée avec le fragment C-HTT587-3144 seul.

Ensemble, ces résultats suggèrent que 1) la protéolyse de la HTT produit des fragments N-ter et C-ter qui contribuent ensemble à la toxicité et 2) la toxicité induite par la HTT pleine longueur dépend du profil protéolytique.

### **3/ Toxicité et interaction des fragments N et C-terminaux.**

Ainsi nous avons observé que la toxicité induite par les fragments N-ter et C-ter diffère selon la taille du fragment N-ter mutés exprimés. Ce phénomène peut s'expliquer par une interaction entre ces deux fragments N-HTT586 et C-HTT587-3144, empêchant leur séparation et, par conséquent, leurs effets toxiques. Cette hypothèse est étayée par des observations récentes indiquant que les régions N-terminales de la HTT sont capables d'interagir avec les autres régions C-terminales.

Dans un premier temps, nous avons co-exprimé les fragments N-HTT586Q100, N-HTT167Q100 et N-HTTExon1Q68 avec le fragment C-HTT587-3144 dans des lignées cellulaires et testé si les différents fragments interagissent ensemble par des expériences d'immunoprécipitation. Ainsi, seul le fragment N-HTT586Q100 interagit avec le fragment C-HTT587-3144. Pour confirmer ces données, nous avons exprimé les constructions FL-HTT-TEV simples ou doubles et induit le clivage *in vitro* par un excès de protéase TEV recombinante afin d'assurer un clivage efficace des constructions. Par immunoprécipitation, le fragment C-HTT587-3144 produit par clivage en position 586 est capable d'interagir avec le fragment N-HTT1-586 sauvage ou muté. À l'inverse, le fragment C-HTT587-3144 n'interagit pas avec les fragments N-HTT1-167Q23 ou N-HTT1-167Q100, issus de la protéolyse séquentielle des fragments N-HTT1-586Q23 et N-HTT1-586Q100.

De ce fait, les fragments, issus d'une protéolyse simple au site 586, interagissent ensemble et le double clivage de la HTT aux sites 167 et 586 induit la perte d'interaction des fragments protéolytiques générés. Enfin, l'expansion polyglutamine n'a pas modifié de façon évidente ces interactions.

Afin de déterminer l'association du fragment HTT-168-586 intermédiaire, nous avons étudié, par immunoprécipitation, son interaction avec les fragments N-ter et C-ter HTT générés après clivages séquentiels aux sites 167 et 586. Ainsi, le fragment HTT-167-586 interagit avec le C-HTT 587-3144 et non avec le N-HTT 1-167. Ces résultats, ainsi que la nécessité des deux événements de clivage pour accroître la toxicité, indiquent l'existence d'une interaction intra-moléculaire au sein de la HTT qui empêche ou retarde la toxicité induite par le clivage de la HTT mutante.

## **4/ Conséquences de la perte des interactions entre les fragments N et C-terminaux.**

### **La perte d'interaction du N-ter et du C-ter coïncide avec l'augmentation de la localisation nucléaire du N-ter.**

Nous avons par la suite étudié la localisation cellulaire des différents fragments N-ter et C-ter HTT par immunofluorescence. En accord avec les données biochimiques, la mesure du pourcentage de colocalisation entre les fragments N-ter et C-ter montre que le N-HTT586Q100 colocalise de façon importante avec le C-HTT587-3144. Une association moindre est observée entre les fragments N-HTT167Q100 et N-HTTExon1Q68 avec le C-HTT587-3144.

En parallèle avec la perte d'interaction des fragments C-HTT587-3144 et des N-ter courts, la localisation nucléaire des fragments N-ter augmente progressivement, tandis que le C-ter reste dans le cytoplasme. Ces résultats sont en accord avec les études précédentes montrant une corrélation inverse entre la localisation nucléaire et la taille des fragments N-ter.

### **La perte d'interaction du N-ter et du C-ter conduit à la formation de vacuoles cytoplasmiques**

Pour mieux comprendre les conséquences de la perte de l'interaction N-ter et C-ter lorsque les fragments N-terminaux deviennent plus courts, nous avons analysé l'effet de leur expression à des temps plus longs. De façon inattendue, lorsque les fragments N-terminaux courts migrent dans le noyau, nous avons observé une apparition progressive de vacuoles massives dans le cytoplasme. Ces vacuoles ont été observées dans les cellules exprimant le fragment C-ter seul et dans les cellules co-exprimant le fragment C-ter avec les fragments N-ter qui n'interagissent pas avec le C-ter, tels que le N-HTTExon1 et le N-HTT1-167. Toutefois, le nombre de cellules vacuolisées est considérablement réduit lorsque les fragments C-HTT587-3144 et N-HTT1-586 sont exprimés. Aucun des fragments N-ter mutés seul n'induit un tel phénotype vacuolaire dans la cellule. En conclusion, le fragment C-HTT 587-3144 issu du clivage de la HTT au site caspase-6 –également observé dans des échantillons de cerveau MH post-mortem– induit des altérations cytoplasmiques caractérisées par une formation anormale de vacuoles.

### **Les vacuoles proviennent du réticulum endoplasmique.**

Pour identifier l'origine de ces vacuoles, nous avons analysé par immunofluorescence, en utilisant différents marqueurs classiques de structures cytoplasmiques et d'organites, les cellules exprimant le fragment C-HTT587-3144.

Les vacuoles induites par le C-HTT587-3144 sont immuno-négatives pour GM130, Cter433 et TGN38 et pour Rab5 et EEA1. Elles sont donc peu susceptibles de provenir de l'appareil de Golgi ou d'endosomes précoces. En outre, LC3-GFP et LAMP2 ne marquent pas les vacuoles. Ceci suggère qu'elles ne sont pas issues des autophagosomes ou des lysosomes. Enfin, la calnexine et ATF6, protéines spécifiques des membranes du réticulum endoplasmique (RE), marquent les vacuoles induites par le C-ter. Cette donnée est confirmée lors de la co-expression du fragment C-HTT587-3144 et d'un vecteur codant pour le motif KDEL, un marqueur luminal du RE, fusionné à la GFP. En effet, par vidéomicroscopie, l'intérieur des vacuoles formées dans les cellules C-HTT587-3144, est positif pour la GFP.

### **La voie de stress du RE est activée**

Nous avons par la suite déterminé si la vacuolisation du RE affecte les voies de stress du RE. Pour cela, nous avons analysé les niveaux de la calnexin, BIP et ATF6 nucléaires, protéines dont l'expression est induite par l'activation des voies du stress du RE. Nous avons observé une augmentation du niveau d'expression de ces marqueurs dans des cellules exprimant le fragment C-HTT587-3144 à des niveaux comparables à des cellules traitées par la tunicamycine, un agent chimique décrit pour activer le stress RE.

Pour mieux comprendre le lien entre la vacuolisation du RE, l'induction de stress du RE et la toxicité, nous avons étudié le mécanisme possible par lequel le fragment C-HTT587-3144 généré par le clivage de la HTT est toxique. Différents inhibiteurs de caspases ne diminuent pas la toxicité cellulaire induite par le fragment C-ter. De plus, les cellules exprimant le fragment C-HTT587-3144 ne présentent pas de fragmentation de l'ADN, suggérant que l'apoptose classique n'est pas impliquée. En outre, l'autophagie, un mécanisme pouvant induire la mort cellulaire, est peu susceptible d'être impliqué. En effet, l'inhibition d'une protéine clé de la voie d'autophagie, Beclin1, n'a pas d'effet sur la toxicité induite par le fragment C-HTT587-3144.

Le stress du RE induit par la formation de ces vacuoles pourrait être responsable de la toxicité du C-ter HTT. Cette hypothèse est étayée par le fait qu'un traitement des cellules par un inhibiteur d'une voie de stress du RE, le salubrinal, réduit significativement la mort cellulaire induite par le fragment C-HTT587-3144. Ce faisant, le pourcentage de cellules contenant des vacuoles à l'issue de ce traitement est augmenté. Ainsi, la mort cellulaire semble découler de la formation de vacuoles qui induisent le stress du RE.

Pour appuyer le rôle du C-ter dans la vacuolisation du RE, nous avons évalué la dilatation du RE après le clivage de la HTT sauvage ou mutante aux sites 167 et 586 (FL-HTT-167/586TEV). Nous avons détecté la présence d'un réseau du RE désorganisé avec la présence d'une zone luminale dilatée, dans les situations de clivage de la HTT sauvage et mutante. Ceci indique que ce phénotype dépend bien du fragment C-ter libéré à l'issue du double clivage de la HTT.

## **5/ Mécanismes moléculaires induisant la vacuolisation par le C-ter.**

Comment le fragment C-HTT587-3144 induit la vacuolisation du RE? Plusieurs études ont rapporté que l'expression de la HTT mutante induit un stress du RE. Cependant, ces études étaient fondées sur l'expression de fragments N-terminaux mutés. Nous avons constaté que ces fragments, contrairement aux fragmentx C-HTT587-3144, sont incapables de provoquer la dilatation et la

vacuolisation du RE. Nous avons cherché, en premier lieu, à identifier les interacteurs potentiels du fragment C-terminal HTT par double hybride.

Afin d'identifier les protéines qui interagissent avec la HTT, les précédentes approches, réalisées par double hybride, ont principalement utilisées les fragments N-terminaux comme appâts. Aucune protéine interagissant avec la partie C-terminale de la HTT n'a été trouvée à ce jour par double hybride. Afin d'optimiser la stratégie d'identification, nous avons utilisé les parties les plus conservées du fragment C-ter HTT comme appât et avons ainsi identifié une douzaine de protéines. Parmi elles, plusieurs pourraient jouer un rôle dans la toxicité induite par la HTT. Aucun de ces interacteurs n'a de lien direct avec la fonction du RE.

### **La dynamine1 interagit différemment avec les fragments protéolytiques de la HTT.**

La dynamine1, un de ces interacteurs identifié par double hybride, est une GTPase décrite pour jouer un rôle dans la fission de membranes et des réactions de fusion au cours de plusieurs processus cellulaires. La dynamine1 est également un interacteur de la HTT *via* sa région N-terminale par double hybride et interagit également avec la HTT pleine longueur pour réguler l'endocytose du récepteur de l'EGF dans les cellules mammaires. Par conséquent, la dynamine1 est susceptible d'interagir avec la HTT pleine longueur *via* les régions N et C-ter et la protéolyse pourrait affecter une telle interaction.

Des expériences d'immunoprécipitation montrent clairement que la FL-HTT, le C-HTT587-3144 et le N-HTT586Q100 interagissent avec la dynamine1. En revanche, la dynamine1 interagit faiblement avec le plus court fragment N-HTT167Q100. De même, la partie N-ter de la HTT interagit avec la dynamine1 après un clivage simple, à la position 586. Cette interaction est cependant perdue après un clivage double de la HTT. Ainsi, la dynamine1 interagit avec les fragments N-HTT586Q100 et C-HTT 587-3144 lorsqu'ils sont exprimés seuls ou ensembles. La dynamine1 n'interagit pas de façon significative avec le fragment N-HTT167Q100.

### **La surexpression de la dynamine1 améliore la survie des cellules exprimant le C-ter HTT.**

Le fragment C-HTT587-3144 interagissant avec la dynamine1, nous avons testé si la modulation de l'activité dynamine1 joue un rôle dans la mort cellulaire induite par le C-HTT587-3144. Lors de la surexpression d'une forme active de la dynamine1, la toxicité induite par l'expression du fragment C-HTT587-3144 diminue significativement. En revanche, la co-expression d'une forme inactive de la dynamine1 n'a aucun effet protecteur, ce qui suggère que l'activité de la dynamine1 est nécessaire pour inhiber la toxicité du fragment C-HTT587-3144. Tous ensemble, ces résultats

montrent que le fragment C-HTT587-3144 interagit avec dynamine1 et suggèrent que la toxicité induite par le fragment C-HTT587-3144 est liée à un dérèglement de l'activité dynamine1.

### **La localisation de la dynamine1 au réticulum endoplasmique est altérée par la protéolyse de la HTT**

Bien que la HTT ait été décrite pour s'associer au RE, la dynamine1 n'a pas été directement associé au réseau du RE. La dynamine1 et les fragments de la HTT se localisent-ils au niveau des membranes du RE ?

Suite à l'isolation des membranes du RE par fractionnement cellulaire, une quantité significative de dynamine1 est co-purifiée avec les membranes du RE. La dynamine1 est donc présente au RE. De plus, le fragment C-HTT587-3144 est enrichi aux membranes du RE par rapport à la HTT pleine longueur. En effet, lors de la protéolyse, une fraction importante des fragments C-HTT587-3144 s'associent aux membranes du RE. En revanche, une fraction significative de la N-HTT586Q100 et la plupart des fragments N-HTT167Q100 se retrouvent dans la fraction cytosolique. Par ailleurs, une réduction du niveau de la dynamine1 au RE est observée après le clivage de la HTT et avec le fragment C-ter HTT seul. Ces résultats sont confirmés par des techniques d'immunofluorescence, où la localisation de la dynamine1 au niveau de la membrane plasmique est réduite par le C-HTT587-3144. L'expression du fragment N-HTT1-586 seul ne modifie pas le niveau de la dynamine1 aux membranes du RE. Ainsi, ces résultats indiquent que la dynamine1 se localise aux membranes cellulaires et que le fragment C-ter-HTT perturbe cette localisation.

### **L'activité de la dynamine1 est réduite par la protéolyse de la HTT et est nécessaire au maintien du RE.**

Nous avons observé une délocalisation de la dynamine1 de la membrane plasmique affectant ainsi l'endocytose dans les cellules exprimant le C-ter HTT. En effet, la capacité d'endocytose, une fonction de la dynamine1 mesurée par l'entrée du ligand transferrine, est significativement diminuée dans les cellules exprimant le fragment C-HTT587-3144.

L'activité de la dynamine1 localisée au RE (dynamine1-RE) est-elle à l'origine de la vacuolisation du RE après clivage de la HTT ? Pour répondre à cette question, nous avons conçu une construction avec une forme active ou inactive dynamine1 fusionnée à un domaine transmembranaire la liant aux membranes du RE. Tout d'abord, ces constructions sont validées par leur localisation correcte sur la face cytosolique du RE. Puis, la toxicité et le potentiel de vacuolisation de la forme inactive de la dynamine1-RE ont été mesurés. La dynamine1-RE inactive induit une augmentation significative de la mort cellulaire et de façon très intéressante, la dynamine1-RE inactive, induit la formation de vacuoles qui remplissent progressivement le cytoplasme des cellules.

En outre, les cellules exprimant la dynamine1 inactive non ciblée au RE ne présentent pas de formation de vacuoles. Cela démontre que l'activité de la dynamine1 localisée au RE est nécessaire pour le bon maintien du réseau RE.

La dynamine1 localisée au RE interagit fortement avec la partie C-terminal de la HTT, tandis que son interaction est plus faible avec la partie N-ter de la HTT. Pris ensemble, ces résultats indiquent que la HTT pleine longueur et les produits protéolytiques générés par clivage en position 586 interagissent avec la dynamine1 au RE. En revanche, après le clivage de la HTT aux positions 586 et 167, seul le produit C-ter HTT reste associé à la dynamine1 au RE.

Quelles sont les conséquences de l'expression de la dynamine1-RE sur la vacuolisation du RE et la mort cellulaire induites par le fragment C-ter HTT? La dynamine1-RE active réduit simultanément le pourcentage de mort ainsi que le nombre de cellules vacuolisées. Aucun effet n'est observé lorsque les cellules expriment la dynamine1-RE inactive.

Pour appuyer l'hypothèse du rôle de l'activité de la dynamine1 au RE sur la dilatation des membranes du RE et la toxicité induite par le double clivage de la HTT, les constructions FL-HTT-167/586TEV-Q23 ou Q100 ont été exprimées avec la dynamine1-RE active ou inactive et le clivage de la HTT en cellules a été induit par le SNIPer-TEV. Ainsi, l'expression de la dynamine1-RE active abolit la toxicité induite par le double clivage de la HTT sauvage et mutée. En effet, le rétablissement de l'activité de la dynamine1 au niveau des membranes du RE est suffisant pour empêcher la mort cellulaire induite par le double clivage de HTT. Par contre, la dynamine1-RE inactive n'est pas capable de restaurer la survie des cellules après clivage de la HTT.

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent qu'après le clivage séquentiel de la HTT, le fragment C-terminal libéré se localise sur les membranes du RE et inactive la dynamine1 conduisant à la vacuolisation du RE et la mort cellulaire.

## **6/ La toxicité du Clivage de la HTT *in vivo*.**

Les effets toxiques du clivage de la HTT ont également été étudiés par des approches *in vivo*. Pour ce faire, nous avons généré des drosophiles (*D. melanogaster*) transgéniques exprimant la HTT mutante pleine longueur ou des fragments N- ou C-ter de la HTT. Comme organisme modèle, la drosophile présente de nombreux avantages expérimentaux et est particulièrement adapté à l'étude des maladies neurodégénératives.

L'expression des transgènes FL-HTT-TEV contenant les différents sites TEV est sous le contrôle du promoteur neuronal ElaV. Afin d'induire le clivage de la HTT-TEV, les drosophiles ont été croisées avec des souches exprimant la protéase TEV. De manière semblable aux clivages *in cellulo*, le clivage de la HTT à la position 586 *in vivo* est plus efficace par rapport au clivage à la position 167. De plus, la génération du fragment N-HTT1-167 est également facilitée par un clivage préalable à la position 586.

La survie des drosophiles transgéniques exprimant les différentes constructions a été mesurée avec ou sans l'induction du clivage par la TEV. Alors que le clivage de la FL-HTT-TEV à la position 167 présente une légère toxicité, le clivage à la position 586, et de façon plus marquée sur les deux sites 167 et 586, réduit considérablement la survie des drosophiles. Aussi le double clivage de la HTT sauvage réduit considérablement la survie des drosophiles. Puisque les fragments N-ter non mutés générés ne sont pas toxiques, ceci indique que le fragment C-ter généré à l'issue du clivage de la HTT sauvage est à lui seul toxique *in vivo*. Enfin, pour appuyer ce résultat, nous avons exprimé individuellement les fragments N-ter et C-ter de la HTT chez les drosophiles. Comme attendu, les drosophiles exprimant, dans leur système neuronal, la FL-HTT mutée ou le N-ter HTT muté montrent un taux de survie diminué par rapport aux drosophiles exprimant le fragment N-ter HTT sauvage. De plus, comparées aux souches exprimant le N-ter HTT muté, trois souches indépendantes exprimant le C-ter HTT montrent une réduction importante du temps de survie ainsi que des capacités locomotrices.

Par microscopie électronique, des coupes de cerveaux des différentes souches ont été analysées. Les souches exprimant le N-ter HTT muté présentent des noyaux condensés sombres indiquant une mort neuronale. Les souches exprimant le C-ter HTT ont une dispersion d'organites avec un élargissement du volume nucléaire ainsi qu'une perte de matière dans les tissus cérébraux, ce qui indique une neurodégénérescence. Ainsi, les deux fragments N et C-ter produits par le clivage de la HTT mutée sont à la fois toxiques lorsqu'ils sont exprimés séparément ou ensemble *in vivo*.

La présence de fragments C-ter de la HTT a déjà été décrite dans les cerveaux de patients MH et dans des modèles murins knock-in de la MH. Puisque le fragment C-ter de la HTT induit une toxicité *in vivo* chez les drosophiles, les caractéristiques de cette toxicité tel que le RE dilaté, devraient également être observées dans le cerveau de souris knock-in de la MH. Nous avons donc évalué l'activation du stress du RE, par Western blot, dans le striatum et le cortex des souris knock-in Hdh<sup>Q111/Q111</sup> âgées de 20 mois. Ainsi, les protéines chaperonnes impliquées dans ces voies de stress sont augmentées dans ces structures. Par microscopie électronique, l'ultrastructure du striatum de ces modèles murins révèle, dans les neurones contenant des agrégats nucléaires, la présence de

tubules ER dilatés, rappelant la dilatation du RE observée dans les cellules exprimant le fragment C-ter HTT. Ensemble, ces résultats indiquent que le clivage de la HTT mutante entraîne une dilatation et le stress du RE *via* la génération de fragments protéolytiques C-terminaux.

## 7/ Conclusions

Dans la MH, le clivage de la HTT est dérégulé par l'activation anormale des protéases due aux gains et pertes de fonction de la HTT mutée. Dans les précédentes études du clivage de la HTT, l'accent a été mis sur les effets toxiques du fragment N-ter muté généré. Ici, nous avons montré qu'une cascade de clivages de la HTT conduit à la perte de l'interaction entre le N-ter et le C-ter-HTT. Ceci libère un fragment C-ter qui provoque une inactivation de dynamine1 localisée aux membranes du RE. Le réseau RE se dilate et *in fine* la mort neuronale est induite à la fois *in cellulo* et *in vivo*.

L'outil TEV, un système de clivage artificiel, a permis de comprendre l'effet de la protéolyse de la HTT au-delà de la toxicité induite par la mutation. Par conséquent, la modélisation du clivage de la HTT, en utilisant l'outil TEV, s'est révélée une approche puissante pour décrypter les effets du clivage de la HTT dans un contexte sauvage ou mutant.

Jusqu'à présent, le rôle de dynamine1 dans la structuration du RE n'avait pas été exploré. Ici, nous apportons un faisceau d'évidences qui démontre le rôle de la dynamine1 dans l'agencement des membranes formant le réseau du RE.

Pour conclure, au cours de ma thèse, j'ai montré que la protéolyse successive de la HTT induit des processus cytotoxiques impliquant non seulement les fragments N-ter mutés mais également les fragments C-ter de la HTT. L'acquisition des fonctions toxiques du fragment C-ter de la HTT surligne la complexité des mécanismes pathogéniques de la MH et soutient l'importance d'étudier la HTT pleine longueur. L'impact du clivage de la HTT et plus particulièrement du fragment C-ter dans la neurodégénérescence devra être pris en compte dans la recherche de pistes thérapeutiques pour la MH.